



HAL
open science

Etude des effets d'une co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques sur l'audition : mécanismes périphériques et centraux

Katy Maguin

► **To cite this version:**

Katy Maguin. Etude des effets d'une co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques sur l'audition : mécanismes périphériques et centraux. Biologie cellulaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10126 . tel-01748383

HAL Id: tel-01748383

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748383>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARE – Nancy 1

U.F.R. DE BIOLOGIE SANTE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT

Spécialité : Biologie Cellulaire et Nutrition

Thèse présentée par **Katy MAGUIN**

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1 en Biologie Cellulaire et Nutrition

soutenue publiquement le 22 janvier 2008

**ETUDE DES EFFETS D'UNE CO-EXPOSITION AU BRUIT
ET AUX SOLVANTS AROMATIQUES SUR L'AUDITION :
MECANISMES PERIPHERIQUES ET CENTRAUX.**

Membres du Jury

Rapporteur : Evelyne FERRARY

Directeur de recherche à l'Inserm, Paris

Rapporteur : Paul AVAN

Professeur, Université de Clermont-Ferrand

Examineur : Cécile PARIETTI-WINKLER

Praticien Hospitalier Universitaire, Nancy-Université

Examineur : Luc FERRARI

Maître de Conférence, Nancy-Université

Président : Jean-Luc PUEL

Professeur, Université de Montpellier 1

Directeur de thèse : Pierre CAMPO

Responsable d'étude à l'INRS, Nancy



Laboratoire de Neurotoxicité et d'Immunotoxicité
Avenue de Bourgogne BP27 54501 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex
www.inrs.fr

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – Nancy 1

U.F.R. DE BIOLOGIE SANTE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT

Spécialité : Biologie Cellulaire et Nutrition

Thèse présentée par **Katy MAGUIN**

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1 en Biologie Cellulaire et Nutrition

soutenue publiquement le 22 janvier 2008

**ETUDE DES EFFETS D'UNE CO-EXPOSITION AU BRUIT
ET AUX SOLVANTS AROMATIQUES SUR L'AUDITION :
MECANISMES PERIPHERIQUES ET CENTRAUX.**

Membres du Jury

Rapporteur : Evelyne FERRARY

Directeur de recherche à l'Inserm, Paris

Rapporteur : Paul AVAN

Professeur, Université de Clermont-Ferrand

Examineur : Cécile PARIETTI-WINKLER

Praticien Hospitalier Universitaire, Nancy-Université

Examineur : Luc FERRARI

Maître de Conférence, Nancy-Université

Président : Jean-Luc PUEL

Professeur, Université de Montpellier 1

Directeur de thèse : Pierre CAMPO

Responsable d'étude à l'INRS, Nancy



Laboratoire de Neurotoxicité et d'Immunotoxicité
Avenue de Bourgogne BP27 54501 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex
www.inrs.fr

Remerciements

Je suis très sensible à l'honneur que me font le Dr. Evelyne FERRARY et le Pr. Paul AVAN en ayant accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et à la présence dans ce jury de thèse du Pr. Jean-Luc PUEL et du Dr. Luc FERRARI en tant qu'examineurs.

Je voudrais remercier en premier lieu le Dr. Pierre CAMPO pour son encadrement et ses qualités humaines dont il a fait preuve tout au long de cette thèse dans la continuité de mon master. Sa philosophie de la recherche et son enthousiasme m'ont permis de surmonter de nombreuses difficultés inhérentes à tout doctorant.

Je tiens ensuite à exprimer ma profonde reconnaissance au Dr. Cécile PARIETTI-WINKLER pour avoir accepté si aimablement d'assurer la responsabilité universitaire de ces recherches en les suivant et les discutant régulièrement, et pour m'avoir activement aidé à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie les Drs. Marie-Thérèse BRONDEAU et François GAGNAIRE, pour m'avoir accueillie au sein du Département Polluants et Santé, dans le Service Neurotoxicité et Immunotoxicité, ainsi que la Direction de l'Institut National de Recherche et de Sécurité pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse dans de bonnes conditions.

Je remercie également tous mes collègues qui ont participé à la réalisation de ce travail et qui m'ont soutenu pendant ces années. Ma reconnaissance va tout d'abord à Robert LATAYE pour ses précieux conseils. Je ne saurais oublier Christian BARTHELEMY et Benoît RIEGER pour leur précieuse collaboration. Je remercie pareillement les animaliers.

J'exprime ma profonde sympathie à mes collègues et amis : Anne-Marie, Aurélie, Cristina, Delphine, Grégory et Sylvie pour leur amical soutien.

Je souhaite également remercier l'ensemble de ma famille pour sa présence dans les moments difficiles qui ont jalonné ces années de thèse.

Enfin, je souhaite exprimer une chaleureuse pensée à Laurent pour ses encouragements, sa patience, son affection.

Table des matières

Liste des abréviations et unités employées _____	7
Liste des figures _____	9
Liste des tableaux _____	12

I. Introduction _____ 13

<input type="checkbox"/> Le bruit _____	13
Législation relative à l'exposition au bruit dans l'industrie _____	13
Effets du bruit sur l'audition _____	14
<input type="checkbox"/> Les solvants aromatiques _____	17
Législation relative à l'exposition aux solvants aromatiques dans l'industrie _____	17
Effets ototoxiques des solvants aromatiques _____	18
<input type="checkbox"/> Co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques : les effets sur l'audition _____	19
<input type="checkbox"/> Protections acoustiques de l'oreille : le réflexe de l'oreille moyenne et le réflexe de l'oreille interne _	21
<input type="checkbox"/> Carences de la littérature relatives aux co-expositions au bruit et aux solvants aromatiques : objectifs du travail de recherche _____	23

II. Matériels et méthodes _____ 25

1. Animaux _____	25
1.1. Modèle animal _____	25
1.2. Anesthésie _____	25
2. Techniques de mesures électrocochléographiques _____	26
2.1. Abords opératoires _____	26
<input type="checkbox"/> Electrode de référence	26
<input type="checkbox"/> Electrode active	27
<input type="checkbox"/> Section des muscles de l'oreille moyenne	28
2.2. Mesures des potentiels électrocochléographiques _____	28
2.2.1. Potentiel microphonique cochléaire _____	29
2.2.1.1. Méthode de stimulation acoustique _____	29
<input type="checkbox"/> Stimulation sonore <i>ipsi</i> -latérale	29
<input type="checkbox"/> Stimulation sonore <i>contra</i> -latérale	30
2.2.1.2. Méthode d'enregistrement _____	31
2.2.2. Potentiel d'action composite _____	32
2.2.2.1. Méthode de stimulation acoustique _____	32
<input type="checkbox"/> Stimulation sonore <i>ipsi</i> -latérale	32
<input type="checkbox"/> Stimulation sonore <i>contra</i> -latérale	33

2.2.2.2. Méthode d'enregistrement	33
3. Exposition aux agents chimiques	35
3.1. Abords opératoires	35
3.2. Administration des agents chimiques	36
3.3. Nature des agents chimiques	37
3.3.1. Solvants aromatiques et non aromatiques	37
3.3.2. Antagonistes des récepteurs neurosensoriels auditifs	39
<input type="checkbox"/> Antagonistes des récepteurs cholinergiques	39
<input type="checkbox"/> Antagonistes des récepteurs calciques	39
3.3.3. Gentamicine	40
4. Techniques histologiques	41
4.1. Cochlées	41
4.1.1. Préparation des spécimens	41
4.1.2. Préparation pour microscopie	41
<input type="checkbox"/> Microscopie optique : coupes semi-fines	42
<input type="checkbox"/> Microscopie électronique à transmission : coupes ultra-fines	42
4.2. Cerveau	42
4.2.1. Préparation des spécimens	42
4.2.2. Mise en évidence de cellules apoptotiques par la technique TUNEL	43
5. Protocoles expérimentaux	45
Choix de l'approche expérimentale	45
5.1. Effets auditifs d'une co-exposition « bruit <i>ipsi</i> -latéral et toluène »	46
5.1.1. Effets de la concentration de toluène	46
5.1.2. Effets du niveau de pression sonore	47
5.1.3. Influence de l'injection d'un bolus de toluène dans les branches carotidiennes interne et occipitale	48
5.2. Effets auditifs d'une co-exposition « bruit <i>contra</i> -latéral et toluène »	49
5.3. Relation « structure – activité »	51
5.4. Effets auditifs d'une injection d'antagonistes des récepteurs neurosensoriels	53
5.5. Effets histopathologiques d'une co-exposition « bruit <i>ipsi</i> -latéral et solvant »	54
6. Traitements statistiques	55

III. Résultats **56**

1. Effets auditifs d'une co-exposition « bruit <i>ipsi</i> -latéral et toluène »	56
1.1. Relation entre l'intensité de la stimulation acoustique et l'amplitude du PMC	56
1.2. Effets d'une injection de toluène sur l'amplitude du PMC	59
1.2.1. Effets de la concentration de toluène	59
<input type="checkbox"/> Amplitude des ondes P et N	60
<input type="checkbox"/> Latence des ondes P et N	61

1.2.2. Effets du niveau de pression sonore	63
<input type="checkbox"/> Amplitude des ondes P et N	63
<input type="checkbox"/> Latence des ondes P et N	64
1.2.3. Influence de l'injection d'un bolus de toluène dans les branches carotidiennes interne et occipitale	64
<input type="checkbox"/> Amplitude des ondes P et N	66
<input type="checkbox"/> Latence des ondes P et N	66
2. Effets auditifs d'une co-exposition « bruit <i>contra</i> -latéral et toluène »	68
2.1. Effets du toluène sur les réflexes de protection acoustique : mesures du PMC	68
2.1.1. Muscles de l'oreille moyenne intacts	68
2.1.2. Muscles de l'oreille moyenne sectionnés	69
2.2. Effets du toluène sur les réflexes de protection acoustique : mesures de l'onde N1 du PAC	72
2.2.1. Muscles de l'oreille moyenne intacts	73
2.2.2. Muscles de l'oreille moyenne sectionnés	74
2.3. Effets d'une injection <i>contra</i> -latérale de toluène	75
3. Relation « structure – activité » de différents solvants sur les réflexes de protection acoustique	76
3.1. Amplitude des ondes P et N	77
<input type="checkbox"/> Onde P	77
<input type="checkbox"/> Onde N	78
3.2. Latence des ondes P et N	79
4. Effets auditifs d'une injection d'antagonistes des récepteurs neurosensoriels	80
4.1. Antagonistes des récepteurs cholinergiques	80
<input type="checkbox"/> Amplitude des ondes P et N	81
<input type="checkbox"/> Latence des ondes P et N	82
4.2. Antagonistes des récepteurs calciques	82
<input type="checkbox"/> Vérapamil	83
<input type="checkbox"/> ω -ctx MVIIC	84
4.3. Gentamicine	86
5. Effets histopathologiques d'une co-exposition « bruit <i>ipsi</i> -latéral et solvant »	88
5.1. Cochlées	89
5.2. Cerveau	95

IV. Discussion **98**

<input type="checkbox"/> Pertinence du modèle expérimental pour étudier les effets auditifs d'une co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques	98
<input type="checkbox"/> Origine de l'augmentation de l'amplitude du PMC induite par le toluène	100
<input type="checkbox"/> Effets d'une co-exposition au bruit et au toluène sur les performances des réflexes de protection acoustique	102
<input type="checkbox"/> Cibles du toluène : réflexe de l'oreille moyenne vs. réflexe de l'oreille interne	104

V. Conclusions/perspectives _____ 114

Bibliographie _____ 116

Annexes _____ 126

- *Maguin K., Lataye R., Campo P., Cossec B., Burgart M., Wanuisiow D.* **Ototoxicity of the three xylene isomers in the rat.** *Neurotoxicol. Teratol.* 2006;28(6):648-656.
- *Lataye R., Maguin K., Campo P.* **Increase in cochlear microphonic potential after toluene administration.** *Hear. Res.* 2007;230(1-2):34-42.
- *Campo P., Maguin K., Lataye R.* **Effects of aromatic solvents on acoustic reflexes mediated by central auditory pathways.** *Toxicol. Sci.* 2007 a;99(2):582-590.
- *Campo P. and Maguin K.* **Solvent-induced hearing loss: mechanisms and prevention strategy.** *IJOMEH.* 2007;21(3):1-6.

Liste des abréviations et unités employées

ACh : acétylcholine	°C : degré Celsius
CAS : <i>Chemical Abstracts Service</i> numéro d'enregistrement	dB : décibel
CCE : cellules ciliées externes	dBA : décibel pondéré A qui tient compte de la sensibilité de l'oreille pendant une exposition de 8 heures
CCI : cellules ciliées internes	dBC : décibel pondéré C
CGS : cellules ganglionnaires spirales	dB SPL : <i>Sound Pressure Level</i> niveau de pression sonore en décibel
CONTRA : <i>contra</i> -latéral	dBV : décibel volt
4-DAMP : 4-diphénylacétoxy-N-méthylpipéridine- méthiodide	kHz : kilohertz
DBE : dihydro-β-érythroïdine hydrobromide	meq : milliéquivalent
dUTP : déoxyuridine 5-triphosphate	ppm : partie par million
FITC : isothiocyanate de fluorescéine	UI : unités internationales
ILip : Intralipide	v : volume
<i>i.m.</i> : intra-musculaire	
<i>i.p.</i> : intra-péritonéale	
IPSI : <i>ipsi</i> -latéral	
K : valeur du test statistique Kruskal-Wallis	
L _{ex,8h} : niveau d'exposition sonore quotidienne évalué sur une journée de travail de 8 h	
Log P _{o/w} : valeur du coefficient de partage octanol/eau	
L _{p,c} : niveau de pression acoustique crête	
<i>m</i> -xylène : <i>méta</i> -xylène	
Ni : onde négative intermédiaire	
NMP : <i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone	
Np : onde négative précoce	
Nt : onde négative tardive	
OBN : <i>Octave Band Noise</i> bruit de bande d'octave	
OsO ₄ : tétraoxyde d'osmium	
<i>o</i> -xylène : <i>ortho</i> -xylène	
P : onde positive	
PAC : potentiel d'action composite	
PBS : tampon phosphate	
PcoGs : potentiels électrocochléographiques	

PMC : potentiel microphonique cochléaire
p-xylène : *para*-xylène
RMS : *Root Mean Square*
valeur efficace
ROI : réflexe de l'oreille interne
ROM : réflexe de l'oreille moyenne
Tdt : terminale désoxynucléotidyltransférase
TUNEL : *Terminal deoxynucleotidyl transferase-*
mediated dUTP Nick End Labeling
VME : valeur limite de moyenne d'exposition
Ø : diamètre
Ø_i : diamètre interne
ω-ctx MVIIC : oméga conotoxine MVIIC

Liste des figures

Figure 1 : (A) Coupe transversale d'une cochlée de rat vue en microscopie optique montrant les différentes rampes ; (B) vue de surface de l'organe de Corti en microscopie électronique à balayage ; (C) coupe transversale de l'organe de Corti vu en microscopie optique montrant les différentes populations cellulaires qui le constituent. _____	15
Figure 2 : Voies neuronales (afférences et efférences) d'activation des réflexes de protection acoustique (d'après Liberman et Guinan, 1998). _____	23
Figure 3 : Localisation de la craniotomie en vue de l'insertion de l'électrode de référence. _____	27
Figure 4 : Schéma des connexions des électrodes au microconnecteur permettant le recueil des signaux électrophysiologiques. _____	27
Figure 5 : Muscle tenseur tympanique avant et après section du tendon le reliant au marteau. _____	28
Figure 6 : Rat Sprague Dawley OFA en contention dans la cabine insonorisée. _____	29
Figure 7 : Stimulation acoustique <i>ipsi</i> -latérale utilisée pour la mesure du PMC. _____	30
Figure 8 : Spectre du bruit de bande de deux octaves centrée sur 4 kHz enregistré dans la cabine audiométrique pour une stimulation de 100 dB. _____	30
Figure 9 : Spectre du bruit de bande d'octave centrée sur 12,5 kHz émis par l'écouteur. _____	31
Figure 10 : Stimulation acoustique <i>ipsi</i> -latérale pour la mesure du PAC. _____	32
Figure 11 : PAC en réponse aux « tone burst » de 4 kHz de 85 dB SPL. _____	32
Figure 12 : Paramètres acoustiques utilisés lors des mesures de l'amplitude du PMC alors que les réflexes de protection étaient déclenchés. _____	34
Figure 13 : Paramètres acoustiques utilisés lors des mesures de l'amplitude de l'onde N1 du PAC alors que les réflexes de protection étaient déclenchés. _____	34
Figure 14 : Cathéter circulaire permettant l'injection intra-carotidienne. _____	35
Figure 15 : Schéma de l'artère carotidienne et de ses différentes branches, précisant la position du cathéter circulaire. _____	36
Figure 16 : Rat Sprague Dawley OFA équipé d'un microconnecteur et d'un cathéter circulaire. _____	36
Figure 17 : Coupe axiale d'une cochlée de rat passant par le modiulus. _____	42
Figure 18 : Effets de la concentration de toluène sur les variations d'amplitude du PMC. _____	46
Figure 19 : Effets du niveau de pression sonore sur les variations d'amplitude du PMC au cours d'une injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène. _____	47

Figure 20 : Etude de l'influence d'une injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène dans les branches carotidiennes interne et occipitale sur l'amplitude du PMC.	48
Figure 21 : Effets du toluène sur les réflexes de protection acoustique. Mesure des amplitudes du PMC et de l'onde N1 du PAC.	49
Figure 22 : Effets de divers antagonistes des récepteurs auditifs neurosensoriels : l'atropine, le 4-DAMP, le DBE, la gentamicine, le vérapamil et l' ω -ctx MVIIC.	53
Figure 23 : Relation entre l'intensité de la stimulation sonore et l'amplitude du PMC.	58
Figure 24 : Enregistrements du PMC obtenus en réponse à un bruit <i>ipsi</i> -latéral, avant, pendant et après l'injection d'un bolus de 100 μ L d'ILip contenant du toluène à différentes concentrations.	60
Figure 25 : Amplitudes moyennes des ondes P et N du PMC mesurées lors d'injections de 100 μ L de 0 – 58,4 – 116,2 et 229,5 mM de toluène dans de l'ILip.	60
Figure 26 : Amplitudes moyennes des ondes P et Nt du PMC en fonction de l'intensité de la stimulation sonore.	63
Figure 27 : En haut : Enregistrement du PMC obtenu en réponse à un bruit <i>ipsi</i> -latéral, avant, pendant et après des injections de 100 μ L d'ILip contenant 116,2 mM de toluène dans les différentes branches de la carotide. En bas : configuration de l'artère stapédienne au moment de l'injection.	65
Figure 28 : Enregistrements du PMC obtenus avec un animal ayant les muscles de l'oreille moyenne intacts et avec un animal ayant les muscles de l'oreille moyenne sectionnés.	70
Figure 29 : Enregistrements du PMC obtenus avec un animal ayant les muscles de l'oreille moyenne intacts et avec un animal ayant les muscles de l'oreille moyenne sectionnés.	70
Figure 30 : Enregistrements du PAC (amplitude de l'onde N1) obtenus avec un animal ayant les muscles de l'oreille moyenne intacts et un animal ayant les muscles de l'oreille moyenne sectionnés.	73
Figure 31 : Amplitudes moyennes des ondes P et N du PMC mesurées lors d'injections <i>ipsi</i> - et <i>contra</i> -latérales d'un bolus d'ILip contenant du toluène.	76
Figure 32 : Amplitudes moyennes des ondes P et N du PMC mesurées lors d'injections d'un bolus de solvants aromatiques ou non aromatiques.	78
Figure 33 : Amplitudes moyennes des ondes P et Nt du PMC mesurées lors d'injections d'antagonistes des récepteurs cholinergiques.	81
Figure 34 : Enregistrements du PMC obtenus en réponse à un bruit <i>ipsi</i> -latéral, avant, pendant et après l'injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène dans de l'ILip ou de 1,25 mM de vérapamil.	84
Figure 35 : Enregistrements du PMC obtenus en réponse à un bruit <i>ipsi</i> -latéral, avant, pendant et après l'injection, dans la branche occipitale de la carotide, d'un bolus de 116,2 mM de toluène dans de l'ILip ou de 211,4 μ M d' ω -ctx MVIIC.	85

Figure 36 : Enregistrements du PMC obtenus en réponse à un bruit <i>ipsi</i> -latéral, avant, pendant et après l'injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène ou de 6,7 mM de gentamicine. _____	86
Figure 37 : Enregistrements du PMC obtenus en réponse à un bruit <i>ipsi</i> -latéral, avant, pendant et après l'injection d'un bolus de 100 µL de 116,2 mM de toluène ou de 110,1 mM de propylbenzène. _____	88
Figure 38 : Organes de Corti vus en microscopie optique de rats ayant été exposés à un bruit <i>ipsi</i> -latéral et ayant reçu deux bolus de 100 µL d'ILip ou deux bolus de 100 µL d'ILip contenant 116,2 mM de toluène ou 110,1 mM de propylbenzène. _____	91
Figure 39 : Ganglions spiraux vus en microscopie optique de rats ayant été exposés à un bruit <i>ipsi</i> -latéral et ayant reçu deux bolus de 100 µL d'ILip ou deux bolus de 100 µL d'ILip contenant 116,2 mM de toluène ou 110,1 mM de propylbenzène. _____	92
Figure 40 : Stries vasculaires vues en microscopie optique et en microscopie électronique à transmission de rats ayant été exposés à un bruit <i>ipsi</i> -latéral et ayant reçu deux bolus de 100 µL d'ILip ou deux bolus de 100 µL d'ILip contenant 116,2 mM de toluène ou 110,1 mM de propylbenzène. _____	93
Figure 41 : En haut, coupe sagittale du tronc cérébral de rat vu en microscopie optique ; en bas, coupe sagittale du tronc cérébral de rat centré sur l'artère basilaire, vu en microscopie optique. _____	95
Figure 42 : Recherche des noyaux cellulaires apoptotiques par la technique TUNEL dans les coupes cérébrales de rat ayant été co-exposés à un bruit <i>ipsi</i> -latéral et à deux bolus d'ILip seul ou d'ILip renfermant 116,2 mM de toluène ou 110,1 mM de propylbenzène. _____	96
Figure 43 : Voie neuronale déclenchant la contraction du muscle stapédien (d'après Lee et al., 2006). _____	106

Liste des tableaux

Tableau 1 : Solvants aromatiques et non aromatiques testés par injection intra-carotidienne. _____	38
Tableau 2 : Conditions expérimentales liées à l'étude des effets d'une co-exposition « bruit <i>ipsi</i> -latéral et toluène ». _____	48
Tableau 3 : Conditions expérimentales liées à l'étude des effets d'une co-exposition « bruit <i>contra</i> -latéral et toluène ». _____	50
Tableau 4 : Solvants utilisés pour étudier l'effet de la structure de la molécule de solvant sur les réflexes de protection acoustique. _____	52
Tableau 5 : Conditions expérimentales liées à l'étude des effets d'une injection d'antagonistes des récepteurs neurosensoriels auditifs. _____	54
Tableau 6 : Amplitudes moyennes du PMC relatives au niveau de pression sonore de la stimulation acoustique <i>ipsi</i> -latérale. _____	57
Tableau 7 : Latences moyennes des ondes P et N du PMC relatives à la concentration de toluène injecté. _____	62
Tableau 8 : Latences moyennes des ondes P et Nt du PMC en fonction de l'intensité de la stimulation sonore. _____	64
Tableau 9 : Amplitudes moyennes des ondes P et Nt du PMC relatives à la configuration de l'injection intra-carotidienne. _____	66
Tableau 10 : Latences moyennes des ondes P et Nt du PMC relatives à la configuration de l'injection intra-carotidienne. _____	67
Tableau 11 : Amplitudes moyennes de la « suppression <i>contra</i> -latérale » et des ondes P et Nt du PMC. _____	72
Tableau 12 : Amplitudes moyennes de la « suppression <i>contra</i> -latérale » et des ondes P et Nt du PAC. _____	74
Tableau 13 : Amplitudes et latences moyennes des ondes P et Nt du PMC relatives à l'injection d'antagonistes des récepteurs cholinergiques administrés. _____	80
Tableau 14 : Amplitudes et latences moyennes des ondes P et Nt du PMC relatives à l'injection d'antagonistes des récepteurs calciques administrés. _____	83
Tableau 15 : Amplitudes et latences moyennes des ondes P et Nt du PMC relatives à l'injection de gentamicine. _____	87

I. Introduction

Les facteurs de risques professionnels sont nombreux et variés. Parmi ceux-ci, on peut citer les facteurs physiques, comme le bruit, mais aussi les nuisances de nature chimique, telles que les solvants aromatiques. Le bruit et les solvants aromatiques constituent des risques individuels pour la fonction auditive mais la co-exposition à ces deux facteurs constitue un risque combiné dont les effets sont plus dommageables pour l'audition. Ce type de risque combiné est un risque professionnel émergent dont la préoccupation est croissante. A ce jour, peut-on encore aborder les risques individuels séparément ?

□ Le bruit

En France, les affections provoquées par le bruit au travail ont été reconnues comme maladie professionnelle par la caisse nationale d'assurance maladie (CNAM) depuis 1963. Ces affections sont répertoriées dans le tableau n°42 des maladies professionnelles sous l'intitulé « Atteinte auditive provoquée par des bruits lésionnels ».

Aujourd'hui encore, ces affections représentent 25 % des maladies professionnelles (Enquête Eurostat, 2004). L'atteinte auditive concerne d'abord les fréquences autour de 4 et 6 kHz puis s'étend aux autres fréquences. La surdité professionnelle est un handicap réel pour la vie sociale, notamment en empêchant la personne de suivre une conversation normale en présence d'un bruit de fond élevé.

Législation relative à l'exposition au bruit dans l'industrie

Pour assurer la protection des travailleurs contre les risques d'une dégradation de l'acuité auditive, le bruit a donc fait l'objet d'une réglementation. Cette réglementation se réfère au niveau d'exposition sonore quotidienne exprimé en dBA ($L_{ex,8h}$) et au niveau de pression acoustique crête ($L_{p,c}$). D'après la directive « bruit » 2003/10/CE du Parlement européen, du 6 février 2003, transposée en droit français par le décret 2006-892 du 19 janvier 2006, les niveaux d'exposition sonore autorisés sont les suivants :

- un $L_{ex,8h}$ de 80 dBA qui correspond à la valeur d'exposition inférieure déclenchant l'action (*),
- un $L_{ex,8h}$ de 85 dBA qui correspond à la valeur d'exposition supérieure déclenchant l'action (*) et qui requiert le port de protecteur individuel contre le bruit,

- un $L_{ex,8h}$ de 87 dBA et un $L_{p,c}$ de 140 dBC qui correspondent aux valeurs limites d'exposition, à ne pas dépasser, prenant en compte l'atténuation apportée par le protecteur individuel contre le bruit.

(*) : Les valeurs d'exposition déclenchant l'action ne sont pas des valeurs limites à ne pas dépasser mais correspondent à des niveaux d'exposition sonore à partir desquels une liste d'actions données doit être entreprise (examen audiométrique préventif, information et formation des travailleurs sur les risques et les résultats de leur évaluation, information sur les protecteurs individuels contre le bruit, ...).

Effets du bruit sur l'audition

En France, seul le bruit est reconnu officiellement comme nuisance professionnelle potentiellement responsable de déficits auditifs. Les déficits auditifs peuvent être soit temporaires, soit permanents. Le déficit auditif temporaire, encore appelé fatigue auditive, est récupérable après cessation de l'exposition au bruit, ce qui n'est pas le cas du déficit auditif permanent. Ce dernier survient lors d'une exposition à une intensité élevée, répétée et de longue durée.

Les dommages auditifs liés au bruit aboutissent à des lésions qui concernent, dans la plupart des cas, l'organe de Corti [*Fig. 1*] (Saunders et al., 1985 ; Liberman et Dodds, 1987 ; Borg et al., 1995). Cet organe est constitué de différents types de cellules de soutien (cellules de Deiters, cellules de Hensen, piliers de Corti, ...) [Roth et Bruns, 1992] et de deux populations de cellules sensorielles :

- une rangée de cellules ciliées internes (CCI) connectées à 95 % du nombre total des fibres afférentes de type I (système afférent radial) [Klinke, 1986 ; pour revue voir Raphael et Altschuler, 2003],
- trois rangées les cellules ciliées externes (CCE) connectées à 95 % du nombre total des fibres efférentes en provenance de l'olive supérieure médiane (système efférent médian) [Guinan et al., 1984 ; Warr et al., 1986].

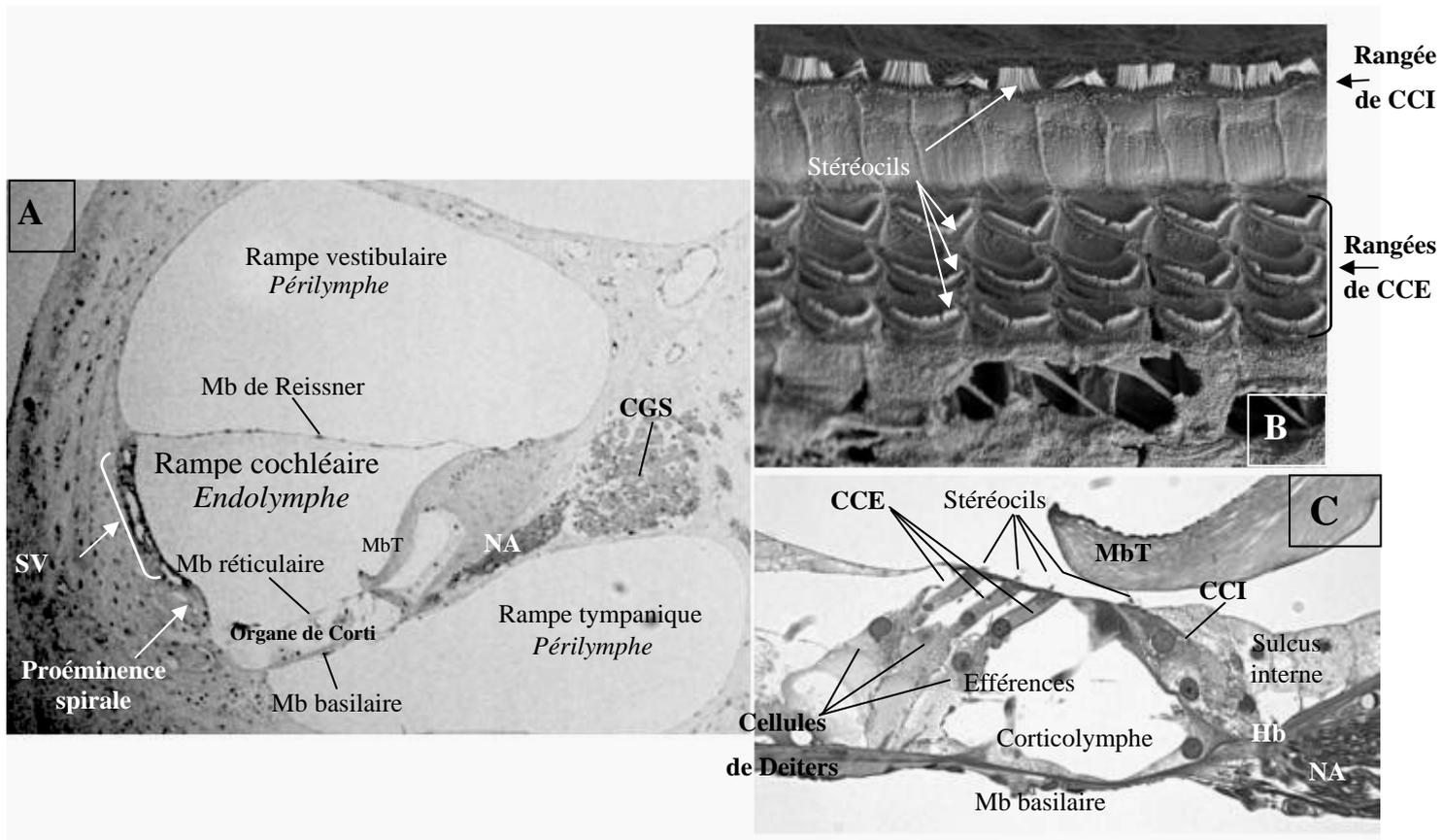


Figure 1 : (A) Coupe transversale d'une cochlée de rat vue en microscopie optique montrant les différentes rampes ; (B) vue de surface de l'organe de Corti en microscopie électronique à balayage ; (C) coupe transversale de l'organe de Corti vu en microscopie optique montrant les différentes populations cellulaires qui le constituent.

CCE : cellules ciliées externes ; CCI : cellules ciliées internes ; CGS : cellules du ganglion spiral ; Hb : Habenula perforata ; Mb : membrane ; MbT : membrane tectoriaire ; NA : nerf auditif ; SV : strie vasculaire.

Les cellules sensorielles sont deux éléments indispensables à la transformation d'un stimulus sonore en un message nerveux. Lors d'une stimulation sonore, le système tympano-ossiculaire transmet les vibrations acoustiques à l'oreille interne par l'intermédiaire des mouvements de l'étrier dans la fenêtre ovale. La chaîne ossiculaire joue ainsi un rôle d'adaptateur d'impédance en transmettant les vibrations sonores d'un milieu aérien (l'oreille moyenne) à un milieu liquidien (l'oreille interne). La différence de pression entre les rampes vestibulaire et tympanique qui en résulte engendre un mouvement vibratoire de la membrane basilaire [Fig. 1 (A) et (C)] se propageant le long de la spirale cochléaire et appelé onde propagée. Les stéréocils situés à l'apex des CCE [Fig. 1 (B)] qui suivent le mouvement de la membrane basilaire grâce au couplage réalisé par les cellules de Deiters, sont cisailés par la membrane tectoriaire inerte dans laquelle ils sont solidairement implantés. Ce cisaillement déclenche le processus de transduction du signal au niveau de la cellule sensorielle, c'est-à-dire la transformation d'une vibration sonore en un message nerveux susceptible d'être décrypté par les centres nerveux supérieurs. En effet, la déflexion ciliaire provoque

l'ouverture de canaux potassiques situés à l'apex des stéréocils. Le K^+ entre dans les CCE créant une dépolarisation de ces dernières. Cette dépolarisation entraîne l'activation des propriétés électromotiles des CCE leur permettant, grâce à la présence de protéines motrices intra-membranaires, de se contracter et s'allonger successivement. Ces contractions rapides des CCE sont à l'origine d'une amplification sélective du mouvement de la membrane basilaire, qui permet alors la déflexion des stéréocils des CCI qui viennent buter contre la membrane tectoriale. Les CCI ainsi stimulées remplissent leur fonction de véritable transducteur neurosensoriel de la cochlée, la déflexion ciliaire créant un courant ionique intra-cellulaire avec libération de Ca^{2+} dans la cellule. La libération de Ca^{2+} intra-cellulaire permet l'exocytose des vésicules synaptiques contenant le neurotransmetteur : le glutamate. La fixation de glutamate sur les récepteurs des fibres afférentes radiales provoque des influx nerveux qui se propagent le long des fibres du nerf auditif jusqu'aux aires corticales auditives.

Les cellules de l'organe de Corti qui interviennent dans la genèse du message auditif sont susceptibles d'être altérées par une exposition sonore d'intensité élevée. Des lésions d'origine mécanique ou métabolique peuvent alors apparaître, la prédominance d'un type de lésion par rapport à l'autre dépendant essentiellement de l'intensité de l'exposition sonore (Spoendlin, 1985).

Lorsque la stimulation est d'un niveau sonore élevé, tel un bruit impulsionnel industriel, un traumatisme acoustique mécanique peut se produire. Si les déplacements de l'organe de Corti excèdent la résistance mécanique des stéréocils reliant les CCE à la membrane tectoriale, il en résulte des fractures, des fusions ou des arrachements des stéréocils (Engström et al., 1986), entraînant à long terme la dégénérescence des cellules ciliées qui les portent. Mulroy et al. (1998) ont également montré l'existence de micro-lésions de la membrane plasmique des cellules ciliées qui résulteraient des tensions mécaniques causées par les mouvements de la membrane basilaire. Enfin, lors d'exposition sonore de forte intensité tel qu'un blast, des déchirures de la membrane de Reissner ou de la membrane réticulaire (Bohne et Rabitt, 1983 ; Hamernick et al., 1986) peuvent avoir lieu et entraîner respectivement une perturbation du fonctionnement des cellules ciliées par modification de la composition chimique de l'endolymphe ou l'empoisonnement des cellules ciliées par perte d'étanchéité du canal cochléaire.

Dans le cas d'une exposition sonore d'intensité plus modérée mais de longue durée, la stimulation sonore peut engendrer des dommages d'origine métabolique. Cela se manifeste par une excitotoxicité due à une libération massive et toxique de glutamate par les CCI qui entraîne une vacuolisation des dendrites radiales (pour mini revue voir Ruel et al., 2007) et

aboutis au découplage synaptique entre les CCI et les dendrites des neurones auditifs primaires. Des modifications ultra-structurales des CCI peuvent également se produire : prolifération et vacuolisation du reticulum endoplasmique, gonflement des mitochondries, accumulation de lysosomes (Pujol, 1989).

Que le déficit auditif soit d'origine mécanique ou métabolique, les cellules ciliées de l'organe de Corti sont les cibles privilégiées du bruit. Il existe d'ailleurs une signature histopathologique des effets du bruit : la première rangée de CCE est la première endommagée, puis les lésions gagnent les CCI et enfin elles s'étendent aux CCE des deuxième et troisième rangées (Robertson et Johnstone, 1980). Ces dommages affectent la portion de la membrane basilaire qui entre en résonance avec la fréquence centrale du son traumatisant ou avec les fréquences supérieures d'une demi-octave à la fréquence centrale de l'exposition sonore (McFadden, 1986 ; pour revue voir Dancer, 1991).

En milieu professionnel, les salariés ne sont pas uniquement exposés au bruit. Ils peuvent être également exposés à des agents chimiques tels que les solvants aromatiques.

□ **Les solvants aromatiques**

Le toluène, le styrène, les xylènes, l'éthylbenzène sont des agents chimiques largement utilisés dans les encres d'imprimerie, les peintures, les laques, les colles, les dégraissants, les détachants ou en tant que matière première, dans la fabrication de produits pétroliers et de résines (Kirk-Othmer, 1984 ; Miller et al., 1994 ; SECCI, 2005). Ce sont généralement des composés volatils qui pénètrent dans l'organisme essentiellement par voie pulmonaire et, dans une moindre mesure, par voie cutanée. Leur propriété lipophile, définie par la valeur du coefficient de partage octanol/eau ($\text{Log } P_{o/w}$), favorise leur absorption puis leur concentration dans les tissus riches en lipides, comme le tissu nerveux (Gospe et Calaban, 1988).

Législation relative à l'exposition aux solvants aromatiques dans l'industrie

En raison de leurs effets toxiques sur le système nerveux central et périphérique (pour revue voir Arlien-Søborg, 1992), des valeurs limites de moyenne d'exposition (VME) ont été définies par le ministère chargé du Travail. Ces valeurs prennent en compte les effets mesurés, ou estimés, sur la durée d'un poste de travail de 8 heures. Cependant, les VME sont propres à chaque pays. Par exemple, la VME du toluène est de 50 ppm en France, en Allemagne et en Suède contre 20 ppm aux USA (décret 2007-1539 du 26 octobre 2007 ;

<http://www.acgih.org/TLV2007list.com>) ; la VME du styrène est de 50 ppm en France contre 20 ppm pour les USA, l'Allemagne et la Finlande (INRS, 1999).

Effets ototoxiques des solvants aromatiques

Depuis les années 80, des données obtenues avec des animaux (Rebert et al., 1983 ; Pryor et al., 1983, 1987 ; Sullivan et al., 1988 ; Crofton et al., 1994 ; Campo et al., 1997 ; Cappaert et al., 1999 ; Gagnaire et Langlais, 2005 ; Maguin et al., 2006) ont mis en exergue les effets cochléotoxiques dus à l'exposition à certains solvants aromatiques tels que le toluène, le styrène, l'éthylbenzène, le *p*-xylène. Ces effets ont tout d'abord été suggérés par les résultats de tests comportementaux tels que des tests de conditionnement d'évitement ou des tests de discrimination de sons (Rebert et al., 1983 ; Pryor et al., 1983 ; Crofton et al., 1994). Puis, ils ont été confirmés à l'aide d'une part, de techniques électrophysiologiques telles que les potentiels évoqués auditifs enregistrés au niveau du cortex cérébral (Sullivan et al., 1988) ou du colliculus inférieur (Campo et al., 1997) et d'autre part, d'analyses morphologiques de l'organe de Corti en microscopie (Sullivan et al., 1988 ; Campo et al., 1997). Quant aux données épidémiologiques (Muijser et al., 1988 ; Abbate et al., 1993 ; Meek et Chan, 1994 ; Johnson et Nylén, 1995 ; Calabrese et al., 1996 ; Morata et al., 1997), elles ont également mis en évidence des pertes de sensibilité auditive dues à l'exposition à ces agents.

Ces études ont permis de caractériser la cochléotoxicité des solvants aromatiques. Elle est fonction de l'espèce animale : la fonction auditive du rat est sensible aux solvants aromatiques (Cappaert et al., 2002), à l'inverse, celle du cobaye (Campo et al., 1993 ; Fechter, 1993) et celle du chinchilla (Davis et al., 2002) ne le sont pas. Cette spécificité de la toxicité des solvants s'expliquerait par des différences de paramètres toxicocinétiques (absorption pulmonaire, coefficient de partition air/sang et clairance) et métaboliques (cytochromes P450, glutathion) selon l'espèce considérée (Davis et al., 2002 ; Campo et al., 2006, 2007 ; Gagnaire et al., 2007).

La cochléotoxicité des solvants aromatiques est également fonction de la structure tridimensionnelle de la molécule. Par exemple, parmi les trois isomères du xylène, seul le *p*-xylène a des propriétés cochléotoxiques (Gagnaire et al., 2001, 2007 ; Maguin et al., 2006). Cette cochléotoxicité propre au *p*-xylène serait due à des différences de détoxification entre les isomères. En effet, Patel et al. (1978) ont montré que le *p*-xylène réduisait certaines activités enzymatiques pulmonaires, ce qui permettrait une plus grande absorption du solvant. Par ailleurs, Toftgard et Nilsen (1982) ont montré que le *p*-xylène induisait les cytochromes P450 hépatiques plus faiblement que les deux autres isomères.

Les dommages engendrés par certains solvants aromatiques affectent la région cochléaire qui code pour les fréquences moyennes (Pryor et al., 1983 ; Mattsson et al., 1990 ; Crofton et al., 1994 ; Lataye et al., 1999), c'est-à-dire la gamme de meilleure sensibilité auditive pour le rat. Les pertes de CCE s'étendent de la troisième vers la première rangée de CCE (Sullivan et al., 1988 ; Campo et al., 1997) ; cette signature histopathologique est vraisemblablement due à la progression des solvants dans la cochlée. En effet, les solvants transportés par le sang, parviendraient à la cochlée par la strie vasculaire ou par la proéminence spirale [Fig. 1 (A)] puis diffuseraient au travers des membranes riches en lipides jusqu'aux cellules du sulcus externe avant d'endommager les cellules de l'organe de Corti (Campo et al., 1999, 2001). Le premier tissu altéré est constitué par les cellules de soutien : les cellules de Hensen puis les cellules de Deiters, tandis que la cible sensorielle des solvants est constituée par les CCE. L'altération des CCE aurait deux origines possibles. La première serait due à la perturbation du recyclage du K^+ assurée par les cellules de Hensen et de Deiters au sein de la cochlée (Spicer et Schulte, 1998), l'accumulation excessive de K^+ dans la corticolymphé pourrait alors « empoisonner » les CCE. La seconde résulterait d'une peroxydation lipidique et par là-même d'une modification structurale des membranes des CCE. Les cellules pourraient alors se vider de leur contenu cytoplasmique (Campo et al., 2001).

L'utilisation des solvants aromatiques dans certaines branches industrielles, telles que l'imprimerie et la construction navale de plaisance, peut s'accompagner d'une exposition sonore de forte intensité (Morata et al., 1994).

❑ **Co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques : les effets sur l'audition**

En France, l'enquête « SUMER 94 » (Heran-Le Roy et Sandret, 1997) a recensé 2,4 millions de salariés exposés aux solvants, et parmi ceux-ci, certains sont exposés à la fois aux solvants et au bruit. Cette co-exposition ne provoquerait pas une simple addition des effets des solvants et du bruit mais une synergie des effets (Nylén, 1994). En effet, des expérimentations chez le rat ont montré que la co-exposition bruit/solvant provoque des déficits auditifs supérieurs à la somme des déficits provoqués par chaque agent et que les lésions du système auditif seraient cochléaires (Johnson et al., 1988 ; Lataye et al., 1997, 2000 ; Brandt-Lassen et al., 2000 ; Cappaert et al., 2001 ; Mäkitie et al., 2003 ; Lataye et al., 2005). La synergie des effets des deux agents semble se limiter à la gamme de fréquences endommagées par le bruit (Lataye et Campo, 1997, 2000 ; Brandt-Lassen et al., 2000). Par

ailleurs, l'interaction des deux agents engendre des pertes de CCE supérieures à celles induites par l'exposition au solvant seul (Lataye et Campo, 1997, 2000 ; Cappaert et al., 2001). Cette augmentation des pertes de CCE pourrait être le résultat d'une fragilisation des membranes des CCE par le solvant les rendant plus vulnérable au bruit (Lataye et al., 2000). Cappaert et al. (2001) ont également évoqué la possibilité que les micro-lésions dues à l'exposition sonore puissent faciliter l'entrée du solvant dans les CCE.

Si l'expérimentation animale a permis de mettre en évidence la synergie des effets d'une exposition combinée au bruit et aux solvants, les conditions d'exposition choisies pour les solvants et pour le bruit étaient, dans la plupart des études, supérieures aux valeurs limites d'exposition recommandées (VME et $L_{ex,8h}$) en milieux industriels (Cary et al., 1997). A l'exception d'une investigation récente (Lataye et al., 2005), la transposition de ces résultats expérimentaux à l'homme était donc difficile compte tenu des conditions expérimentales choisies par rapport aux conditions d'exposition en milieu professionnel.

Chez l'homme, on dispose de quelques données sur les effets d'une exposition professionnelle aux solvants et au bruit. L'existence d'une synergie des effets d'une co-exposition sur l'audition a été suggérée par Morata et al. (1993, 2002) et par Morioka et al. (2000). De façon plus modérée, Śliwińska-Kowalska et al. (2003) et Chang et al. (2006) ont suggéré que l'exposition au solvant pourrait aggraver les pertes auditives induites par le bruit. L'exacerbation par les solvants des pertes auditives dues au bruit concerne les fréquences conversationnelles (Barregård et Axelsson, 1984 ; Śliwińska-Kowalska et al., 2003 ; De Barba et al., 2005 ; Chang et al., 2006 ; Johnson et al., 2006). Ces résultats obtenus chez l'homme corroborent donc les données obtenues avec les expérimentations animales.

Par ailleurs, Morata et al. (1993) qui ont mesuré les performances du réflexe stapédien chez des imprimeurs et des peintres, ont observé que les salariés exposés au bruit et au toluène présentaient des retards de déclenchement du réflexe stapédien par rapport aux salariés exposés au bruit seul. D'après les auteurs, ces retards pourraient être dus à une altération des voies auditives centrales. En s'appuyant sur ces résultats, les auteurs ont suggéré que si l'exposition au bruit seul était responsable de traumatismes cochléaires, une co-exposition bruit/toluène pouvait altérer la fonction cochléaire mais aussi celle du tronc cérébral. De la même manière, Prasher et al. (2005) rapportent, d'après une étude réalisée avec des salariés travaillant dans la maintenance aérienne, que les seuils moyens de déclenchement du réflexe stapédien, mesurés par impédancemétrie, présentaient des différences entre les individus exposés au bruit seul et ceux exposés au bruit associé à un mélange de solvants. Ils relatent également que la voie *contra*-latérale de déclenchement du réflexe était préférentiellement affectée par les solvants. En s'appuyant sur ces résultats, les

auteurs ont supposé que les solvants pouvaient avoir un effet sur le tronc cérébral et plus particulièrement sur les voies efférentes croisées. Dans la même étude, la perturbation du fonctionnement physiologique du tronc cérébral par les solvants était confortée par l'allongement des latences des ondes des potentiels auditifs.

En somme, les résultats de ces deux études épidémiologiques (Morata et al., 1993 ; Prasher et al., 2005) suggéraient donc que les travailleurs exposés au bruit et aux solvants pouvaient présenter en plus d'un traumatisme cochléaire, une altération de leurs réflexes de protection acoustique.

□ **Protections acoustiques de l'oreille : le réflexe de l'oreille moyenne et le réflexe de l'oreille interne**

L'oreille dispose de deux systèmes de protection acoustique (*Fig. 2*) : le réflexe de l'oreille moyenne (ROM) [Lee et al., 2006] et le réflexe de l'oreille interne (ROI) [White et Warr, 1983]. Ces deux réflexes protègent la cochlée contre des sons d'intensité élevée (Puel et al., 1988 ; Pujol, 1994 ; Pilz et al., 1997 ; Rajan, 2000 ; Lee et al., 2006).

Le ROI comme le ROM, peuvent être déclenchés bilatéralement par des bruits de forte intensité sonore. En ce sens, la stimulation sonore au niveau d'une oreille déclenche simultanément les réflexes dans les deux oreilles. Cependant, la sensibilité des réflexes dépend de la composante en fréquences du bruit. De plus, si les deux réflexes limitent l'énergie acoustique absorbée par la cochlée, les mécanismes mis en oeuvre sont différents.

Le ROI est déclenché par les neurones olivo-cochléaires cholinergiques (Klinke, 1986 ; Eybalin, 1993) provenant majoritairement de l'olive supérieure médiane (système efférent médian), quelques fibres provenant également de l'olive supérieure latérale (système efférent latéral). Cependant, en l'absence de données stabilisées sur le réflexe acoustique issu du système efférent latéral (voir Guinan, 2006 pour revue), seules les fibres provenant du système efférent médian seront prises en considération lorsque nous évoquerons le ROI (*Fig. 2*). Le ROI protège des dommages occasionnés par une exposition de la cochlée à des sons intenses en augmentant la rigidité de l'organe de Corti. En effet, le système efférent médian qui innerve les CCE, joue un rôle de modulateur des contractions lentes de ces cellules par l'intermédiaire de la libération d'acétylcholine (ACh). Ces contractions lentes s'ajoutent aux contractions rapides des CCE, et par là, modulent la rigidité de l'organe de Corti. En augmentant sa rigidité, les déplacements de l'organe de Corti sont limités et par conséquent,

les traumatismes sonores sont réduits. En raison de la répartition des fibres olivo-cochléaires médianes le long de l'organe de Corti (Guinan et al., 1984 ; Liberman et Guinan, 1998 ; Kujawa et Liberman, 2001), ce réflexe est majoritairement déclenché par des sons de moyennes à hautes fréquences. Le seuil d'activation du ROI est inférieur à celui requis pour déclencher le ROM (Guinan et McCue, 1987 ; Liberman et Guinan, 1998).

Quant au ROM, il est, chez le rat, déclenché par les moto-neurones provenant des noyaux du trijumeau (Strutz et al., 1988) et des noyaux faciaux (Rouiller et al., 1989) situés à proximité du complexe olivaire supérieur, dans le tronc cérébral. Le neurotransmetteur impliqué dans la neurotransmission des moto-neurones est l'ACh (Wamsley et al., 1981 ; Liu et al., 1998 ; Zaninetti et al., 1999 ; Keiger et Walker, 2000). L'effecteur de l'arc réflexe est constitué par deux muscles : le muscle tenseur tympanique inséré sur le marteau (*Fig. 5*) et le muscle stapédien inséré sur le col de l'étrier. Le ROM protège la cochlée des sons d'intensité élevée en modifiant la rigidité du système tympano-ossiculaire dans l'oreille moyenne, atténuant ainsi l'énergie acoustique absorbée par l'oreille interne. Chez le rat, cette atténuation concerne particulièrement les fréquences avoisinant 8 kHz : fréquence présentant la meilleure sensibilité auditive (Kelly et Masterton, 1977). Le seuil de déclenchement du ROM est de 77 dB SPL pour 10 kHz, fréquence caractéristique du rat Sprague Dawley (Pilz et al., 1997).

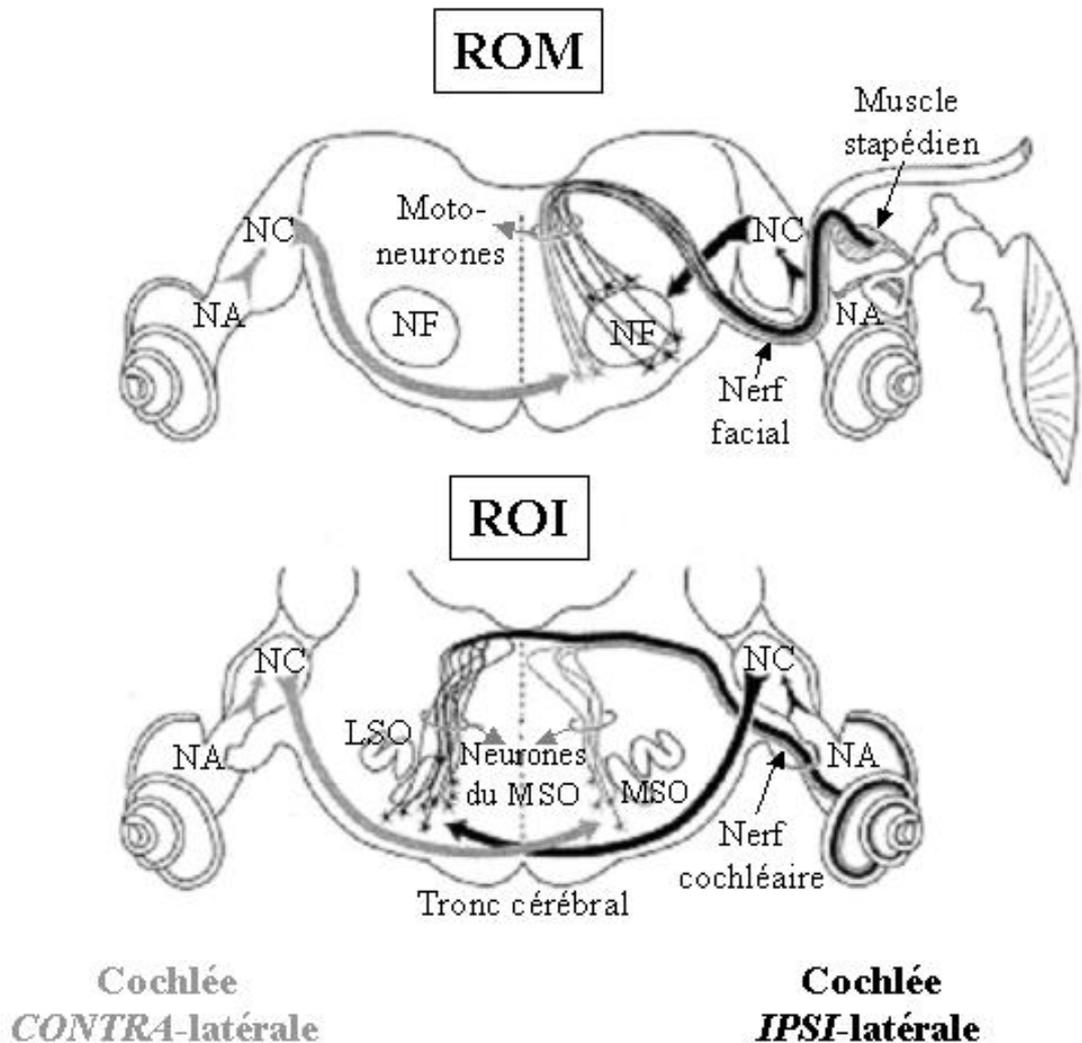


Figure 2 : Voies neuronales (afférences et efférences) d'activation des réflexes de protection acoustique (d'après Liberman et Guinan, 1998). En gris, voie neuronale activée par un bruit contra-latéral ; en noir, voie neuronale activée par un bruit ipsi-latéral. Etant donné que la voie d'activation du muscle tenseur tympanique est similaire à celle du muscle stapédien, elle n'a pas été représentée sur la figure par souci de clarté. LSO : olive latérale supérieure ; MSO : olive médiane supérieure ; NA : nerf auditif ; NC : noyau cochléaire ; NF : noyau facial ; ROI : réflexe de l'oreille interne ; ROM : réflexe de l'oreille moyenne.

❑ **Carences de la littérature relatives aux co-expositions au bruit et aux solvants aromatiques : objectifs du travail de recherche**

A ce jour, les effets d'une co-exposition au bruit et au solvant sont bien décrits dans la littérature. Une potentialisation par les solvants aromatiques des dommages cochléaires induits par le bruit a été observée dans de nombreuses études. Cependant, les mécanismes provoquant la synergie des effets observés lors d'une co-exposition n'ont toujours pas été compris. Une fragilisation des membranes des cellules ciliées a été évoquée par Lataye et al., en 2000, et par Cappaert et al., en 2001. Ces observations suggèrent une origine cochléaire du mécanisme responsable de la synergie des effets du bruit par les solvants. Par ailleurs, les études épidémiologiques de Morata et al., en 1993, et de Prasher et al., en 2005, ont évoqué

une possible altération des performances des réflexes de protection acoustique lors d'une co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques. Cette hypothèse suggère une origine centrale du mécanisme responsable de la synergie des effets du bruit par les solvants. Aujourd'hui, l'origine des mécanismes responsables de la synergie des effets du bruit par les solvants reste controversée. Nous nous proposons donc d'identifier le site, cochléaire ou central, et de déterminer les mécanismes responsables de la synergie des effets du bruit par les solvants.

Dans la perspective d'appréhender les mécanismes périphériques et centraux induits par ce type d'exposition, une approche expérimentale aiguë a été entreprise chez le rat. Le premier objectif de ce travail a donc porté sur la validation de l'approche expérimentale comme modèle pertinent pour étudier les effets d'une co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques. Le second objectif a été d'identifier d'abord le site, cochléaire ou central, puis de préciser la cible à l'origine de la synergie des effets des solvants sur ceux induits par le bruit. Le troisième et dernier objectif a porté sur la recherche des mécanismes responsables de la synergie des effets d'une co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques.

Ainsi, à l'aide d'une approche expérimentale aiguë, les mécanismes responsables de la synergie des effets du bruit par les solvants ont été étudiés. La compréhension de ces mécanismes chez le rat devrait permettre de faire des recommandations pour les personnes co-exposées au bruit et aux solvants aromatiques en milieu professionnel. En effet, seules les limites réglementaires à l'exposition au bruit et les valeurs limites moyennes d'exposition aux solvants aromatiques existent séparément. Par contre, aucune recommandation ou législation ne permet de prendre en compte le risque auditif émergent relatif à une co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques. Les résultats scientifiques de cette étude pourraient donc permettre d'alerter les acteurs de la prévention.

II. Matériels et méthodes

1. Animaux

1.1. Modèle animal

Le modèle animal employé dans l'ensemble des investigations a été le rat mâle ou femelle, de souche Sprague Dawley OFA. Les animaux pesaient entre 350 et 550 g, l'âge des animaux était donc compris entre 3 et 5 mois. Les animaux ont été fournis par le laboratoire français Charles River. A leur arrivée, les rats ont été maintenus deux semaines en stabulation, pour leur acclimatation, au sein d'une animalerie agréée (B54-547-10), dans des cages individuelles (350 x 180 x 184 mm) en polycarbonate garnies de rafles de maïs irradiées (Gold cob 891180, Special Diets Services, France). De la nourriture standardisée irradiée (A0410, Safe/UAR, France) ainsi que de l'eau filtrée (0,22 µm), provenant du réseau public, étaient à leur disposition *ad libitum*. L'animalerie était éclairée de 07 h 00 à 19 h 00 selon un cycle jour/nuit normal. La température des pièces de stabulation était maintenue à 22 ± 2 °C et l'humidité relative à 55 ± 10 %. L'ensemble des expériences décrites ci-après a été mené dans le respect de la Convention Européenne STE n°123, transposée en droit français par le décret 87-848 du 19 octobre 1987, relative aux expériences pratiquées sur les animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques.

1.2. Anesthésie

Compte tenu des techniques invasives employées, les expériences se sont déroulées avec des animaux sous anesthésie générale. Cependant, l'anesthésique utilisé se devait de ne pas trop affecter les propriétés des réflexes de protection acoustique. En ce sens, le choix de l'anesthésique s'est porté sur la kétamine (Clorketam 1000, Vétoquinol S.A.), substance qui n'influence que faiblement les réflexes de protection de l'oreille (Bosatra et al. 1984 ; Bissinger et al., 2000).

Les rats étaient d'abord pré-anesthésiés avec une injection intra-péritonéale (*i.p.*) de lévomépromazine (Nozinan, 20 mg/kg, Rhône Poulenc) pour minimiser leur stress. Un quart d'heure plus tard, l'anesthésie était induite par injection *i.p.* de kétamine (50 mg/kg). Au besoin, l'anesthésie pouvait être confortée par une injection intra-musculaire (*i.m.*) de 0,15 mL d'une solution de kétamine à 35,7 mg/mL. Avant les prélèvements des cochlées ou

du cerveau, une anesthésie plus profonde était induite par injection *i.p.* de kétamine (75 mg/kg).

Par ailleurs, la température de l'animal anesthésié était maintenue à 38 ± 2 °C au moyen d'une couverture chauffante. Avant tout acte chirurgical, un examen otoscopique était pratiqué sur les deux oreilles afin de vérifier l'absence d'infection de l'oreille moyenne, d'obstruction du canal auditif externe ou d'anomalie de la membrane tympanique.

2. Techniques de mesures électrocochléographiques

2.1. Abords opératoires

Pour enregistrer des potentiels cochléaires différentiels, deux électrodes ont été implantées chez l'animal : une électrode active sur la niche de la fenêtre ronde de la cochlée et une électrode de référence au-dessus des lobes olfactifs.

□ Electrode de référence

Une incision antéro-postérieure de 2,5 cm de longueur était pratiquée sur le vertex de l'animal anesthésié. L'os du crâne était ensuite débarrassé, au moyen d'une rugine, des résidus musculo-aponévrotiques et du périoste qui le recouvrent. Puis, il était dévitalisé à l'aide d'une solution saturée de nitrate d'argent avant d'être recouvert par une fine couche de colle cyanoacrylate (Loctite 401) pour faciliter le maintien du ciment dentaire enrobant le connecteur. Une craniotomie ($\varnothing = 1$ mm environ) était ensuite réalisée avec une fraise chirurgicale (fraise à tête diamantée, Dentsply type 012, réf. E012314001200), au-dessus des lobes olfactifs, à l'endroit indiqué sur la figure 3, en prenant soin de ne pas endommager les méninges. L'électrode de référence, une vis en laiton reliée à un fil de cuivre était alors introduite dans l'emplacement de la craniotomie. Enfin, l'électrode était soudée à un microconnecteur femelle (Innove Electronique, *Fig. 4*).

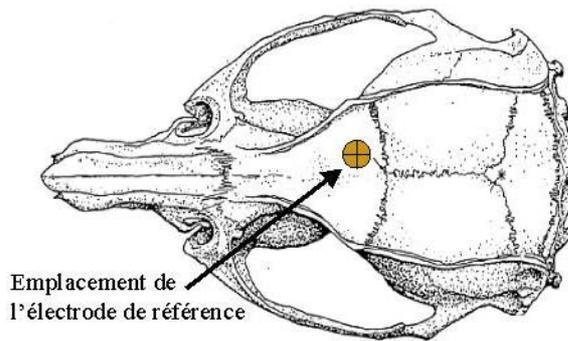


Figure 3 : Localisation de la craniotomie en vue de l'insertion de l'électrode de référence.

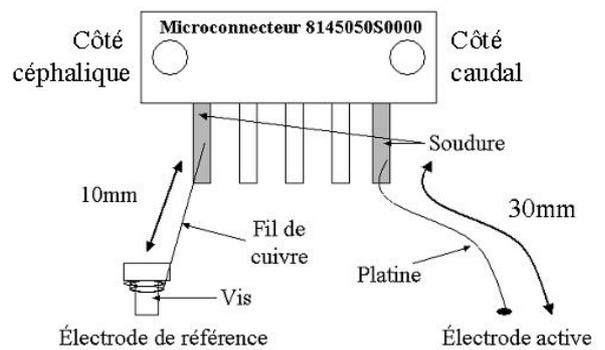


Figure 4 : Schéma des connexions des électrodes au microconnecteur permettant le recueil des signaux électrophysiologiques.

□ Electrode active

Une incision rétro-auriculaire, d'une longueur approximative de 2,5 cm, était pratiquée derrière le pavillon gauche de l'animal. La bulle tympanique gauche était dégagée des tissus sous-cutanés, des muscles splenius et digastrique qui la recouvrent, puis séchée. Avec la pointe d'une lame de bistouri, une ouverture était réalisée dans le haut de la bulle tympanique. L'électrode active, en platine gainée de téflon, y était introduite et placée au contact de la membrane obturant la fenêtre ronde. Pour éviter d'endommager la membrane de la fenêtre ronde, l'extrémité de l'électrode de platine était préalablement passée sous la flamme d'un chalumeau afin de former une boule. Une fois placée, l'électrode était collée à la bulle et le trou refermé avec du ciment dentaire (TAAB 2000, Kerr). L'extrémité libre de l'électrode de mesure était ensuite soudée au microconnecteur et l'incision suturée. Pour finir, le microconnecteur était solidarisé sur le crâne de l'animal avec du ciment dentaire. Les potentiels électrocochléographiques (PCoGs) provenant de la fenêtre ronde de la cochlée pouvaient alors être enregistrés avec la bulle tympanique fermée. Des mesures électrophysiologiques avec une bulle tympanique ouverte auraient changé la résonance de la cavité tympanique et produit des courts-circuits acoustiques.

□ Section des muscles de l'oreille moyenne

Pour supprimer le réflexe de l'oreille moyenne (ROM), le muscle tenseur tympanique et le muscle stapédien ont été sectionnés.

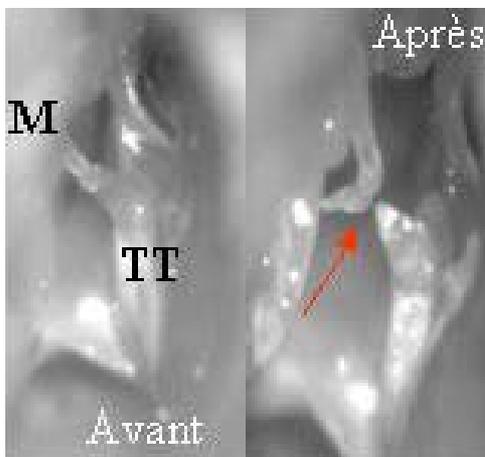


Figure 5 : Muscle tenseur tympanique (TT) avant et après section du tendon le reliant au marteau (M).

La bulle tympanique gauche était exposée comme indiqué dans le paragraphe précédent puis percée avec la pointe d'un scalpel, dans le but de voir le muscle tenseur tympanique et le muscle stapédien. Le faisceau de fibres musculaires stapédiennes, attachées à l'étrier, était coupé en utilisant le biseau d'une aiguille (Terumo 25G) et en prenant soin de ne pas perturber la chaîne des osselets. Quant à la section du muscle tenseur tympanique (Fig. 5), elle était réalisée en deux étapes. D'abord, le

tendon reliant le muscle au marteau était sectionné à l'aide de microciseaux, ensuite l'insertion inférieure du tendon sur les parois de la caisse tympanique était coupée en utilisant le biseau d'une aiguille (Terumo 25G). Pour finir, l'ouverture de la bulle tympanique était refermée avec du ciment dentaire.

2.2. Mesures des potentiels électrocochléographiques

Le potentiel microphonique cochléaire (PMC) et le potentiel auditif composite (PAC) ont été enregistrés au niveau de la fenêtré ronde de la cochlée.

Ces mesures étaient réalisées dans une cabine insonorisée (Elstar, modèle MR, <http://www.elstarpreventi.com>), située dans une chambre semi-anéchoïque. L'émission des stimuli acoustiques et le traitement des signaux électrophysiologiques étaient réalisés par une chaîne audiométrique Tucker-Davis Technologies équipée du logiciel BioSig. Les animaux anesthésiés étaient en contention dans un manchon métallique afin de maintenir une distance constante de 15 cm et une incidence perpendiculaire de la tête de l'animal par rapport au haut parleur (JBL 2405) situé dans la cabine (Fig. 6).

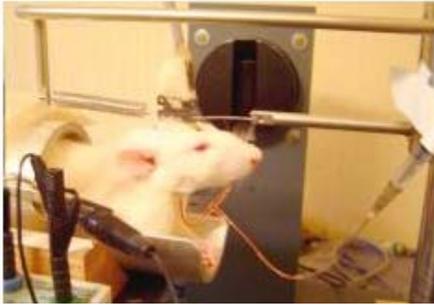


Figure 6 : Rat Sprague Dawley OFA en contention dans la cabine insonorisée.

Deux stimulations sonores ont été utilisées, une stimulation *ipsi*-latérale pour évoquer les PCoGs et une stimulation *contra*-latérale pour déclencher les réflexes de protection acoustique. Le déclenchement des réflexes de protection de l'oreille étant bilatéral, la stimulation sonore au niveau d'une oreille déclenche simultanément les réflexes dans les deux oreilles.

2.2.1. Potentiel microphonique cochléaire

La méthode décrite ci-après a permis le recueil de la valeur efficace ou « root mean square » (RMS) du PMC.

2.2.1.1. Méthode de stimulation acoustique

□ Stimulation sonore *ipsi*-latérale

Le stimulus sonore *ipsi*-latéral (*Fig. 7*), d'une durée de 2,6 s, était un bruit de bande de deux octaves, centrée sur 4 kHz (2OBN – 4 kHz) (*Fig. 8*), émis en champ libre avec les niveaux de pression sonore suivants : 65, 75, 85 et 95 dB SPL. Il était visualisé sur un oscilloscope (Gould 1604).

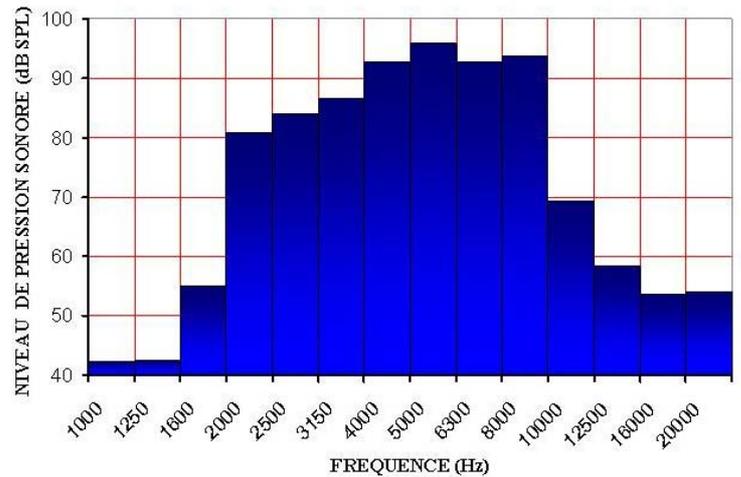
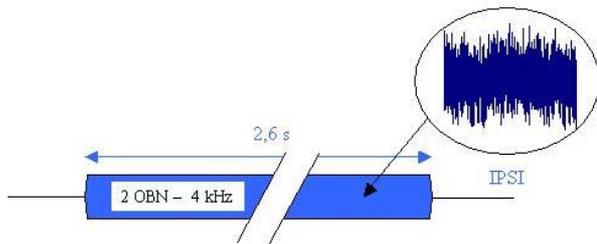


Figure 7 : Stimulation acoustique ipsi-latérale (2OBN – 4 kHz) utilisée pour la mesure du PMC.

Figure 8 : Spectre du bruit de bande de deux octaves centrée sur 4 kHz enregistré dans la cabine audiométrique pour une stimulation de 100 dB.

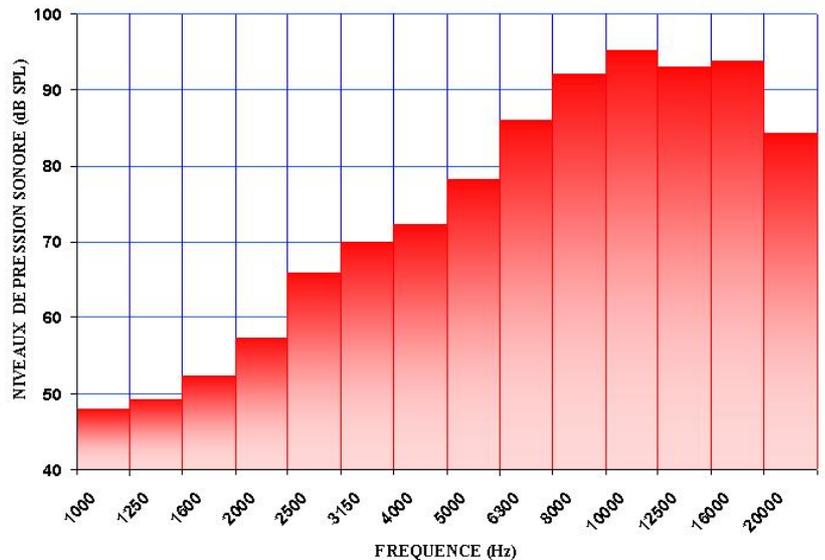
Dans notre protocole expérimental, le spectre de la stimulation sonore a été choisi de façon à enregistrer l'activité du plus grand nombre de CCE de la cochlée (Møller, 1983).

Le calibrage des stimuli était réalisé avec un haut parleur qui produisait un bruit continu dont le spectre correspondait à un bruit de 2OBN – 4 kHz. Un microphone 1/2" (Brüel et Kjaer 4133) positionné au point normalement occupé par le centre de la tête de l'animal permettait de mesurer le niveau de pression sonore émis par le haut parleur. L'intensité ciblée était obtenue en ajustant le niveau de bruit continu.

□ Stimulation sonore *contra*-latérale

La stimulation *contra*-latérale, délivrée par un écouteur (Etymotic, ER-4P) positionné dans le conduit auditif externe droit de l'animal, était un bruit de bande d'un octave centrée sur 12,5 kHz (OBN – 12,5 kHz) [Fig. 9] d'une intensité de 110 dB SPL.

Figure 9 : Spectre du bruit de bande d'octave centrée sur 12,5 kHz émis par l'écouteur.



Le spectre et l'intensité de cette stimulation ont été choisis afin de stimuler les deux réflexes de protection de l'oreille : le ROM et le réflexe de l'oreille interne (ROI).

La stimulation *contra*-latérale était émise 0,5 s avant le début de la stimulation *ipsi*-latérale, elle durait 3,6 s et s'arrêtait 0,5 s après la fin de la stimulation *ipsi*-latérale (Fig. 12).

2.2.1.2. Méthode d'enregistrement

La réponse électrophysiologique était amplifiée (5000x, CP511 A.C. Amplifier, Grass Instrument), filtrée de 2 à 8 kHz à l'aide d'un filtre Kémo (VBF8 mk4) et visualisée sur un oscilloscope (Gould 1604). La valeur RMS du potentiel était calculée sur toute la durée du stimulus (2,6 s) [Fig. 7] par un amplificateur de mesure (Brüel et Kjaer 2636). Cette valeur était exprimée en dBV, c'est-à-dire en décibel (dB) référencé par rapport à 1 volt (V). L'acquisition et le traitement des signaux étaient pilotés par un logiciel développé au laboratoire.

2.2.2. Potentiel d'action composite

La méthode décrite ci-après a permis la mesure de l'amplitude de l'onde N1 du PAC correspondant à l'activité synchronisée des fibres nerveuses afférentes radiales et spirales.

2.2.2.1. Méthode de stimulation acoustique

□ Stimulation sonore *ipsi*-latérale

Le stimulus sonore *ipsi*-latéral, délivré en champ libre, était un « tone burst » de 4 kHz, d'une intensité de 85 dB SPL, et dont l'enveloppe était définie par un temps de montée/descente de 0,5 ms et un plateau de 1 ms (Fig. 10). Il était visualisé sur un oscilloscope (Gould 1604). Un « tone burst » sur deux était émis en opposition de phase, à un rythme de 20/s. Ainsi, le PMC était éliminé par sommation et seul le PAC apparaissait à la suite de l'amélioration du rapport signal sur bruit (Fig. 11).

La procédure de calibrage de la chaîne audiométrique était similaire en tout point à celle utilisée pour les mesures de PMC avec une seule différence : le haut parleur produisait un son pur continu de 4 kHz.

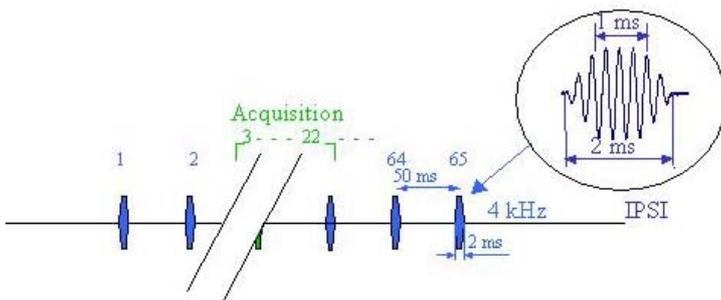


Figure 10 : Stimulation acoustique *ipsi*-latérale (« tone burst » de 4 kHz) pour la mesure du PAC.

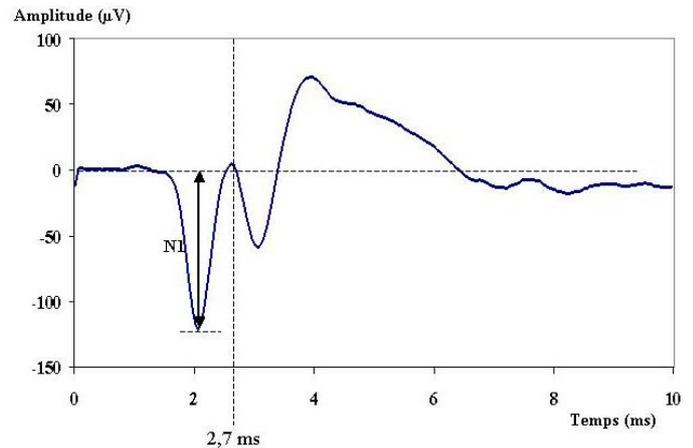


Figure 11 : PAC en réponse aux « tone burst » de 4 kHz de 85 dB SPL.

□ Stimulation sonore *contra*-latérale

Le spectre et l'intensité de la stimulation *contra*-latérale étaient identiques à ceux utilisés pour le PMC (*Fig. 9*). Cependant, la durée du stimulus était de 4,2 s entrecoupée par des fenêtres de silence de 3,5 ms pendant lesquelles les PAC étaient déclenchés par des stimulations *ipsi*-latérales (*Fig. 13*). Le découpage de la stimulation *contra*-latérale était nécessaire pour ne pas perturber les mesures effectuées au niveau de la fenêtre ronde *ipsi*-latérale (crosstalk acoustique). Les paramètres du découpage temporel des deux stimulations acoustiques ont été choisis de façon à ce que l'action des réflexes de protection persiste malgré la cessation du bruit *contra*-latéral. D'après Warren et Liberman (1989), l'effet supprimeur de la stimulation *contra*-latérale requiert au minimum 100 ms pour disparaître.

2.2.2.2. Méthode d'enregistrement

L'activité bio-électrique était amplifiée (5000x, CP511 A.C. Amplifier, Grass Instrument) et filtrée de 0,3 à 3 kHz avant d'être traitée par un convertisseur analogique/numérique et échantillonnée sur une fenêtre d'analyse de 10 ms. Le signal était moyenné sur 20 acquisitions pour améliorer le rapport signal sur bruit. Il était visualisé sur un oscilloscope (Gould 1604). Enfin, l'amplitude négative maximale de l'onde N1 (*Fig. 11*) était calculée sur une durée limitée à 2,7 ms à l'aide d'un logiciel développé au laboratoire.

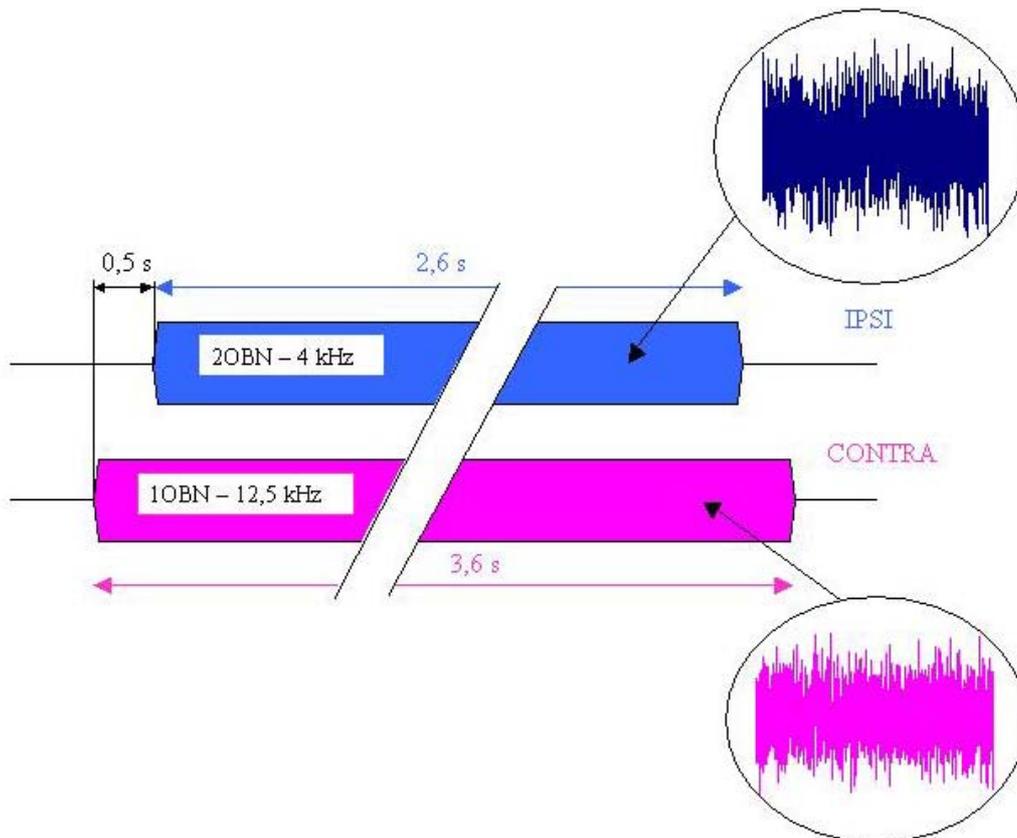


Figure 12 : Paramètres acoustiques utilisés lors des mesures de l'amplitude du PMC alors que les réflexes de protection étaient déclenchés : stimulations acoustiques ipsi-latérale (IP SI) [2OBN - 4 kHz] et contra-latérale (CONTRA) [1OBN - 12,5 kHz de 110 dB SPL].

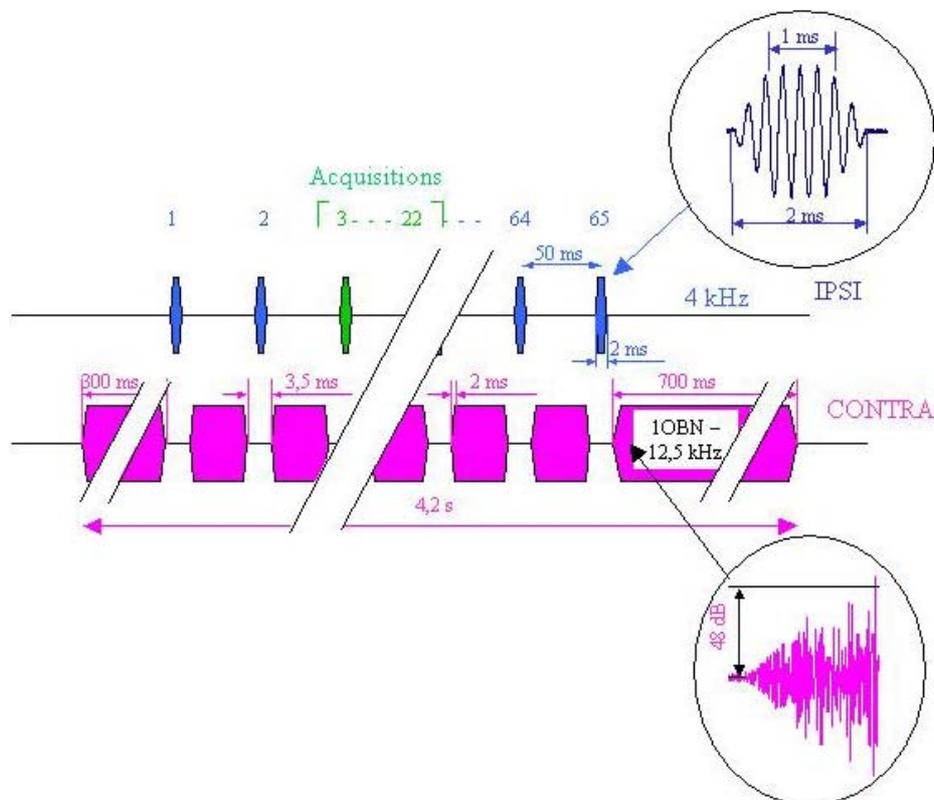


Figure 13 : Paramètres acoustiques utilisés lors des mesures de l'amplitude de l'onde N1 du PAC alors que les réflexes de protection étaient déclenchés : stimulations acoustiques ipsi-latérale (IP SI) [« tone burst » - 4 kHz] et contra-latérale (CONTRA) [1OBN - 12,5 kHz de 110 dB SPL].

3. Exposition aux agents chimiques

3.1. Abords opératoires

Dans le but d'intoxiquer les rats par voie artérielle, un cathéter circulaire a été implanté dans le tronc commun de la carotide.

L'animal anesthésié était placé en décubitus dorsal. Après incision de l'épiderme du cou, le vaisseau sanguin de la glande mandibulaire gauche était ligaturé, puis la glande retirée. La carotide gauche du rat était alors dégagée sur une longueur approximative de 2 cm. La branche externe de l'artère (*Fig. 15*) était ligaturée afin de diriger le bolus injecté principalement vers la cochlée et le système nerveux central via une des branches collatérales de la carotide interne : l'artère stapédienne (Yamamoto et al., 2003), et l'artère occipitale respectivement (Kastin et al., 1976). Après avoir positionné deux clamps sur le tronc commun de l'artère, un du côté céphalique et l'autre du côté cardiaque, la carotide était entaillée à deux endroits entre les clamps afin d'implanter un cathéter circulaire (*Fig. 14 à 16*).

Ce cathéter, fabriqué au laboratoire, était constitué d'un raccord en T en polypropylène ($\text{\O}i = 1,6 \text{ mm}$, réf. 95907, Fisher Bioblock Scientifique) prolongé par :

- un embout proximal de 3 cm de silicone ($\text{\O}i = 0,635 \text{ mm}$, réf. 602155, Sedat) et par un embout distal de 1 cm de polyéthylène ($\text{\O}i = 0,58 \text{ mm}$, réf. 300030, Folioplast), pour les extrémités du cathéter implantées dans l'artère. L'embout distal était formaté en « L » dans de l'eau bouillante,
- un embout proximal de 3 cm de polyéthylène qui était raccordé à un embout de 3 cm de silicone, lui-même raccordé à un embout de 3 cm de polyéthylène, pour la voie d'injection.

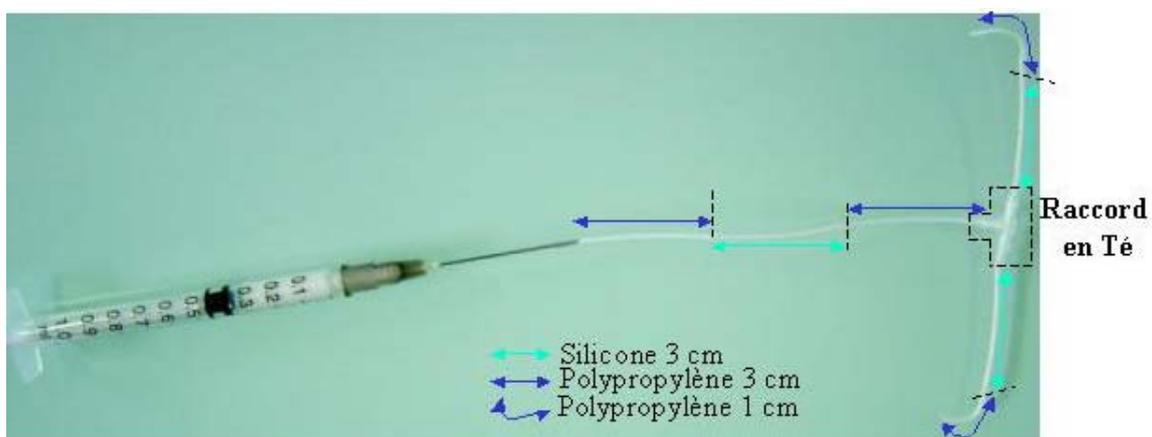


Figure 14 : Cathéter circulaire permettant l'injection intra-carotidienne.

Les deux branches du cathéter, remplies avec une solution de NaCl 9 ‰ héparinée (Héparine Choay, 50 UI/mL), étaient introduites dans le tronc commun de la carotide (*Fig. 15*). Une fois le cathéter fiché dans la carotide, l'artère était déclamée, rétablissant ainsi, au travers du cathéter, le flux sanguin de l'animal tout en permettant de réaliser des injections intra-carotidiennes (*Fig. 16*).

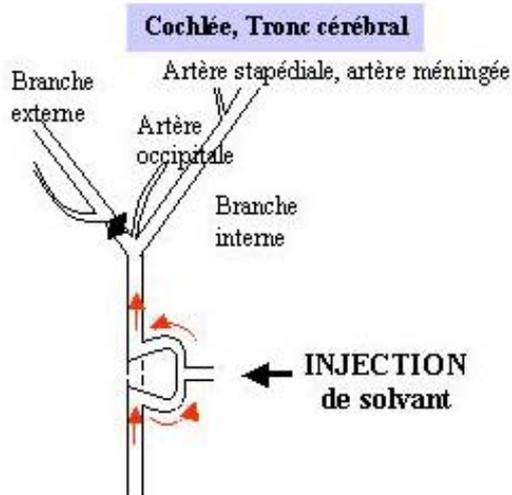


Figure 15 : Schéma de l'artère carotidienne et de ses différentes branches, précisant la position du cathéter circulaire.

◆ : ligature.

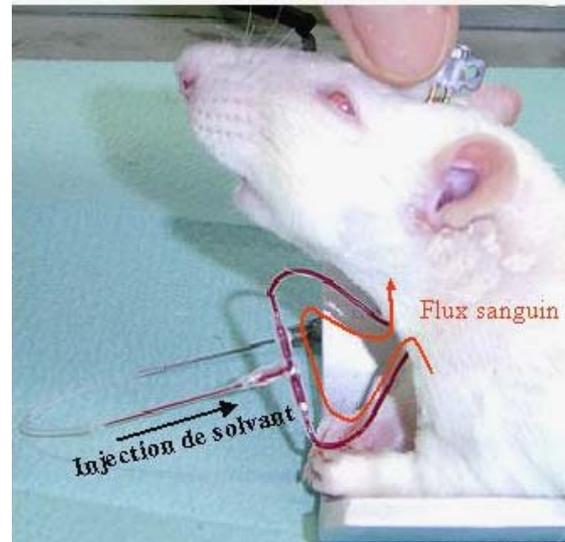


Figure 16 : Rat Sprague Dawley OFA équipé d'un microconnecteur et d'un cathéter circulaire.

Pour les injections intra-carotidiennes *contra*-latérales, la méthode d'implantation décrite ci-dessus était simplement appliquée à la carotide droite.

3.2. Administration des agents chimiques

L'exposition des rats aux agents chimiques se faisait par une injection intra-carotidienne de véhicule contenant l'agent. Le véhicule utilisé était de l'Intralipide (ILip, émulsion constituée d'huile de soja purifiée et d'acides gras essentiels [Intralipide 10 %, réf. 830513161, Fresenius Kabi]). Cette solution pouvait être administrée par voie intra-carotidienne sans perturbation apparente des potentiels mesurés, et permettait de se charger en agent chimique dans une gamme de concentrations compatibles avec celles utilisées dans nos conditions expérimentales. Les préparations « ILip + agent chimique » étaient fraîchement confectionnées avant chaque injection. Les volumes injectés correspondaient à des bolus de 100 μ L pour les mesures du PMC. Cependant, des injections de 200 μ L ont été nécessaires pour enregistrer des variations d'amplitude du PAC, moins sensible que le PMC. Les

injections étaient réalisées à l'aide d'un perfuseur (KD Scientific model 100), calibré pour délivrer un volume de 100 μL pendant 30 s ou 200 μL pendant 1 min.

3.3. Nature des agents chimiques

3.3.1. Solvants aromatiques et non aromatiques

Différents solvants ont été testés. En premier, le toluène, considéré comme solvant de référence en raison de sa structure simple ($\text{CH}_3\text{-}\phi$) et de ses effets cochléotoxiques bien établis. Suite à des essais préliminaires, quatre concentrations ont été testées : 0 – 58,4 – 116,2 – 229,5 mM. En fait, la concentration la plus forte (229,5 mM) équivaut à la quantité maximale de toluène miscible dans l'ILip, pour obtenir un mélange homogène sans apparition de gouttelettes de solvant.

Pour les autres solvants aromatiques ou non aromatiques testés, les concentrations indiquées dans le tableau 1 engendraient des réponses électrophysiologiques de même amplitude que celles induites par 116,2 mM de toluène.

Le tableau 1 ci-dessous résume les solvants testés, leur formule chimique, la concentration injectée et leur numéro d'enregistrement auprès du Chemical Abstracts Service (numéro CAS).

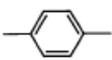
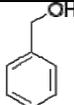
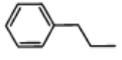
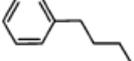
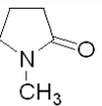
Solvant testé	Formule chimique	Concentration injectée (mM)	Numéro CAS
benzène		138,9	71 43 2
cyclohexane		114,1	110 82 7
toluène		0 58,4 116,2 229,5	108 883
<i>p</i> -xylène		100,1	108 38 3
<i>o</i> -xylène		102,3	95 47 6
<i>m</i> -xylène		100,5	106 42 3
alcool benzylique		119,3	100 51 6
éthylbenzène		199,9	100 41 4
styrène		107,4	100 42 5
propylbenzène		110,1	103 65 1
butylbenzène		117,9	104 51 8
NMP		115,4	872 50 4
éthanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	1194,8	64 17 5

Tableau 1 : Solvants aromatiques et non aromatiques testés par injection intra-carotidienne.

3.3.2. Antagonistes des récepteurs neurosensoriels auditifs

Différents récepteurs neurosensoriels interviennent le long des boucles d'activation des réflexes de protection acoustique. Afin de préciser le mode d'action du solvant sur ces boucles d'activation des réflexes, les effets des antagonistes des récepteurs neurosensoriels ont été étudiés et comparés à ceux induits par le toluène.

□ Antagonistes des récepteurs cholinergiques

Trois antagonistes des récepteurs cholinergiques ont été testés :

- un antagoniste non sélectif des récepteurs cholinergiques, le sulfate d'atropine (1 mg/mL Aguetant, CAS 51558),
- des antagonistes spécifiques des récepteurs nicotiques ou muscariniques comme le dihydro- β -érythroïdine hydrobromide (DBE, CAS 29734 68 7, réf. D149, Sigma) ou le 4-diphénylacétoxy-N-méthylpipéridine-méthiodide (4-DAMP, CAS 1952 15 4, réf. D104, Sigma) respectivement.

Une étude de type « effet/dose » a été réalisée pour chaque antagoniste afin de déterminer sa concentration efficace (Lataye et al., 2007). La concentration d'antagoniste était considérée comme efficace lorsqu'elle provoquait une augmentation de l'amplitude du PMC équivalente à celle engendrée par l'injection de 100 μ L de toluène à la concentration de 116,2 mM, notre concentration de référence.

Les concentrations d'antagonistes testées ont été les suivantes :

- 325 – 487 et 691 μ M pour l'atropine sulfate,
- 100 – 150 et 175 μ M pour le DBE,
- 44,3 – 88,6 et 122 μ M pour le 4-DAMP.

□ Antagonistes des récepteurs calciques

Deux antagonistes des récepteurs calciques ont été testés. Le premier était le vérapamil hydrochloride (CAS 23313 68 0, réf. V4629, Sigma), un antagoniste connu pour avoir une action sur les récepteurs calciques de type L principalement exprimés par les cellules musculaires. Le second était l'oméga conotoxine MVIIC (ω -ctx MVIIC, CAS 147794 23 8, réf. C4188, Sigma), un antagoniste des récepteurs calciques de type P/Q et N présents dans les neurones.

Une étude de type « effet/dose » a été réalisée pour déterminer les concentrations efficaces. Les concentrations d'antagonistes testées ont été les suivantes :

- 312,5 – 625 et 1250 μM pour le vérapamil, préparé dans du NaCl à 0,9 % et non de l'ILip. En effet, le vérapamil est une substance très lipophile, son affinité pour l'ILip est telle qu'elle en atténue son efficacité (Tebbutt et al., 2006),
- 83,5 – 145,2 et 211,4 μM pour l' ω -ctx MVIIC, préparé également dans du NaCl à 0,9%.

3.3.3. Gentamicine

Les effets du sulfate de gentamicine (CAS 1405 41 0, réf. G3632, Sigma), un aminoglycoside ayant la caractéristique d'inhiber le système auditif efférent médian (Smith et al., 1994 ; Yoshida et al., 1999) et d'être cochléotoxique (Tachibana et al., 1983 ; Forge et Schacht, 2000) ont été évalués par les mesures du PMC et comparés à ceux induits par le toluène. La littérature rapporte qu'une injection *i.m.* unique de 150 mg/kg inhibait le système auditif efférent médian (Smith et al., 1994). Pour un animal pesant 350 g, cette posologie équivaut à une injection *i.m.* de 52,5 mg de gentamicine, ou, dans nos conditions expérimentales, à l'injection intra-carotidienne d'un bolus de 100 μL d'une solution de gentamicine à la concentration de 525 g/L (1,2 M). Etant donné la différence de voie d'injection (*i.m.* vs. intra-carotidienne), la première dose de gentamicine testée par injection intra-carotidienne fut 262,5 g/L ou 0,6 M mais cette dernière s'est avérée létale. Des essais préliminaires ont donc été menés avec des concentrations 100 fois plus faibles : 6,7 – 4,4 et 2,2 mM de gentamicine préparé avec de l'ILip.

4. Techniques histologiques

4.1. Cochlées

4.1.1. Préparation des spécimens

Les rats profondément anesthésiés (kétamine, 75 mg/kg) étaient perfusés par voie intracarotidienne avec 2 mL de fixateur : solution constituée de glutaraldéhyde (3 %), de formaldéhyde (2 %), d'acroléine (1 %) et de diméthylsulfoxyde (2,5 %) dans un tampon cacodylate de sodium 0,08 M à pH 7,4.

Les animaux étaient ensuite décapités et les cochlées prélevées. Une perfusion intralabyrinthique des cochlées avec la solution de fixateur était réalisée avant de les plonger dans la solution de fixateur pendant une nuit. Le lendemain, elles étaient rincées avec du tampon cacodylate, puis post-fixées pendant 1 h avec une solution de tétraoxyde d'osmium (OsO_4 2 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,4) avant d'être à nouveau rincées avec du tampon cacodylate. Les cochlées étaient ensuite fraisées dans de l'éthanol à 70 % jusqu'à l'obtention d'une fine couche osseuse, puis stockées dans cette même solution à 4 °C.

4.1.2. Préparation pour microscopie

Les cochlées étaient décalcifiées durant 8 h dans une solution constituée d'éthylène diamine tétra-acétate et d'éthanol (10 % / 70 %), puis déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante : 70, 80, 90 et 100 %. Les échantillons étaient ensuite inclus dans de la résine (Epon 25,3 %, DDSA 55,8 %, Araldite 15,2 %, dibutyl phtalate 2 % et 2, 4, 6-tridiméthylaminométhyl phénol 1,7 %). Pour finir, les cochlées étaient placées 15 h à l'étuve à 30 °C puis 24 h à 60 °C. Les blocs de résine polymérisée étaient alors débités à l'ultratrime (Leica) dans l'axe du modiolus de la cochlée jusqu'à voir apparaître le nerf auditif au centre de la cochlée (*Fig. 17*).

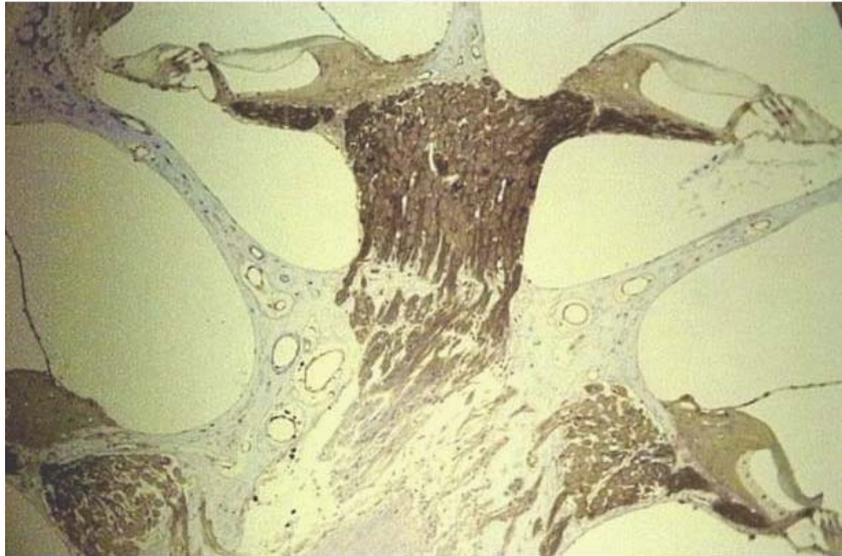


Figure 17 : Coupe axiale d'une cochlée de rat passant par le modiolus.

□ **Microscopie optique : coupes semi-fines**

Après avoir été coupés avec l'ultratrif, les blocs de résine étaient débités en coupes de 2,5 μm d'épaisseur avec un microtome (Microm HM 355S). Ces dernières étaient déposées sur lame dans une goutte de crésyl violet puis montées sous lamelle. Les coupes étaient observées avec un microscope optique (Olympus BX 51 WI).

□ **Microscopie électronique à transmission : coupes ultra-fines**

La zone cochléaire que l'on souhaitait observer était isolée au moyen du microtome. Les blocs de résine étaient ensuite débités en coupes de 75-95 nm avec un ultramicrotome (Leica Ultracut S) équipé d'un diamant de coupe (Diatome MT5166). Les coupes ultra-fines étaient alors déposées sur des grilles de cuivre circulaires ($\text{\O} = 3 \text{ mm}$, maillage 200, barre 40 μm , trou 85 x 85 μm). Elles étaient ensuite contrastées à l'acétate d'uranyle à 5 % (1 h) puis au citrate de plomb à 6,2 % (1 h). Les observations étaient faites avec un microscope électronique à transmission (Zeiss EM910).

4.2. Cerveau

4.2.1. Préparation des spécimens

Les animaux, profondément anesthésiés (kétamine, 75 mg/kg), étaient décapités et leur cerveau prélevé en prenant soin de préserver les paraflocculi. Les échantillons étaient immédiatement congelés à $-60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ avant d'être débités, selon un axe frontal, en partant du

cervelet jusqu'aux paraflocculi. Des coupes sériées de 20 µm d'épaisseur étaient réalisées avec un microtome (Microm HM 560 Cryostat) jusqu'au-delà des colliculi et déposées sur des lames silanisées.

4.2.2. Mise en évidence de cellules apoptotiques par la technique TUNEL

La technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) a été appliquée sur les coupes de cerveau (*Fig. 41*) dans lesquelles on distinguait le complexe olivaire supérieur, les noyaux faciaux et du trijumeau, ainsi que le nerf vestibulo-cochléaire. Le kit de détection Apoptag plus fluorescein (S7111, Chemicon international) a été utilisé. Cette technique permet de repérer *in situ* des fragments d'ADN, produits lorsqu'une cellule est entrée dans un processus d'apoptose. En effet, lorsqu'une cellule entre dans un processus de mort programmée, elle subit des « digestions » affectant d'abord le cytoplasme puis le noyau. L'ADN est « digéré » par des endonucléases, ce qui produit des grands fragments d'ADN ou des unités nucléosomiques qui peuvent être détectés par immunomarquage. Dans la technique TUNEL, l'enzyme désoxynucléotidyltransférase terminale (Tdt) ajoute des désoxyribonucléotides modifiés (dUTP couplé à la digoxigénine) aux extrémités 3'OH terminales de l'ADN. Ensuite, les désoxyribonucléotides modifiés sont révélés au moyen d'un anticorps couplé à un fluorochrome (anticorps anti-digoxigénine couplé à une sonde FITC). Un contre marquage à l'iodure de propidium, un agent intercalant de l'ADN, a été réalisé en parallèle pour révéler l'ensemble des noyaux cellulaires présents dans le tissu. Ainsi, lors de l'observation du tissu en microscopie à fluorescence, la superposition du marquage d'un noyau cellulaire avec le fluorochrome utilisé atteste de la présence de fragments d'ADN dans le noyau, caractéristique d'une cellule en apoptose.

Le kit de détection a été utilisé selon les recommandations du fabricant. Les coupes cérébrales étaient fixées 10 min dans une solution de formaldéhyde à 3,7 % dans du tampon phosphate (PBS) 0,1 M pH 7,4, puis post-fixées 5 min dans un mélange éthanol 96 % / acide acétique (2/1 v/v) à -20°C. Après une série de lavages dans du PBS, 0,1 M, pH 7,4, les échantillons tissulaires (lames tests) étaient préalablement équilibrés avec 13 µL de tampon d'équilibration (Apoptag, réf. 90416) puis incubés, en chambre humide à 37°C, avec 11 µL d'enzyme Tdt (Apoptag, réf. 90418), à 40 %, dans du tampon de réaction (Apoptag, réf. 90417). Après 1 h d'incubation, la réaction enzymatique était stoppée avec un tampon stop (Apoptag, réf. 90419), puis les coupes étaient lavées dans du PBS. Les extrémités 3'OH, produites dans les cellules en apoptose étaient alors révélées avec 13 µL d'anticorps anti-

digoxigénine - FITC (Apoptag, réf. 90426) à 50 % dans une solution Apoptag (réf. 90425), puis laissées en incubation pendant 30 min à l'obscurité dans une chambre humide. Après lavages, les coupes étaient montées sous lamelle dans un milieu de montage constitué d'iodure de propidium/antifade (Euromedex, réf. S7112) à 0,5 µg/mL dans du PBS, 0,1 M, pH 7,4. Les coupes étaient alors prêtes à être observées en microscopie optique à fluorescence (Leica DC 100) : filtre I3 pour une excitation dans le bleu (450 – 490 nm) spécifique pour le FITC, et filtre N2.1 pour une excitation dans le vert (515 – 560 nm) pour l'iodure de propidium. Une photographie des coupes cérébrales était prise avec chaque filtre. Ensuite, ces deux photographies étaient superposées à l'aide du logiciel analySIS FIVE de façon à distinguer les noyaux cellulaires en apoptose (deux couleurs superposées) des autres noyaux.

En plus de ces lames tests, des lames de contrôle positif et négatif étaient réalisées afin de mimer la fragmentation de l'ADN induite lors de l'apoptose et de mettre en évidence la fixation non spécifique des anticorps utilisés dans le kit. Ces lames de contrôle permettaient ainsi de valider le bon fonctionnement de l'expérience. Pour ce faire, des coupes cérébrales de rat fixées étaient traitées de la façon suivante :

- pour le témoin positif, les coupes étaient mises au contact de 50 µL de protéinase K (Sigma, réf. P2308) à 0,25 µg/mL dans du PBS, 0,1 M, pH 7,4, durant 15 min, puis fixée à nouveau 10 min dans du formaldéhyde à 3,7 %. Après lavages, elles étaient équilibrées 5 min avec 50 µL de tampon DN (tris base 30 mM pH 7,2, chlorure de magnésium 4 mM, 1,4-dithiothreitol 0,1 mM) puis incubées 10 min avec 25 µL de DNase I (Sigma, réf. D7291) à 0,5 µg/mL dans du tampon DN. Après plusieurs lavages, les coupes subissaient le même traitement que les coupes tests,

- pour le témoin négatif, le protocole décrit précédemment pour les lames tests était appliqué, à l'exception de l'étape avec la Tdt.

5. Protocoles expérimentaux

L'étude des mécanismes périphériques et centraux responsables de la synergie des effets d'une co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques a été entreprise chez le rat avec une approche expérimentale aiguë.

Choix de l'approche expérimentale

Le solvant de référence choisi pour réaliser cette étude était le toluène dont les propriétés cochléotoxiques (Pryor et al., 1983 ; Crofton et al., 1994 ; Loquet et al., 1999 ; Campo et al., 1997 ; Lataye et al., 1999 ; Gagnaire et Langlais, 2005) et la synergie des effets d'une co-exposition avec le bruit (Johnson et al., 1988 ; Lataye et al., 1997 ; Brandt-Lassen et al., 2000) ont été amplement démontrées.

Le rat est un modèle adapté pour ce type d'étude puisque son oreille est sensible aux solvants aromatiques (Cappaert et al., 2002) et que, comme chez l'homme, l'oxydation hépatique du toluène est réalisée principalement par les cytochromes P450 de type 2E1 (Nakajima et al., 1991, 1997).

Pour réaliser cette étude, les animaux étaient équipés d'une électrode placée sur la niche de la fenêtre ronde et d'un cathéter introduit dans le tronc commun de la carotide. L'électrode permettait l'enregistrement du PMC qui traduit les variations bio-électriques des flux de K^+ entrant et sortant dans les CCE (Ashmore, 1988 ; Withnell, 2001). Le PMC a donc été choisi comme outil de mesure des performances cochléaires. De surcroît, il est également un indicateur de l'activité du faisceau olivo-cochléaire médian (Kemp et Souter, 1988 ; Patuzzi et al., 1989, 1991) puisque 95 % des fibres nerveuses sont connectées aux CCE, effecteurs de l'arc réflexe de l'oreille interne (ROI). Pour finir, le PMC permet aussi d'évaluer l'énergie acoustique absorbée par la cochlée (Dancer et Franke, 1980) et par conséquent d'évaluer le fonctionnement du ROM. Ainsi, à l'aide du PMC, le fonctionnement des CCE et les performances du ROI et du ROM, pouvaient être évalués. La stimulation sonore était un bruit de bande de deux octaves centrée sur 4 kHz (2OBN – 4 kHz) choisie pour stimuler l'ensemble de la cochlée (Møller, 1983) ; son intensité était de 85 dB SPL pour se placer dans des conditions proches de celles rencontrées dans les milieux professionnels. Pour évaluer l'activité des CCI, le mesurage de l'onde N1 du PAC a également été réalisé.

Le cathéter introduit dans le tronc commun de la carotide permettait d'exposer les animaux au solvant. Cette voie d'exposition artérielle permettait de minimiser l'impact du métabolisme hépatique sur la cochléotoxicité des solvants aromatiques (Pryor et al., 1991 ; Campo et al., 2007 b) et de ne tester que la toxicité de la molécule mère. Par ailleurs, cette voie

d'intoxication permettait au solvant d'atteindre le récepteur auditif et le tronc cérébral d'où partent les voies nerveuses efférentes impliquées dans les réflexes de protection. En effet, si l'irrigation sanguine de la cochlée du rat est assurée principalement par l'artère labyrinthique, il n'en demeure pas moins que 30 % de l'irrigation est assuré par l'artère stapédienne, branche collatérale de la carotide interne (Yamamoto et al., 2003). Par ailleurs, l'irrigation du tronc cérébral est assurée, en partie tout au moins, par la branche occipitale de la carotide (Kastin et al., 1976).

5.1. Effets auditifs d'une co-exposition « bruit *ipsi-latéral* et toluène »

Ce protocole était destiné d'une part, à valider l'approche expérimentale décrite ci-dessus comme modèle adapté à l'étude des effets d'une co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques (*Cf. II. 5.1.1.*) et d'autre part, à identifier le site, cochléaire ou central, à l'origine de la synergie des effets des solvants sur ceux induits par le bruit (*Cf. II. 5.1.2. et 5.1.3.*). Pour ce faire, les variations d'amplitude du PMC ont été étudiées sur des rats anesthésiés exposés à une stimulation sonore *ipsi-latérale* (2OBN – 4 kHz) alors qu'ils recevaient un bolus de 100 μ L d'ILip contenant du toluène par voie intra-carotidienne.

5.1.1. Effets de la concentration de toluène

Les effets de la concentration de toluène sur l'amplitude du PMC provoqué par une stimulation sonore de 85 dB SPL ont tout d'abord été étudiés (*Fig. 18*). Quatre concentrations de toluène ont été testées : 0 – 58,4 – 116,2 ou 229,5 mM.

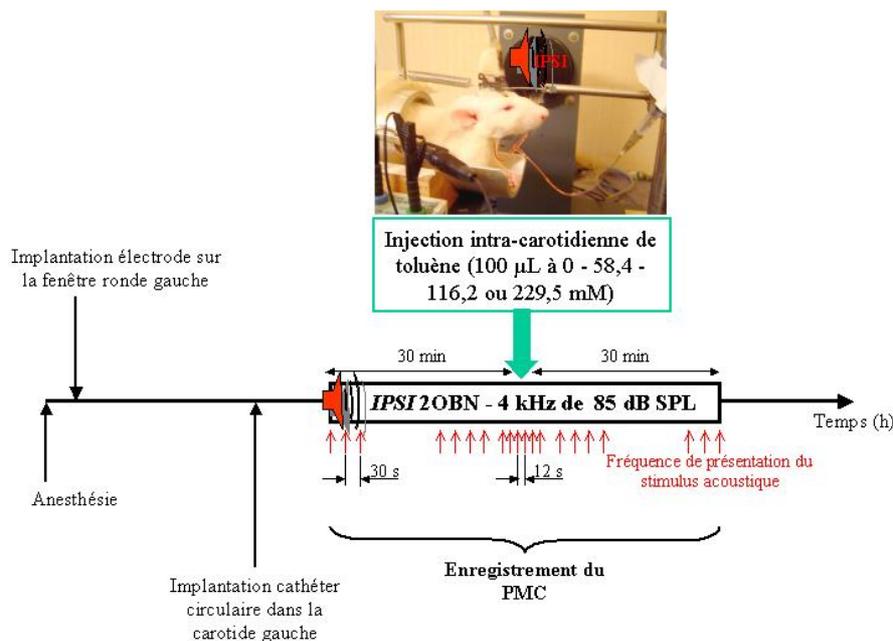


Figure 18 : Effets de la concentration de toluène sur les variations d'amplitude du PMC.

Les animaux étaient testés pendant approximativement une heure, soit trente minutes avant et trente minutes après l'injection du solvant (*Fig. 18*). Les périodes d'injection duraient 200 s à partir du début de l'injection. La fréquence de présentation du stimulus acoustique était variable pendant la période d'enregistrement du PMC : elle était de un stimulus toutes les 12 s pendant les périodes d'injection et de un stimulus toutes les 30 s en dehors de ces périodes pour minimiser les effets d'une éventuelle fatigue auditive.

5.1.2. Effets du niveau de pression sonore

Les effets du niveau de pression sonore sur les variations d'amplitude du PMC mesurées lors d'une injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène ont ensuite été étudiés (*Fig. 19*). Dans cette expérience, seul le niveau de pression sonore de la stimulation acoustique variait : 65, 75, 85 ou 95 dB SPL.

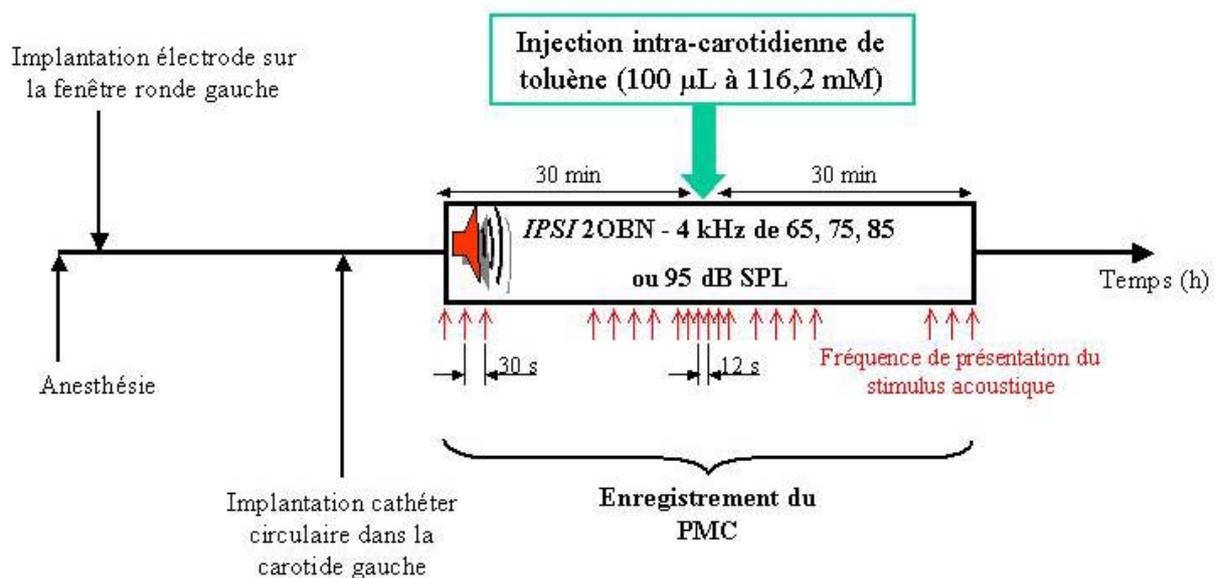


Figure 19 : Effets du niveau de pression sonore sur les variations d'amplitude du PMC au cours d'une injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène.

5.1.3. Influence de l'injection d'un bolus de toluène dans les branches carotidiennes interne et occipitale

L'influence de l'injection d'un bolus de toluène dans les branches carotidiennes interne et occipitale sur les variations d'amplitude du PMC a été étudiée (Fig. 20). Le PMC a été mesuré sur des rats recevant un bolus de 116,2 mM de toluène dans la branche interne, puis dans la branche occipitale de la carotide ou *vice versa*. Pendant l'expérimentation, la stimulation sonore était de 85 dB SPL.

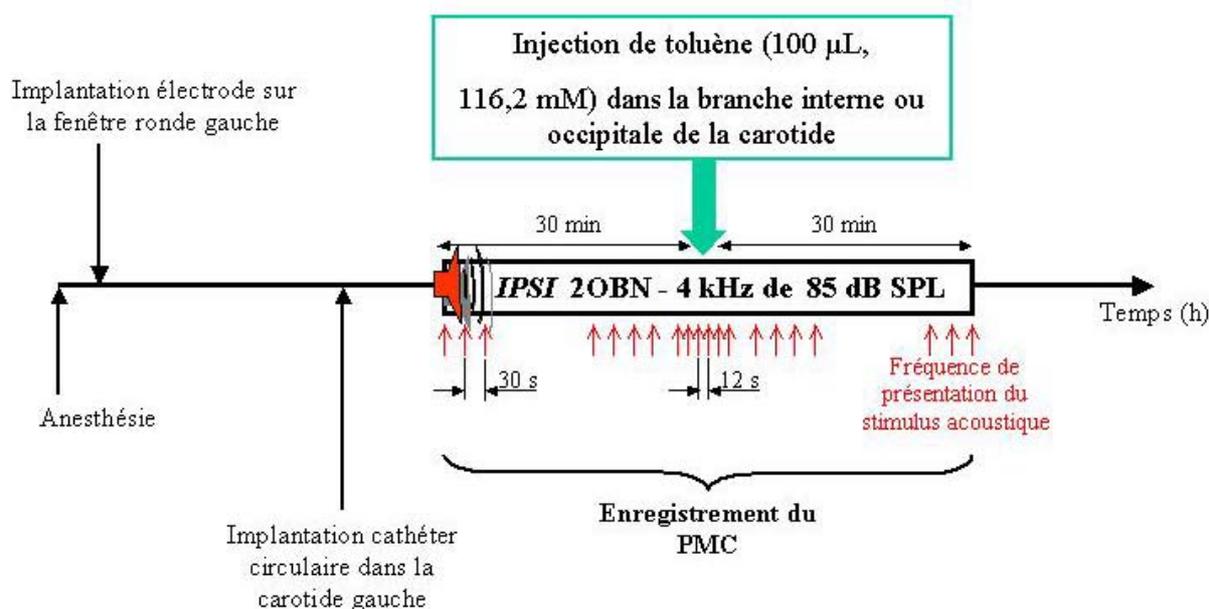


Figure 20 : Etude de l'influence d'une injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène dans les branches carotidiennes interne et occipitale sur l'amplitude du PMC.

Le tableau 2 ci-dessous récapitule les différentes expositions et le nombre de rats associé à ces expérimentations :

Mesures du PMC : bolus de 100 µL, bruit <i>ipsi</i> -latéral (2OBN – 4 kHz)		Nombre de rats testés
Concentration de toluène (mM) + bruit de 85 dB SPL	0	5
	58,4	5
	116,2	5
	229,5	5
Niveaux de pression sonore (dB SPL) + 116,2 mM de toluène	65	5
	75	5
	85	5
	95	4
116,2 mM de toluène + bruit de 85 dB SPL	branche occipitale	4
	branche interne	

Tableau 2 : Conditions expérimentales liées à l'étude des effets d'une co-exposition « bruit *ipsi*-latéral et toluène ».

5.2. Effets auditifs d'une co-exposition « bruit *contra*-latéral et toluène »

Le protocole utilisé dans cette étude (Fig. 21) avait pour but de préciser la cible du solvant au sein des centres nerveux supérieurs. Les effets d'une injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène sur les performances des réflexes bilatéraux de protection acoustique (ROM et ROI) ont été étudiés. Pour ce faire, les réflexes de protection ont été déclenchés par une stimulation *contra*-latérale (OBN – 12,5 kHz, 110 dB SPL) tandis que leurs effets sur l'amplitude du PMC et de l'onde N1 du PAC ont été mesurés au niveau de l'oreille *ipsi*-latérale. Ainsi, le déclenchement des réflexes de protection acoustique par la stimulation *contra*-latérale était dissocié du bruit *ipsi*-latéral qui nous permettait d'enregistrer les potentiels.

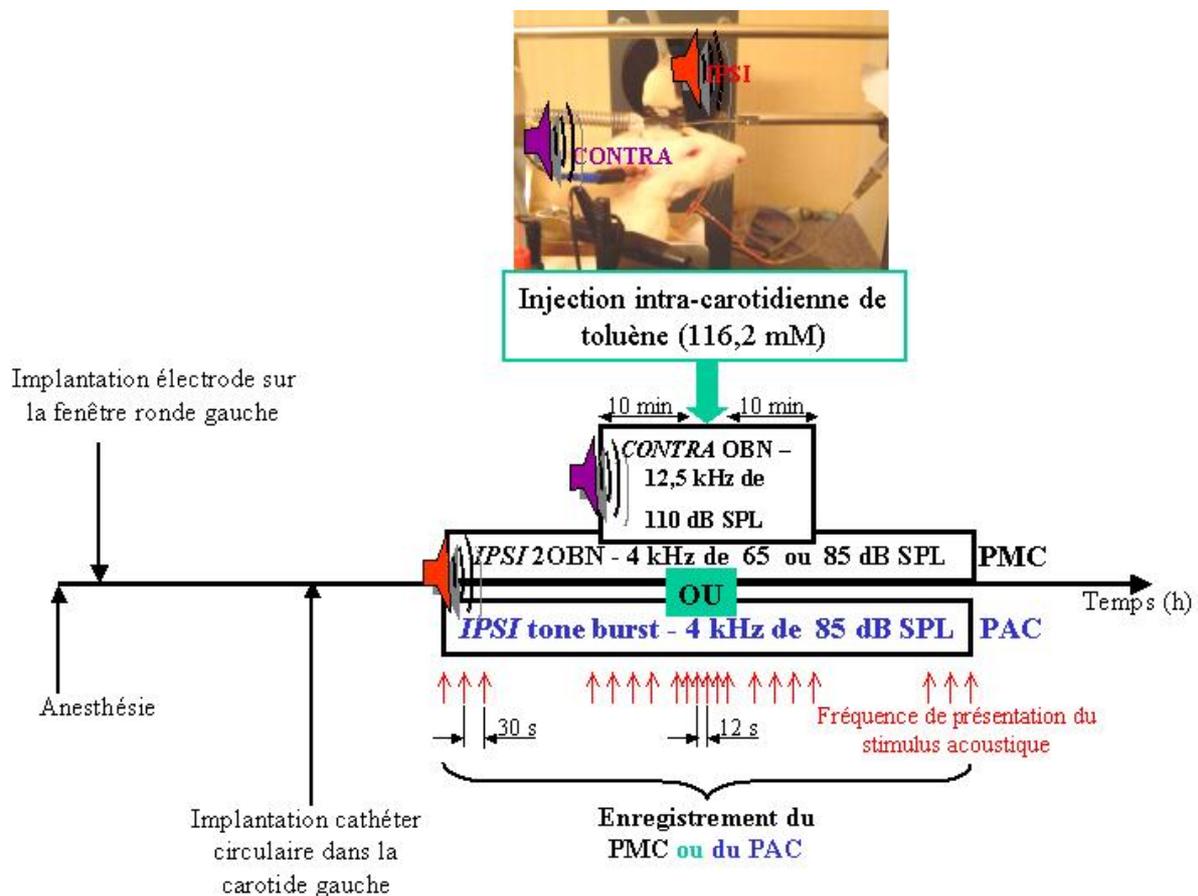


Figure 21 : Effets du toluène sur les réflexes de protection acoustique. Mesure des amplitudes du PMC et de l'onde N1 du PAC.

Deux niveaux de pression sonore ont été utilisés pour la stimulation *ipsi*-latérale du PMC : un niveau de 65 dB SPL qui est inférieur au seuil de déclenchement des réflexes de protection acoustique et un niveau de 85 dB SPL pour être dans les conditions expérimentales similaires à celles utilisées lors des précédentes expériences.

Quel que soit le potentiel enregistré, la fréquence de présentation du stimulus *contra*-latéral était identique à celle du bruit *ipsi*-latéral. Les animaux étaient soumis au bruit *contra*-

latéral pendant approximativement vingt minutes, soit dix minutes avant et dix minutes après l'injection du solvant.

Puis, l'effet relatif du toluène sur les réflexes de protection (ROM et ROI) a été évalué en mesurant le PMC et le PAC (Fig. 21) sur des rats dont les muscles de l'oreille moyenne avaient été sectionnés. Les conditions expérimentales étaient identiques à celles utilisées dans l'expérience précédente : les rats privés des muscles de l'oreille moyenne étaient exposés aux bruits *ipsi-* et *contra-*latéral et un bolus d'ILip contenant 116,2 mM de toluène (100 ou 200 µL pour les mesures de PMC et de PAC respectivement) leur était administré.

Enfin, puisque le déclenchement des réflexes de protection acoustique fait intervenir des inter-neurones et des neurones effecteurs (fibres efférentes médianes pour le ROI et moto-neurones pour le ROM [Fig. 43]), l'effet du toluène sur ces neurones a été étudié. Pour ce faire, des rats ont été exposés au toluène par injection intra-carotidienne *contra-*latérale alors qu'ils étaient parallèlement soumis à des bruits *ipsi-* et *contra-*latéral.

Le tableau 3 résume les conditions et le nombre de rats associés à ces expérimentations :

Mesures du PMC : bolus de 100 µL d'ILip contenant du toluène (116,2 mM), bruits <i>ipsi-</i> latéral (2 OBN – 4 kHz) et <i>contra-</i> latéral (OBN – 12,5 kHz de 110 dB SPL)		Nombre de rats testés
Injection <i>ipsi-</i> latérale + bruit <i>ipsi-</i> latéral de 65 dB SPL	MOMs intacts	3
	MOMs sectionnés	3
Injection <i>ipsi-</i> latérale + bruit <i>ipsi-</i> latéral de 85 dB SPL	MOMs intacts	3
	MOMs sectionnés	4
Injection <i>contra-</i>latérale + bruits <i>ipsi-</i> de 65 dB SPL et <i>contra-</i> latéral	MOMs intacts	3
Mesures du PAC : bolus de 200 µL d'ILip contenant du toluène (116,2 mM), « tone burst » <i>ipsi-</i> latéraux – 4 kHz de 85 dB SPL et bruit <i>contra-</i> latéral (OBN – 12,5 kHz de 110 dB SPL)		Nombre de rats testés
Injection <i>ipsi-</i> latérale + « tone burst » <i>ipsi-</i> et bruit <i>contra-</i> latéral	MOMs intacts	3
	MOMs sectionnés	3

Tableau 3 : Conditions expérimentales liées à l'étude des effets d'une co-exposition « bruit *contra-*latéral et toluène ».

MOMs : muscles de l'oreille moyenne.

5.3. Relation « structure – activité »

Pour déterminer les caractéristiques chimiques responsables de l'inhibition des réflexes de protection, la relation « structure – activité » de plusieurs solvants, aromatiques et non aromatiques, sur les réflexes de protection acoustique a été étudiée. Le premier des solvants aromatiques étudiés a été le benzène car il est réduit à un simple noyau benzénique. Ensuite, une attention particulière a été portée aux trois isomères du xylène : cela nous permettait de tester l'influence de la position de deux groupements méthyles autour du noyau benzénique. Quant au styrène, il avait l'avantage de présenter une double liaison au niveau de la chaîne latérale portée par le noyau benzénique. Des solvants aromatiques à longue chaîne latérale, comme le propylbenzène et le butylbenzène, ont également été testés. Pour finir, des solvants non aromatiques ont été administrés (cyclohexane et NMP) afin de tester l'influence du caractère aromatique de la molécule de solvant. Ainsi, l'amplitude du PMC a été mesurée en réponse à une stimulation sonore *ipsi-latérale* (2OBN – 4 kHz) de 85 dB SPL chez des rats exposés à des injections de 100 µL d'ILip contenant les solvants.

Par ailleurs, dans le but de caractériser l'effet du toluène sur les réflexes de protection acoustique, l'éthanol, un solvant qui perturbe la matrice lipidique, a été injecté et ses effets ont été comparés à ceux provoqués par le toluène.

Le tableau 4 ci-dessous résume les différents solvants, leur structure, la concentration à laquelle ils ont été administrés et le nombre de rats expérimentés :

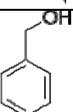
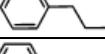
Solvants	Structure testée	Formule chimique	Concentration injectée (mM)	Nombre de rats testés
benzène	Hydrocarbure benzénique		138,9	4
cyclohexane	Hydrocarbure monocyclique		114,1	2
toluène	NB avec un Me		116,2	5
<i>p</i> -xylène	2 Me différemment organisés autour du NB		100,1	2
<i>o</i> -xylène			102,3	2
<i>m</i> -xylène			100,5	2
alcool benzylique	NB avec une fonction alcool : phénol		119,3	3
éthylbenzène	NB avec une chaîne latérale à 2 C		199,9	4
styrène	NB avec une chaîne latérale portant une double liaison		107,4	4
propylbenzène	NB avec une chaîne latérale à 3 C		110,1	3
butylbenzène	NB avec une chaîne latérale à 4 C		117,9	2
NMP	amide cyclique		115,4	3
éthanol	alcool aliphatique	CH ₃ -CH ₂ -OH	1194,8	4

Tableau 4 : Solvants utilisés pour étudier l'effet de la structure de la molécule de solvant sur les réflexes de protection acoustique.

C : carbone ; Me :méthyle ; NB : noyau benzénique.

Les concentrations de solvants indiquées dans le tableau 4, à l'exception de l'éthanol, engendraient des réponses électrophysiologiques de même amplitude que celles induites par 116,2 mM de toluène.

5.4. Effets auditifs d'une injection d'antagonistes des récepteurs neurosensoriels

Les réflexes de protection acoustique cholinergiques font intervenir deux types de récepteurs neurosensoriels : des récepteurs nicotiques et des récepteurs muscariniques. De plus, des récepteurs calciques neuronaux et musculaires contribuent au fonctionnement des boucles d'activation des réflexes de protection. Le protocole de cette étude avait pour but de préciser le mode d'action du solvant sur les récepteurs impliqués dans les réflexes de protection. Les effets d'une injection d'antagonistes de ces récepteurs neurosensoriels auditifs ont été étudiés et comparés avec ceux provoqués par le toluène (Fig. 22). L'amplitude du PMC a été mesurée en réponse à une stimulation sonore *ipsi*-latérale, sur des rats auxquels des antagonistes des récepteurs cholinergiques (atropine, 4-DAMP, DBE) et des récepteurs calciques (vérapamil, ω -ctx MVIIC) ont été injectés. Les antagonistes ont été précisément choisis pour leurs effets au niveau nerveux et musculaire le long des boucles d'activation des réflexes de protection acoustique.

Par ailleurs, les effets de la gentamicine, antibiotique qui inhibe le système auditif efférent médian et qui est cochléotoxique ont également été étudiés.

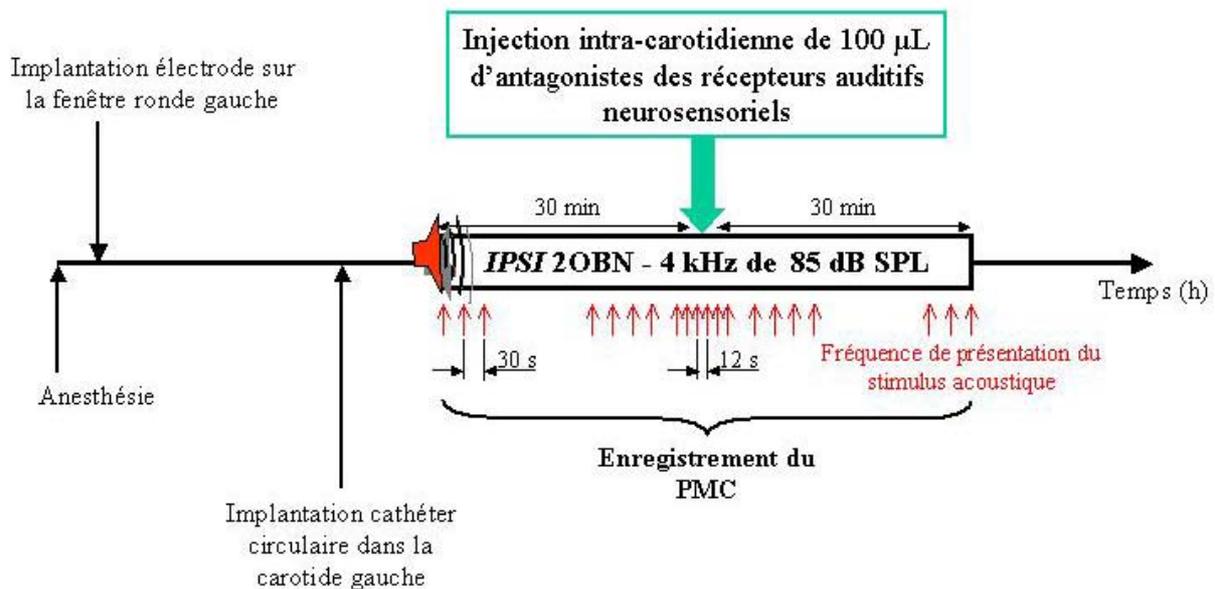


Figure 22 : Effets de divers antagonistes des récepteurs auditifs neurosensoriels : l'atropine, le 4-DAMP, le DBE, la gentamicine, le vérapamil et l' ω -ctx MVIIC.

Le tableau 5 récapitule les conditions expérimentales liées à cette étude :

Mesures du PMC : bolus de 100 μ L, bruit <i>ipsi</i> -latéral (2OBN – 4 kHz) de 85 dB SPL		Nombre de rats testés par concentration
Antagonistes	atropine 325 – 487 et 691 μ M	4
	4-DAMP 44,3 – 88,6 et 122 μ M	4
	DBE 100 – 150 et 175 μ M	4
	vérapamil 312,5 – 625 et 1250 μ M	3
	ω -ctx MVIIC 83,5 – 145,2 et 211,4 μ M	2
	gentamicine 2,2 – 4,4 et 6,7 mM	1 – 1 et 4

Tableau 5 : Conditions expérimentales liées à l'étude des effets d'une injection d'antagonistes des récepteurs neurosensoriels auditifs.

5.5. Effets histopathologiques d'une co-exposition « bruit *ipsi*-latéral et solvant »

Le protocole décrit ci-après était dédié à l'étude des effets histopathologiques provoqués par l'injection de solvant associée à une exposition sonore sur le récepteur auditif et sur les structures auditives supérieures. Pour conforter les données électrophysiologiques, l'organe de Corti, les ganglions spiraux et la strie vasculaire ont été observés en microscopie optique. Une observation complémentaire en microscopie électronique à transmission a été nécessaire pour l'analyse de la strie vasculaire. Quant aux structures auditives supérieures, situées dans le tronc cérébral, les cellules apoptotiques ont été recherchées à l'aide de la technique TUNEL.

Puisque les effets électrophysiologiques étaient réversibles, deux injections intra-artérielles de 100 μ L d'ILip ou d'ILip contenant du solvant ont été effectuées alors que les animaux étaient exposés à un bruit *ipsi*-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL. La durée de l'exposition sonore a été de 80 min (avec une présentation du stimulus toutes les 12 s pendant les périodes d'injection et toutes les 30 s en dehors de ces périodes) et les injections ont été effectuées à 30 et 50 min. En ce qui concerne l'étude du récepteur auditif, les animaux (n = 3 par substance injectée) ont été sacrifiés 30 min après la fin de la seconde injection et la cochlée *ipsi*-latérale a été prélevée. Pour ce qui est de l'étude des structures auditives supérieures par la technique TUNEL, puisque la fragmentation d'ADN est un élément tardif dans le processus d'apoptose, les rats (n = 3 par substance injectée) ont été sacrifiés 8 h après la fin de la seconde injection.

6. Traitements statistiques

L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel Statgraphics, version XV centurion. Les variations d'amplitudes du PMC et de l'onde N1 du PAC, ont été analysées avec une analyse de variance (ANOVA) à un facteur, lorsque les échantillons satisfaisaient aux conditions de normalité et d'homogénéité de variance du résidu, ou avec un test de Kruskal-Wallis (Test K) lorsque la variabilité du résidu n'était pas normalement distribuée et/ou la variance du résidu n'était pas homogène. De plus, pour compléter l'ANOVA ou le test K, un test des étendues multiples ou le graphique des boîtes à moustaches a été utilisé.

Ainsi, dans l'étude *III. 1.*, l'amplitude et la latence des ondes P et Nt ont été analysées en fonction des facteurs suivants :

- la concentration de toluène administré (0 – 58,4 – 116,2 ou 229,5 mM),
- le niveau de pression sonore de la stimulation *ipsi*-latérale (65, 75, 85 ou 95 dB SPL),
- la voie d'injection carotidienne (branche occipitale ou interne).

Concernant l'étude *III. 2.*, les amplitudes de la « suppression *contra*-latérale » et des ondes P et Nt ont été analysées en fonction des facteurs suivants :

- le niveau de pression sonore de la stimulation *ipsi*-latérale (65 ou 85 dB SPL),
- l'état des muscles de l'oreille moyenne (intacts ou sectionnés),
- le côté de l'injection intra-carotidienne (*ipsi*- ou *contra*-latérale).

Pour l'étude *III. 3.*, la variable à expliquer était l'amplitude ou la latence des ondes P et N, tandis que le facteur qualitatif était la nature du solvant administré (toluène, benzène, xylène, NMP, ...).

Enfin, dans l'étude *III. 4.*, l'amplitude et la latence des ondes P et Nt ont été analysées en fonction de la nature de la substance injectée (toluène, antagoniste, ou antibiotique).

Le seuil de confiance des tests a été fixé à 5 %, soit $p < 0,05$ et les résultats statistiques exprimés sous la forme [F(q-1,n-q) = valeur ; p = valeur] pour une ANOVA à un facteur et [K = valeur ; p = valeur] pour un test de Kruskal-Wallis. Dans ces formulations, q-1 et n-q représentent respectivement le nombre de degrés de liberté du modèle et du résidu, q le nombre de groupes, n le nombre d'échantillons, p la valeur de probabilité, et K la valeur du test statistique.

III. Résultats

L'ensemble des résultats décrits ci-après, à l'exception de ceux obtenus avec les antagonistes des récepteurs calciques et de ceux sur les effets histopathologiques, a fait l'objet de publications dans des revues internationales à comité de lecture :

- *Lataye R., Maguin K., Campo P. Increase in cochlear microphonic potential after toluene administration.* Hear. Res. 2007;230(1-2):34-42.
- *Campo P., Maguin K., Lataye R. Effects of aromatic solvents on acoustic reflexes mediated by central auditory pathways.* Toxicol. Sci. 2007 a;99(2):582-590.
- *Campo P. and Maguin K. Solvent-induced hearing loss: mechanisms and prevention strategy.* IJOMEH. 2007;21(3):1-6.

Les données restantes feront l'objet d'un quatrième article (**Toluene-effects on acoustic reflexes: mechanism.**)

Dans le but d'étudier les mécanismes périphériques et centraux à l'origine de la synergie des effets d'une co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques, le fonctionnement du récepteur neurosensoriel et l'activité des voies efférentes centrales impliquées dans les réflexes de protection acoustique ont été évalués au moyen d'une approche expérimentale aiguë. Cette approche reposait sur la mesure de l'amplitude du PMC chez le rat auquel on administrait un bolus intra-carotidien d'Intralipide (ILip) renfermant du toluène

1. Effets auditifs d'une co-exposition « bruit *ipsi*-latéral et toluène »

Puisque les animaux étaient équipés d'un cathéter implanté dans la carotide adjacente à la cochlée bio-instrumentée, la première étape de notre étude a été de s'assurer que l'insertion du cathéter ne perturbe pas les mesures du PMC.

1.1. Relation entre l'intensité de la stimulation acoustique et l'amplitude du PMC

La figure 23 illustre la relation entre l'intensité de la stimulation acoustique *ipsi*-latérale (2OBN – 4 kHz) et l'amplitude du PMC [en dBV (A) et (C) ou en μ V (B)]. Cette relation a été établie avec 12 rats anesthésiés équipés ou non d'un cathéter circulaire placé dans la

carotide contiguë à la cochlée bio-instrumentée. Pour chaque intensité testée, trois valeurs consécutives du potentiel étaient acquises. Chaque point de la figure 23 correspond donc à une moyenne calculée avec trois valeurs.

Sur l'ensemble de la gamme d'intensités testées, les amplitudes du PMC mesurées n'ont pas présenté de différences statistiquement significatives sans ou avec cathéter [Fig. 23 (A)].

Par ailleurs, l'amplitude du PMC pouvait être exprimée, soit en μV [Fig. 23 (B)], soit en dBV [Fig. 23 (C)], sachant que la corrélation entre les deux unités est définie par la relation suivante :

$$\text{dBV} = 20 \log (P_{\text{en } \mu\text{V}} / 1_{\mu\text{V}})$$

où P représente la pression acoustique. Puisque la stimulation acoustique (dB SPL), en abscisse, correspond à une unité logarithmique, une unité logarithmique a également été choisie en ordonnée : le dBV. De ce fait, la relation établie entre l'intensité de la stimulation sonore et l'amplitude du PMC suivait un modèle de type linéaire :

$$y = 0,482 x - 129,460 ; R^2 = 0,814$$

sur la gamme d'intensités testées pour la courbe dBV = f (dB SPL) [Fig. 23 (C)]. Ainsi, les amplitudes moyennes du PMC mesurées pour les stimulations acoustiques *ipsi-latérales* de 65 à 95 dB SPL étaient :

Niveau de pression sonore (dB SPL)	65	75	85	95
Amplitude moyenne du PMC en dBV	-97,2±2,4	-93,7±2,4	-89,8±2,3	-86,5±2,4
Amplitudes moyennes correspondantes en $\mu\text{V} = 10^{(\text{dBV}/20)}$	13,8	20,6	31,6	47,3

Tableau 6 : Amplitudes moyennes (n = 12) du PMC (dBV ou μV) relatives au niveau de pression sonore (dB SPL) de la stimulation acoustique *ipsi-latérale*.

A l'instar de la relation établie chez des animaux non équipés d'un cathéter, l'amplitude du PMC, mesurée chez des rats équipés d'un cathéter dans la carotide adjacente à la cochlée bio-instrumentée, a pu être exprimée selon un modèle linéaire sur la gamme d'intensités testées. Ainsi, la mise en place du cathéter ne semble pas interférer avec les mesures du PMC.

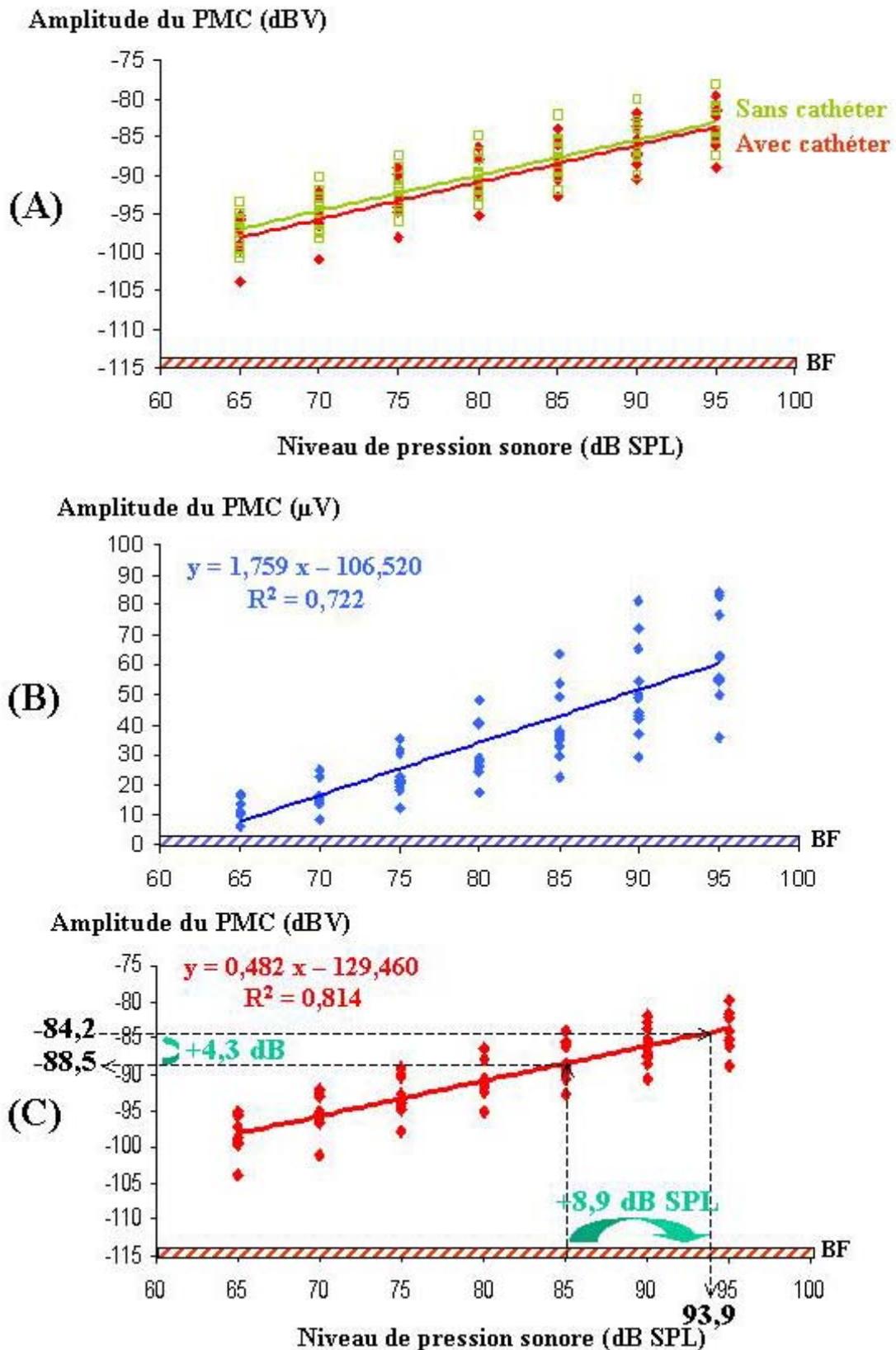


Figure 23 : Relation entre l'intensité de la stimulation sonore et l'amplitude du PMC. (A) Amplitudes du PMC (en dBV) mesurées sans ou avec le cathéter circulaire, en réponse à un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz. Amplitudes du PMC, en μ V (B) et en dBV (C), mesurées avec le cathéter circulaire, en réponse à un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz. Les équations des droites de régression linéaire et le coefficient de détermination sont exprimés sous la forme $y = a x + b$ et R^2 .

BF : bruit de fond.

Puisque l'insertion du cathéter dans la carotide ne perturbe pas les mesures du PMC, nous avons donc utilisé ce modèle pour étudier les effets d'une co-exposition au bruit et au toluène.

1.2. Effets d'une injection de toluène sur l'amplitude du PMC

Pour tester la pertinence de l'approche expérimentale, les variations d'amplitude du PMC ont été mesurées au cours d'une injection intra-carotidienne d'un bolus d'ILip renfermant du toluène. La concentration de toluène administré et le niveau de pression sonore de la stimulation utilisée pour déclencher le PMC ont été étudiés séparément. Par ailleurs, l'influence de l'injection de solvant dans les différentes branches carotidiennes a été évaluée.

1.2.1. Effets de la concentration de toluène

La figure 24 représente les enregistrements du PMC en réponse à un bruit *ipsi*-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL, acquis avant, pendant et après l'injection d'un bolus de 100 µL d'ILip contenant du toluène aux concentrations suivantes : 0 – 58,4 – 116,2 ou 229,5 mM. L'administration intra-carotidienne du véhicule seul, soit 0 mM de toluène, pendant 30 s, n'a pas induit de variations d'amplitude du PMC. En revanche, les injections de solvant ont provoqué une augmentation transitoire de l'amplitude du PMC, que l'on a appelée onde P ; elle était suivie d'une diminution de l'amplitude du PMC, que l'on a appelée onde N.

Les variations d'amplitude du PMC ont été calculées de la façon suivante :

- l'onde P, en dB, correspond à la différence entre l'amplitude maximale atteinte suite à l'injection et l'amplitude moyenne du niveau de base du potentiel,
- l'onde N correspond à la différence entre l'amplitude minimale atteinte suite à l'injection et l'amplitude moyenne du niveau de base du potentiel.

Si l'administration d'un bolus contenant 58,4 mM de toluène a provoqué uniquement une onde N, les deux autres concentrations testées 116,2 et 229,5 mM ont engendré une onde P, puis une onde N. Les latences des ondes N engendrées par l'injection de 58,4 ou de 116,2 et 229,5 mM de toluène étant différentes, nous avons défini deux types d'ondes négatives en fonction de leur délai d'apparition : une onde précoce, dite N_p, de latence inférieure à 100 s, et une onde tardive, dite N_t, de latence supérieure à 100 s.

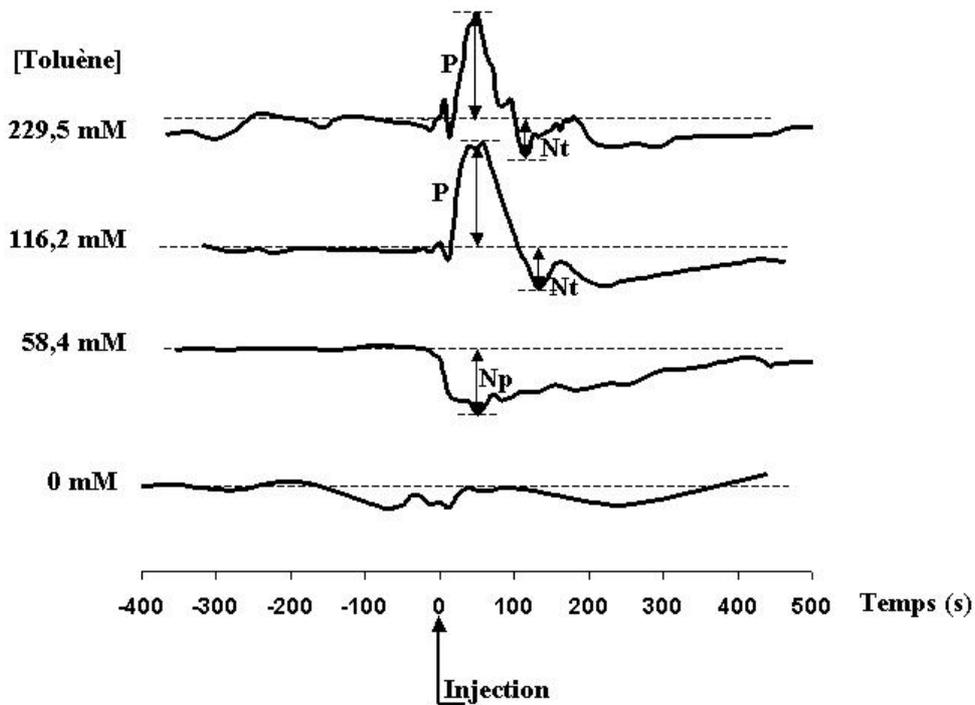


Figure 24 : Enregistrements du PMC obtenus en réponse à un bruit ipsi-latéral de 20BN - 4 kHz de 85 dB SPL, avant, pendant et après l'injection d'un bolus de 100 µL d'ILip contenant du toluène à différentes concentrations. L'injection dure 30 s. Chaque courbe correspond à l'enregistrement du PMC chez un animal. P : onde positive ; Np : onde négative précoce ; Nt : onde négative tardive.

□ Amplitude des ondes P et N

Les amplitudes moyennes de variation du PMC en fonction de la concentration de toluène injecté sont illustrées par la figure 25. Les conditions d'exposition des animaux étaient similaires à ceux de la figure 24 et sont précisées dans la légende de la figure 25.

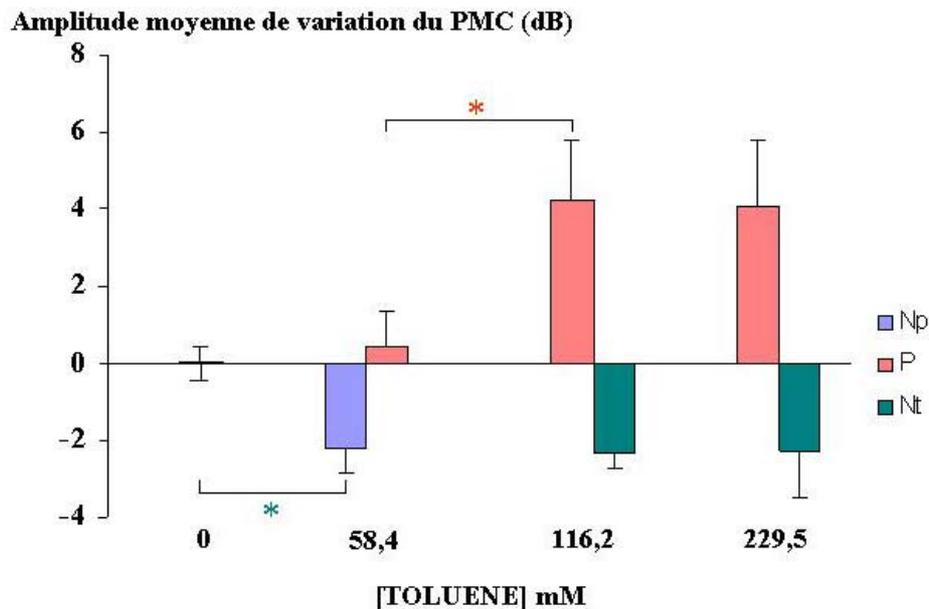


Figure 25 : Amplitudes moyennes ($n = 5$ par concentration testée) des ondes P et N du PMC mesurées lors d'injections de 100 µL de 0 - 58,4 - 116,2 et 229,5 mM de toluène dans de l'ILip. Les animaux ont été stimulés avec un bruit ipsi-latéral de 20BN - 4 kHz de 85 dB SPL. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types. * : différence statistiquement significative déterminée d'après le graphique des boîtes à moustaches. P : onde positive ; Np : onde négative précoce ; Nt : onde négative tardive.

Les amplitudes des ondes P mesurées pour les quatre concentrations de toluène testées étaient statistiquement différentes [$K = 13,59$; $p = 0,004$]. D'après le graphique des boîtes à moustaches, cette différence d'amplitude était significative entre les groupes d'animaux exposés à 58,4 et 116,2 mM de toluène. En revanche, elle n'était pas significative entre les groupes ayant reçus des injections d'ILip (0 mM de toluène) et de 58,4 mM de toluène ($0,0 \pm 0,4$ vs. $0,4 \pm 0,9$ dB) et entre les groupes ayant reçu 116,2 et 229,5 mM de toluène ($4,3 \pm 1,5$ vs. $4,1 \pm 1,7$ dB).

Dans la gamme de concentrations testées, l'administration artérielle d'un bolus de 116,2 mM de toluène était nécessaire et suffisante pour provoquer une augmentation de l'amplitude du PMC ($4,3 \pm 1,5$ dB) en réponse à une stimulation sonore de 85 dB SPL. Cette concentration a donc été considérée comme la concentration de référence pour les études suivantes.

Si l'on se réfère à la relation amplitude du PMC/niveau de pression sonore du stimulus [Fig. 23 (C)], cette augmentation de 4,3 dB du PMC, mesurée avec un bruit de 85 dB SPL, correspondrait à une variation du potentiel qui aurait été engendrée par une augmentation de 8,9 dB SPL de la stimulation acoustique, soit $85 \text{ dB} + 8,9 \text{ dB} = 93,9 \text{ dB SPL}$.

Concernant les ondes N du PMC, les amplitudes mesurées pour les quatre concentrations de toluène testées étaient statistiquement différentes [$K = 11,03$; $p = 0,012$]. D'après le graphique des boîtes à moustaches, cette différence d'amplitude était seulement significative entre les groupes d'animaux exposés à 0 et 58,4 mM de toluène mais la différence entre les amplitudes des ondes Np et Nt ne l'était pas. Une onde Np d'une amplitude de $-2,2 \pm 0,6$ dB a été obtenue avec les injections de 58,4 mM de toluène, tandis que des ondes Nt, d'amplitudes semblables ($-2,3 \pm 0,4$ et $-2,3 \pm 1,2$ dB), ont été obtenues avec des injections respectives de 116,2 et 229,5 mM de toluène.

□ Latence des ondes P et N

Le tableau 7 reporte les latences moyennes des ondes P et N en fonction des diverses concentrations de toluène testées. La latence moyenne de l'onde P_{58,4 mM} n'a pas pu être déterminée étant donné que l'onde P n'a été obtenue qu'avec un seul des animaux du groupe. Par contre, une onde Np a été obtenue sur l'ensemble des rats de ce groupe. D'un point de vue statistique, les latences des diverses ondes, P, Np et Nt, étaient différentes [$K = 19,16$;

p = 0,002] entre elles, cependant il n'y avait pas de différence significative de latence entre les ondes P et Np.

Concentrations de toluène (mM)	Latences moyennes des ondes (s)		
	Np	P	Nt
58,4	52,8 ± 13,7	ND	-
116,2	-	40,8 ± 6,6	127,2 ± 40,3
229,5	-	48,0 ± 20,8	124,8 ± 37,8

Tableau 7 : Latences moyennes (n = 5 par concentration testée) des ondes P et N du PMC relatives à la concentration de toluène injecté. Les rats ont été stimulés avec un bruit ipsi-latéral de 20BN – 4 kHz de 85 dB SPL et ont reçu un bolus de 100 µL d'ILip contenant du toluène.

P : onde positive ; Np : onde négative précoce ; Nt : onde négative tardive.

ND : valeur moyenne non déterminée.

Trois conclusions se dégagent de cette étude :

- l'amplitude de l'onde P dépend de la concentration de toluène administré,
- 116,2 mM est la concentration minimale de toluène requise pour produire une onde P,
- l'onde Np_{58,4 mM} a une latence comparable à celle des ondes P_{116,2} et P_{229,5 mM}.

Avec l'approche expérimentale utilisée dans cette étude, l'injection intra-carotidienne d'un bolus de 116,2 mM de toluène a provoqué une augmentation de l'amplitude du PMC. Ce résultat était inattendu puisque d'après les propriétés cochléotoxiques avérées du toluène, nous nous attendions à ce que l'injection intra-carotidienne de ce solvant provoque une diminution du PMC.

Si l'augmentation de l'amplitude du PMC ne s'explique pas par les effets cochléotoxiques du toluène, elle pourrait être la conséquence d'un autre effet périphérique ou alors d'une perturbation du fonctionnement physiologique des centres nerveux supérieurs.

Pour déterminer l'origine de l'onde P, périphérique ou centrale, l'effet du niveau de pression sonore et l'influence de l'injection d'un bolus de toluène en direction de la cochlée ou du tronc cérébral ont été étudiés.

1.2.2. Effets du niveau de pression sonore

□ Amplitude des ondes P et N

L'effet du niveau de pression sonore sur l'amplitude des ondes P et Nt du PMC, au cours d'une injection d'un bolus d'ILip chargé en toluène, est illustré par la figure 26. Les animaux étaient stimulés avec un bruit *ipsi*-latéral de 2OBN – 4 kHz de 65, 75, 85 ou 95 dB SPL et recevaient une injection de 100 µL d'ILip contenant 116,2 mM de toluène, c'est-à-dire la plus faible concentration donnant une onde P sur le PMC dont l'amplitude était supérieure à 4 dB.

La figure 26 montre que l'amplitude de l'onde P variait de façon statistiquement significative [$K = 12,58$; $p = 0,006$] en fonction de l'intensité de la stimulation acoustique : plus le niveau de pression sonore était élevé, plus l'amplitude de l'onde P était grande. D'après le graphique des boîtes à moustaches, les amplitudes significativement différentes concernaient les niveaux de pression sonore situés entre 75 et 85 dB SPL ($1,2 \pm 1,7$ vs. $4,3 \pm 1,5$ dB respectivement).

Quant à l'onde Nt du PMC, l'intensité de la stimulation sonore n'a pas eu d'effet (Test K ; $p > 0,05$) sur son amplitude.

Amplitude moyenne de variation du PMC (dB)

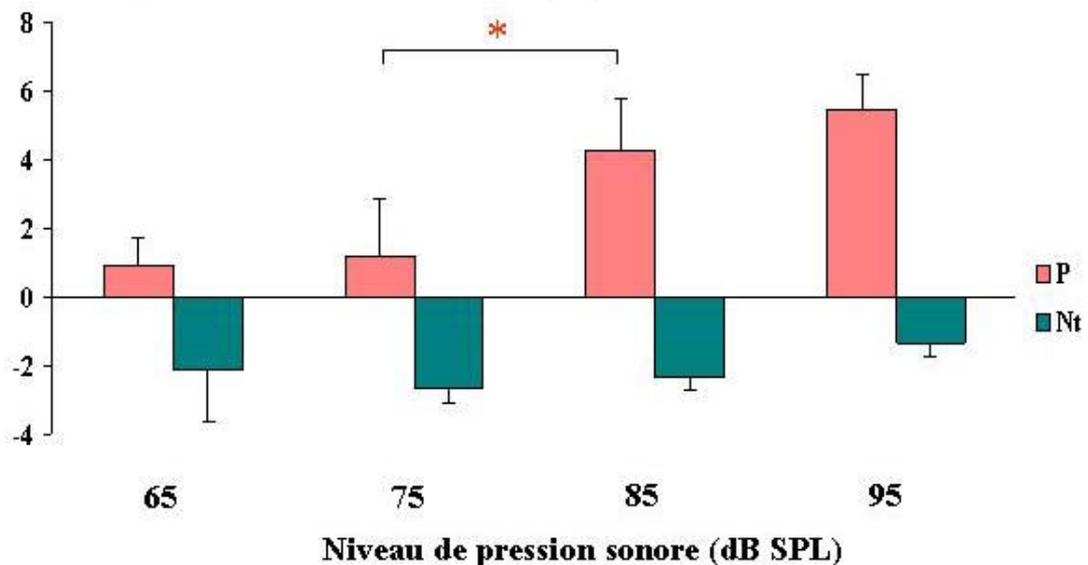


Figure 26 : Amplitudes moyennes des ondes P et Nt du PMC en fonction de l'intensité de la stimulation sonore. Les animaux ($n = 5$ pour les groupes 65, 75 et 85 dB et $n = 4$ pour le groupe 95 dB SPL) ont été stimulés avec un bruit *ipsi*-latéral de 2OBN – 4 kHz et ont reçu un bolus de 100 µL d'ILip contenant 116,2 mM de toluène. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types.

* : différence statistiquement significative déterminée d'après le graphique des boîtes à moustaches.

P : onde positive ; Nt : onde négative tardive.

□ Latence des ondes P et N

Les latences des ondes P et Nt du PMC mesurées en fonction du niveau de pression sonore de la stimulation ont été reportées dans le tableau 8. Il existe une différence significative entre les latences des ondes P et Nt, cependant l'intensité de la stimulation sonore n'a pas d'influence sur le délai d'apparition de ces deux ondes (Test K ; $p > 0,05$).

dB SPL	Latences moyennes des ondes (s)	
	P	Nt
65	38,4 ± 10,0	108,0 ± 9,8
75	33,0 ± 6,0	103,2 ± 47,7
85	40,8 ± 6,6	127,2 ± 40,3
95	45,0 ± 6,0	145,5 ± 38,1

Tableau 8 : Latences moyennes des ondes P et Nt du PMC en fonction de l'intensité de la stimulation sonore. Les rats, $n = 5$ pour les groupes 65, 75 et 85 dB et $n = 4$ pour le groupe 95 dB SPL, ont été stimulés avec un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz et ont reçu un bolus de 100 μ L d'ILip contenant 116,2 mM de toluène. P : onde positive ; Nt : onde négative tardive.

Les résultats de cette expérimentation peuvent se résumer ainsi :

- l'amplitude de l'onde P dépend de l'intensité de la stimulation sonore,
- un niveau de pression sonore de 85 dB SPL est nécessaire et suffisant pour observer une onde P dont l'amplitude est supérieure à 4 dB.

1.2.3. Influence de l'injection d'un bolus de toluène dans les branches carotidiennes interne et occipitale

Avec cette expérience, l'impact de notre bolus de solvant de référence (100 μ L d'ILip renfermant 116,2 mM de toluène) dirigé soit vers la cochlée, soit vers le système nerveux central, a été étudié. La figure 27 illustre l'enregistrement du PMC obtenu en fonction des différentes conditions expérimentales testées. La stimulation acoustique était un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL, les bolus de solvant étaient injectés soit dans le tronc commun de la carotide [branches interne et occipitale (a)], soit dans la branche occipitale (c), soit dans la branche interne (b) de la carotide.

Amplitude normalisée du PMC (dBV)

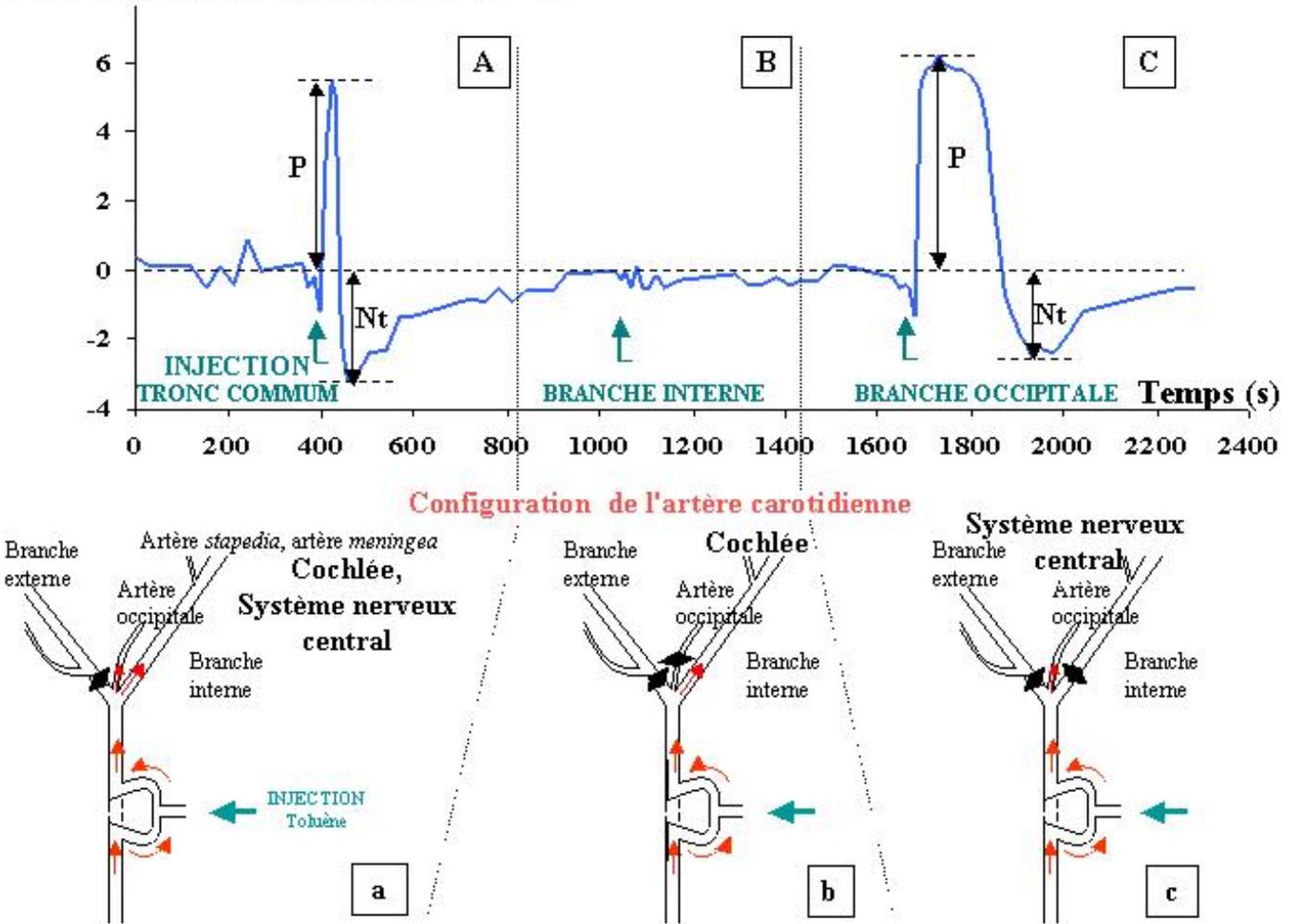


Figure 27 : En haut : Enregistrement du PMC obtenu en réponse à un bruit ipsi-latéral de 20BN – 4 kHz de 85 dB SPL, avant, pendant et après des injections de 100 μ L d'ILip contenant 116,2 mM de toluène dans les différentes branches de la carotide. Trois injections ont été réalisées : la première à 396, la seconde à 1044 et la troisième à 1668 s. La courbe correspond à l'enregistrement du PMC obtenu avec un seul animal.
En bas : Configuration de l'artère carotidienne au moment de l'injection.
P : onde positive ; Nt : onde négative tardive. \blacklozenge : ligature.

Dans l'exemple illustré par la figure 27, l'injection dans la branche occipitale de la carotide (c) a engendré une onde P et une onde Nt de mêmes amplitudes que celles obtenues avec une injection dans le tronc commun de la carotide (a). Cependant, les durées des ondes P et Nt (C) étaient plus grandes lorsque le solvant était administré en (c) par rapport à celles mesurées en (a). Soulignons que l'injection de solvant dans la branche interne (b) n'a produit que de faibles variations dont les amplitudes n'étaient pas différentes de celles mesurées pour des injections d'ILip dans le tronc commun de la carotide ($0,0 \pm 0,4$ dB, Fig. 25).

□ **Amplitude des ondes P et N**

Configuration de l'injection	Amplitudes moyennes des ondes du PMC (dB)	
	P	Nt
tronc commun : branches interne & occipitale	5,0 ± 0,9 	-2,5 ± 0,4 
branche interne	 0,4 ± 0,8 	 -0,4 ± 0,8 
branche occipitale	*  6,2 ± 0,5	*  -1,8 ± 0,4

Tableau 9 : Amplitudes moyennes ($n = 4$) des ondes P et Nt du PMC relatives à la configuration de l'injection intra-carotidienne. Les animaux ont été stimulés avec un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL et ont reçu des bolus de 100 μ L d'ILip renfermant 116,2 mM de toluène.

* : différence statistiquement significative déterminée d'après le test des étendues multiples.

P : onde positive ; Nt : onde négative tardive.

D'un point de vue statistique, l'injection du bolus d'ILip chargé en toluène dans l'une ou l'autre des branches carotidiennes a conditionné l'obtention des ondes du PMC : [$F_{\text{onde P}}(2,9) = 66,22$; $p < 0,05$] et [$F_{\text{onde Nt}}(2,9) = 15,41$; $p = 0,001$]. D'après le test des étendues multiples, seules les amplitudes des ondes P et Nt observées lors de l'injection du bolus de solvant dans la branche interne de la carotide étaient statistiquement différentes de celles observées d'une part, lors de l'injection dans le tronc commun de la carotide et d'autre part, lors de l'injection dans la branche occipitale de la carotide. Le passage du bolus de solvant par l'artère occipitale semble donc être la condition requise pour observer les ondes P et Nt du PMC.

□ **Latence des ondes P et N**

Le tableau 10 présente les latences moyennes des ondes P et Nt du PMC en fonction de la configuration de l'injection intra-carotidienne. Les latences relatives à l'injection dans la branche interne de la carotide n'ont pas pu être déterminées puisque seul un animal sur les quatre expérimentés a donné une onde P ou Nt. Les injections dans la branche carotidienne occipitale ont statistiquement modifié la latence de l'onde Nt du PMC ($K = 4,08$; $p = 0,043$).

Configuration de l'injection	Latences moyennes des ondes (s)	
	P	Nt
tronc commun : branches interne & occipitale	30,0 ± 12,0	84,0 ± 25,9
branche interne	ND	ND
branche occipitale	42,0 ± 15,5	186,0 ± 77,5

Tableau 10 : Latences moyennes ($n = 4$) des ondes P et Nt du PMC relatives à la configuration de l'injection intra-carotidienne. Les rats ont été stimulés avec un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL et ont reçu des bolus de 100 μ L d'ILip contenant 116,2 mM de toluène.

* : différence statistiquement significative déterminée d'après le graphique des boîtes à moustaches.

P : onde positive ; Nt : onde négative tardive. ND : valeur moyenne non déterminée.

Compte tenu des risques hémorragiques encourus par les animaux lors de l'isolation de l'artère occipitale, et de l'absence de différence d'amplitude des ondes P et Nt entre les deux configurations d'injection : branche occipitale vs. branches interne & occipitale (Tableau 9), nous avons préféré conserver une implantation du cathéter dans le tronc commun de la carotide sans ligature de l'artère occipitale pour la suite de nos expérimentations.

Puisque l'amplitude de l'onde P est influencée par le niveau de pression sonore et que l'injection du bolus de solvant en direction du tronc cérébral est une condition requise pour observer les variations d'amplitude du PMC, l'effet du toluène sur les centres nerveux supérieurs semble être l'hypothèse la plus vraisemblable.

Les protocoles expérimentaux initiaux privilégiaient l'hypothèse d'une action du solvant sur la cochlée. Le spectre de la stimulation ipsi-latérale pour la mesure du PMC avait d'ailleurs été choisi dans ce sens afin de stimuler un grand nombre de CCE. La progression du solvant dans la cochlée se faisant par la strie vasculaire, nous avons parallèlement envisagé de mesurer le potentiel endocochléaire produit par l'activité de la pompe Na^+ , K^+ -ATPase, du co-transporteur Na^+ , 2Cl^- , K^+ et des canaux K^+ voltage-dépendants présents dans la strie. Ces mesures auraient été complétées par l'utilisation d'antagonistes de la pompe, du co-transporteur et des canaux afin de tester une possible perturbation de ces éléments par le solvant. En raison de l'hypothèse d'action du toluène sur les centres nerveux supérieurs plutôt que sur la cochlée, nous avons été amenés à réorienter nos recherches pour privilégier l'étude de l'effet central du solvant.

Comme l'amplitude de l'onde P variait en fonction de l'intensité de la stimulation sonore, l'action du toluène sur les voies efférentes impliquées dans les réflexes de protection acoustique, dont les déclenchements dépendent d'une certaine intensité du stimulus sonore, a été suspectée puis testée.

2. Effets auditifs d'une co-exposition « bruit *contra*-latéral et toluène »

L'objectif de cette étude était d'éprouver les effets du toluène sur les réflexes de protection acoustique déclenchés par les fibres olivo-cochléaires médianes pour le réflexe de l'oreille interne (ROI) et par les moto-neurones pour le réflexe de l'oreille moyenne (ROM).

2.1. Effets du toluène sur les réflexes de protection acoustique : mesures du PMC

L'amplitude du PMC a été mesurée en réponse à un bruit *ipsi*-latéral de 2OBN – 4 kHz de 65 ou 85 dB SPL, alors que les réflexes de protection acoustique (ROI et ROM) ont été déclenchés par un bruit *contra*-latéral de OBN – 12,5 kHz de 110 dB SPL. Les variations d'amplitude du PMC ont été mesurées lors d'injections de 100 µL d'ILip contenant 116,2 mM de toluène.

2.1.1. Muscles de l'oreille moyenne intacts

Les courbes noires des figures 28 et 29 représentent les enregistrements du PMC en réponse aux stimulations *ipsi*- et *contra*-latérale, avant, pendant et après l'injection d'un bolus de toluène. Les animaux avaient leurs réflexes de protection acoustique intacts.

La figure 28 illustre l'enregistrement du PMC en réponse à une stimulation sonore *ipsi*-latérale de 65 dB SPL. Le potentiel a accusé une baisse d'amplitude de 7,9 dB à -168 s lors du déclenchement de la stimulation *contra*-latérale ; cette diminution de l'amplitude du PMC a été appelée « suppression *contra*-latérale ». L'amplitude du PMC est retournée à sa valeur initiale, à 318 s, après l'arrêt de la stimulation *contra*-latérale. La « suppression *contra*-latérale » était donc parfaitement synchronisée à la stimulation *contra*-latérale et au déclenchement des réflexes de protection acoustique.

L'injection de solvant a provoqué, quant à elle, une augmentation transitoire de l'amplitude du PMC. L'onde P (9,0 dB / 36 s) a été suivie d'une diminution temporaire de l'amplitude du PMC : l'onde Nt (-2,5 dB / 120 s). Puisque l'onde P annulait les effets des

réflexes de protection, elle traduisait ainsi une inhibition des réflexes de protection, tandis que l'onde Nt qui accentuait les effets des réflexes correspondait à une potentialisation des réflexes de protection. De part ses deux effets, le solvant a donc momentanément perturbé les effets des réflexes de protection déclenchés par la stimulation *contra*-latérale.

Comme illustré par la figure 29, l'injection d'un bolus d'ILip contenant du toluène, associée à une stimulation *ipsi*-latérale de 85 dB SPL, a provoqué une onde P suivie d'une onde Nt.

Soulignons que ces ondes P (4,8 dB / 48 s) et Nt (-1,6 dB / 96 s) engendrées par l'injection de solvant étaient équivalentes à celles observées sur des animaux exposés à une stimulation *ipsi*-latérale seule de 85 dB SPL (onde P : $4,3 \pm 1,5$ dB / $40,8 \pm 6,6$ s et onde Nt : $-2,3 \pm 0,4$ dB / $127,2 \pm 40,3$ s) [Cf. III. 1.2.1. ou 1.2.2.]. D'après ces résultats, il semble que les variations d'amplitude du PMC induites par le toluène lors d'une stimulation *ipsi*-latérale seule, de 85 dB SPL, traduisent une perturbation des réflexes de protection : une stimulation *ipsi*-latérale d'au moins 85 dB SPL est donc suffisante pour observer les effets perturbateurs (inhibition et potentialisation) du toluène sur les réflexes de protection. Bien que l'approche expérimentale aiguë ait été développée en vue d'étudier les effets du toluène sur la cochlée, elle permet également d'étudier l'effet du solvant sur le système nerveux central.

Nous venons de montrer que le toluène peut perturber les réflexes de protection. La question qui se pose alors est :

le toluène perturbe-t-il le réflexe de l'oreille moyenne, celui de l'oreille interne ou les deux ?

2.1.2. Muscles de l'oreille moyenne sectionnés

Des animaux dont les muscles de l'oreille moyenne avaient été sectionnés, ont été exposés aux mêmes conditions expérimentales que celles indiquées dans le paragraphe précédent. Les courbes bleues des figures 28 et 29 correspondent à l'enregistrement du PMC de deux animaux privés de leurs muscles de l'oreille moyenne.

Amplitude normalisée du PMC (dBV)

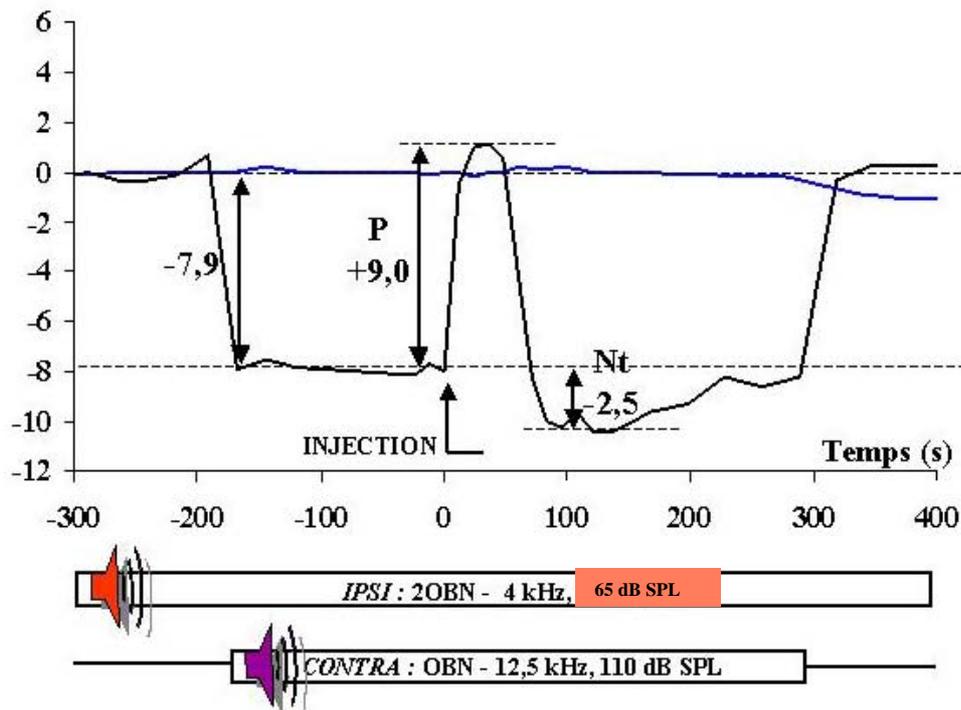


Figure 28 : Enregistrements du PMC obtenus avec un animal ayant les muscles de l'oreille moyenne intacts (courbe noire) et avec un animal ayant les muscles de l'oreille moyenne sectionnés (courbe bleue). Bruit ipsi-latéral : 2OBN - 4 kHz de 65 dB SPL ; bruit contra-latéral : OBN - 12,5 kHz de 110 dB SPL ; injection : 100 μ L d'ILip contenant 116,2 mM de toluène. L'injection dure 30 s. Le déclenchement et l'arrêt du bruit contra-latéral ont été respectivement opérés à -168 et 288 s.

Amplitude normalisée du PMC (dBV)

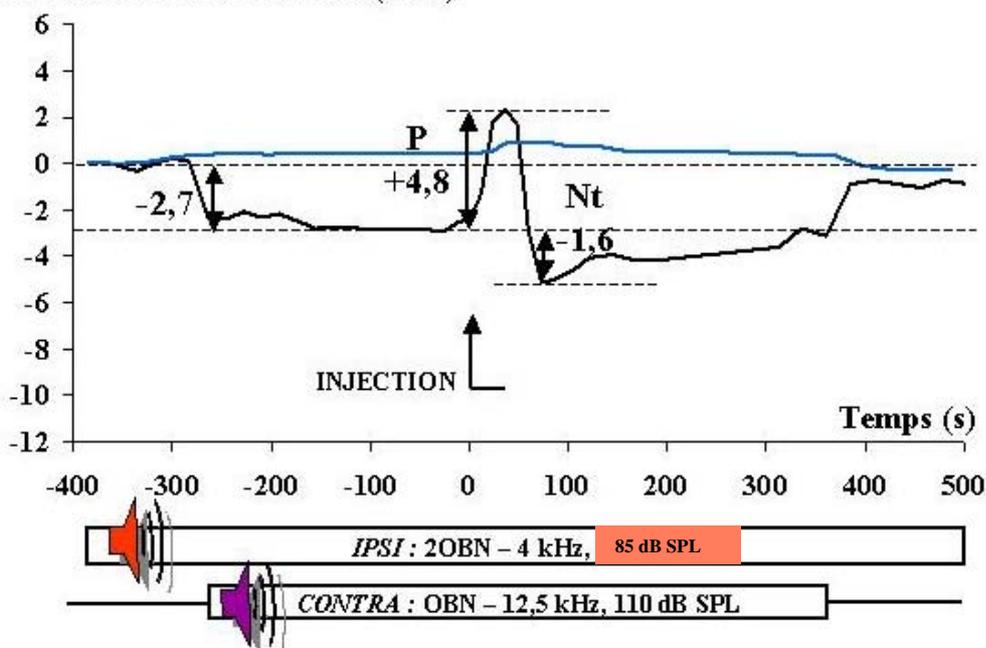


Figure 29 : Enregistrements du PMC obtenus avec un animal ayant les muscles de l'oreille moyenne intacts (courbe noire) et avec un animal ayant les muscles de l'oreille moyenne sectionnés (courbe bleue). Bruit ipsi-latéral : 2OBN - 4 kHz de 85 dB SPL ; bruit contra-latéral : OBN - 12,5 kHz de 110 dB SPL ; injection : 100 μ L d'ILip contenant 116,2 mM de toluène. L'injection dure 30 s. Le déclenchement et l'arrêt du bruit contra-latéral ont été respectivement opérés à -264 et 360 s.

Quelle que soit l'intensité de la stimulation *ipsi*-latérale, 65 ou 85 dB SPL, ni le déclenchement de la stimulation *contra*-latérale, ni l'injection de solvant n'a produit de variations d'amplitude du PMC (*Tableau 11*).

D'après le tableau 11, en comparant les variations d'amplitude du PMC en fonction des deux niveaux de pression sonore de la stimulation *ipsi*-latérale, il est apparu que :

- l'amplitude de la « suppression *contra*-latérale » ($-5,8 \pm 1,9$ à 65 dB et $-2,8 \pm 0,1$ dB à 85 dB SPL) variait de façon statistiquement significative [$K = 3,86$; $p = 0,049$] en fonction du niveau de pression sonore de la stimulation *ipsi*-latérale,
- en revanche, l'amplitude des ondes P et Nt ($6,4 \pm 2,3$ à 65 dB et $5,5 \pm 1,7$ dB à 85 dB SPL pour l'onde P) ne dépendait pas du niveau de pression sonore de la stimulation *ipsi*-latérale (Test K ; $p > 0,05$).

Concernant les variations d'amplitude du PMC en fonction de l'état des muscles de l'oreille moyenne (intacts ou sectionnés), il est apparu que :

- l'amplitude de la « suppression *contra*-latérale » dépendait [$K = 4,50$; $p = 0,034$] de la présence ou non des muscles de l'oreille moyenne, donc du fonctionnement du ROM ($-2,8 \pm 0,1$ vs. $0,1 \pm 0,4$ dB avec les muscles de l'oreille moyenne fonctionnels vs. non fonctionnels),
- les amplitudes des ondes P et Nt variaient en fonction de l'état des muscles de l'oreille moyenne. A 85 dB SPL, les amplitudes de P étaient égales à $5,5 \pm 1,7$ avec les muscles de l'oreille moyenne intacts et à $0,3 \pm 0,1$ dB avec les muscles de l'oreille moyenne sectionnés. Une telle différence était statistiquement significative [$K = 4,58$; $p = 0,032$]. De même, les amplitudes de Nt étaient statistiquement différentes [$K = 5,48$; $p = 0,019$] sans et avec les muscles de l'oreille moyenne sectionnés. Ainsi, la présence de l'onde P et de l'onde Nt induites par le bolus de toluène était conditionnée par la présence des muscles de l'oreille moyenne intacts c'est-à-dire par la présence du ROM fonctionnel.

Amplitudes moyennes (dB)			MOMs	Intensité de la stimulation ipsi-latérale
« suppression <i>contra</i> -latérale »	Onde P	Onde Nt		
-5,8 ± 1,9	6,4 ± 2,3	-2,2 ± 1,2	intacts	65 dB SPL
* 0,1 ± 0,8	* 0,3 ± 0,3	* -0,1 ± 0,2	sectionnés	
-2,8 ± 0,1	5,5 ± 1,7	-2,2 ± 0,7	intacts	85 dB SPL
* 0,1 ± 0,4	* 0,3 ± 0,1	* 0,0 ± 0,0	sectionnés	

Tableau 11 : Amplitudes moyennes ($n = 3$) de la « suppression *contra*-latérale » et des ondes P et Nt du PMC. Les rats dont les muscles de l'oreille moyenne étaient ou non sectionnés, ont été stimulés avec un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz et avec un bruit *contra*-latéral de OBN – 12,5 kHz de 110 dB SPL et ont reçu un bolus d'ILip renfermant 116,2 mM de toluène.

* : différence statistiquement significative.

MOMs : muscles de l'oreille moyenne ; P : onde positive ; Nt : onde négative tardive.

Il apparaît ainsi que, dans nos conditions expérimentales, les réflexes de protection, et en particulier le ROM, peuvent être perturbés par le toluène. De plus, il semble que les ondes P et Nt soient, toutes les deux, le résultat d'une action du toluène sur le ROM.

Jusqu'à présent nous avons étudié l'activité électrique des cellules ciliées externes (CCE) de l'organe de Corti. Puisque la libération de glutamate par les cellules ciliées internes est intimement liée à l'activité des CCE, la perturbation des réflexes de protection par le toluène devrait également avoir des conséquences sur l'activité des CCI et par là même, sur celle des fibres nerveuses afférentes.

2.2. Effets du toluène sur les réflexes de protection acoustique : mesures de l'onde N1 du PAC

L'amplitude de l'onde N1 du PAC a été mesurée en réponse à des « tone burst » ipsi-latéraux (4 kHz, 85 dB SPL) alors que les réflexes de protection de l'oreille étaient déclenchés par un bruit *contra*-latéral de OBN – 12,5 kHz de 110 dB SPL. Dans cette série d'expérimentations, les variations d'amplitude de l'onde N1 du PAC ont été mesurées avec des injections de 200 μ L d'ILip renfermant 116,2 mM de toluène.

2.2.1. Muscles de l'oreille moyenne intacts

La courbe noire de la figure 30 correspond à l'enregistrement du PAC chez un animal ayant les muscles de l'oreille moyenne intacts. Elle est représentative de la réponse obtenue sur le groupe d'animaux expérimentés dans les mêmes conditions. L'addition du bruit *contra*-latéral, à -36 s, a provoqué une « suppression *contra*-latérale » de 5,9 dB sur l'amplitude du PAC. L'arrêt de la stimulation, à 156 s, a annulé la « suppression *contra*-latérale ». Cette dernière était donc synchronisée à la stimulation *contra*-latérale. Ces résultats confortent ceux obtenus avec les mesures du PMC, la stimulation *contra*-latérale active effectivement les réflexes de protection acoustique.

A l'instar de la réponse du PMC, une onde P (4,7 dB / 36 s), suivie d'une onde Nt (1,4 dB / 120 s) apparaissent lors de l'injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène. L'augmentation de l'amplitude de l'onde N1 du PAC synchronisée à l'injection de toluène traduisait l'inhibition transitoire de la « suppression *contra*-latérale ».

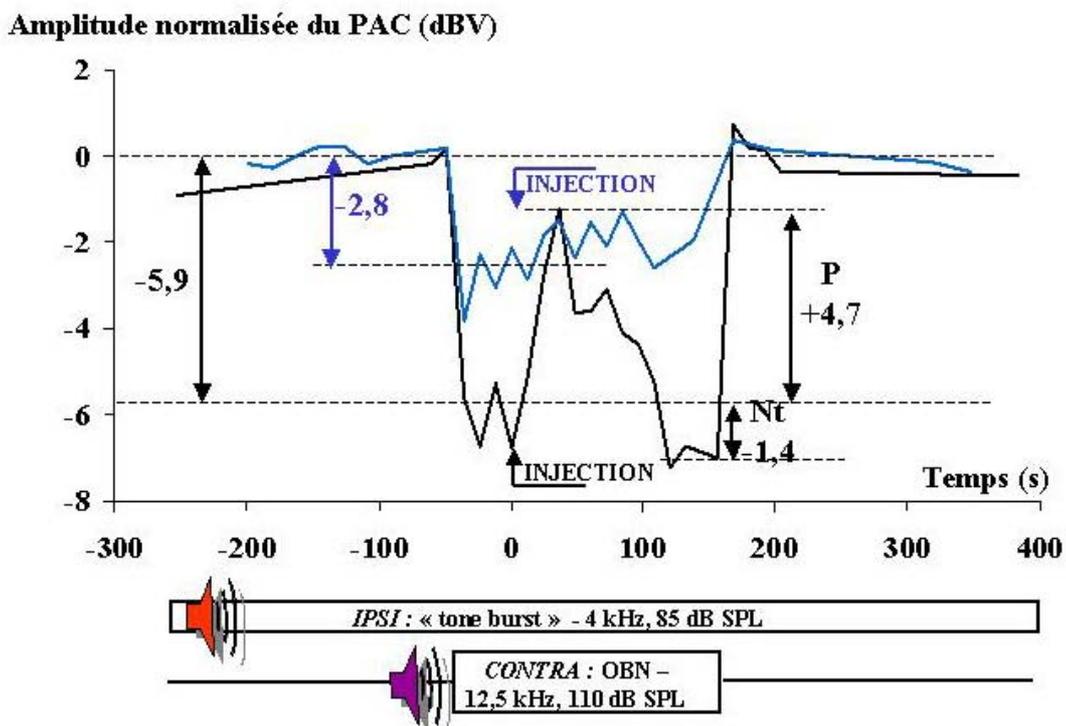


Figure 30 : Enregistrements du PAC (amplitude de l'onde N1) obtenus avec un animal ayant les muscles de l'oreille moyenne intacts (courbe noire) et un animal ayant les muscles de l'oreille moyenne sectionnés (courbe bleue). « Tone burst » ipsi-latéral : 4 kHz de 85 dB SPL ; bruit *contra*-latéral : OBN - 12,5 kHz de 110 dB SPL ; injection : 200 μ L d'ILip renfermant 116,2 mM de toluène. L'injection dure 60 s. Le déclenchement et l'arrêt du bruit *contra*-latéral ont été respectivement opérés à -36 et 156 s.

2.2.2. Muscles de l'oreille moyenne sectionnés

La courbe bleue de la figure 30 correspond à l'enregistrement du PAC chez à un animal privé des muscles de l'oreille moyenne. L'enregistrement obtenu chez ce rat est représentatif du groupe d'animaux auquel il appartient. Alors que la stimulation *contra*-latérale a provoqué une diminution de l'amplitude du PAC, l'injection d'un bolus d'ILip contenant du toluène n'a pas engendré de variation d'amplitude du PAC.

Le tableau 12 ci-dessous résume les variations d'amplitude du PAC, mesurées sur des animaux ayant les muscles de l'oreille moyenne intacts ou sectionnés. D'un point de vue statistique, l'amplitude de la « suppression *contra*-latérale » et celle de l'onde P variaient de façon significative [$K = 3,86$; $p = 0,049$] en fonction de l'état des muscles de l'oreille moyenne. Au contraire, celle de l'onde Nt n'était pas statistiquement différente (Test K ; $p > 0,05$).

Amplitudes (dB) moyennes			MOMs
« suppression <i>contra</i> -latérale »	Onde P	Onde Nt	
-5,2 ± 0,7	4,1 ± 0,9	-1,6 ± 1,7	intacts
-2,9 ± 0,2	0,7 ± 1,5	0,0 ± 0,0	sectionnés

Tableau 12 : Amplitudes moyennes ($n = 3$) de la « suppression *contra*-latérale » et des ondes P et Nt du PAC. Les rats dont les muscles de l'oreille moyenne étaient ou non sectionnés, ont été stimulés avec des « tone burst » ipsi-latéraux de 4 kHz de 85 dB SPL et avec un bruit *contra*-latéral de OBN – 12,5 kHz de 110 dB SPL et ont reçu un bolus d'ILip renfermant 116,2 mM de toluène.

* : différence statistiquement significative.

MOMs : muscles de l'oreille moyenne ; P : onde positive ; Nt : onde négative tardive.

En résumé, les enregistrements du PAC sont similaires à ceux obtenus avec le PMC : une « suppression *contra*-latérale » synchronisée au bruit *contra*-latéral, confirmant le déclenchement effectif des réflexes de protection de l'oreille. Par ailleurs, l'injection d'un bolus d'ILip contenant du toluène supprime transitoirement la « suppression *contra*-latérale ». Par contre, une diminution de l'amplitude du PAC est apparue, lors de l'ajout de la stimulation *contra*-latérale, chez des animaux dont les muscles de l'oreille moyenne étaient sectionnés.

Ces résultats confirment que le toluène, dans nos conditions expérimentales, est capable d'inhiber le système de protection acoustique de l'oreille moyenne.

Pour préciser l'élément de l'arc réflexe de l'oreille moyenne perturbé (inter-neurones et moto-neurones [Fig. 43]), les effets d'une injection *contra*-latérale de solvant ont été étudiés.

2.3. Effets d'une injection *contra*-latérale de toluène

L'histogramme de la figure 31 illustre les amplitudes moyennes de variation du PMC lors de l'injection *contra*-latérale d'un bolus de 100 µL d'ILip contenant 116,2 mM de toluène chez des animaux stimulés par un bruit *ipsi*-latéral de 2OBN – 4 kHz de 65 dB SPL et par un bruit *contra*-latéral de OBN – 12,5 kHz de 110 dB SPL.

Comme précédemment, la stimulation *contra*-latérale a provoqué une « suppression *contra*-latérale » d'amplitude égale à $-4,3 \pm 0,2$ dB (résultats non reportés), dont la valeur était voisine de celle mesurée dans les mêmes conditions expérimentales lors d'une précédente expérience (Cf. III. 2.1. ou Tableau 11). Sur la figure 31, il apparaît que contrairement à l'injection *ipsi*-latérale qui provoquait une onde P, l'effet principal de l'injection *contra*-latérale de solvant était une onde Np. En fonction du côté de l'injection choisi, *ipsi*- ou *contra*-latéral, les différences d'amplitude de l'onde P ($6,4 \pm 2,3$ vs. $0,2 \pm 0,4$ dB) étaient statistiquement significatives [K = 3,97 ; p = 0,046].

Les ondes N, quant à elles, avaient une amplitude similaire (Test K ; p > 0,05) quel que soit le côté de l'injection. Cependant, leurs latences étaient statistiquement différentes [K = 4,09 ; p = 0,043] en fonction du côté de l'injection : $108,0 \pm 20,8$ s en *ipsi*- (Nt) et $44,0 \pm 6,9$ s en *contra*-latéral (Np).

Par contre, les effets de l'injection *contra*-latérale du bolus de 116,2 mM de toluène étaient similaires à ceux d'un bolus de 58,4 mM de toluène administré *ipsi*-latéralement. En effet, l'amplitude et la latence de l'onde Np mesurées lors d'une injection *contra*-latérale n'étaient pas statistiquement différentes (Test K ; p > 0,05) de celles de l'onde Np observée lors d'une injection *ipsi*-latérale d'un bolus de 58,4 mM de toluène (Fig. 25 et Tableau 7).

Amplitude moyenne de variation du PMC (dB)

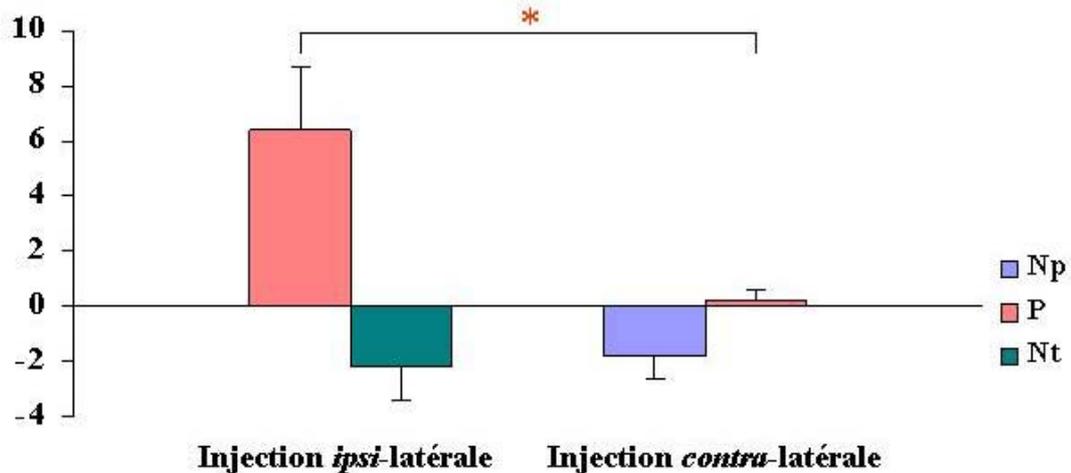


Figure 31 : Amplitudes moyennes ($n = 3$) des ondes P et N du PMC mesurées lors d'injections ipsi- et contra-latérales d'un bolus d'ILip contenant du toluène. Les animaux ont été stimulés avec un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz de 65 dB SPL et avec un bruit contra-latéral de OBN – 12,5 kHz de 110 dB SPL et ont reçu un bolus de 100 μ L d'ILip contenant 116,2 mM de toluène. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types.

* : différence statistiquement significative.

P : onde positive ; Np : onde négative précoce ; Nt : onde négative tardive.

L'injection de toluène dans la carotide adjacente à la cochlée bio-instrumentée semble donc être la condition *sine qua non* pour observer l'onde P. Quant à l'onde N, elle est observée quel que soit le côté de l'injection. Si l'on considère que l'injection ipsi-latérale de toluène perturbe la zone cérébrale ipsi-latérale et que l'injection contra-latérale perturbe la zone cérébrale contra-latérale, l'onde P semblerait traduire l'inhibition des moto-neurones tandis que l'onde N illustrerait une perturbation des inter-neurones du ROM par le toluène.

Puisque les ondes P et N semblent être deux résultats de l'action du toluène sur le ROM (Cf. III. 2.1.2.), nous avons voulu examiner s'il existait une relation entre la structure de la molécule de solvant et le type de perturbation du ROM engendrée.

3. Relation « structure – activité » de différents solvants sur les réflexes de protection acoustique

Différents solvants, aromatiques ou non aromatiques, ont été testés pour leur capacité à perturber les réflexes de protection.

Puisqu'un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL suffisait à induire des variations d'amplitude du PMC lors de l'injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène (Cf. III. 1.2.2. et 2.1.1.), nous avons jugé inutile d'utiliser une stimulation contra-latérale dans le cadre

de cette étude. L'amplitude du PMC a donc été mesurée avec un bruit *ipsi*-latéral de 20BN – 4 kHz de 85 dB SPL sur des rats auxquels on administrait des bolus de 100 μ L d'ILip renfermant différents solvants.

3.1. Amplitude des ondes P et N

La figure 32 présente les amplitudes moyennes de variation du PMC mesurées lors de l'injection des différents solvants. Ces variations ont été comparées à celles engendrées par 116,2 mM de toluène, solvant de référence au cours de nos études précédentes.

□ Onde P

Sur l'ensemble des solvants testés, aromatiques et non aromatiques, seuls certains solvants aromatiques, le toluène, les trois isomères du xylène, l'alcool benzylique, le styrène, l'éthylbenzène ont provoqué une augmentation statistiquement significative [$K = 27,99$; $p = 0,003$] de l'amplitude du PMC. De plus, il est apparu que, dans ce groupe, la concentration de solvant requise pour induire une onde P d'amplitude proche de 4 dB (comme celle induite par le toluène) variait selon le solvant considéré. Les augmentations de l'amplitude du PMC mesurées suite à l'injection d'un bolus de xylènes, d'alcool benzylique ou de styrène étaient obtenues avec des concentrations comprises dans une gamme qui s'étendait de 100 à 120 mM. En revanche, une concentration de 199,9 mM d'éthylbenzène a été requise pour observer une onde P d'au moins 4 dB. Ainsi, au sein du groupe de solvants aromatiques testés, il apparaissait que l'onde P dépendait à la fois de la concentration de solvant aromatique administré mais aussi de la structure de la chaîne latérale attachée au noyau benzénique. En effet, pour des concentrations de solvants proches de 116,2 mM, l'onde P était observée lorsque que le solvant administré comportait un ou deux groupements méthyles sur le noyau benzénique (toluène, xylènes) ou une fonction phénol (alcool benzylique) ou une chaîne latérale de 2 C avec une double liaison (styrène) alors que l'onde P disparaissait dès lors que la chaîne latérale était absente (benzène) ou constituée d'un nombre de $C > 2$ (propylbenzène, butylbenzène).

Concernant l'éthanol, un perturbateur de la matrice lipidique, administré à la concentration de 1194,8 mM, il induisait une onde P d'amplitude égale à $0,7 \pm 0,8$ dB.

□ Onde N

Tous les solvants testés ont induit une onde N. En comparant la réponse de tous les solvants (excepté l'éthanol et l'éthylbenzène en raison de la différence de concentration avec les autres solvants), indépendamment de la nature ou de la structure des solvants, la valeur du test statistique indiquait que l'amplitude de cette onde variait de façon significative [$K = 24,79$; $p = 0,006$] en fonction du solvant administré. Cependant, si l'on ne considère que les solvants aromatiques, aucune différence d'amplitude n'a été relevée entre les ondes N.

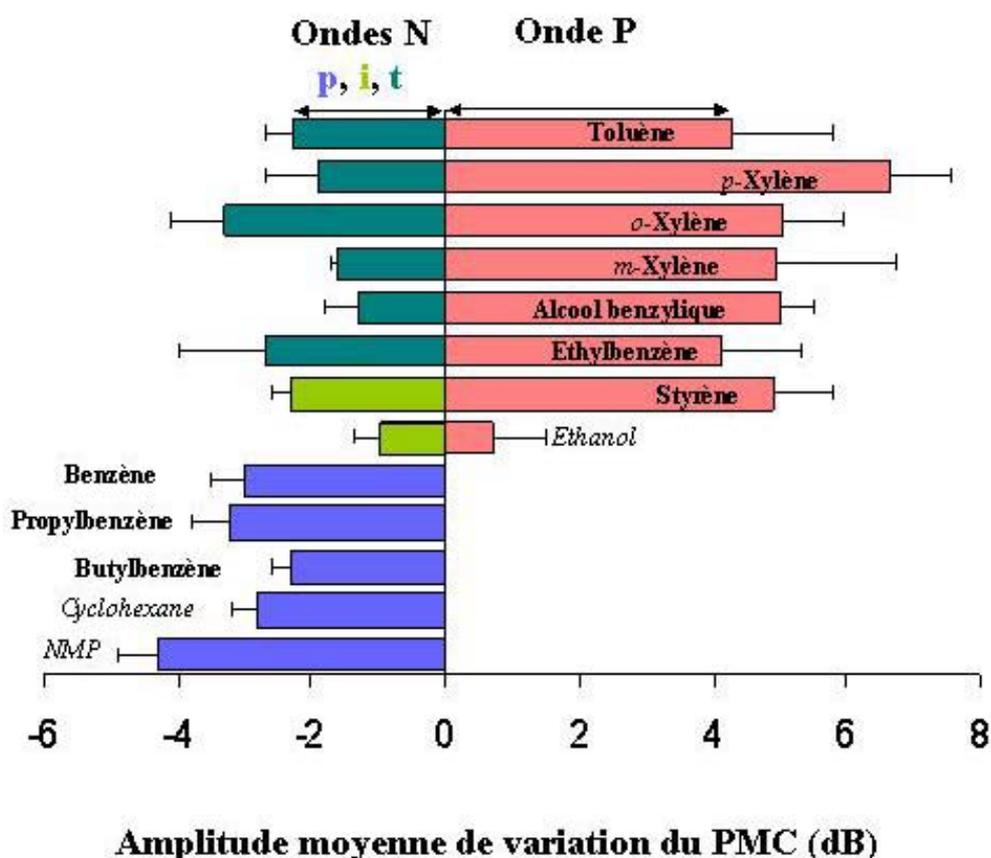


Figure 32 : Amplitudes moyennes des ondes P et N du PMC mesurées lors d'injections d'un bolus de solvants aromatiques (toluène 116,2 mM, p-xylène 100,1 mM, o-xylène 102,3 mM, m-xylène 100,5 mM, alcool benzylique 119,3 mM, éthylbenzène 199,9 mM, styrène 107,4 mM, benzène 138,9 mM, propylbenzène 110,1 mM, butylbenzène 114,1 mM,) ou non aromatiques (éthanol 1194,8 mM, cyclohexane 117,9 mM, NMP 115,4 mM). Les animaux ont été stimulés avec un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL et ont reçu un bolus de 100 µL d'ILip contenant du solvant. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types. P : onde positive ; Np : onde négative précoce ; Ni : onde négative intermédiaire ; Nt : onde négative tardive.

3.2. Latence des ondes P et N

Les latences de l'onde P étaient homogènes (Test K ; $p > 0,05$). Par contre, les latences de l'onde N variaient selon le solvant administré [$K = 24,85$; $p = 0,009$].

Parmi les solvants aromatiques, les latences de l'onde N ont été regroupées en trois classes :

- le propylbenzène, le butylbenzène, et le benzène avec une latence inférieure à 50 s (N_p),
- le toluène, les isomères du xylène, et l'alcool benzylique avec une latence supérieure à 100 s (N_t), et enfin,
- le styrène avec une latence intermédiaire comprise entre 50 et 100 s (N_i).

Pour les solvants non aromatiques ($N_{NMP} : 28,0 \pm 6,9$ s et $N_{cyclohexane} : 36,0 \pm 0,0$ s), les latences des ondes N étaient comparables (Test K ; $p > 0,05$) à celles des ondes N_p induites par les solvants aromatiques.

De l'ensemble de ces résultats, trois conclusions peuvent être édictées :

- seuls les hydrocarbures aromatiques sont capables d'engendrer une augmentation de l'amplitude du PMC (onde P),
- la structure de la chaîne latérale associée au noyau benzénique joue un rôle clé dans l'obtention d'une onde P. Cette dernière requiert la présence d'un noyau benzénique associé à une ou deux chaînes latérales comprenant au total un nombre de $C \leq 2$,
- dans le cas de l'obtention d'une onde P, la latence de l'onde N associée est toujours supérieure à 50 s.

Alors que les résultats de cette étude montrent que la structure de la molécule joue un rôle déterminant dans le type d'onde induite par le solvant, ils suggèrent également que l'onde P, provoquée par certains solvants aromatiques seulement, serait plus la conséquence d'une action spécifique du solvant sur un récepteur membranaire que la perturbation non spécifique de l'intégrité membranaire des moto-neurones du ROM. Au contraire, l'onde N, observée quel que soit le solvant administré, correspondrait davantage à une action non spécifique sur les membranes. Toutefois, les différences de latences de l'onde N observées entre les solvants aromatiques et non aromatiques (cyclohexane, NMP) suggèrent que l'onde N pourrait être provoquée par différents modes d'action.

L'onde P semble être la conséquence de l'action du toluène sur un récepteur membranaire des moto-neurones impliqués dans le ROM. Or, les moto-neurones utilisent deux types de récepteurs cholinergiques. Des récepteurs calciques neuronaux et musculaires

interviennent également dans le fonctionnement de l'arc réflexe du ROM. Pour préciser le mécanisme d'action du toluène sur le ROM, les effets de divers antagonistes des récepteurs ont été étudiés et comparés à ceux produits par le toluène.

4. Effets auditifs d'une injection d'antagonistes des récepteurs neurosensoriels

Comme précédemment, un bruit *ipsi*-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL a été suffisant pour étudier les variations d'amplitude du PMC lors de l'injection de 100 µL d'antagonistes des récepteurs cholinergiques ou d'antagonistes des récepteurs calciques.

4.1. Antagonistes des récepteurs cholinergiques

Quel que soit l'antagoniste administré, atropine, DBE ou 4-DAMP, l'injection a engendré une onde P et une onde Nt dont les amplitudes et les latences sont reportées dans le tableau 13. Seule l'amplitude de l'onde P s'est avérée sensible à la concentration de l'antagoniste injecté.

		Atropine (µM)			DBE (µM)			4-DAMP (µM)		
		325	487	691	100	150	175	44,3	88,6	122
Onde P	Amplitude (dB)	0,3±0,9	1,9±1,0	4,5±0,5	1,0±0,2	2,2±0,9	4,0±0,8	0,5±1,0	2,7±1,1	4,3±0,6
	Latence (s)	39,0±6,0	42,0±15,5	27,0±6,0	48,0±13,9	33,0±6,0	36,0±0,0	40,0±6,9	33,0±6,0	33,0±6,0
Onde Nt	Amplitude (dB)	-0,2±0,4	-0,6±0,5	-1,0±0,7	-0,1±0,3	0,0±0,0	-0,1±0,2	-0,2±0,4	-0,4±0,3	-0,4±0,5
	Latence (s)	84,0±17,0	166,0±91,1	127,5±47,3	ND	-	ND	ND	166,0±33,0	152,0±55,4

Tableau 13 : Amplitudes et latences moyennes ($n = 4$ par concentration testée) des ondes P et Nt du PMC relatives à l'injection d'antagonistes des récepteurs cholinergiques administrés. Les rats ont été stimulés avec un bruit *ipsi*-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL et ont reçu un bolus de 100 µL d'ILip contenant des antagonistes aux concentrations indiquées.

Atropine : antagoniste large spectre des récepteurs cholinergiques ; DBE : antagoniste nicotinique ; 4-DAMP : antagoniste muscarinique.

P : onde positive ; Nt : onde négative tardive ; ND : valeur moyenne non déterminée.

En gras : Amplitudes et latences moyennes des ondes P et Nt du PMC relatives à l'injection d'antagonistes des récepteurs cholinergiques administrés à leur concentration « efficace ».

□ Amplitude des ondes P et N

Les concentrations « efficaces » d'antagonistes ont été recherchées de telle sorte que l'antagoniste provoque une onde P d'amplitude équivalente à celle engendrée par l'injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène. Comme indiqué dans le tableau 13, les bolus de 691 μM d'atropine, de 175 μM de DBE et de 122 μM de 4-DAMP ont provoqué des augmentations du PMC ($4,5 \pm 0,5$ – $4,0 \pm 0,8$ et $4,3 \pm 0,6$ dB respectivement) dont les amplitudes étaient statistiquement (Test K ; $p > 0,05$) équivalentes à celle provoquée par l'injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène (Fig. 33). Néanmoins, bien que les augmentations du PMC aient été de même amplitude, les concentrations d'antagonistes des récepteurs cholinergiques requises pour engendrer une onde P étaient différentes de celle du toluène : μM vs. mM.

Quant à l'onde Nt, l'amplitude mesurée avec l'atropine ou le DBE ou le 4-DAMP était statistiquement différente ($K = 8,61$; $p = 0,013$) de celle induite par le toluène.

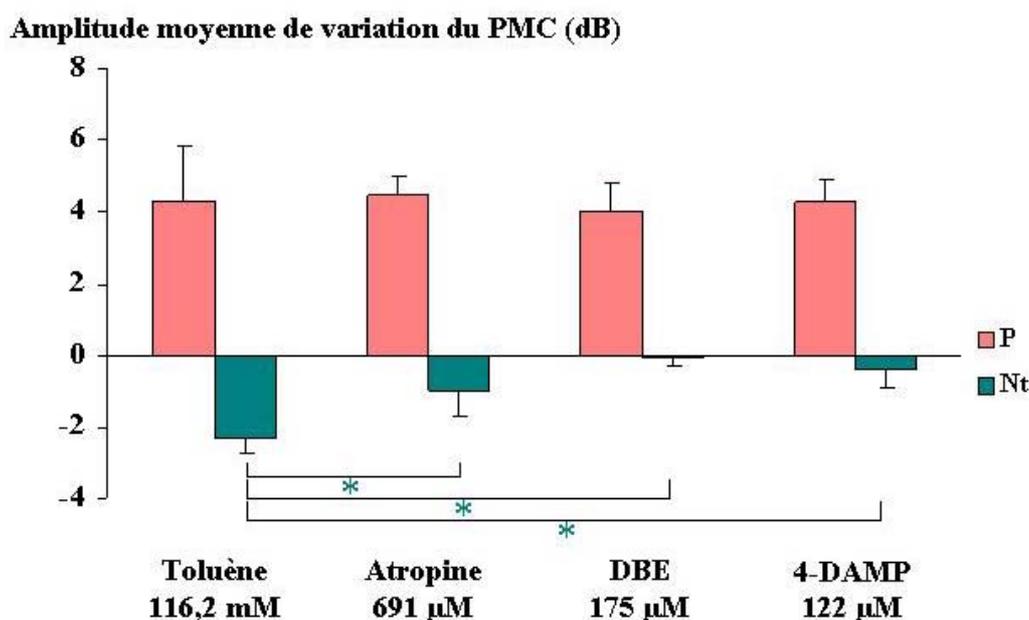


Figure 33 : Amplitudes moyennes ($n = 4$) des ondes P et Nt du PMC mesurées lors d'injections d'antagonistes des récepteurs cholinergiques.

Les amplitudes des ondes P et Nt du PMC mesurées lors des injections d'un bolus de 116,2 mM de toluène dans l'ILip ont été reportées pour comparaison. Les animaux ont été stimulés avec un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL et ont reçu un bolus de 100 μL d'ILip renfermant des antagonistes des récepteurs cholinergiques aux concentrations « efficaces ». Les barres d'erreur correspondent aux écart-types.

* : différence statistiquement significative d'après le graphique des boîtes à moustaches.

P : onde positive ; Nt : onde négative tardive.

□ Latence des ondes P et N

La latence de l'onde P_{toluène} ($40,8 \pm 6,6$ s) s'est avérée semblable à celles des antagonistes des récepteurs cholinergiques (atropine $691 \mu\text{M}$, DBE $175 \mu\text{M}$ et 4-DAMP $122 \mu\text{M}$) [Tableau 13]. Les latences moyennes de l'onde Nt n'ont pas pu être déterminées dans le cadre de l'injection de 100 et 175 μM de DBE, ni de 44,3 mM de 4-DAMP puisque seul un des animaux sur le groupe testé a montré une onde N suite à l'injection.

En résumé, le toluène administré à la concentration de référence, 116,2 mM, provoque une augmentation du PMC ayant une amplitude et une latence équivalentes à celles engendrées par l'injection d'antagonistes des récepteurs cholinergiques aux concentrations suivantes : atropine, 691 μM – DBE, 175 μM et 4-DAMP, 122 μM . Il est à noter que la gamme de concentrations requises pour l'obtention de l'onde P avec les antagonistes des récepteurs cholinergiques est différente de celle requise avec le toluène : μM vs. mM.

4.2. Antagonistes des récepteurs calciques

Le tableau 14 ci-dessous rapporte les amplitudes et latences moyennes des variations du PMC en réponse à deux types d'antagonistes des récepteurs calciques: le vérapamil et l' ω -ctx MVIIC. Le vérapamil a été injecté dans le tronc commun de la carotide, tandis que l' ω -ctx MVIIC a été injectée dans la branche occipitale de la carotide. Ce choix a été dicté par la faible quantité d' ω -ctx MVIIC dont nous disposions, et par le fait qu'une injection dans le tronc commun de la carotide et une injection dans la branche occipitale engendrent une onde P d'amplitude et de latence comparables (Cf. III. 1.2.3.). Malgré les risques hémorragiques encourus par les animaux lors de l'isolation de la branche occipitale, nous avons choisi d'optimiser ainsi notre échantillon d' ω -ctx MVIIC.

Quelle que soit la configuration de l'injection intra-carotidienne, les deux antagonistes des récepteurs calciques ont provoqué une onde P, suivie d'une onde Nt.

		Vérapamil (μM)			ω -ctx MVIIC (μM)		
		312,5	625	1250	83,5	145,2	211,4
Onde P	Amplitude (dB)	1,4 \pm 0,5	3,4 \pm 0,7	4,1 \pm 1,2	0,3 \pm 0,3	3,0 \pm 2,0	7,3 \pm 0,3
	Latence (s)	52,0 \pm 30,2	44,0 \pm 6,9	68,0 \pm 6,9	36,0 \pm 0,0	24,0 \pm 0,0	24,0 \pm 0,0
Onde Nt	Amplitude (dB)	-0,7 \pm 0,7	-1,1 \pm 1,2	-0,9 \pm 0,4	-0,6 \pm 0,8	-1,0 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0
	Latence (s)	190,0 \pm 81,9	228,0 \pm 55,0	464,0 \pm 248,9	ND	147,0 \pm 4,2	-

Tableau 14 : Amplitudes et latences moyennes ($n = 3$ pour le vérapamil et $n = 2$ pour l' ω -ctx MVIIC par concentration testée) des ondes P et Nt du PMC relatives à l'injection d'antagonistes des récepteurs calciques administrés. Les rats ont été stimulés avec un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL et ont reçu un bolus de 100 μL d'une solution d'antagoniste aux concentrations indiquées.

P : onde positive ; Nt : onde négative tardive ; ND : valeur moyenne non déterminée.

En gras : Amplitudes et latences moyennes des ondes P et Nt du PMC relatives à l'injection d'antagonistes des récepteurs calciques administrés à leur concentration « efficace ».

□ Vérapamil

Sur les deux ondes produites par le vérapamil, seule l'amplitude de l'onde P a augmenté avec la concentration d'antagoniste des récepteurs calciques injecté. L'injection d'une solution de 1250 μM soit de 1,25 mM de vérapamil a provoqué une onde P d'amplitude ($4,1 \pm 1,2$ dB) similaire (ANOVA ; $p > 0,05$) à celle induite par l'injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène ($4,3 \pm 1,5$ dB), mais dont la cinétique était différente (Fig. 34). Par contre, l'amplitude de l'onde Nt ($-0,9 \pm 0,4$ dB) mesurée avec le vérapamil était statistiquement différente [$F(1,6) = 20,85$; $p = 0,004$] de celle mesurée avec le toluène ($-2,3 \pm 0,4$ dB).

Quant aux latences des deux ondes, elles étaient statistiquement différentes pour l'onde P [K = 5,38 ; p = 0,020] et pour l'onde Nt [K = 5,00 ; p = 0,025] en fonction de la substance injectée, vérapamil ou toluène. En effet, la latence de l'onde P provoquée par le toluène était de $40,8 \pm 6,6$ s alors que celle provoquée par le vérapamil était de $68,0 \pm 6,9$ s. Parallèlement, la latence de l'onde Nt pour le toluène était de $127,2 \pm 40,3$ et de $464,0 \pm 248,9$ s pour le vérapamil. De plus, la cinétique d'action du vérapamil était plus grande (400 s) que celle du toluène (100 s) [Fig. 34].

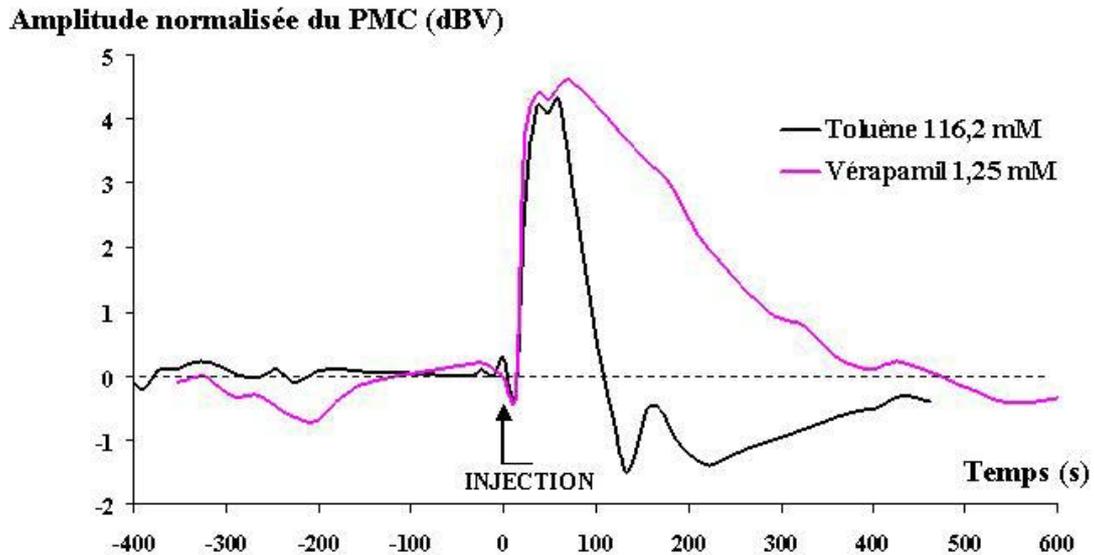


Figure 34 : Enregistrements du PMC obtenus en réponse à un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL, avant, pendant et après l'injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène dans de l'ILip ou de 1,25 mM de vérapamil dans du NaCl 0,9 %. Les injections durent 30 s. Les courbes représentent l'enregistrement du PMC chez deux animaux différents.

□ ω -ctx MVIIC

Concernant les variations d'amplitude du PMC engendrées par l' ω -ctx MVIIC, l'amplitude de l'onde P augmentait avec la concentration d'antagoniste des récepteurs calciques injecté, tandis que celle de l'onde Nt était constante mise à part pour les injections de 211,4 μ M d' ω -ctx MVIIC pour lesquelles l'onde Nt était absente.

Bien que les résultats de l'analyse statistique n'ont pas pu être pris en considération compte tenu du nombre faible d'animaux expérimentés avec l' ω -ctx MVIIC, l'injection d'une solution de 211,4 μ M d' ω -ctx MVIIC a engendré une unique onde P dont l'amplitude ($7,3 \pm 0,3$ dB) était du même ordre de grandeur que celle induite par un bolus de 116,2 mM de

toluène ($6,2 \pm 0,5$ dB) injecté dans la branche occipitale de la carotide, mais la cinétique était très différente (Fig. 35). En effet, la latence (24 s) et la cinétique d'action (40 s) de l' ω -ctx MVIIC étaient plus courtes que celles du toluène (latence : 60 s, cinétique d'action : 200 s) [Fig. 35].

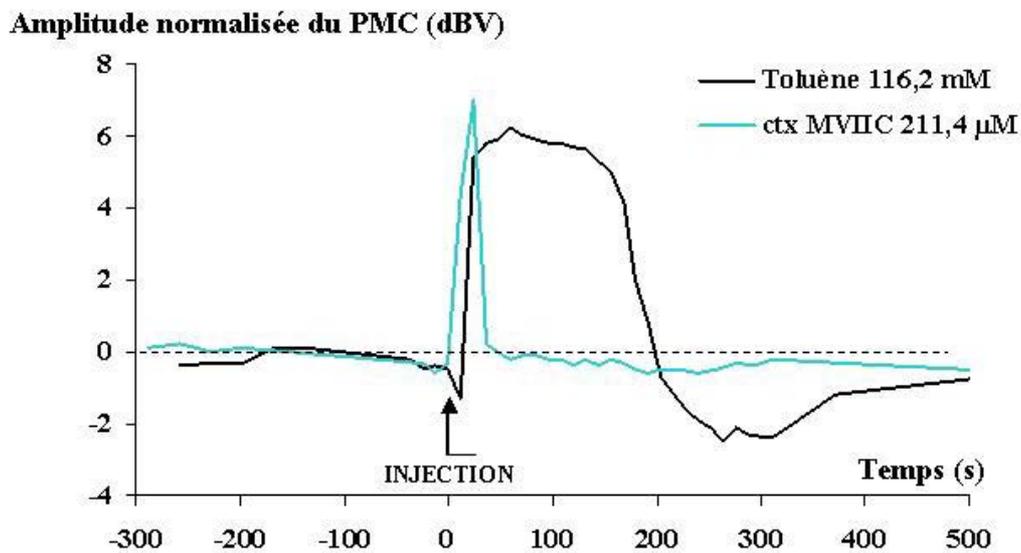


Figure 35 : Enregistrements du PMC obtenus en réponse à un bruit ipsi-latéral de 20BN – 4 kHz de 85 dB SPL, avant, pendant et après l'injection, dans la branche occipitale de la carotide, d'un bolus de 116,2 mM de toluène dans de l'ILip ou de 211,4 µM d' ω -ctx MVIIC dans du NaCl 0,9 %. Les injections durent 30 s. Les courbes représentent l'enregistrement du PMC chez deux animaux différents.

En dépit d'une amplitude semblable de l'onde P, la cinétique des antagonistes des récepteurs calciques est différente de celle observée avec le solvant.

Alors que l'ensemble des antagonistes des récepteurs cholinergiques et des récepteurs calciques provoque une inhibition du ROM, les latences de l'onde P diffèrent en fonction de la nature de l'antagoniste. Ces différences de latence sont cohérentes avec les cibles respectives des différents antagonistes :

- l' ω -ctx MVIIC a une action sur les récepteurs calciques exprimés par les neurones,
- les antagonistes des récepteurs cholinergiques agissent en aval de la libération d'ACh par les neurones, et
- le vérapamil a une action sur les récepteurs calciques principalement exprimés par les muscles.

En comparant les latences obtenues ci-dessus avec celle mesurée pour le toluène, la correspondance des latences de l'onde P entre le solvant et les antagonistes des récepteurs cholinergiques semble indiquer que le mode d'action du toluène sur le ROM s'apparenterait

davantage à une inhibition des récepteurs cholinergiques plutôt qu'à inhibition des récepteurs calciques.

Par ailleurs, les propriétés inhibitrices du système efférent médian et de cochléotoxicité de la gentamicine ont également été étudiées. L'étude de ces effets a permis d'obtenir un argument supplémentaire en faveur de l'origine, périphérique ou centrale, de l'augmentation du PMC provoquée par le toluène.

4.3. Gentamicine

Les variations d'amplitude du PMC ont été mesurées en réponse à un bruit *ipsi*-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL lors de l'injection de 100 μ L de gentamicine.

Les essais préliminaires réalisés avec les concentrations de gentamicine suivantes : 2,2 mM (n = 1), 4,4 mM (n = 1) et 6,7 mM (n = 4) ont provoqué des augmentations transitoires de l'amplitude du PMC suivies de diminutions permanentes de l'amplitude du PMC. Cependant seule l'amplitude des ondes P_{6,7 mM} était voisine de celle mesurée avec 116,2 mM de toluène.

La figure 36 montre l'enregistrement du PMC lors de l'injection d'un bolus d'ILip contenant 6,7 mM de gentamicine. La courbe illustre la réponse d'un animal représentatif du groupe auquel il appartient.

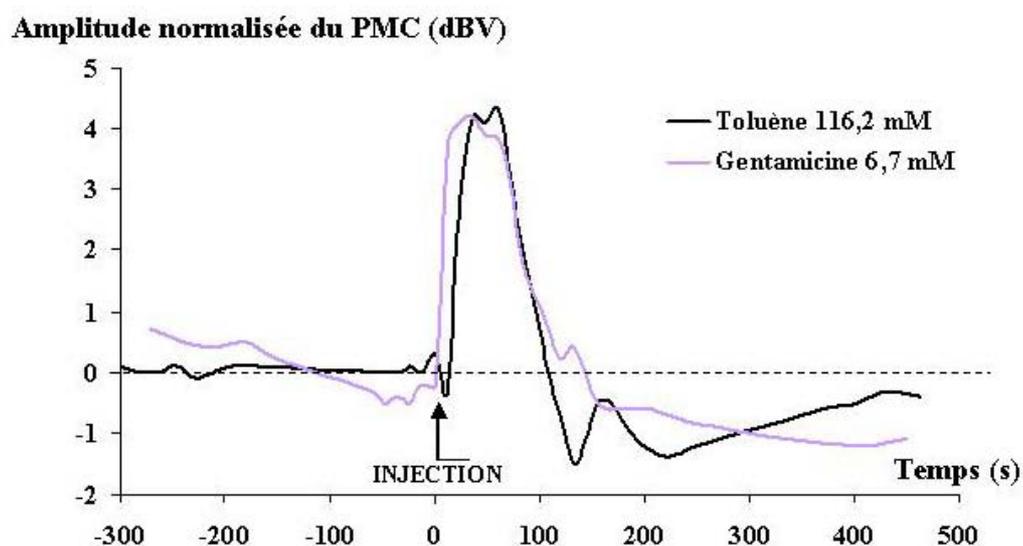


Figure 36 : Enregistrements du PMC obtenus en réponse à un bruit *ipsi*-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL, avant, pendant et après l'injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène ou de 6,7 mM de gentamicine dans l'ILip. Les injections durent 30 s. Les courbes représentent l'enregistrement du PMC chez deux animaux différents.

Concernant le groupe d'animaux testé avec 6,7 mM de gentamicine, les amplitudes et les latences moyennes des deux ondes du PMC sont reportées dans le tableau 15. Les amplitudes des ondes P et Nt n'ont pas présenté de différence statistiquement significative (ANOVA, $p > 0,05$) en fonction de la substance injectée, solvant ou antibiotique. Par contre, les latences des ondes P et Nt ont varié de façon statistiquement significative en fonction de la substance injectée, toluène ou gentamicine : [$K = 6,86$; $p = 0,009$] pour la latence de l'onde P et [$K = 6,00$; $p = 0,014$] pour l'onde Nt. De même, les durées de l'onde Nt étaient différentes : transitoire pour le toluène et permanente pour la gentamicine (Fig. 36).

	Valeurs moyennes	Gentamicine 6,7 mM	Toluène 116,2 mM
Onde P	Amplitude (dB)	4,4 ± 1,1	4,3 ± 1,5
	Latence (s)	24,0 ± 0,0	40,8 ± 6,6
Onde Nt	Amplitude (dB)	-1,8 ± 0,3	-2,3 ± 0,4
	Latence (s)	1164,0 ± 768,0	127,2 ± 40,3

Tableau 15 : Amplitudes et latences moyennes ($n = 4$) des ondes P et Nt du PMC relatives à l'injection de gentamicine. Les rats ont été stimulés avec un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL et ont reçu un bolus de 100 μ L d'ILip contenant 6,7 mM de gentamicine. Les valeurs mesurées lors d'injections d'ILip contenant 116,2 mM de toluène sont indiquées dans le tableau pour comparaison.

* : différence statistiquement significative.

P : onde positive ; Nt : onde négative tardive.

Dans cette approche expérimentale, l'augmentation du PMC observée suite à l'injection de gentamicine ne résulte pas d'un effet cochléotoxique de l'antibiotique mais serait davantage la conséquence d'une action inhibitrice de l'antibiotique sur le système efférent médian. A l'instar du toluène, la gentamicine induit des ondes P et Nt du PMC bien que leurs latences diffèrent. Soulignons également que l'onde Nt induite par la gentamicine a un caractère permanent contrairement à celle du toluène.

Pour finir, nous avons entrepris d'étudier les effets histopathologiques sur la cochlée et sur le tronc cérébral, provoqués par l'injection de solvants aromatiques, afin d'apporter de nouveaux éléments pouvant expliquer l'origine des ondes P et N.

5. Effets histopathologiques d'une co-exposition « bruit ipsi-latéral et solvant »

Sur l'ensemble des quatorze solvants testés, deux solvants aromatiques ont été choisis pour étudier les dommages cochléaires et cérébraux induits par l'injection intra-carotidienne de ces produits. Le toluène (116,2 mM) a été choisi, car il produit une onde P et une onde Nt (Cf. III. 1.2.1. ou III. 3.). De plus, il est considéré comme le solvant aromatique de référence. Quant au propylbenzène (110,1 mM), il a été choisi car il provoquait une onde Np unique, d'amplitude et de latence voisines de celles de l'onde P provoquée par le toluène (Cf. III. 3.). La figure 37 illustre les enregistrements du PMC relatifs à l'injection de ces deux solvants.

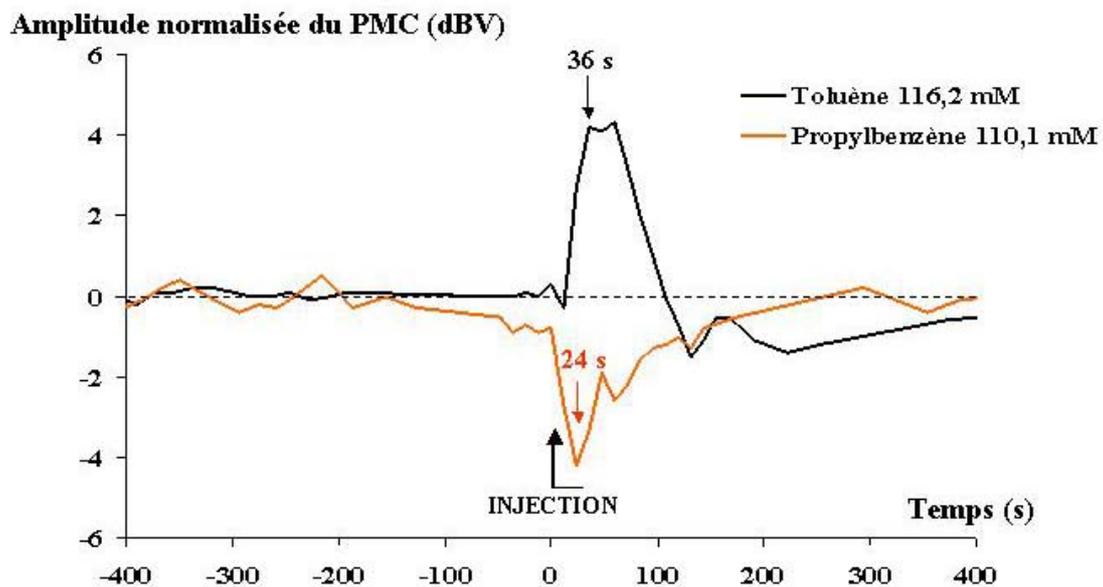


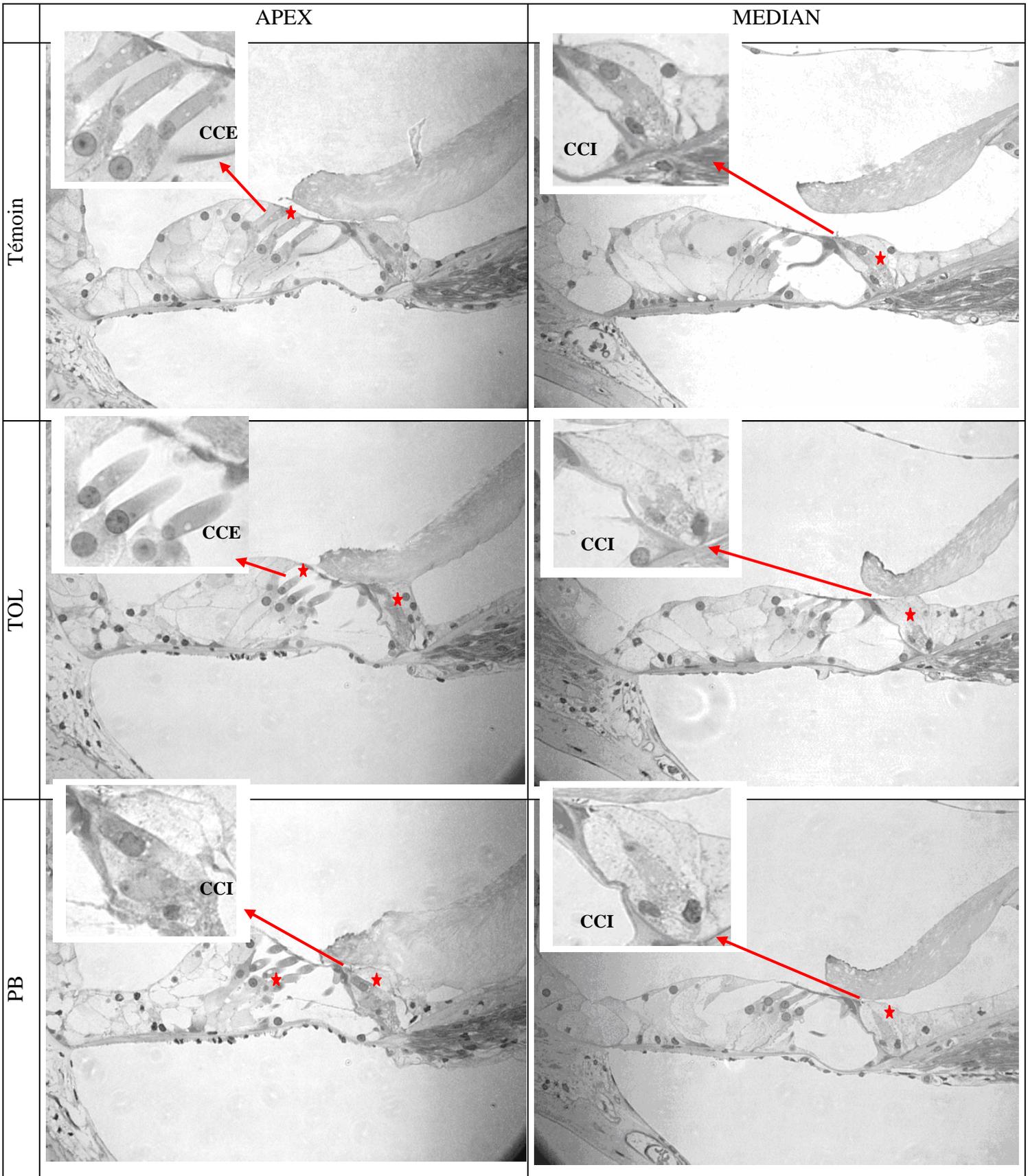
Figure 37 : Enregistrements du PMC obtenus en réponse à un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL, avant, pendant et après l'injection d'un bolus de 100 μ L de 116,2 mM de toluène ou de 110,1 mM de propylbenzène. Les injections durent 30 s.

5.1. Cochlées

Les signes pathologiques (vacuole, digestion ou absence de cellule, etc.) qui pourraient être liés à l'injection intra-carotidienne des bolus de solvant ont été recherchés dans l'organe de Corti [Fig. 38], dans les ganglions spiraux (Fig. 39) et dans la strie vasculaire [Fig. 40]. Les cochlées *ipsi*-latérales ont été prélevées 30 min après la fin de la seconde injection.

Les structures cochléaires étudiées ont montré un aspect similaire, quel que soit le bolus administré, ILip, toluène ou propylbenzène.

Des vacuoles (★) ont été observées dans le cytoplasme des CCE et des CCI des animaux témoins et expérimentés (Fig. 38). Cette vacuolisation était sans doute un artéfact de fixation des tissus par le cathéter implanté dans la carotide. De telles images ont en effet été observées dans des organes de Corti prélevés sur des animaux équipés d'un cathéter circulaire mais n'ayant été soumis à aucune exposition (ni bruit, ni injection d'ILip ou de solvant), de même que chez des animaux équipés d'un cathéter et ayant été exposés uniquement au bruit (données non reportées) alors qu'elles étaient absentes dans des organes de Corti prélevés sur des animaux n'ayant été soumis à aucune exposition mais dont les tissus avaient été fixés par voie intra-cardiaque.



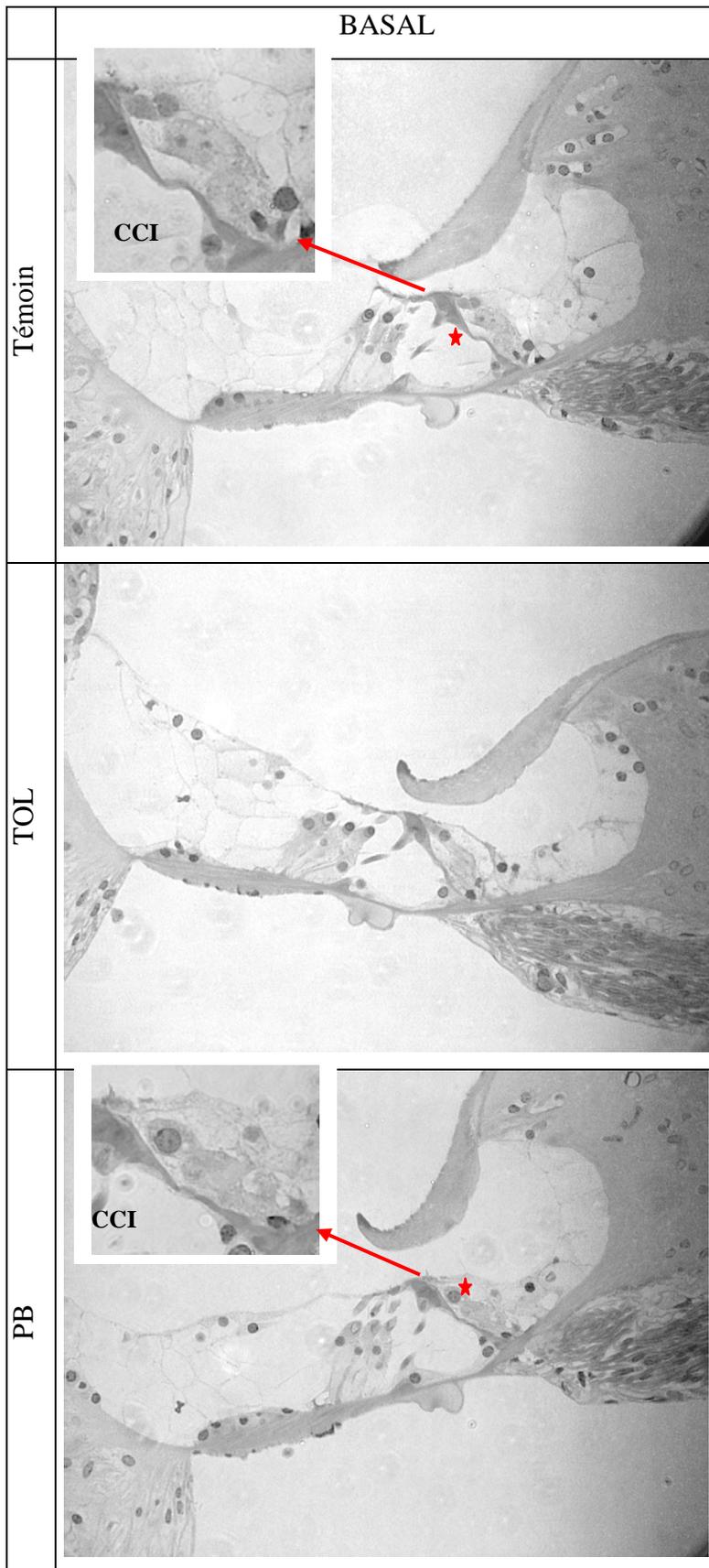


Figure 38 : Organes de Corti vus en microscopie optique (G x400) de rats ayant été exposés à un bruit ipsi-latéral de 20BN – 4 kHz de 85 dB SPL et ayant reçu deux bolus de 100 μ L d'ILip (Témoïn) ou deux bolus de 100 μ L d'ILip contenant 116,2 mM de toluène (TOL) ou 110,1 mM de propylbenzène (PB).

Encarts : cellules ciliées de l'organe de Corti (G x1000).
 CCE : cellules ciliées externes ; CCI : cellules ciliées internes ;
 ★ : vacuoles.

La figure 39 présente les ganglions spiraux, apicaux et médians d'animaux témoins et expérimentés (TOL ou PB). Les densités cellulaires des ganglions et l'aspect des corps cellulaires (absence de vacuoles) étaient normales quelles que soient les conditions expérimentales.

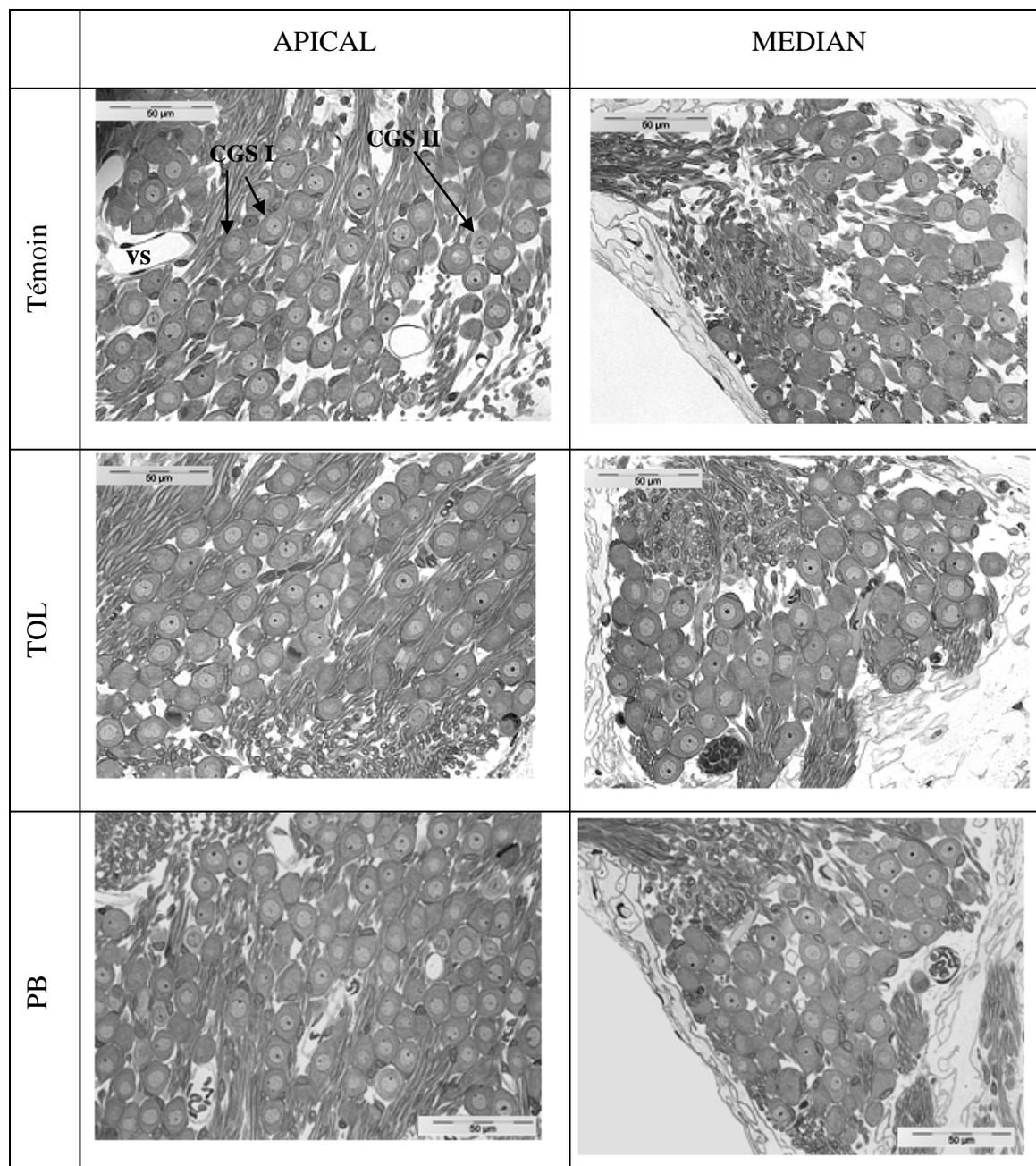


Figure 39 : Ganglions spiraux vus en microscopie optique (G x400) de rats ayant été exposés à un bruit ipsi-latéral de 20BN – 4 kHz de 85 dB SPL et ayant reçu deux bolus de 100 µL d'ILip (Témoin) ou deux bolus de 100 µL d'ILip contenant 116,2 mM de toluène (TOL) ou 110,1 mM de propylbenzène (PB). vs : vaisseau sanguin ; CGS I : cellule ganglionnaire spirale de type 1 ; CGS II : cellule ganglionnaire spirale de type 2.

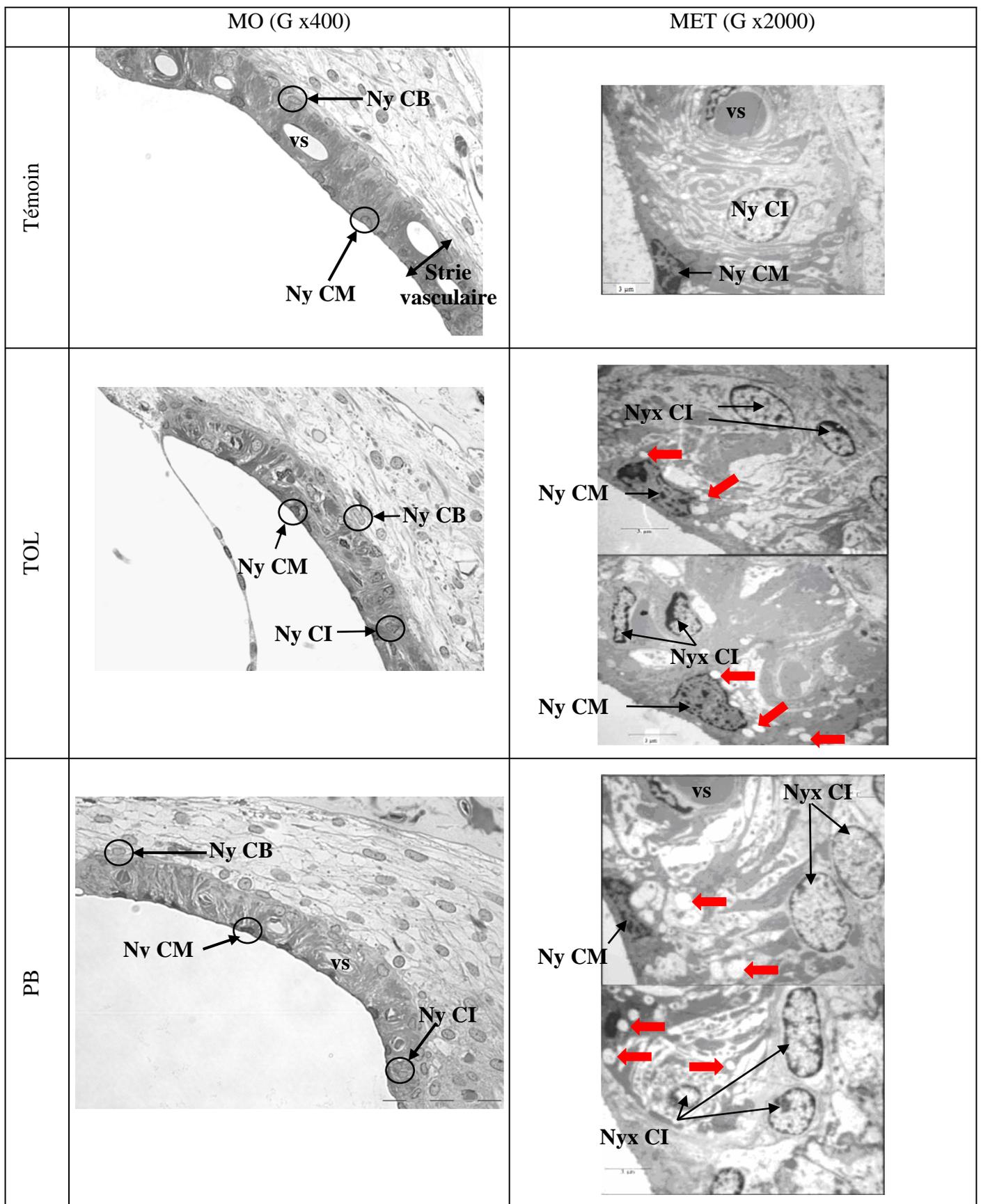


Figure 40 : Stries vasculaires vues en microscopie optique (MO) et en microscopie électronique à transmission (MET) de rats ayant été exposés à un bruit ipsi-latéral de 20BN – 4 kHz de 85 dB SPL et ayant reçu deux bolus de 100 μ L d'ILip (Témoïn) ou deux bolus de 100 μ L d'ILip contenant 116,2 mM de toluène (TOL) ou 110,1 mM de propylbenzène (PB).

CB : cellule basale ; CI : cellule intermédiaire ; CM : cellule marginale ; Ny : noyau ; vs : vaisseau sanguin ; \blacktriangleright : vacuoles ou gouttelettes de solvant.

Les stries vasculaires (*Fig. 40*), quant à elles, ont présenté, en microscopie optique, une allure différente selon la nature du bolus injecté : ILip seul ou ILip renfermant du solvant. Les stries vasculaires provenant d'animaux ayant reçu des injections d'ILip renfermant du toluène ou du propylbenzène ont toutes deux montré une structure désorganisée. En microscopie électronique à transmission, on pouvait percevoir que les stries avaient un aspect boursoufflé, l'arrangement de l'espace inter-cellulaire semblait désordonné et contenait des petites vacuoles ou des gouttelettes de solvant (➡).

En dépit de la désorganisation de la strie vasculaire qui prouve la présence du solvant dans cette structure cochléaire, le fonctionnement des CCE ne semble pas perturbé pour autant puisque les tracés électrophysiologiques du PMC sont retournés à leur valeur initiale après avoir accusés les variations suite à l'injection de solvant : toluène ou propylbenzène. Aussi, les variations distinctes d'amplitude du PMC engendrées par le toluène (onde P et onde Nt) ou le propylbenzène (onde Np) ne semblent associées ni à une pathologie des cellules sensorielles (vacuoles) ni à une pathologie de la strie vasculaire (vacuoles et désorganisation).

5.2. Cerveau

L'éventuelle toxicité centrale engendrée par l'injection artérielle de solvant a été évaluée au travers de la recherche de phénomènes apoptotiques sur des coupes cérébrales d'animaux ayant été co-exposés au bruit et au solvant.

Dans les coupes du tronc cérébral choisies pour la mise en évidence des phénomènes apoptotiques, on distinguait le nerf vestibulocochléaire, le complexe olivaire supérieur qui abrite les olives supérieures médianes et latérales, et les noyaux faciaux et du trijumeau dont les moto-neurones innervent respectivement le muscle stapédien et le muscle tenseur tympanique (*Fig. 41*).

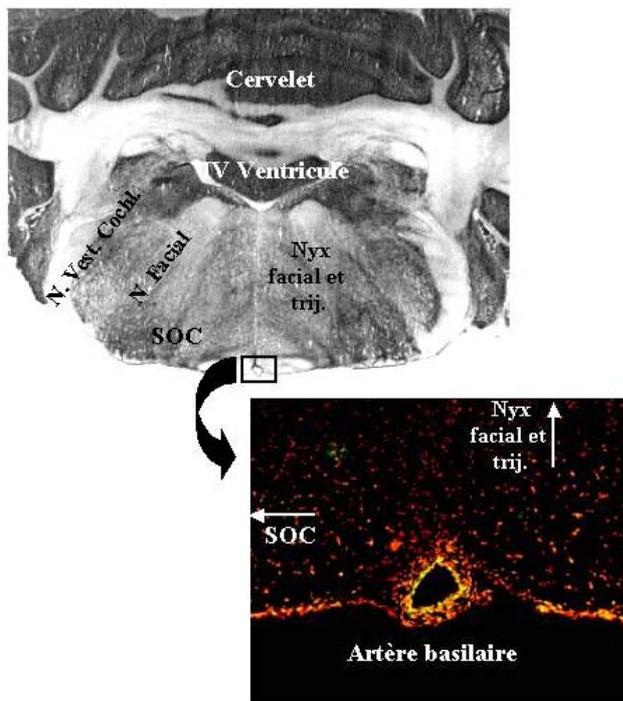


Figure 41 : En haut, coupe sagittale du tronc cérébral de rat vu en microscopie optique (G x100); en bas, coupe sagittale du tronc cérébral de rat centré sur l'artère basilaire, vu en microscopie optique (G x400).

SOC : complexe olivaire supérieur ; Nyx facial et trij. : noyaux facial et du trijumeau ; N. Vest. Cochl. : nerf vestibulocochléaire ; N. facial : nerf facial.

Les résultats électrophysiologiques ayant mis en exergue une action des solvants sur les réflexes de protection acoustique, l'analyse histologique des cellules apoptotiques s'est focalisée sur les noyaux faciaux, du trijumeau et au complexe olivaire supérieur (*Fig. 41*).

La figure 42 présente les coupes sagittales du tronc cérébral dans lesquelles les cellules ayant entrepris un processus de mort cellulaire programmée par apoptose ont été recherchées à l'aide de la technique TUNEL, 8 h après la seconde injection.

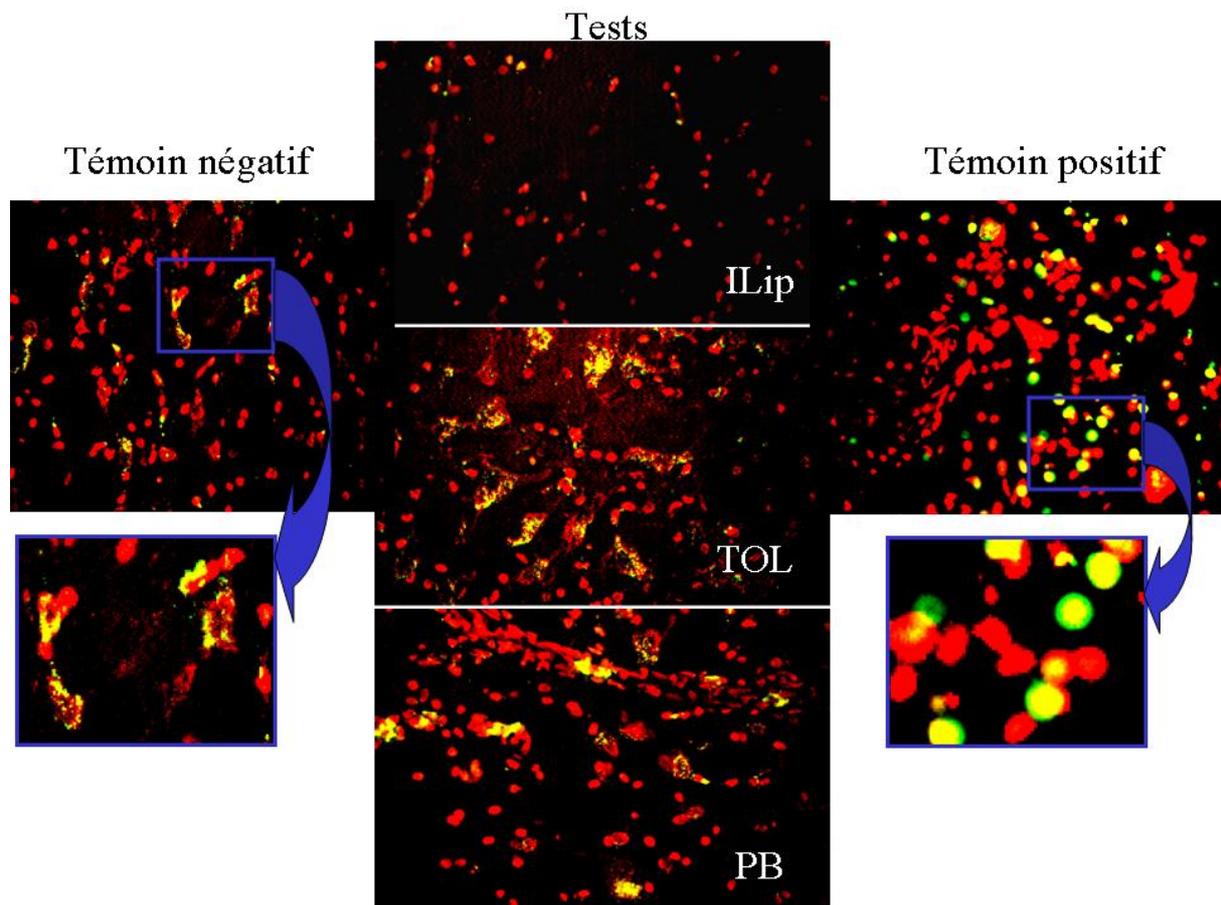


Figure 42 : Recherche des noyaux cellulaires apoptotiques par la technique TUNEL dans les coupes cérébrales de rat ($G \times 400$ en microscopie optique) ayant été co-exposés à un bruit ipsi-latéral de 2OBN – 4 kHz de 85 dB SPL et à deux bolus d'ILip seul (Tests : ILip) ou d'ILip renfermant 116,2 mM de toluène ou 110,1 mM de propylbenzène (Tests : TOL et PB). Témoin négatif : coupe cérébrale de rat n'ayant pas été mis au contact de la Tdt ; Témoin positif : coupe cérébrale de rat dans laquelle la fragmentation d'ADN a été provoquée par un traitement avec de la DNase I.

Marquage rouge : ADN cellulaire marqué par l'iodure de propidium ; marquage verte : fragment d'ADN ayant incorporé un dUTP couplé à la digoxigénine et révélé à l'aide d'un anticorps anti-digoxigénine couplé au FITC.

Sur les coupes cérébrales de rat ayant servi de « témoin positif » lors de l'expérience, on pouvait observer des noyaux cellulaires apoptotiques. Par contre, sur les lames « témoin négatif », les quelques marques de couleur verte-jaune observées correspondaient à une fixation non spécifique des anticorps anti-digoxigénine utilisés. En effet, la forme de ces marques de coloration verte, ronde ou diffuse, nous permettait respectivement de distinguer une cellule en apoptose d'une fixation non spécifique de l'anticorps anti-digoxigénine.

Dans notre contexte expérimental, quelle que soit la nature du bolus injecté, ILip ou solvant, les tissus cérébraux (Fig. 42 Tests), prélevés 8 h après l'injection, ne présentaient pas de noyaux cellulaires apoptotiques. En effet, dans les centres auditifs supérieurs étudiés, le complexe olivaire supérieur et les noyaux faciaux et du trijumeau, la superposition des

marques de coloration verte avec celles de coloration rouge n'a pas été observée comme cela a pu l'être sur les coupes cérébrales « témoin positif ». En revanche, les coupes cérébrales issues d'animaux exposés au toluène ou au propylbenzène présentaient une fixation non spécifique des anticorps comme les coupes cérébrales « témoin négatif ».

Ainsi, l'injection de toluène ou de propylbenzène ne semble pas avoir engendré d'apoptose dans les centres nerveux auditifs supérieurs. Les variations d'amplitude du PMC, relatives à la molécule de solvant aromatique administrée, ne s'accompagneraient pas d'une cytotoxicité des centres nerveux auditifs supérieurs.

Alors que nous avons démontré que le toluène pouvait inhiber le ROM, l'absence d'apoptose des centres nerveux supérieurs indique que l'injection de solvant n'aurait eu qu'un effet pharmacologique sur les récepteurs cholinergiques impliqués dans le ROM.

IV. Discussion

L'objectif de ce travail était d'étudier les effets auditifs, périphériques et centraux, d'une co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques. Dans ce but, le potentiel microphonique cochléaire (PMC) a été utilisé comme outil audiométrique. En effet, il présente un double avantage : d'une part, il représente l'image électrique de l'activité des cellules ciliées externes (CCE) [Withnell, 2001], particulièrement sensibles aux solvants aromatiques (Sullivan et al., 1988 ; Johnson et Canlon, 1994 ; Campo et al., 1997, 2001), et d'autre part, il permet d'apprécier les performances du réflexe de l'oreille interne (ROI) [Kemp et Souter, 1988 ; Patuzzi et al., 1989, 1991] et celles du réflexe de l'oreille moyenne (ROM) [Dancer et Franke, 1980]. Quant à la voie d'intoxication, la voie intra-carotidienne a été choisie car elle permet à la molécule mère de solvant d'atteindre directement la cochlée (Yamamoto et al., 2003) et le tronc cérébral (Kastin et al., 1976) tout en écartant l'action éventuelle d'un métabolite du solvant.

❑ **Pertinence du modèle expérimental pour étudier les effets auditifs d'une co-exposition au bruit et aux solvants aromatiques**

Le PMC a été déclenché par une stimulation sonore *ipsi*-latérale dont le spectre correspondait à un bruit de bande de deux octaves centrée sur 4 kHz (2OBN – 4 kHz). Dans ces conditions expérimentales, l'amplitude du PMC était proportionnelle au niveau de pression sonore de la stimulation lorsqu'elle augmentait de 65 à 95 dB SPL [Fig. 23 (A) et (B)], en dépit du cathéter « circulaire » implanté dans la carotide adjacente à la cochlée bio-instrumentée. La relation entre l'intensité de la stimulation acoustique, en dB SPL, et l'amplitude du signal électrophysiologique, en dBV, a pu être exprimée selon le modèle linéaire suivant :

$$y = 0,482 x - 129,460 ; R^2 = 0,814 \text{ [Fig. 23 (C)].}$$

En plus de la linéarité du PMC dans cette gamme d'intensités, la mesure de l'amplitude du PMC était cohérente avec les données de la littérature. Par exemple, l'amplitude du PMC de 13,8 μ V mesurée pour un bruit de 2OBN – 4 kHz de 65 dB SPL (Tableau 6) n'était pas très différente de l'amplitude de 11 à 15 μ V obtenue par Lohuis, en 2000, avec des sons purs de 2 et 4 kHz à la même intensité. En conséquence, l'insertion du cathéter « circulaire » dans la carotide adjacente à la cochlée bio-instrumentée ne semble pas avoir perturbé le PMC et

vraisemblablement pas le fonctionnement physiologique des CCE, dans la gamme d'intensités acoustiques s'échelonnant de 65 à 95 dB SPL tout en permettant l'injection des bolus de solvant.

Le bolus de solvant injecté dans le tronc commun de la carotide se divisait entre la branche interne de l'artère, en direction de la cochlée (Yamamoto et al., 2003), et la branche occipitale de l'artère, en direction du système nerveux central (Kastin et al., 1976). Compte tenu de la sensibilité des CCE aux solvants aromatiques et d'une possible altération du réflexe de protection de l'oreille moyenne par les solvants (Morata et al., 1993 ; Prasher et al., 2005), une variation de l'amplitude du PMC était envisageable lors de l'injection intra-carotidienne d'un bolus d'Intralipide (ILip) renfermant au moins 116,2 mM de toluène. Une augmentation d'environ 4 dB du PMC, l'onde P, a été mesurée pour une stimulation sonore de 85 dB SPL. L'onde P était suivie d'une diminution du PMC, l'onde N, de plus faible amplitude. Ces variations d'amplitude étaient déclenchées par l'injection du bolus de solvant et avaient un caractère transitoire (*Fig. 24 et 25*). Par ailleurs, ces variations d'amplitude du PMC ont pu être répétées avec plusieurs injections de solvant sur un même animal. De plus, la séquence d'apparition des variations d'amplitude du PMC, onde N unique ou onde P suivie d'une onde N, dépendait de la concentration de solvant administré (*Fig. 25*). Etant donné que la concentration de 116,2 mM de toluène était la plus faible concentration qui provoquait une augmentation et une diminution de l'amplitude du PMC en réponse à une stimulation sonore de 85 dB SPL, nous l'avons donc considérée comme la concentration de « référence » pour la suite de notre étude.

Dans la littérature, peu de travaux ont relaté des augmentations du PMC dues à une stimulation autre que le bruit. Guinan (1996) relate que Fex, en 1959, et Gifford et Guinan, en 1987, ont observé des augmentations de PMC pouvant aller jusqu'à 4 dB selon le niveau de pression acoustique de la stimulation, suite à une stimulation électrique du faisceau olivo-cochléaire. Selon Sridhar et al. (1995), l'augmentation du PMC - « slow effect » - résulterait de l'augmentation de la conductance membranaire des CCE : la stimulation électrique déclencherait la libération d'acétylcholine (ACh) par les terminaisons pré-synaptiques des fibres efférentes olivo-cochléaires médianes. Puis, la fixation de l'ACh sur les récepteurs cholinergiques des CCE permettrait l'entrée de Ca^{2+} extra-cellulaire. Ces ions activeraient alors l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants au niveau des citernes sub-synaptiques des CCE. Cette mobilisation intra-cellulaire de Ca^{2+} activerait ensuite l'ouverture de canaux potassiques Ca^{2+} -dépendants, permettant un efflux de K^+ . Le gradient

électrochimique existant entre le milieu intra-cellulaire des CCE et l'endolymphe augmenterait. Par conséquent, l'amplitude du PMC augmenterait.

Par ailleurs, il serait également possible qu'une augmentation du PMC puisse être le résultat d'un dysfonctionnement de la strie vasculaire qui provoquerait une augmentation du potentiel endocochléaire. En effet, si le fonctionnement de la pompe Na^+ , K^+ -ATPase (Sakagami et al., 1993), du co-transporteur Na^+ , 2Cl^- , K^+ (Goto et al., 1997) et/ou des canaux K^+ voltage-dépendants KCNQ1/KCNE1 (Sakagami et al., 1993), présents dans la strie vasculaire, venait à être activé, la concentration potassique de l'endolymphe pourrait augmenter ($> 150 \text{ meq/L}$) et modifier ainsi les potentiels endocochléaire et microphonique.

Enfin, l'augmentation du PMC pourrait être la conséquence d'une action inhibitrice du solvant sur les voies auditives efférentes impliquées dans les réflexes de protection acoustiques (ROM et ROI) qui ajustent l'énergie acoustique absorbée par la cochlée. En inhibant le fonctionnement de ces réflexes, le solvant permettrait l'absorption d'une plus grande énergie acoustique par la cochlée ce qui se traduirait aussi par une augmentation du PMC.

En résumé, l'augmentation de l'amplitude du PMC déclenché par un bruit *ipsi*-latéral de 85 dB SPL, synchronisée à l'injection d'un bolus d'ILip renfermant du toluène, pourrait résulter d'une modification des paramètres physiologiques :

- périphériques, et plus précisément d'une augmentation du potentiel endocochléaire,
- centraux, émanant d'une inhibition des voies efférentes qui innervent les CCE de l'organe de Corti ou les muscles de l'oreille moyenne intervenant dans le ROM.

□ **Origine de l'augmentation de l'amplitude du PMC induite par le toluène**

Pour évaluer l'importance relative d'une modification des paramètres physiologiques périphériques ou centraux dans l'augmentation du PMC, les effets du niveau de pression sonore et l'influence d'une injection d'un bolus de solvant en direction de la cochlée, via la branche carotidienne interne, ou en direction du tronc cérébral, via la branche carotidienne occipitale, ont été étudiés.

La figure 26 montre que l'amplitude de l'onde P, provoquée par un bolus de 116,2 mM de toluène, dépendait de l'intensité de la stimulation acoustique utilisée pour déclencher le

PMC. Un niveau de pression sonore de 85 dB SPL s'est révélé nécessaire pour observer une onde P d'une amplitude proche de 4 dB.

La figure 27 montre que les variations d'amplitude du PMC, induites par l'injection d'un bolus de 116,2 mM de toluène, étaient conditionnées par l'injection du bolus de solvant dans la branche occipitale de la carotide. Aucune variation d'amplitude du PMC n'a pu être constatée lorsque l'injection de solvant était limitée à la branche interne de la carotide qui irrigue pourtant 30 % de la cochlée (Yamamoto et al., 2003). Le solvant devait donc être dirigé vers le tronc cérébral pour observer les ondes P et N.

L'intensité de la stimulation acoustique qui est un des paramètres déterminants dans le déclenchement des réflexes de protection et l'injection du solvant dans la branche occipitale sont deux arguments en faveur d'une perturbation centrale plutôt que périphérique à l'origine des variations d'amplitude observées sur le PMC. En effet, les neurones olivo-cochléaires médians (système efférent médian) qui interviennent dans le ROI et les moto-neurones impliqués dans le ROM peuvent être activés à partir d'une certaine intensité de bruit. Par exemple, le seuil de déclenchement du ROM chez le rat, est atteint avec une stimulation de 77 dB SPL à 10 kHz (Pilz et al., 1997) ; le seuil d'activation du ROI est inférieur à celui requis pour déclencher le ROM (Guinan et McCue, 1987 ; Liberman et Guinan, 1998).

L'hypothèse d'une perturbation centrale plutôt que périphérique a été confortée par l'augmentation de l'amplitude du PMC obtenue suite à l'injection d'un bolus de 6,7 mM de gentamicine (*Fig. 36 et Tableau 15*). En effet, la gentamicine est un antibiotique qui a la particularité d'avoir des propriétés inhibitrices du système efférent médian (Smith et al., 1994 ; Yoshida et al., 1999) mais aussi cochléotoxiques, en altérant les CCE (Tachibana et al., 1983 ; Forge et Schacht, 2000). Pour expliquer l'augmentation de l'amplitude du PMC constatée à la suite de l'injection de gentamicine, l'effet cochléotoxique de l'antibiotique peut être d'emblée écarté puisque Takada et Schacht, en 1982, ainsi que Tachibana et al., en 1983, ont montré que la perfusion intra-cochléaire de gentamicine engendrait une diminution potentiellement réversible de l'amplitude du PMC. Puisque la gentamicine provoquait une augmentation de l'amplitude du PMC, il était raisonnable de penser que l'onde P correspondait à une inhibition du système efférent médian. Toutefois, une autre hypothèse pouvait expliquer les effets observés de la gentamicine. S'il est bien établi que la gentamicine est un inhibiteur du système auditif efférent médian, il a également été montré que la gentamicine peut bloquer la transmission cholinergique au niveau de la jonction

neuromusculaire d'une préparation *ex vivo* (Paradelis et al., 1980, Yamada et al., 1986) en inhibant les courants calciques pré-synaptiques (Redman et Silinsky, 1994 ; Parsons et al., 1992). Dans notre contexte expérimental, la gentamicine pourrait inhiber la jonction neuromusculaire qui intervient dans le ROM. Cette dernière implique des moto-neurones en provenance du tronc cérébral et des muscles situés en périphérie. De façon plus précise, étant donné que la latence de l'onde P induite par la gentamicine (Tableau 15) est similaire à celle provoquée par un antagoniste des récepteurs calciques exprimés par les neurones (l' ω -ctx MVIIC, Tableau 14), il semble que la gentamicine agisse davantage sur les moto-neurones que sur la terminaison synaptique *sensu stricto*.

Que l'action de la gentamicine porte sur le système efférent médian et/ou sur les moto-neurones du ROM, l'amplitude de l'onde P était voisine de celle engendrée par le toluène. En revanche, la latence de l'onde P induite par la gentamicine était plus courte que celle induite par le solvant. Cela laisse donc penser que le solvant, comme la gentamicine, pourrait agir sur le système efférent médian et/ou sur les moto-neurones du ROM, mais par des mécanismes différents.

Concernant l'onde N permanente observée suite à l'injection de gentamicine (*Fig. 36*), elle pourrait être une conséquence de la toxicité de l'antibiotique sur l'organe de Corti. Puisque les ondes N induites par le toluène et la gentamicine ont des amplitudes similaires (Tableau 15), la diminution de l'amplitude du PMC pourrait être due à la cochléotoxicité du toluène. Cependant, le caractère transitoire de l'onde N induite par le solvant (*Fig. 36*) et l'absence d'onde N lors d'une injection de solvant dirigée vers la cochlée (*Fig. 27*) ne renforcent pas cette hypothèse.

En résumé, le rôle majeur de l'intensité de la stimulation acoustique, l'absence de perturbation du PMC lors d'une injection de solvant dans la branche interne de la carotide et les effets de la gentamicine laissent penser que le toluène perturberait davantage les voies efférentes centrales impliquées dans les réflexes de protection acoustique que le récepteur périphérique, la cochlée.

□ **Effets d'une co-exposition au bruit et au toluène sur les performances des réflexes de protection acoustique**

Puisque la perturbation par le toluène semble être centrale plutôt que périphérique et dépend de l'intensité sonore de la stimulation, il était légitime de penser que le

fonctionnement des deux réflexes de protection acoustique, le ROI et le ROM, pouvait être perturbé par les solvants aromatiques. Pour tester l'impact relatif du toluène sur les deux réflexes, une série d'expérimentations inspirées par les travaux de Liberman (1989) a été réalisée. Ces expériences exploitent la caractéristique bilatérale des réflexes de protection acoustique : une stimulation acoustique dans une oreille déclenche simultanément les réflexes dans les deux oreilles.

Une stimulation *contra*-latérale par rapport à l'oreille bio-instrumentée, d'intensité élevée, a été utilisée pour stimuler les fibres olivo-cochléaires médianes impliquées dans le ROI et les moto-neurones issus des noyaux faciaux et du trijumeau impliqués dans le ROM. En revanche, la « suppression *contra*-latérale » a été mesurée dans l'oreille *ipsi*-latérale, en réponse à un bruit de 65 ou 85 dB SPL.

Comme le montrent les figures 28 et 29 (courbes noires), la stimulation *contra*-latérale a bien déclenché une « suppression *contra*-latérale » dont l'amplitude dépendait de l'intensité de la stimulation sonore *ipsi*-latérale (*Tableau 11*). Pour expliquer cette différence d'amplitude de la « suppression *contra*-latérale », rappelons qu'à une intensité de 85 dB SPL, la stimulation *ipsi*-latérale déclenche partiellement les réflexes de protection (Guinan et McCue, 1987 ; Pilz et al., 1997 ; Liberman et Guinan, 1998) ; la stimulation *contra*-latérale ne fait que compléter l'activation de ces derniers (*Tableau 11*). En revanche, lors de la stimulation *ipsi*-latérale de 65 dB SPL, seule la stimulation *contra*-latérale déclenche la « suppression *contra*-latérale » mesurée (*Tableau 11*).

L'injection intra-carotidienne d'un bolus de 116,2 mM de toluène (*Fig 28 et 29, Tableau 11*) a momentanément perturbé les effets des réflexes de protection : l'augmentation transitoire de l'amplitude du PMC, suivie d'une diminution transitoire de l'amplitude du PMC en sont la preuve. Quelle que soit la stimulation sonore utilisée : *ipsi*-latérale seule (*Fig. 26, 85 dB SPL*) ou *ipsi*- et *contra*-latérale (*Fig. 28 et 29, Tableau 11*), l'injection de toluène a engendré des variations du PMC de mêmes amplitudes. On peut donc en déduire que les variations d'amplitude du PMC induites par le toluène traduisent une perturbation des réflexes de protection acoustique. Si l'onde P induite par le toluène annule les effets des réflexes, l'onde N semble renforcer les effets des réflexes. En d'autres termes, l'onde P traduit une inhibition des réflexes alors que l'onde N traduirait une potentialisation des réflexes. Par ailleurs, le fait que l'amplitude moyenne de l'onde P soit supérieure à celle de la « suppression *contra*-latérale », quelle que soit l'intensité de la stimulation *ipsi*-latérale

(Tableau 11), laisse penser que le bolus de solvant injecté a inhibé la *quasi* totalité des réflexes, et ce quel que soit leur état initial d'activation.

A l'instar des résultats obtenus avec le PMC, l'amplitude de l'onde N1 du PAC a montré une « suppression *contra*-latérale » synchronisée à la stimulation acoustique (Fig. 30). La stimulation *contra*-latérale a, cette fois encore, activé efficacement les réflexes de protection. De même, l'augmentation de l'amplitude de l'onde N1 du PAC, provoquée par l'injection de toluène, montre que le solvant inhibe momentanément les effets des réflexes de protection (Fig. 30 et Tableau 12).

En résumé, quel que soit le potentiel mesuré, PAC ou PMC, les résultats montrent que les réflexes de protection peuvent être transitoirement inhibés par le toluène.

□ **Cibles du toluène : réflexe de l'oreille moyenne vs. réflexe de l'oreille interne**

Pour identifier les effets relatifs du toluène sur le ROM par rapport à ceux du ROI, les expériences précédentes ont été renouvelées sur des animaux dont les muscles de l'oreille moyenne avaient été préalablement sectionnés.

Les figures 28 et 29 (courbes bleues) montrent que d'une part, la stimulation *contra*-latérale n'a pas induit de « suppression *contra*-latérale » et d'autre part, que l'injection de solvant n'a pas produit de variations d'amplitude du PMC. Par contre, la figure 30 (courbe bleue) montre qu'une fraction de la « suppression *contra*-latérale » du PAC persistait en dépit de la section du muscle tenseur tympanique et du muscle stapédien. Cette « suppression *contra*-latérale » résiduelle pourrait s'expliquer par l'effet du ROI sur le PAC. En effet, si l'intensité et la gamme de fréquences de la stimulation *contra*-latérale sont efficaces pour activer le ROM, elles le sont également pour déclencher le ROI dont le seuil est inférieur à celui du ROM (Guinan et McCue, 1987 ; Liberman et Guinan, 1998). De plus, si l'injection de solvant perturbe les centres nerveux supérieurs, il est fort probable qu'elle perturbe l'olive supérieure médiane (relais nerveux du système efférent médian qui intervient dans le ROI) situé à proximité des noyaux faciaux et du trijumeau dans le tronc cérébral. Enfin, la stimulation audiométrique utilisée pour déclencher le PAC était un son pur, contrairement à celle utilisée pour déclencher le PMC. Il se pourrait donc qu'avec une telle stimulation, le PAC soit plus sensible pour détecter les variations du ROI. Si tel était le cas, l'injection de solvant chez les animaux privés de leur ROM aurait dû néanmoins se traduire par une

augmentation de l'amplitude du PAC (*Fig. 30*). Comme aucune augmentation de l'amplitude du PAC n'a été constatée, un masquage acoustique semble, dans notre contexte expérimental, être l'hypothèse la plus probable pour expliquer cette « suppression *contra*-latérale » résiduelle. Malgré le découpage temporel de la stimulation *contra*-latérale (*Cf. II. 2.2.2.1. et Fig. 13*) et la différence de spectre entre les stimulations *ipsi*- et *contra*-latérale (*Fig. 8 et 9*), la propagation du bruit *contra*-latéral d'une oreille à l'autre (crosstalk acoustique), par conduction aérienne ou osseuse ne peut être écartée.

Quelle que soit l'origine de la « suppression *contra*-latérale », l'absence de l'onde P et de l'onde Nt (*Fig. 28 à 30*), chez les animaux dont les muscles de l'oreille moyenne avaient été sectionnés, laisse penser que le ROM était la cible du toluène et que la réponse majeure à l'injection de toluène était une inhibition du ROM. Puisque l'arc réflexe impliqué dans le ROM fait intervenir un récepteur, des neurones sensitifs, un centre nerveux, des moto-neurones et enfin un effecteur (*Fig. 43*), cette inhibition pourrait avoir lieu au niveau soit :

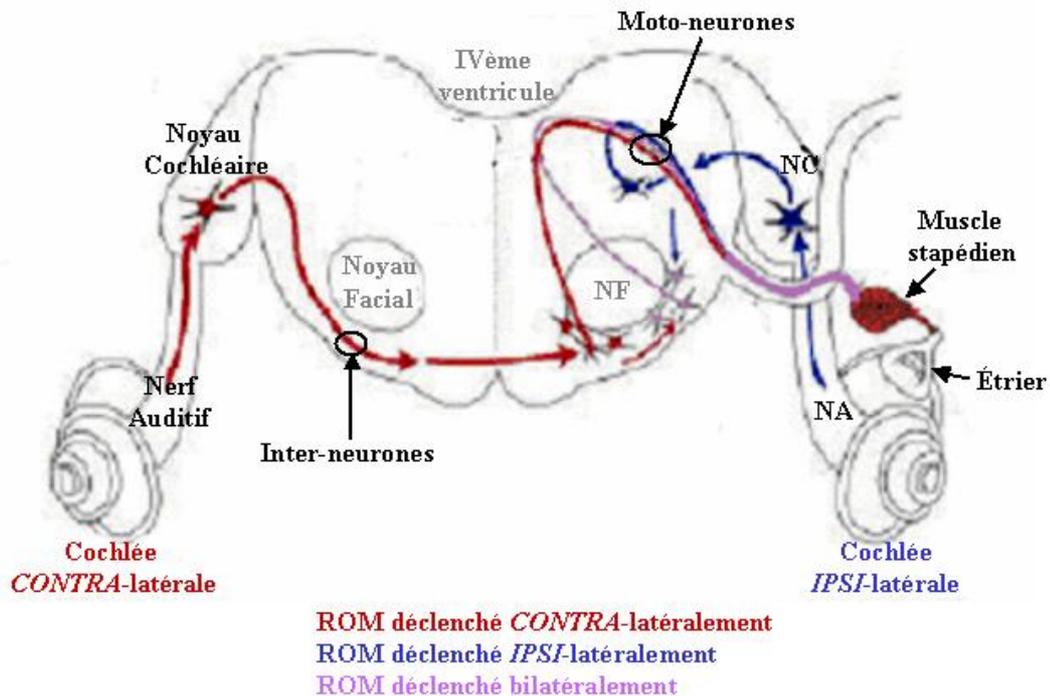
- de l'organe de Corti,
- des inter-neurones (voie afférente),
- des noyaux faciaux et du trijumeau,
- des moto-neurones (voie efférente),
- des muscles eux-mêmes.

D'emblée, l'organe de Corti peut être écarté puisque l'augmentation de l'amplitude du PMC n'a pas été observée lorsque l'injection de solvant était réalisée dans la branche interne de la carotide connectée à l'artère stapédienne (Yamamoto et al., 2003), c'est-à-dire en direction de la cochlée (*Fig. 27*). De plus, les résultats histologiques ne montrent pas de perturbations morphologiques évidentes des CCE (*Fig. 38*) bien que la désorganisation des stries vasculaires laisse penser que le toluène atteint cette structure cochléaire (*Fig. 40*).

Quant aux muscles de l'oreille moyenne, ils peuvent être également écartés puisque le vérapamil, un antagoniste des récepteurs calciques de type L exprimés principalement au niveau musculaire engendre une augmentation de l'amplitude du PMC dont la latence est supérieure à celle du toluène (*Tableaux 8 et 14*).

Enfin, pour évaluer le rôle des inter-neurones et des moto-neurones (*Fig. 43*), une expérience a été réalisée avec une stimulation sonore *contra*-latérale associée à une injection *contra*-latérale de toluène. Rappelons qu'une stimulation *contra*-latérale stimule d'abord le noyau cochléaire *contra*-latéral qui active, via des inter-neurones croisant ventralement le tronc cérébral, les moto-neurones *ipsi*-latéraux. Enfin, ces derniers déclenchent la contraction des muscles de l'oreille moyenne [*Fig. 43* d'après Lee et al., 2006].

VOIE NEURONALE IMPLIQUEE DANS L'ACTIVATION DU MUSCLE STAPEDIEN



*Figure 43 : Voie neuronale (afférences et efférences) déclenchant la contraction du muscle stapédien (d'après Lee et al., 2006). En rouge, réflexe stapédien croisé ou voie neuronale impliquée dans l'activation du muscle par un bruit *contra*-latéral ; en bleu, réflexe stapédien non croisé ou voie neuronale impliquée dans l'activation du muscle par un bruit *ipsi*-latéral ; en violet, voie neuronale impliquée dans l'activation du muscle par un bruit bilatéral.*

NA : nerf auditif ; NC : noyau cochléaire ; NF : noyau facial.

L'absence de l'onde P lors de l'injection *contra*-latérale d'un bolus de toluène (*Fig. 31*) prouve que les inter-neurones n'étaient pas l'élément de l'arc réflexe impliqué dans l'augmentation de l'amplitude du PMC. De ce fait, seuls les moto-neurones et/ou les noyaux *ipsi*-latéraux avaient en revanche un rôle déterminant dans l'augmentation de l'amplitude du PMC.

Par contre, la présence de l'onde N obtenue lors de l'injection *contra*-latérale laisse penser que les inter-neurones pourraient être l'élément de l'arc réflexe responsable de la

diminution d'amplitude du PMC. Cependant, il est également possible que la dilution du bolus de solvant injecté *contra*-latéralement n'ait pas permis d'atteindre une concentration suffisante pour inhiber la cible *ipsi*-latérale : les moto-neurones et/ou les noyaux *ipsi*-latéraux. En effet, l'onde N provoquée par le bolus *contra*-latéral de 116,2 mM de toluène était similaire en amplitude et en latence à l'onde Np obtenue lors d'une injection *ipsi*-latérale d'un bolus de 58,4 mM de toluène (*Fig. 25 et Tableau 7*).

En résumé, notre approche expérimentale est telle que le toluène, administré *ipsi*-latéralement à raison de 116,2 mM, inhibe la voie efférente impliquée dans le ROM et notamment les moto-neurones et/ou les noyaux *ipsi*-latéraux.

□ **Mécanisme d'action à l'origine de la perturbation du réflexe de l'oreille moyenne**

Alors que l'action du toluène sur le ROM a été clairement démontrée dans cette étude, il restait à préciser le mode d'action du toluène sur ce réflexe. A l'instar des anesthésiques et des alcools, deux théories peuvent expliquer l'action d'un solvant sur sa cible biologique : « the lipid theory » vs. « the protein theory » (Peoples et al., 1996).

La première théorie repose sur la capacité des solvants à perturber l'intégrité membranaire. Cette capacité est directement liée au caractère lipophile de la molécule (Sikkema et al., 1994), mais aussi à d'autres facteurs tels que la taille, la forme, le nombre de doubles liaisons de la molécule de solvant (Naskali et al., 1993).

La seconde théorie s'appuie sur la capacité spécifique du solvant à interagir avec une protéine fichée dans la membrane plasmique.

Dans la littérature, les données favorables à l'une ou l'autre des théories sont nombreuses. Par exemple, Lebel et Schatz (1989) ont montré que l'injection *i.p.* de toluène (1 g/kg, 1 h) chez le rat augmentait la fluidité des membranes synaptosomales et que cette interaction du toluène avec les phospholipides membranaires entraînait également une modification de la composition et de la fonction des membranes. Au cours d'expériences *in vitro*, Engelke et al. (1992) ont également constaté que le toluène engendrait une augmentation de la fluidité des membranes synaptosomales issues de rat. Par ailleurs, des données obtenues avec des études *in vitro* tendent à prouver que les solvants organiques agissent sur une variété de récepteurs ionotropiques neuronaux. A ce jour, il a été montré que le toluène pouvait :

- perturber les courants ioniques déclenchés par les récepteurs gabaergiques (Beckstead et al., 2000 ; Meulenberg et Vijverberg, 2003 ; Bale et al., 2005 a) et les récepteurs P2X (Woodward et al., 2004),
- potentialiser la fonction des récepteurs sérotoninergiques (Lopreato et al., 2003),
- inhiber les courants ioniques déclenchés par les récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (Cruz et al., 1998, 2000), les récepteurs nicotiniques (Bale et al., 2005 b), les récepteurs muscariniques (Tsuga et Honma, 2000), les canaux Ca^{2+} (Tillar et al., 2002 ; Shafer et al., 2005) et Na^+ voltage-dépendants (Cruz et al., 2003).

D'une façon générale, il ressort de ces études *in vitro* que l'action du toluène sur les récepteurs ionotropiques neuronaux est rapide, réversible, dépend de la concentration d'exposition au solvant et du type de sous unité qui compose le récepteur.

Compte tenu des arguments en faveur de ces deux théories, il nous fallait donc répondre à la question fondamentale suivante : les effets du toluène sur le ROM étaient-ils la conséquence d'une perturbation non spécifique de l'intégrité membranaire des moto-neurones et/ou les noyaux *ipsi*-latéraux, ou d'une perturbation spécifique d'un récepteur neurosensoriel, ou encore d'une perturbation globale de la membrane et des récepteurs ?

L'injection intra-carotidienne d'un bolus d'éthanol, un solvant qui perturbe l'intégrité membranaire (Yamashita et al., 1992 ; Yun et al., 1994 ; Gutiérrez-Ruiz et al., 1995) n'a provoqué qu'une faible augmentation de l'amplitude du PMC en dépit de la concentration testée qui était 10 fois supérieure à celle du toluène (*Fig. 32*). Par conséquent, une perturbation de l'intégrité membranaire des moto-neurones et/ou les noyaux *ipsi*-latéraux ne pouvait pas expliquer, à elle seule, l'augmentation de l'amplitude du PMC provoquée par le toluène. La désorganisation des membranes est en majeure partie liée au caractère lipophile d'une molécule, c'est-à-dire à la valeur de son coefficient de partage octanol/eau ($\text{Log } P_{o/w}$). Or, l'augmentation de l'amplitude du PMC n'était pas directement liée à la valeur du $\text{Log } P_{o/w}$ de l'agent chimique injecté. Preuve en est, le $\text{Log } P_{o/w}$ de l'éthanol est égal à 0,31 alors que celui du toluène est égal à 2,65 ; on pouvait donc penser qu'une valeur minimale de $\text{Log } P_{o/w}$ devait être atteinte pour observer une onde P. Cependant, d'autres solvants, tels que le propylbenzène ou le butylbenzène, dont le $\text{Log } P_{o/w}$ est respectivement de 3,85 et de 4,35, n'ont pas engendré d'augmentation de l'amplitude du PMC (*Fig. 32*). Ainsi, le caractère lipophile des solvants ne peut pas être considéré comme le responsable majeur de l'augmentation de l'amplitude du PMC. Il semble donc plus probable que les solvants agissent plus spécifiquement sur un récepteur neurosensoriel en fonction de leur structure.

Les variations d'amplitude du PMC observées lors de l'injection intra-carotidienne de divers solvants, aromatiques et non aromatiques (*Fig. 32*) ont conforté l'hypothèse d'une perturbation spécifique, de type « clé-serrure », des solvants aromatiques sur un récepteur donné. En biologie moléculaire, le concept « clé-serrure » renvoie à l'idée d'une interaction spécifique ; il modélise la réactivité ou la compatibilité purement morphologique de deux molécules tel qu'un ligand avec un récepteur. Sur l'ensemble des solvants aromatiques testés, les trois isomères du xylène, l'alcool benzylique, le styrène, et l'éthylbenzène ont provoqué des ondes P et N, tandis que le benzène, le butylbenzène et le propylbenzène n'ont provoqué qu'une onde N. Par ailleurs, les deux solvants non aromatiques testés : la NMP et le cyclohexane ont engendré tous deux une onde N unique. De ces résultats, illustrés par la figure 32, on déduit que l'augmentation de l'amplitude du PMC, ou en d'autres termes, l'inhibition des voies auditives efférentes qui interviennent dans le ROM, dépend :

- 1) de la présence d'un noyau aromatique (absence de noyau aromatique pour la NMP et le cyclohexane),
- 2) de la présence d'une chaîne latérale associée au noyau aromatique (absence de chaîne latérale avec le benzène),
- 3) du nombre de C constituant la chaîne latérale ($C < 3$).

Ainsi, la structure tridimensionnelle de la molécule de solvant aromatique paraît être un élément déterminant dans l'inhibition du ROM, même si l'augmentation de la concentration de solvant aromatique administré peut parfois pallier le manque d'affinité de la molécule de solvant sur les récepteurs cibles. En effet, l'exemple de l'éthylbenzène montre qu'une concentration de 1,7 x la concentration de référence du toluène peut provoquer une onde P d'au moins 4 dB.

Par contre, l'onde N qui pourrait traduire la potentialisation du ROM, ne semble pas être déterminée par certaines caractéristiques tridimensionnelles de la molécule de solvant puisqu'elle est observée quel que soit le solvant administré. L'onde N semblerait donc liée davantage à une action non spécifique sur les membranes des inter-neurones ou des motoneurones impliqués dans le ROM.

En résumé, les solvants aromatiques, dont la structure tridimensionnelle répond aux critères cités précédemment, possèdent la faculté d'inhiber le ROM en interagissant probablement spécifiquement avec un récepteur neurosensoriel des voies auditives efférentes impliquées dans le réflexe.

Alors qu'un modèle de type « clé-serrure » des solvants sur un récepteur neurosensoriel a été pressenti dans cette étude, la nature du récepteur neurosensoriel cible restait à être déterminée. Les moto-neurones du ROM sont cholinergiques et utilisent deux familles de récepteurs :

- les récepteurs nicotiniques dont les sous-unités identifiées ont été $\alpha 2-7$, $\alpha 9$, $\beta 2-4$ (Liu et al., 1998 ; Zaninetti et al., 1999) et,
- les récepteurs muscariniques (Wamsley et al., 1981 ; Keiger et Walker, 2000).

Au sein de cette neurotransmission cholinergique, un élément majeur intervient : le Ca^{2+} (Dunant et Israël, 1985 ; Altschuler et Fex, 1986). Ce dernier est nécessaire pour la libération des vésicules de neurotransmetteur (Katz et Miledi, 1967) ; il intervient également dans la génération des potentiels d'action musculaires (Endo, 2006). Plant et al. (1998) ont montré chez le rat que les moto-neurones issus des noyaux faciaux exprimaient des récepteurs calciques de type T, N, L et Rs au niveau somatique alors qu'au niveau de la terminaison synaptique, les récepteurs calciques étaient de type P. En ce qui concerne les moto-neurones issus des noyaux du trijumeau, les récepteurs calciques seraient plutôt de type N et P/Q (Hsio et al., 2005). Comme l'ensemble des muscles squelettiques (Catterall et al., 1988 ; Day et al., 1997), les récepteurs calciques exprimés dans les muscles de l'oreille moyenne sont de type L.

Pour éprouver l'action de certains solvants aromatiques sur les récepteurs cholinergiques et sur les récepteurs calciques, les effets de divers antagonistes ont été testés sur le PMC. Les injections d'atropine (691 μ M), un antagoniste non sélectif des récepteurs cholinergiques, de DBE (175 μ M), un antagoniste nicotinique, et de 4-DAMP (122 μ M), un antagoniste muscarinique (*Fig. 33*) ont toutes provoqué une augmentation du PMC dont l'amplitude était statistiquement (*Cf. III. 4.1.*) identique à celle provoquée par l'injection de notre bolus de « référence ». Puisque le DBE et le 4-DAMP ont engendré tous deux une réponse du PMC identique à celle provoquée par le toluène, nous n'avons pas pu discerner le rôle prépondérant d'un type de récepteur cholinergique par rapport à l'autre. Par contre, la gamme de concentrations requises pour l'obtention de l'onde P avec les antagonistes était différente de celle requise avec le toluène : μ M vs. mM. Cette différence de concentration pourrait traduire une différence d'affinité entre le toluène et les antagonistes sur les récepteurs cholinergiques bien qu'il faille également tenir compte du caractère lipophile du toluène par rapport aux antagonistes des récepteurs cholinergiques. En effet, il est possible qu'une fraction du bolus de solvant injecté ait pu être adsorbée par des tissus riches en lipide avant d'atteindre les récepteurs cholinergiques cibles. Le cas échéant, la concentration de 116,2 mM

de toluène contenue dans la seringue serait surestimée par rapport à la concentration de toluène requise pour inhiber les récepteurs cholinergiques.

Quoi qu'il en soit, il semble que le toluène puisse interagir :

- avec les récepteurs nicotiques et muscariniques ou,
- avec des récepteurs cholinergiques ayant des propriétés pharmacologiques mixtes (nicotinique et muscarinique) tels que les récepteurs $\alpha 9$ (Elgoyhen et al., 1994).

La perturbation des récepteurs cholinergiques par un solvant aromatique avait déjà été mise en évidence avec des techniques *in vitro*. Bale et al. (2005 b) ont mis en évidence une inhibition par le toluène (0,03 – 0,9 mM) des récepteurs nicotiques neuronaux $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 3\beta 2$ de rat exprimés dans des oocytes. Les concentrations de toluène utilisées dans cette étude étaient du même ordre de grandeur que celles mesurées au niveau cérébral dans des expériences *in vivo* chez le rat (Bushnell et al., 1994). Tsuga et Honma (2000) ont montré qu'une exposition des rats à 1000 ppm de toluène pendant 6 h réduisait l'affinité de fixation du carbamylcholine sur les récepteurs muscariniques présents sur les fractions membranaires du cortex frontal de rat. D'après ces auteurs, le toluène pourrait ainsi perturber la signalisation cellulaire déclenchée par l'activation des récepteurs muscariniques du cortex frontal de rat. Il serait donc possible que le toluène agisse également sur les récepteurs cholinergiques $\alpha 9$, notamment ceux exprimés dans le ganglion trigéminal, relais du nerf trijumeau innervant le muscle tenseur tympanique impliqué dans le ROM (Keiger et Walker, 2000).

Par ailleurs, une augmentation de l'amplitude du PMC de plus de 4 dB a été obtenue lors de l'injection intra-carotidienne d'un bolus de 1,25 mM de vérapamil (*Fig. 34*), un antagoniste des récepteurs calciques de type L principalement exprimés au niveau des muscles, et de 211,4 μ M d' ω -ctx MVIIC (*Fig. 35*), un antagoniste des récepteurs calciques de type P/Q et N qui sont exprimés uniquement dans les cellules nerveuses. Le vérapamil a engendré une onde P dont la latence (*Tableau 14* et *Fig. 34*) était plus longue que celle induite par le toluène (*Tableau 8* et *Fig. 34*). Il semblerait ainsi que le toluène ne perturbe pas directement les récepteurs calciques de type L. Quant à l' ω -ctx MVIIC, la latence (*Tableau 14* et *Fig. 35*) de l'onde P était plus courte que celle induite par le toluène injecté dans la branche occipitale de la carotide (*Tableau 10* et *Fig. 35*). Le toluène ne semblerait donc pas, non plus, perturber les récepteurs calciques de type P/Q et N.

Par contre, les augmentations de l'amplitude du PMC obtenues avec les injections d'atropine, de DBE et de 4-DAMP apparaissaient avec une latence (*Tableau 13*) comparable à celle induite par le toluène (*Tableau 8*). En s'appuyant sur ces derniers résultats, le mode

d'action du toluène correspondrait davantage à une inhibition des récepteurs cholinergiques, plutôt qu'à une inhibition des récepteurs calciques.

En résumé, l'onde P observée suite à l'injection d'un bolus de toluène, ou de certains autres solvants aromatiques, traduirait une inhibition des récepteurs cholinergiques des voies auditives efférentes. Cette inhibition aurait pour effet de bloquer la contraction des muscles impliqués dans le ROM lors d'une stimulation sonore de 85 dB SPL ou plus.

Si le mécanisme à l'origine de l'augmentation de l'amplitude du PMC semble élucidé, celui de la diminution de l'amplitude du PMC provoquée par l'injection de toluène reste encore à préciser. Deux hypothèses ont été évoquées : un effet cochléotoxique ou une potentialisation du ROM. L'hypothèse d'un effet cochléotoxique peut être d'emblée écartée puisque l'injection d'un bolus de toluène limitée à la branche interne de la carotide adjacente à l'artère stapédienne n'a pas induit d'onde N (*Fig. 27*). Par ailleurs, l'onde N n'apparaît pas lorsque les muscles de l'oreille moyenne sont sectionnés (*Fig. 28 à 30*) ce qui signifie que l'onde N requiert la présence fonctionnelle de ces muscles. L'onde N serait donc liée à une contraction plus importante des muscles de l'oreille moyenne et aurait donc pour effet de renforcer les effets du ROM. La potentialisation du ROM pourrait s'expliquer par trois mécanismes différents :

(1) un effet rebond (relaxation/contraction rebond) lié à une hypersensibilité de la membrane post-synaptique après un blocage prolongé des récepteurs cholinergiques. Il ne concernerait donc que les solvants capables d'inhiber les récepteurs cholinergiques, c'est-à-dire ceux qui engendrent une onde P, à savoir le toluène, le styrène, les xylènes, l'éthylbenzène et l'alcool benzylique (*Fig. 32*),

(2) un effet inhibiteur de l'acétylcholinestérase (Korpela et Tähti, 1988 a et b ; Engelke et al., 1992 ; Naskali et al. ; 1993), enzyme qui catabolise l'ACh et qui est présente dans les membranes plasmiques neuronales pré- et post-synaptiques (Davis et Koelle, 1978 ; Davidoff et Irintchev, 1986). Cette inhibition de l'acétylcholinestérase par les solvants résulterait d'une modification de la fluidité membranaire et donc d'une modification des interactions lipide/protéine (Engelke et al., 1992). Elle pourrait également résulter d'un effet direct du solvant sur l'acétylcholinestérase ancrée dans la membrane (Korpela et Tähti, 1988 b). En conséquence les quanta d'ACh libre au niveau les fentes synaptiques augmenteraient et il en résulterait une contraction des muscles,

(3) un effet agoniste du solvant sur les récepteurs neurosensoriels qui interviennent dans le ROM (récepteurs cholinergiques ?). Il ne concernerait que les solvants non aromatiques, le cyclohexane et la NMP, qui provoquent une onde Np unique dont la latence est équivalente à celle de l'onde P (*Fig. 32*).

Il se pourrait aussi que l'onde N soit le résultat d'un ou de plusieurs effets induits par un seul et même solvant.

Quelle qu'en soit l'origine, l'onde N traduit une contraction des muscles de l'oreille moyenne, elle est équivalente à une potentialisation du ROM. La latence de l'onde N (Np, Ni et Nt) dépendrait de la nature (*Fig. 32*) et de la concentration du solvant injecté (*Fig. 24*). Les différences de latence pourraient s'expliquer de la manière suivante : lors de l'injection de solvant aromatique, les variations du PMC traduisent les effets inhibiteur ou activateur des solvants sur le ROM ; selon la concentration du solvant administré, l'onde P pourrait masquer l'onde N ou inversement. En effet, dans le cas du toluène, une faible concentration induit une onde N alors qu'une plus forte concentration induit également une onde P dont les effets peuvent masquer en partie ceux de l'onde N (*Fig. 24*).

D'après nos résultats, les variations électrophysiologiques engendrées par les solvants aromatiques correspondent à une perturbation du ROM. Ces variations seraient dues à une perturbation des noyaux faciaux et du trijumeau et/ou des moto-neurones qui les relient aux muscles de l'oreille moyenne plutôt qu'à une perturbation du récepteur auditif, la cochlée. Bien que l'apoptose soit un processus de mort cellulaire fréquemment observé dans la cytotoxicité cérébrale induite par un traumatisme mécanique (Namura et al., 1998) ou par un agent chimique toxique (Lin et al., 2002 ; Han et al., 2005), l'injection de toluène ou de propylbenzène dans notre contexte expérimental n'a pas provoqué d'apoptose dans les centres nerveux supérieurs (*Fig. 42*). Ces résultats suggèrent donc que les variations d'amplitude du PMC observées seraient principalement dues à un effet pharmacologique des solvants sur les voies auditives efférentes impliquées dans le ROM.

V. Conclusions/perspectives

Les résultats obtenus avec l'approche expérimentale aiguë décrite dans cette thèse, montrent que *in vivo* les solvants aromatiques ont une action pharmacologique sur les récepteurs nicotiques et muscariniques. Cette action correspond essentiellement à une inhibition des récepteurs cholinergiques localisés au niveau des moto-neurones et/ou des noyaux faciaux et du trijumeau impliqués dans le réflexe de protection de l'oreille moyenne (ROM). L'inhibition du ROM dépend de la structure tridimensionnelle de la molécule de solvant et en particulier :

- de la présence d'un noyau aromatique,
- de la présence d'une chaîne latérale associée au noyau aromatique,
- du nombre de C constituant la chaîne latérale.

L'inhibition des récepteurs cholinergiques centraux par certains solvants aromatiques pourrait expliquer, en partie tout au moins, la synergie des effets périphériques observés lors d'une co-exposition au bruit et au solvant. L'exposition au solvant priverait la cochlée de son système de protection. Par conséquent, l'énergie acoustique présentée devant la cochlée serait plus importante et donc plus dommageable pour les cellules sensorielles. En d'autres termes, les effets dus au bruit seraient potentialisés par les solvants.

Le mécanisme d'inhibition centrale du ROM par certains solvants aromatiques a été démontré chez l'animal à l'aide d'une intoxication par voie intra-carotidienne. Puisque la voie majeure d'intoxication aux solvants est l'inhalation, on est en droit de se poser la question suivante :

Quels crédits peut-on accorder à une exposition intra-carotidienne par rapport à une exposition par inhalation ?

Pour répondre à cette question, une étude des effets du bruit chez le rat inhalant des solvants aromatiques pourrait être entreprise. L'impédancemétrie, l'électromyographie ou encore les produits de distorsion pourraient être utilisés pour étudier les performances du ROM (la force de contraction et le délai de déclenchement).

D'un point de vue de la prévention, l'inhibition du ROM par certains solvants aromatiques prend toute son importance lors d'une co-exposition professionnelle qui allie bruit et solvants aromatiques. En effet, à ce jour, la législation en vigueur impose uniquement

des valeurs limites d'exposition au bruit et aux solvants aromatiques. Peu de considération n'est accordée aux co-expositions par la réglementation européenne. En s'appuyant sur les résultats de cette thèse, les valeurs limites d'expositions recommandées dans l'industrie pourraient être réévaluées de façon à tenir compte des risques encourus en milieu multifactoriel. Dans l'attente d'expériences conçues pour étudier une stratégie de prévention adéquate, des recommandations ont été proposées, par précaution, pour protéger l'audition des travailleurs exposés au bruit et aux solvants aromatiques (Campo et Maguin, 2007). Dans un environnement bruyant pollué par des solvants aromatiques, le port de protecteur individuel contre le bruit a été préconisé dès 80 dBA, valeur d'exposition inférieure déclenchant l'action définie par la législation européenne.

Bibliographie

- Abbate C., Giorgianni C., Munaò F., Brecciaroli R.* **Neurotoxicity induced by exposure to toluene. An electrophysiologic study.** *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1993;64(6):389-392.
- Altschuler R.A. and Fex J.* **Efferent neurotransmission.** In: *Neurobiology of hearing: The cochlea*, ed. Altschuler R.A., Bobbin R.P., Hoffman D.A. Raven Press, New York. 1986;pp.383-396.
- Arlien-Søborg P.* **Solvent neurotoxicity.** Boca Raton, CRC Press. 1992;pp.129-153.
- Ashmore J.* **Ionic mechanisms in hair cells of the mammalian cochlea.** In: *Transduction and cellular mechanisms in sensory receptors*, ed. Hamann & Iggo. Elsevier. 1988;74:3-9.
- Bale A., Tu Y., Carpentier-Hyland E.P., Chandler L.J., Woodward J.J.* **Alterations in glutamatergic and gabaergic ion channel activity in hippocampal neurons following exposure to the abused inhalant toluene.** *Neuroscience.* 2005 a;130(1):197-206.
- Bale A., Meacham A., Benignus V., Bushnell P., Shafer T.* **Volatile organic compounds inhibit human and rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in Xenopus oocytes.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005 b;205(1):77-88.
- Barregård L. and Axelsson A.* **Is there an ototraumatic interaction between noise and solvents?** *Scand. Audiol.* 1984;13(3):151-155.
- Beckstead M.J., Weiner J.L. Eger II E.I., Gong D.H. Mihic S.J.* **Glycine and γ -aminobutyric acid(A) receptor function is enhanced by drugs of abuse.** *Mol. Pharmacol.* 2000;57(6):1199-1205.
- Bissinger U., Plinkert P.K., Sesterhenn G., Grimm A., Lenz G.* **Influence of volatile and intravenous anesthetics on the threshold of the acoustically evoked stapedius reflex.** *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2000;257(7):349-354.
- Bohne B.A. and Rabitt K.D.* **Holes in the reticulum lamina after noise exposure: implication for continuing damage in the organ of Corti.** *Hear. Res.* 1983;11(1):41-54.
- Borg E., Canlon B., Engström B.* **Noise induced hearing loss. Literature review and experiments in rabbits. Morphological and electrophysiological features, exposure parameters and temporal factors, variability and interactions.** *Scand. Audiol.* 1995;40:1-147.
- Bosatra A., Russolo M., Silverman C.A.* **Acoustic reflex latency: State of the art.** In: *The acoustic reflex; Basic principles and clinical applications*, ed. Silman S. Academic Press, Orlando, Florida. 1984.
- Brandt-Lassen R., Lund S.P., Jepsen G.B.* **Rats exposed to toluene and noise may develop loss of auditory sensitivity due to synergistic interaction.** *Noise & Health.* 2000;3(9):33-44.
- Bushnell P.J., Kelly K.L., Crofton K.M.* **Effects of toluene inhalation on detection of auditory signals in rats.** *Neurotoxicol. Teratol.* 1994;16(2):148-160.
- Calabrese G., Martini A., Sessa G., Cellini M., Bartolucci G.B., Marcuzzo G., De Rosa E.* **Otoneurological study in workers exposed to styrene in the fiberglass industry.** *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1996;68(4):219-223.

Campo P., Lataye R., Bonnet P. No interaction between noise and toluene on cochlea in the guinea pig. Acta Acoust. 1993;1:35-42.

Campo P., Lataye R., Cossec B., Placidi V. Toluene-induced hearing loss: a mid-frequency location of the cochlear lesions. Neurotoxicol. Teratol. 1997;19(2):129-140.

Campo P., Loquet G., Blachère V., Roure M. Toluene and styrene intoxication route in the rat cochlea. Neurotoxicol. Teratol. 1999;21(4):427-434.

Campo P., Lataye R., Loquet G., Bonnet P. Styrene-induced hearing loss: a membrane insult. Hear. Res. 2001;154(1-2):170-180.

Campo P., Blachère V., Payan J.P., Cossec B., Ducos P. Toluene toxicokinetics and metabolism parameters in the rat and guinea pig. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2006;21(3):276-282.

Campo P., Maguin K., Lataye R. Effects of aromatic solvents on acoustic reflexes mediated by central auditory pathways. Toxicol. Sci. 2007 a;99(2):582-590.

Campo P., Waniusiow D., Lataye R., Cossec B., Rieger B., Cosnier F., Burgart M. Toluene-induced hearing loss in phenobarbital-treated rats. Neurotoxicol. Teratol. 2007 b; DOI: 10.1016/j.ntt.2007.10.001.

Campo P. and Maguin K. Solvent-induced hearing loss: mechanisms and prevention strategy. IJOMEH. 2007;21(3):1-6.

Cappaert N.L.M., Klis S.F.L., Muijser H., de Groot J.C.M.J., Kulig B.M., Smoorenburg G.F. The ototoxic effects of ethyl benzene in rats. Hear. Res. 1999;137(1-2):91-102.

Cappaert N.L.M., Klis S.F.L., Muijser H., Kulig B.M., Smoorenburg G.F. Simultaneous exposure to ethyl benzene and noise: synergistic effects on outer hair cells. Hear. Res. 2001;162(1-2):67-67.

Cappaert N.L.M., Klis S.F.L., Muijser H., Kulig B.M., Ravensberg L.C., Smoorenburg G.F. Differential susceptibility of rat and guinea pig to the ototoxic effects of ethyl benzene. Neurotoxicol. Teratol. 2002;24(4):503-510.

Cary R., Clarke S., Delic J. Effects of combined exposure to noise and toxic substances. Critical review of the literature. Br. Occup. Hyg. Soc. 1997;41(4):455-465.

Catterall W.A., Seagar M.J., Takahashi M. Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels in skeletal muscle. JBC. 1988;263(8):3535-3538.

Chang S.J., Chen C.J., Lien C.H., Sung F.C. Hearing loss in workers exposed to toluene and noise. Environ. Health Perspect. 2006;114(8):1283-1286.

Convention Européenne STE n°123 sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques.

<http://conventions.coe.int/Treaty/fr/Treaties/Html/123.htm>

Crofton K.M., Lassiter T., Rebert C. Solvent-induced ototoxicity in rats: an atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res. 1994;80(1):25-30.

*Cruz S.L., Mirshahi T., Thomas B., Balster R.L., Woodward J.J. Effects of the abused solvent on recombinant N-Methyl-D-Aspartate and non N-Methyl-D-Aspartate receptors expressed in *xenopus* oocytes.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 1998;286(1):334-340.

*Cruz S.L., Balster R.L., Woodward J.J. Effects of volatil solvents on recombinant N-Methyl-D-Aspartate receptors expressed in *xenopus* oocytes.* Br. J. Pharmacol. 2000;131(7):1303-1308.

Cruz S.L., Orta-Salazar G., Gauthereau M.Y., Millan-Perez Peña L., Salinas-Stefanón E.M. **Inhibition of cardiac sodium currents by toluene exposure.** *Br. J. Pharmacol.* 2003;140(4):653-660.

Dancer A. and Franke R. **Intracochlear sound pressure measurements in guinea pigs.** *Hear. Res.* 1980;2(3-4):191-205.

Dancer A. **Le traumatisme acoustique.** *Médecine/Sciences.* 1991 ;7(4) :357-367.

Davis R. and Koelle G.B. **Electron microscope localization of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the superior cervical ganglion of the cat. I. Normal ganglion.** *J. Cell Biol.* 1978;78(3):785-809.

Davis R.R., Murphy W.J., Snawder J.E., Striley C.A., Henderson D., Khan A, Krieg E.F. **Susceptibility to the ototoxic properties of toluene is species specific.** *Hear. Res.* 2002;166(1-2):24-32.

Davidoff M.S. and Irintchev A.P. **Acetylcholinesterase activity and type C synapses in the hypoglossal, facial and spinal-cord motor nuclei of rats. An electron-microscope study.** *Histochemistry.* 1986;84(4-6):515-524.

Day N.C., Wood S.J., Ince P.G., Volsen S.G., Smith W., Slater C.R., Shaw P.J. **Differential localisation of voltage-dependent calcium channel $\alpha 1$ subunits at the human and rat neuromuscular junction.** *J. Neurosci.* 1997;17(16):6226-6235.

De Barba M.C., Jurkiewiewicz A.L., Zeigelboim B.S., De Oliveira L.A., Pompermayer Bellé A. **Audiometric findings in petrochemical workers exposed to noise and chemical agents.** *Noise & Health.* 2005;7(29):7-11.

Décret 87-848 du 19 octobre 1987. *J.O. Rep. Fr.* 1987.

Décret 2006-892 du 19 juillet 2006. *J.O. Rep. Fr.* 2006;T14.

Décret 2007-1539 du 26 octobre 2007. *J.O. Rep Fr.* 2007;T13.

Directive « bruit » 2003/10/CE du Parlement européen. *J. Off. Union Eur.* 2003;L42:38-44.

Dunant Y. and Israël M. **La liberation d'acétylcholine.** *Pour la Science.* 1985;pp.52-60.

Elgoyhen A.B., Johnson D.S., Boulter J., Vetter D.E., Heinemann S. **Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cell.** *Cell.* 1994;79(4):705-715.

Endo M. **Calcium ion as a second messenger with special reference to excitation-contraction coupling.** *J. Pharmacol. Sci.* 2006;100(5):519-524.

Engelke M., Diehl H., Tähti H. **Effects of toluene and n-hexane on rat synaptosomal membrane fluidity and integral enzyme activities.** *Pharmacol. Toxicol.* 1992;71(5):343-347.

Engström B., Borg E., Canlon B. **Morphology of stereocilia on cochlear hair cells after noise exposure.** In: *Basic and applied aspects of noise-induced hearing loss*, ed. Salvi R.J., Henderson D., Hamernik R.P., Colletti V. *Nato Sci. Series A: vol.III Life Sciences.* New York, London: Plenum Press. 1986;pp.1-9.

Eurostat. **Occupational diseases in Europe in 2001. Statistics in focus, population and social conditions.** 2004;15.

Eybalin M. **Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea.** *Physiol. Rev.* 1993;73(2):309-373.

Fechter L. Effects of acute styrene and simultaneous noise exposure on auditory function in the guinea pig. *Neurotoxicol. Teratol.* 1993;15(3):151-155.

Fex J. Augmentation of cochlear microphonic by stimulation of efferent fibers to the cochlea. *Acta Otolaryngol.* 1959;50:540-541.

Forge A. and Schacht J. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol. Neurootol.* 2000;5(1):3-22.

Gagnaire F., Marignac B., Langlais C. Bonnet P. Ototoxicity in rats exposed to ortho-, meta-, and para-xylene vapours for 13 weeks. *Pharmacol. Toxicol.* 2001;89(1):6-14.

Gagnaire F. and Langlais C. Relative ototoxicity of 21 aromatic solvents. *Arch. Toxicol.* 2005;79(6):346-354.

Gagnaire F., Marignac B., Blachère V., Grossmann S., Langlais C. The role of toxicokinetics in xylene-induced ototoxicity in the rat and guinea-pig. *Toxicol.* 2007;231(2-3):147-158.

Gifford M.L. and Guinan J.J. Effects of electrical stimulation of medial olivocochlear neurons on ipsilateral and contralateral cochlear responses. *Hear. Res.* 1987;29(2-3):179-194.

Gospe S.M.J. and Calaban M.J. Central nervous system distribution of inhaled toluene. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1988;11(3):540-545.

Goto S., Oshima T., Ikeda N., Ueda N., Takasaka T. Expression and localization of the Na-K-2Cl cotransporter in the rat cochlea. *Brain Res.* 1997;765(2):324-326.

Guinan J.J., Warr W.B., Norris B.E. Topographic organization of the olivocochlear projections from the lateral and medial zones of the superior olivary complex. *J. Comp. Neurol.* 1984;226(1):21-27.

Guinan J.J. and McCue M.P. Asymmetries in the acoustic reflexes of the cat stapedius muscle. *Hear. Res.* 1987;26(1):1-10.

Guinan J.J. Medial efferent stimulation increases CM end evokes the MOC potential. In: *The cochlea*, ed. Fay R.R. and Popper A.N. Springer, New York. 1996;pp.445-446.

Guinan J.J. Olivocochlear efferents: anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans. *Ear Hearing.* 2006;27(6):589-607.

Gutiérrez-Ruis M.C., Gómez J.L., Souza V., Bucio L. Chronic and acute ethanol treatment modifies fluidity and composition in plasma membranes of a human hepatic cell line (WRL-68). *Cell Biol. Toxicol.* 1995;11(2):69-78.

Hamernick R.P., Turrentine G.A., Roberto M. Mechanically-induced morphological changes in the organ of Corti. In: *Basic and applied aspects of noise-induced hearing loss*, ed. Salvi R.J., Henderson D., Hamernick R.P., Colletti V. Nato Sci. Series A: vol.III Life Sciences. New York, London: Plenum Press. 1986;pp.69-83.

Han J.Y., Joo Y., Kim Y.S., Lee Y.K., Kim H.J., Cho G.J., Choi W.S., Kang S.S. Ethanol induces cell death by activating caspase-3 in the rat cerebral cortex. *Mol. Cells.* 2005;20(2):189-195.

Heran-Le Roy O. and Sandret N. Premiers résultats de l'enquête "SUMER 94". *Documents pour le médecin du travail.* 1997;69:63-70.

<http://www.acgih.org/TLV2007list.com>

Hsio C.F., Wu N., Chandler S.H. **Voltage-dependent calcium currents in trigeminal motoneurons of early postnatal rats: modulation by 5-HT receptors.** *J. Neurophysiol.* 2005;94(3):2063-2072.

INRS. **Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France.** *Cah. Notes Docum. Hyg. Sécurité. Trav.* 1999;174:59-77.

Johnson A.C., Juntunen L., Nylén P.R., Borg E., Höglund G. **Effect of interaction between noise and toluene on auditory function in the rat.** *Acta. Otolaryngol.* 1988;105(1-2):56-63.

Johnson A.C. and Canlon B. **Progressive hair cell loss induced by toluene exposure.** *Hear. Res.* 1994;75(1-2):201-208.

Johnson A.C. and Nylén P.R. **Effects of industrial solvents on hearing.** *Occupational Medicine: State of the Art Reviews.* 1995;10(3):623-640.

Johnson A.C., Morata T.C., Lindblad A.C., Nylén P.R., Svensson E.B., Krieg E., Aksentijevic A., Prasher D. **Audiological findings in workers exposed to styrene alone or in concert with noise.** *Noise & Health.* 2006;8(30):45-57.

Kastin A.J., Nissen C., Nokolics K., Medzihradzky K. **Distribution of ³H- α -MSH in rat brain.** *Br. Res. Bulletin.* 1976;1(1):19-26.

Katz B. and Miledi R. **A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses.** *J. Physiol.* 1967;192(2):407-436.

Keiger C.J. and Walker J.C. **Individual variation in the expression profiles of nicotinic receptors in the olfactory bulb and trigeminal ganglion and identification of α 2, α 6, α 9, and β 3 transcripts.** *Biochem. Pharmacol.* 2000;59(3):233-240.

Kelly J.B. and Masterton B. **Auditory sensitivity of the albino rat.** *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1977;91(4):930-936.

Kemp D.T. and Souter M. **A new rapid component in the cochlear response to brief electrical efferent stimulation: CM and otoacoustic observations.** *Hear. Res.* 1988;34(1):49-62.

Kirk-Othmer R. **Economic aspect.** In: *Encyclopedia of chemical technology* (4^e edition), Wiley A. – Interscience publication Wiley J. & sons, New York – Chichester-Weinheim – Singapore – Toronto. 1984;24:367-381.

Klinke R. **Neurotransmission in the inner ear.** *Hear. Res.* 1986;22:235-243.

Korpela M. and Tähti H. **The effect of in vitro and in vivo toluene exposure on rat erythrocyte and synaptosome membrane integral enzymes.** *Pharmacol. Toxicol.* 1988 a;63(1):30-32.

Korpela M. and Tähti H. **Human and rat erythrocyte membrane as a model for studying the effects of organic solvents on membrane-bound acetylcholinesterase *in vitro*.** *Toxicol.* 1988 b;2(2):135-139.

Kujawa S.G. and Liberman M.C. **Effects of olivocochlear feedback on distortion product otoacoustic emissions in guinea pigs.** *JARO.* 2001;2(3):268-278.

Lataye R. and Campo P. **Combined effects of simultaneous exposure to noise and toluene on hearing function.** *Neurotoxicol. Teratol.* 1997;19(5):373-382.

Lataye R., Campo P., Loquet G. **Toluene ototoxicity in rats: assessment of the frequency of hearing deficit by electrocochleography.** *Neurotoxicol. Teratol.* 1999;21(3):267-276.

Lataye R., Campo P., Loquet G. **Combined effects of noise and styrene exposure on hearing function.** *Hear. Res.* 2000;139(1-2):86-96.

Lataye R., Campo P., Loquet G., Morel G. **Combined effects of noise and styrene on hearing: comparison between active and sedentary rats.** *Noise & Health.* 2005;7(27):49-64.

Lataye R., Maguin K., Campo P. **Increase in cochlear microphonic potential after toluene administration.** *Hear. Res.* 2007;230(1-2):34-42.

Lebel C.P. and Schatz R.A. **Effect of toluene on rat synaptosomal phospholipid methylation and membrane fluidity.** *Biochem. Pharmacol.* 1989;38(22):4005-4011.

Lee D., De Venecia R., Guinan J., Brown C. **Central auditory pathways mediating the rat middle ear muscles reflexes.** *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 2006;288(4):358-369.

Lieberman M.C. and Dodds M.C. **Acute ultrastructural changes in acoustic trauma: serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates.** *Hear. Res.* 1987;26(1):45-64.

Lieberman M.C. **Rapid assessment of sound-evoked olivocochlear feedback: suppression of compound action potentials by contralateral sound.** *Hear. Res.* 1989;38(1-2):47-56.

Lieberman M.C. and Guinan J.J. **Feedback control of the auditory periphery: anti-masking effects of middle ear muscle vs. olivocochlear efferents.** *J. Commun Disord.* 1998;31(6):471-483.

Lin H.J., Shaffer K.M., Chang Y.H., Barker J.L., Pancrazio J.J., Stenger D.A., Ma W. **Acute exposure of toluene transiently potentiates p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity in cultured rat cortical astrocytes.** *Neurosci. Lett.* 2002;332(2):103-106.

Liu L., Chang G.Q., Jiao Y.Q., Simon S.A. **Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia.** *Brain Res.* 1998;809(2):238-245.

Lohuis P.J., Börjesson P.K., Klis S.F., Smoorenburg G.F. **The rat cochlea in the absence of circulating adrenal hormones: an electrophysiological and morphological study.** *Hear. Res.* 2000;143(1-2):189-196.

Lopreato G.F., Phelan R., Borghese C.M., Beckstead M.J., Mihic S.J. **Inhaled drugs of abused enhance serotonin-3 receptor function.** *Drug Alcohol Depend.* 2003;70(1):11-15.

Loquet G., Campo P., Lataye R. **Comparison of toluene-induced and styrene-induced hearing losses.** *Neurotoxicol. Teratol.* 1999;21(6):689-697.

Maguin K., Lataye R., Campo P., Cossec B., Burgart M., Wanuisiow D. **Ototoxicity of the three xylene isomers in the rat.** *Neurotoxicol. Teratol.* 2006;28(6):648-656.

Mäkitie A.A., Pirvola U., Pyykkö I., Sakakibara H., Riihimäki V., Ylikoski J. **The ototoxic interaction of styrene and noise.** *Hear. Res.* 2003;179(1-2):9-20.

Mattsson J.L., Gorzinski S.J., Albee R.R., Zimmer M.A. **Evoked potential changes from 13 weeks of simulated toluene abuse in rats.** *Pharmacol. Behav.* 1990;36(3):683-689.

Meek M. and Chan P. **Toluene: Evaluation of risks to human health from environmental exposure.** *Environ. Carcino. Ecotox., Canada.* 1994;C12:507-515.

Meulenberg C.J.W. and Vijverberg H.P.M. **Selective inhibition of γ -aminobutyric acid type A receptors in human IMR-32 cells by low concentrations of toluene.** *Toxicol.* 2003;190(3):243-248.

- McFadden D.* **The curious half octave shift: evidence for a basalward migration of the travelling wave envelope with increasing intensity.** In: Basic and applied aspects of noise-induced hearing loss, ed. Salvi R.J., Henderson D., Hamernik R.P., Colletti V. Nato Sci. Series A: vol.III Life Sciences. New York, London: Plenum Press. 1986;pp.69-83.
- Miller R.R., Newhook R., Poole A.* **Styrene production, use, and human exposure.** Crit. Rev. Toxicol. 1994;24(S1-S10).
- Møller A.R.* **Auditory neurophysiology.** New York: Academic press. 1983.
- Morata T.C., Dunn D.E., Kretschmer L.K., Lemasters G.K., Keith R.W.* **Occupational exposure to organic solvents and noise on hearing.** Scand. J. Work Environ. Health. 1993;19(4):245-254.
- Morata T.C., Dunn D.E., Sieber W.K.* **Occupational exposure to noise and ototoxic organic solvents.** Arch. Environ. Health. 1994;49(5):359-365.
- Morata T.C., Fiorini A.C., Fisher F.M., Colacioppo S., Wallingford K.M., Krieg E., Dunn D.E.* **Toluene-induced hearing loss among rotogravure printing workers.** Scand. J. Work Environ. Health. 1997;23(4):289-298.
- Morata T.C., Johnson A.C., Nylen P., Svensson E.B., Cheng J., Krieg E.F., Lindblad A.C., Ernstgård L; Franks J.* **Audiometric findings in workers exposed to low levels of styrene and noise.** J Occup Environ Med. 2002;44(9):806-814.
- Morioka I., Miyai N., Yamamoto H., Miyashita K.* **Evaluation of combined effect of organic solvents and noise by the upper limit of hearing.** Ind. Health. 2000;38(2):252-257.
- Muijser H., Hoogendijk E.M., Hooisma J.* **The effect of occupational exposure to styrene on high-frequency hearing thresholds.** Toxicology. 1988;49(2-3):331-340.
- Mulroy M.J., Henry W.R., McNeil P.L.* **Noise-induced transient microlesions in the cell membranes of auditory hair cells.** Hear. Res. 1998;115(1-2):93-100.
- Nakajima T., Wang R.S., Elovaara E., Park S.S., Gelboin H.V., Hietanen E., Vainio H.* **Monoclonal antibody-directed characterization of cytochrome P450 isoforms responsible for toluene metabolism in rat liver.** Biochem. Pharmacol. 1991;41(3):395-404.
- Nakajima T., Wang R.S., Elovaara E., Gonzalez F.J., Gelboin H.V., Raunio H., Pelkonen O., Vainio H., Aoyama T.* **Toluene metabolism by cDNA-expressed human hepatic cytochrome P450.** Biochem. Pharmacol. 1997;53(3):271-277.
- Namura S., Zhu J., Fink K., Endres M., Srinivasan A., Tomaselli K, Yuan J., Moskowitz M.A.* **Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia.** J. Neurosci. 1998;18(10):3659-3668.
- Naskali L., Engelke M., Tähti H., Diehl H.* **The effects of selected organic solvents on rat synaptosomal membrane fluidity and integral enzyme activities.** Neurosci. Res. Communications. 1993;13(1):27-35.
- Nylén P.R.* **Organic solvent toxicity in the rat with emphasis on combined exposure interactions in the nervous system.** Arbete & Hälsa. 1994;3:1-50.
- Paradelis A.G., Triantaphyllidis C., Giala M.M.* **Neuromuscular blocking activity of aminoglycoside antibiotics.** Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 1980;2(1):45-51.
- Parsons T.D., Obaid A.L. Salzberg B.M.* **Aminoglycoside antibiotics block voltage-dependent calcium channels in intact vertebrate nerve terminals.** J. Gen. Physiol. 1992;99(4):491-504.

- Patel J.M., Harper C., Drew T.* **The biotransformation of *p*-xylene to a toxic aldehyde.** *Drug Metab. Dispos.* 1978;6(4):368-374.
- Patuzzi R.B., Yates G.K., Johnstone B.M.* **Changes in cochlear microphonic and neural sensitivity produced by acoustic trauma.** *Hear. Res.* 1989;39(1-2):189-202.
- Patuzzi R.B. and Thompson M.L.* **Cochlear efferent neurones and protection against acoustic trauma: protection of outer hair cell receptor current and interanimal variability.** *Hear. Res.* 1991;54(1):45-58.
- Peoples R.W., Li C., Weight F.F.* **Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1996;36:185-201.
- Pilz P.K.D., Ostwald J., Kreiter A., Schnitzler H.U.* **Effect of the middle ear reflex on sound transmission to the inner ear of rat.** *Hear. Res.* 1997;105(1-2):171-182.
- Plant T.D., Schirra C., Katz E., Uchitel O.D., Konnerth A.* **Single-cell RT-PCR and functional characterization of Ca²⁺ channels in motoneurons of the rat facial nucleus.** *J. Neurosci.* 1998;18(23):9573-9584.
- Prasher D., Al-Hajjaj H., Aylott S., Aksentijevic A.* **Effect of exposure to a mixture of solvents and noise on hearing and balance in aircraft maintenance workers.** *Noise & Health.* 2005;7(29):31-39.
- Pryor G.T., Dickinson J., Howd R.A., Rebert C.S.* **Transient cognitive deficits and high-frequency hearing loss in weanling rats exposed to toluene.** *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 1983;5(1):53-57.
- Pryor G.T., Rebert C.S., Howd R.A.* **Hearing loss in rats caused by inhalation of mixed xylenes and styrene.** *J. Appl. Toxicol.* 1987;7(1):55-61.
- Pryor G.T., Rebert C.S., Kassay K., Kuiper H.* **The hearing loss associated with exposure to toluene is not caused by a metabolite.** *Brain Res. Bull.* 1991;27(1):109-113.
- Puel J.L., Bobbin R.P., Fallon M.F.* **An ipsilateral cochlear efferent loop protects the cochlea during intense sound exposure.** *Hear. Res.* 1988;37(1):65-70.
- Pujol R.* **Anatomie et physiologie de la cochlée.** *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 1989;97:51-78.
- Pujol R.* **Lateral and medial efferents: a double neurochemical mechanism to protect and regulate inner and outer hair cell function in the cochlea.** *Br. J. Audiol.* 1994;28(4-5):185-191.
- Rajan R.* **Centrifugal pathways protect hearing sensitivity at the cochlea in noisy environments that exacerbate the damage induced by loud sound.** *J. Neurosci.* 2000;20(17):6684-6693.
- Raphael Y. and Altschuler R.A.* **Structure and innervation of the cochlea.** *Brain Res. Bull.* 2003;60(5-6):397-422.
- Rebert C.S., Sorensen S.S., Howd R.A., Pryor G.T.* **Toluene-induced hearing loss in rats evidenced by the brainstem auditory-evoked response.** *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 1983;5(1):59-62.
- Redman R.S. and Silinsky E.M.* **Decrease in calcium currents induced by aminoglycoside antibiotics in frog motor nerve endings.** *Br. J. Pharmacol.* 1994;113(2):375-378.
- Robertson D. and Johnstone B.M.* **Acoustic trauma in the guinea pig cochlea: early changes in ultrastructure and neural threshold.** *Hear. Res.* 1980;3(2):167-179.

- Roth B. and Bruns V. Postnatal development of the rat organ of Corti. II. Hair cell receptors and their supporting elements.* Anat. Embryol. 1992;185(6):571-581.
- Rouiller E.M., Capt M., Dolivo M., De Ribaupierre F. Neuronal organization of the stapedius reflex pathways in the rat: a retrograde HRP and viral transneuronal tracing study.* Brain Res. 1989;476(1):21-28.
- Ruel J., Wang J., Rebillard G., Eybalin M., Lloyd R., Pujol R., Puel J.C. Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex.* Hear. Res. 2007;227(1-2):19-27.
- Sakagami M., Fukazawa K., Murata J., Matsunaga T. Morphological aspects of transport of potassium ion in the marginal cell.* Acta Otolaryngol. Suppl. 1993;501:63-65.
- Saunders J.C., Dear S.P., Schneider M.E. The anatomical consequences of acoustic injury: a review and tutorial.* J. Acoust. Soc. Am. 1985;78(3):833-860.
- SECCI : Service des études et des statistiques industrielles - Panorama de l'industrie par grands secteurs d'activité - édition 2005.*
http://www.industrie.gouv.fr/observat/chiffres/f2o_indu.htm
- Shafer T.J., Bushnell P.J., Benignus V.A., Woodward J.J. Perturbation of voltage-sensitive Ca²⁺ channel function by volatile organic solvents.* J. Pharmacol. Exp. Therapeutics. 2005;315(3):1109-1118.
- Sikkema J., de Bont J.A.M., Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes.* JBC. 1994;269(11):8022-8028.
- Śliwińska-kowalska M., Zamysłowska-szmytka E., Szymczak W., Kotyło P., Fiszer M., Wesolowski W., Pawlaczyk-Luszczynska M. Ototoxic effects of occupational exposure of styrene and co-exposure to styrene and noise.* J. Occup. Environ. Med. 2003;45(1):15-24.
- Smith D., Erre J.P., Aran J.M. Rapid, reversible elimination of medial olivocochlear efferent function following single injections of gentamicin in the guinea pig.* Brain Res. 1994;652(2):243-248.
- Spicer S.S. and Schulte B.A. Evidence for a medial K⁺ recycling pathway from inner hair cell.* Hear. Res. 1998;118(1-2):1-12.
- Spoendlin H. Histopathology of noise deafness.* J. Otolaryngol. 1985;14:282-286.
- Sridhar T.S., Liberman M.C., Brown M.C., Sewell W.F. A novel cholinergic "slow effect" of efferent stimulation on cochlear potentials in the guinea pig.* J. Neurosci. 1995;15(5):3667-3678.
- Strutz J., Munker G., Zollner C. The motor innervation of the tympanic muscles in the guinea pig.* Arch Otorhinolaryngol. 1988;245(2):108-111.
- Sullivan M.J., Rarey K.E., Conolly R.B. Ototoxicity of toluene in rats.* Neurotoxicol. Teratol. 1988;10(6):525-530.
- Tachibana M., Anniko M., Schacht J. Effects of perilymphatically perfused gentamicin on microphonic potential, lipid labelling and morphology of cochlear tissues.* Acta Otolaryngol. 1983;96(1-2):31-38.
- Takada A. and Schacht J. Calcium antagonism and reversibility of gentamicin-induced loss of cochlear microphonics in the guinea pig.* Hear. Res. 1982;8(2):179-186.
- Tebbutt S., Harvey M., Nicholson T., Cave G. Intralipid prolongs survival in a rat model of verapamil toxicity.* Acad. Emerg. Med. 2006;13(2):134-139.

- Tillar R., Shafer T.J., Woodward J.J.* **Toluene inhibits voltage-sensitive calcium channels expressed in pheochromocytoma cells.** *Neurochem. Internat.* 2002;41(6):391-397.
- Toftgard R. and Nilsen O.* **Effects of xylene and xylene isomers on cytochrome P-450 and in vitro enzymatic activities in rat liver, kidney and lung.** *Toxicol.* 1982;23(2-3):197-212.
- Tsuga H. and Honma T.* **Effects of short-term exposure on ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors in the frontal cortex and hippocampus.** *Neurotox. Teratol.* 2000;22(4):603-606.
- Wamsley J.K., Lewis M.S., Young W.S., Kuhar M.J.* **Autoradiographic localization of muscarinic cholinergic receptors in rat brainstem.** *J. Neurosci.* 1981;1(2):176-191.
- Warr W.B., Guinan J.J., White J.S.* **Organization of the efferent fibers: the lateral and the medial olivocochlear systems.** In: *Neurobiology of hearing: the cochlea*, ed. Altschuler R.A., Bobbin R.P., Hoffman D.A. Raven press, New York. 1986;pp.333-348.
- Warren E.H., Liberman M.C.* **Effects of contralateral sound on auditory-nerve responses. I. Contributions of cochlear efferents.** *Hear. Res.* 1989;37(2):89-104.
- White J.S. and Warr W.B.* **The dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat.** *J. Comp. Neurol.* 1983;219(2):203-214.
- Withnell R.H.* **Brief report: the cochlear microphonic as an indication of outer hair cell function.** *Ear Hear.* 2001;22(1):75-77.
- Woodward J., Nowak M., Davies D.* **Effects of the abused solvent toluene on recombinant P2X receptors expressed in HEK293 cells.** *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2004;125(1-2):86-95.
- Yamada S., Kuno Y., Iwanaga H.* **Effects of aminoglycoside antibiotics on the neuromuscular junction: part I.** *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 1986;24(3):130-138.
- Yamamoto H., Tominaga M., Sone M., Nakashima T.* **Contribution of stapedial artery to blood flow in the cochlea and its surrounding bone.** *Hear. Res.* 2003;186(1-2):69-74.
- Yamashita T., Tanaka T., Warashina M., Kondo K., Goto Y., Kawai S., Kunito S., Monna T., Matsui T., et al.* **Effect of acute ethanol administration on lipid composition of rat liver plasma membrane and serum with two different doses of ethanol.** *Arukoro Kenkyuto Yakubutsu Ison.* 1992;27(6):613-622.
- Yoshida N., Liberman M.C., Brown M.C., Sewel W.F.* **Gentamicin blocks both fast and slow effects of olivocochlear activation in anesthetized guinea pigs.** *Am. Physiol. Soc.* 1999;82(6):3168-3174.
- Yun I., Lee S.H., Kang J.S.* **The effect of ethanol on lateral and rotational mobility of plasma membrane vesicles isolated from cultured Mar 18.5 hybridoma cells.** *J. Membr. Biol.* 1994;138(3):221-227.
- Zaninetti M., Tribollet E., Bertrand D., Raggenbass M.* **Presence of functional neuronal acetylcholine receptors in brainstem motoneurons of the rat.** *Eur. J. Neurosci.* 1999;11(8):2737-2748.

Annexes

- *Maguin K., Lataye R., Campo P., Cossec B., Burgart M., Wanuisiow D.* **Ototoxicity of the three xylene isomers in the rat.** *Neurotoxicol. Teratol.* 2006;28(6):648-656.
- *Lataye R., Maguin K., Campo P.* **Increase in cochlear microphonic potential after toluene administration.** *Hear. Res.* 2007;230(1-2):34-42.
- *Campo P., Maguin K., Lataye R.* **Effects of aromatic solvents on acoustic reflexes mediated by central auditory pathways.** *Toxicol. Sci.* 2007 a;99(2):582-590.
- *Campo P. and Maguin K.* **Solvent-induced hearing loss: mechanisms and prevention strategy.** *IJOMEH.* 2007;21(3):1-6.

Ototoxicity of the three xylene isomers in the rat

Katy Maguin, Robert Lataye, Pierre Campo *, Benoît Cossec,
Manuella Burgart, Delphine Waniusiow

Laboratoire de neurotoxicité, Institut National de Recherche et de Sécurité, Avenue de Bourgogne, BP 27, Vandoeuvre, 54501 cédex, France

Received 7 June 2006; received in revised form 22 August 2006; accepted 22 August 2006

Available online 1 September 2006

Abstract

Numerous experiments have shown that the aromatic solvents can affect the auditory system in the rat, the cochlea being targeted first. Solvents differ in cochleotoxic potency: for example, styrene is more ototoxic than toluene or xylenes. The goal of this study was to determine the relative ototoxicity of the three isomers of xylene (*o*-, *m*- or *p*-xylene). Moreover, by dosing with the two urinary metabolites of xylene, methylhippuric (MHAs) and mercapturic acids (MBAs), this study points toward a causal relationship between the cochleotoxic effects and potential reactive intermediates arising from the biotransformation of the parent molecules. Separate groups of rats were exposed by inhalation to one isomer following this schedule: 1800 ppm, 6 h/d, 5 d/wk for 3 wk. Auditory thresholds were determined with brainstem-auditory evoked potentials. Morphological analysis of the organ of Corti was performed by counting both sensory and spiral ganglion cells. Among the three isomers, only *p*-xylene was cochleotoxic. A 39-dB permanent threshold shift was obtained over the tested frequencies range from 8 to 20 kHz. Whereas outer hair cells were largely injured, no significant morphological change was observed within spiral ganglia. The concentrations of urinary *p*-, *o*- or *m*-MHA were greater (*p*-MHA: 33.2 g/g; *o*-MHA: 7.8 g/g; *m*-MHA: 20.4 g/g) than those obtained for MBAs (*p*-MBA: 0.04 g/g; *o*-MBA: 6.2 g/g; *m*-MBA: 0.03 g/g). Besides, there is a large difference between *o*-MBA (6.2 g/g) and *p*-MBA (0.04 g/g). As a result, since the cysteine conjugates are not determinant in the ototoxic process of xylenes, the location of the methyl groups around the benzene nucleus could play a key role.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Solvent; Xylene; Ototoxicity; Animal

1. Introduction

A wide range of chemicals like aromatic solvents cause hearing impairments [23]. The notion of ototoxicity stemming from chemical agents is important, especially when people are concerned about potential workplace exposures [30]. These solvents are produced worldwide in large quantities for use in a variety of industrial and commercial applications. For instance, the European production of xylene was 2.7 million tons in 1995 [34]. Solvents are commonly used in paints, varnishes, printing inks, degreasers, adhesives, fuel additives, glues, thinners and plastics. They are also used as a starting material in the manufacture of chemicals, pharmaceuticals [1,15]. For xylene, the time-weighted average and the threshold limit value are respectively 50 and 100 ppm in France. Human and animal studies

have shown that several aromatic solvents can induce irreversible hearing loss [23], the cochlea being considered as a target organ [3,7,11].

Today, solvent-induced hearing loss can be characterized quite accurately. First, solvent-induced hearing loss is clearly species dependent. For instance, hearing of guinea pigs [2,5,9] and chinchillas [8] seems to be less sensitive than that of rat. Second, the pathological signature of the injury caused by solvents at the level of the organ of Corti has been well described [3]. Basically, the most sensitive cells within the organ of Corti are the outer hair cells (OHCs): the third row of OHCs being more sensitive than the second row which is itself more sensitive than the first row [16,19]. Third, there is definitely a degree of toxicity depending on the spatial organisation of the molecule within the family of the aromatic solvents. For example, despite the fact that ethylbenzene has the same molecular formula as xylene and similar physicochemical properties, it is much more ototoxic than xylene [5,12].

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 50 21 55; fax: +33 3 83 50 20 96.
E-mail address: Pierre.campo@inrs.fr (P. Campo).

Compared to toluene, investigations of the ototoxic effects of xylene are curiously scarce and sometimes controversial [26,28]. Most of the studies found in the literature characterized the effects of mixed xylenes on audition [7,26,28]. It is true that most of the time, solvent exposures commonly involve mixtures of substances or mixtures of isomers of a single solvent [15]. However, data from mixtures are not optimal for studying mechanisms of solvent-induced hearing loss.

From a metabolic point of view, the hepatic metabolism of xylene isomers mainly proceeds via oxidation of one of the methyl groups. The parent molecule is transformed to methylbenzyl alcohol by cytochrome P-450 2E1 (CYP450 2E1). Further biotransformation leads to methylhippuric acid (MHA) which is the major metabolite of xylene and, to a lesser extent, to mercapturic acids from binding with glutathione (GSH) [22,35]. Most of the common organic solvents increase hepatic CYP450 concentrations and NADPH activity, but some of them, like *p*-xylene, do not increase the CYP450 content as much as the others [33]. Therefore, a causal relationship may exist between the cochleotoxic effects of the solvents and their biotransformation to reactive intermediates [27,32]. The metabolism of different isomers might thus lead to different reactive intermediates and different degrees of toxicity [22].

Studies performed by [11,12] showed that *p*-xylene was the only isomer of xylene that was ototoxic. Gagnaire and co-workers recorded far-field auditory evoked potentials using an electrode placed on the vertex of the skull over the colliculus, and triggered by a wide band click which was not frequency specific. This approach did detect ototoxicity, but did not provide detailed tone specific information or possible cellular sites of damage. In the current experiment, near-field evoked potentials triggered by pure tones were used and accompanied by morphological techniques specifically devoted for testing auditory function. Moreover, the previous study did not deal with the neurotoxic effect (on the afferent pathway) of the three xylene isomers. Finally, the literature does not mention any metabolic particularity of the three isomers in the same experimental conditions.

Due to the absence of these data in the literature, the present project aimed (1) to determine whether there is any tonal specificity to the ototoxicity of xylene, (2) to determine the site(s) of damage within the cochlea, and (3) to characterize the effects of the three xylene isomers on hepatic metabolites. The three xylene isomers were primarily selected for their structural similarity to toluene — a reference molecule for our laboratory — as they differ only in the addition and position of a second methyl group. By studying the isomeric differences in metabolite profiles of the isomers, we hoped to better understand the relative role of the parent molecule with regard to its derivatives, like the cysteine conjugates. Indeed, certain cysteine conjugates are known to be nephrotoxic [24], and they could be ototoxic. Because the relative importance of the different metabolic pathways could explain, at least partly, the striking difference in toxicity observed among the three isomers, the secondary goal of this study was to establish a causal relationship between the cochleotoxic potency and the metabolism of each isomer.

2. Material and methods

2.1. Animals

A total of 32 male Long–Evans rats obtained from Janvier Laboratories in France, was used throughout this investigation. The rats were 9 wk old and their weight ranged between 300 g and 325 g when they arrived in the animal facility. They were housed in individual cages (350 × 180 × 184 mm) with irradiated pinewood bedding (supplier: Special Diets Services, France, ref: Gold cob 891180) 2 wk before the start of the experiments. Food and tap water were available *ad libitum* except during exposure. The animals were on a normal day/night cycle: lighting was on 12 h/d. The temperature in the animal quarters was 22 ± 2 °C and the relative humidity was 55 ± 10%. The animals were weighed weekly. No significant difference in body weight was found between the controls and xylene-exposed animals during the experiment. While conducting the research described in this article, the investigators adhered to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals, as promulgated by the French Conseil d'Etat through the decree n°87-848 published in the French Journal Officiel on October 20th, 1987.

2.2. Audiometry

Anaesthesia was induced with a mixture of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg, *i.p.*). Rats were then placed on a stereotaxic table and a tungsten electrode was implanted into the right inferior colliculus (IC). A second needle electrode was implanted in the rostral cranium just below the dura mater to serve as the reference electrode. The two electrodes were then fastened to a transistor socket which was mounted to the vertex of the skull with metacrylate cement. The animals were allowed to recover for 4 wk before testing. One month after surgery, audiometric testing was performed in a soundproof booth (Elstar, model MR <http://www.elstarprevention.com>) on awake rats placed in a restraining device. The acoustic signals were generated and shaped by a Tucker–Davis Technologies apparatus equipped with Biosig software (version 2.0). The acoustic stimuli (2 cycles for the rise/fall ramp, 4 cycles for the plateau) were gated sinusoidal stimuli at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 and 32 kHz, presented at a rate of 20/s, with an analysis window of 30 ms. The stimuli were transduced by a speaker (JBL, 2405) positioned 15 cm from the left pinna.

For each frequency, acoustic calibration was carried out by measuring the sound pressure level emitted by the speaker driven by a continuous pure tone. The sound field was calibrated by positioning a microphone at a point normally occupied by the center of the animal's head. The targeted intensity was obtained by adjusting the level of the continuous pure tone. The electrical signal from the implanted electrode was amplified (x2000) and filtered between 30 and 3000 Hz. Averaged auditory-evoked potentials were obtained from 260 presentations. The overall recording session lasted 30 min. Since the awake animals would not stay completely quiet over such long periods, they were lightly sedated with an injection of levomepromazine (12 mg/kg). An amplitude trough-to-peak (N1-

P1) of 15 μ V of the response was considered as the threshold value in our experimental conditions. For each animal, an audiogram was obtained prior to xylene exposure (T1) and 4 wk after the end of the exposure (T2). Permanent threshold shifts [PTS] were defined as $PTS = T2 - T1$.

2.3. Xylene exposure

The rats were exposed to 1800 ppm *p*- (mean_p = 1789 ± 26.8 ppm), or *o*- (mean_o = 1817 ± 34.9 ppm), or *m*-xylene (mean_m = 1812 ± 38 ppm) or room air for 6 h per day, 5 d/wk for 3 consecutive weeks (6 h/d, 5 d/wk, 3 wk) in 200-L inhalation chambers. The exposure schedule was from 9h00 to 15h00. *p*-, *o*-, *m*-xylenes were obtained from Acros 99%, their CAS numbers were respectively, 108383, 95476 and 106423. No food or water was offered during the exposure. Four separate chambers containing 8 animals housed in individual cages were simultaneously used: one chamber each for *p*-, *o*-, *m*-xylene and one chamber ventilated with fresh air for the controls. Designed to sustain a dynamic and adjustable airflow (5–6 m³/h), the chambers were maintained at a negative pressure of no more than 3 mm H₂O. The input air was filtered and conditioned to a temperature of 22 ± 3 °C and a relative humidity of 50 ± 20%. The xylene was vaporized by bubbling an additional airflow through a flask containing the test compound. The ambient noise inside the chambers did not exceed 66 dB lin [19]. The solvent concentration in the chambers was measured by collecting atmosphere samples through glass tubes packed with activated charcoal. Xylene samples were desorbed with carbon disulfide and analyzed by a gas chromatograph (Shimadzu, GC 8A) using toluene as the internal standard. These analyses allowed daily calibration of another GC used for the continuous monitoring of exposure level; this GC was equipped with a flame ionisation detector and an automatic gas-sampling valve. Concentration measurements were performed at regular intervals (0.5 min).

2.4. Urinary metabolites

2.4.1. Urine collection

The animals were placed individually in metabolic-type stainless steel cages with free access to food and water between 15.00 and 08.30 h each Wednesday for the 3-wk period of exposure. During this 17.5-h period, urine was collected and refrigerated with a cooling system. Urinary samples were frozen and stored at –20 °C right after the collection and thawed just before analysis.

2.4.2. Methylhippuric acid (MHA) measurement

o-, *m*- or *p*-MHA were measured using an HPLC reverse phase chromatography. A clean-up procedure involving solid-phase extraction (SPE) cartridges was applied to each sample. An activated SAX column (BondElut cartridge; Varian) was loaded with 100 μ L of each sample diluted in distilled water (dilution ratio: DR_{oMHA} = 1/3; R_{mMHA} = 1/30; DR_{pMHA} = 1/60). Then, 800 μ L of the diluted internal standard (0.16 g/L in distilled water) was added. 3-Methylbenzoylalanine (3-MBA)

was chosen as internal standard and synthesized according the method described in [36]. Standard samples were prepared using respectively 100 μ L of diluted *o*-MHA (1.5 g/L), *m*-MHA (0.75 g/L) or *p*-MHA (0.75 g/L) in distilled water and 800 μ L of MBA. *o*-, *m*- or *p*-MHA and MBA were then eluted from the SPE columns using 3 mL of a MeOH/AcOH mixture (9/1; v/v). The elution layers were dried at 70 °C for 40 min and the residues reconstituted in 2 mL of the HPLC eluant (water/methanol/formic acid; 60/40/1.5; v/v/v). The chromatographic separation was performed at a flow rate of 1 mL/min in a Lichrospher RP 8 column (length 250, i.d. 4.6 mm, 5 μ m). The UV detector was set at 260 nm (reproducibility \leq 2%; limit of quantitation: LOQ_{oMHA} \approx 5 mg/L; LOQ_{mMHA} \approx 2 mg/L; LOQ_{pMHA} \approx 1 mg/L).

2.4.3. Methylbenzylmercapturic acid (MBA) measurement

o-, *m*- or *p*-MBA were synthesized according to a methods described by [24] and [31] and were determined with an HPLC method [4]. A SPE double step pre-purification procedure was required in this method. 100 μ L of each diluted urine samples (DR_{oMBA} = 1/200; DR_{mMBA} and DR_{pMBA} = 1) was loaded on a C8 SPE column, then to a SAX SPE column (Isolute cartridges, IST). The product of the elution was enzymatically deacetylated, and deproteinized. The filtrated solutions associated with a mixture of 2-mercaptoethanol (MCE) and OPA (*o*-phthaldialdehyde) were derivatized. The derivatized samples were separated on a HPLC supelcosil C18 column (length 150, i.d. 4.6 mm, 3 μ m). The eluant was a mixture of an aqueous buffer, tetrahydrofuran and MeOH. The aqueous buffer was composed of 0.05 M sodium acetate (pH 6.5) and 0.83 g/L of tetraethylammoniumchloride. The effluent (flowrate = 0.8 ml/min) was monitored by a fluorescent detector (λ_{exc} = 330 nm and λ_{em} = 440 nm). Finally, the treated samples are compared to calibration curves (reproducibility for *o*-MBA \leq 8.5%, *m*-MBA \leq 5.2% and *p*-MBA \leq 4%; LOQ_{oMBA} \approx 11.4 μ g/L; LOQ_{mMBA} \approx 20 μ g/L; LOQ_{pMBA} \approx 24 μ g/L). This detailed procedure will be published in an up-coming report.

2.5. Histology

2.5.1. Cochlea fixation

Following the last audiogram (4 weeks after the end of the exposure), deep anaesthesia was induced in each animal with an injection of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg). The animals were then fixed by transcardiac perfusion with 300 mL of a tri-aldehyde fixative solution composed of 3% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 1% acrolein and 2.5% dimethylsulfoxide (DMSO) in 0.08 M sodium cacodylate buffer. The temporal bones were then removed, the tympanic bullae opened, and the cochleae fixed again by a perilymphatic perfusion. Following the primary 24 h-fixation, the cochleae were post-fixed with 2% OsO₄ in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 1 h and finally washed in a trihydrate solution of sodium cacodylate.

2.5.2. Surface preparation

The cochleae were dissected in 70% ethanol at room temperature. The organ of Corti was dissected and mounted in

glycerin. Cells were counted as present either when the stereocilia, the cuticular plate or the cell nucleus could be visualized. No attempt was made to assess the degree of possible cellular damage to surviving cells. The frequency-place map established by Ref. [25] was used to superimpose the frequency coordinates on the length coordinates of the organ of Corti. A cochleogram showing the percentage of hair cell loss as a function of distance from the base of the cochlea was plotted for each animal. The results were averaged across each group of 4 animals for comparison between groups.

2.5.3. Spiral ganglion cells (SGCs)

The opposite cochleae which were not used for the surface preparations, were prepared for sections. The cochleae were entirely immersed at room temperature in 0.7 M ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, pH 7.8) for 8 h, then dehydrated in ascending concentrations of ethanol up to 100%, and finally infiltrated with resin (Epon/Araldite).

A quantitative stereological tool [the fractionator [13]], was used to determine the density of the SGCs. The method can be described in the following way. Serial 2.5 μm -thick sections [$t=2.5 \mu\text{m}$] were cut parallel to the mid-modiolar plane to obtain an averaged profile [A] of Rosenthal's canal of 0.029 mm^2 for the middle spiral ganglion (Fig. 5). The modiolar sections were serially collected onto slides and stained with cresyl violet. Every fourth (4) section was saved, and at least three sections were counted. Observations were made with a light microscope equipped with a camera. The entire section of Rosenthal's canal was readable on the computer screen at a magnification of 250. The image was captured and the Rosenthal's canal surface calculated using custom imaging software. The type I and II SGCs were counted based on the presence or not of the SGC nucleus. To minimize sampling errors, the nuclear diameters of the SGCs were first measured when their perimeters were clearly observable in the section. Because the nuclei are more or less spherical, the maximum diameter corresponded approximately to the section crossing the centre of the nucleus.

The maximum diameter measured within the canal was $d_{\text{max}} \approx 10 \mu\text{m}$, therefore four 2.5 μm -thick sections were sufficient for not counting twice the same nucleus [$4 \times t=10 \mu\text{m}$]. In order to calculate the density of SGCs in a reconstructed volume ($V=A \times t \times 4$), the counts of the type I and II cells (N) were multiplied by 4 and divided by a correction factor F . This factor, modified from Ref. [14] takes into account the nuclei sectioned by the knife and appearing in several adjacent sections. The density would be overestimated without a correction factor. F corresponds to the number of successive sections in which one nucleus could appear several times. This therefore depends on the thickness of the section and on the maximum diameter of the nuclei ($F=d_{\text{max}}/t$). Finally, the density formula can be expressed as follows: $D=(N \times 4)/(F \times V)$.

2.6. Statistical analysis

Statgraphics plus (version 5) software was used to run all the statistical analyses. A multifactor analysis of variance (ANOVA), with “xylene” as a between-subject factor, and tone

“frequency” as within subject variable, was run. This ANOVA allowed evaluation of either the “xylene” effect, or interactions such as “xylene X frequency”. F (between-subject factor X within subject factor) = $z; p$). When needed, the ANOVA test was followed by a post-hoc Bonferroni's test which allows the means at each frequency to be compared. The statistical differences in SGCs density between exposed and unexposed animals were used for determining the statistical significances of the tests. Alpha levels of 0.05 (significant at 95%) were used for the significance of the tests.

3. Results

3.1. Electrophysiological data

3.1.1. Auditory thresholds

The mean auditory [IC-evoked potentials] thresholds obtained from 32 rats prior the exposure solvents are shown in Fig. 1. The best frequency sensitivity range is located around 8–12 kHz. Before exposure, no significant differences were found between the different groups [$F_{\text{group}}(3, 8)=1.47, p=0.222$] regardless of the frequency [$F_{\text{group} \times \text{frequency}}(24, 287)=0.88, p=0.633$].

3.1.2. Auditory threshold shifts

Fig. 2 shows significant [$F_{\text{group}}(3, 8)=584.10, p<0.001$] PTS between the *p*-xylene-exposed groups compared to those obtained with *o*- or *m*-xylene groups. The main threshold shifts were located in a frequency range from 8 to 20 kHz ($p<0.05$), with the peak occurring at 12 kHz [$F_{\text{group} \times \text{frequency}}(24, 287)=2.46; p<0.001$]. This frequency corresponds to the mid-frequency range in the rat.

3.2. Histological data

3.2.1. Surface preparation

Fig. 3 is a cochleogram which displays the data obtained from four analysed animals exposed to *o*-xylene. Only very small amounts of hair cell loss can be observed along the organ of Corti, but they do not exceed 1% of all cells for any turn. No significant differences between controls and animals exposed to

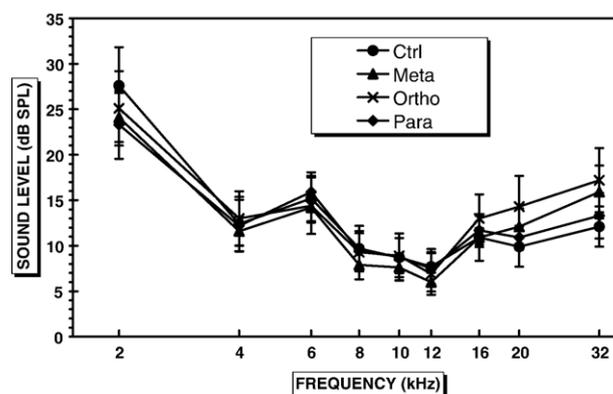


Fig. 1. Mean auditory IC-evoked potentials thresholds obtained from 32 Long-Evans rats before exposure. Half of the confidence intervals (95%) have been left out in the interest of clarity.

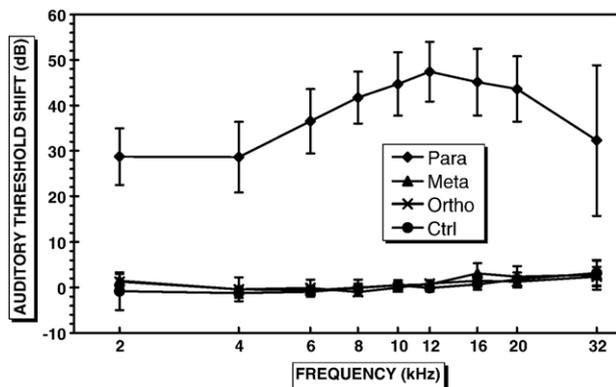


Fig. 2. PTS versus frequencies, ranging from 2 kHz to 32 kHz, obtained from animals exposed to *p*-xylene, *o*-xylene and *m*-xylene. The solvent exposure was identical regardless of the isomer. Xylene exposure: 1800 ppm, 6 h/d, 5 d/wk, 4 wk. Each point represents the mean ($n=8$) and the bars represent the 95% half-confidence intervals.

m-xylene were found. Consequently, only the cochleogram obtained with *o*-xylene exposed rats is plotted in the present paper, but it is representative of those obtained with the controls or with the *m*-xylene exposed rats.

Fig. 4 is a cochleogram obtained with rats exposed to *p*-xylene. The cochleogram shows severe losses at the level of the three rows of OHCs, even though the third row (OHC3) is more damaged than the second row (OHC2), which itself is more damaged than the first row (OHC1).

3.2.2. Spiral ganglion cells

Fig. 5 illustrates the location of both apical and median spiral ganglions. Fig. 6 is a histogram corresponding to the number of cells/mm³ as a function of xylene isomers. Whatever the ganglion considered, the difference between the SGCs is not significant as a function of the xylene isomers. Even for the

p-xylene-exposed animals, no significant difference was observed with regard to the controls.

3.3. Metabolic data

Because no significant difference between the concentrations of metabolites was obtained over the experiment [$F_{\text{week}}(2, 12)=0.72$; $p=0.476$], only the results obtained the last week are illustrated in this report.

3.3.1. Methylhippuric acids: MHAs

In spite of the same exposure schedule (6 h/d, 5 d/wk, 3 wk) and a rigorous control of the isomer concentrations ($X_o=1816\pm 34.9$ ppm, $X_m=1812\pm 38$ ppm or $X_p=1789.2\pm 26.8$ ppm) within the inhalation chambers, there are large and significant differences in the urinary MHA concentrations [$F_{\text{isomer}}(3, 48)=202.68$; $p<0.001$]. As illustrated in Fig. 7, *p*-xylene gives much more MHA than *m*-xylene or *o*-xylene: respectively 33.2, 20.4 and 7.8 g/g of creatinine.

3.3.2. Methyl benzylmercapturic acids: MBAs

As for the MHAs, there are large differences [$F_{\text{isomer}}(3, 16)=415.71$; $p<0.001$] in the urinary concentrations of MBAs. In fact, there is a striking difference between the *o*-MBAs and the others (6.22 vs. 0.04 g/g) as illustrated in Fig. 7.

4. Discussion

The results reported in this study clearly confirm that *p*-xylene severely disrupted auditory function and, more specifically, cochlea morphology. Conversely, the two other isomers, *o*-xylene and *m*-xylene, did not cause any detectable ototoxicity. The strong causal relationship between *p*-xylene

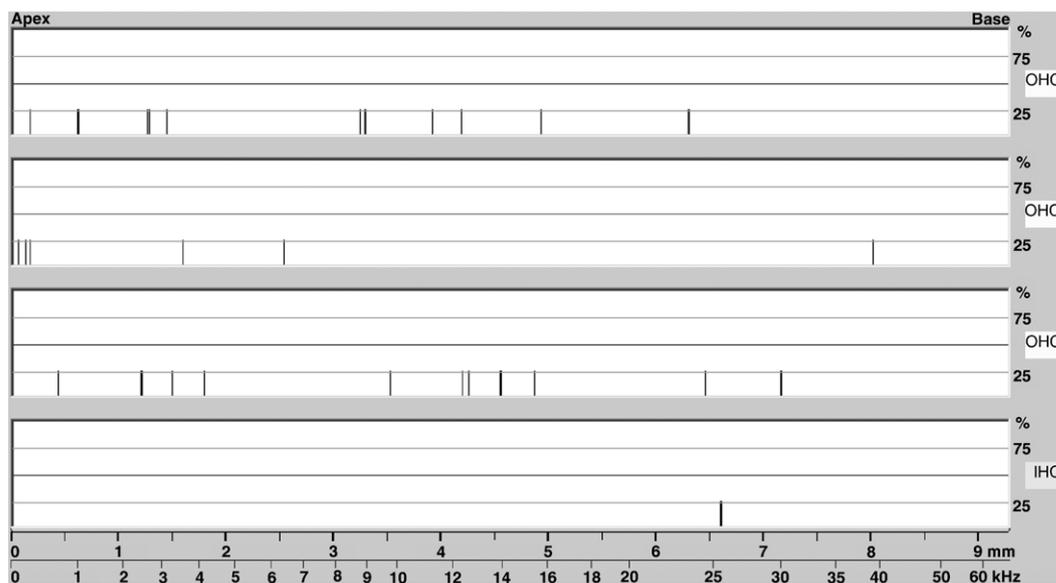


Fig. 3. Cochleogram obtained from four Long–Evans exposed to 1800-ppm *o*-xylene for 6 h/d, 5 d/wk, 3 wk. Abscissa: upper trace corresponds to length (mm) of the entire spiral course of the organ of Corti from the apex up to the bottom of the hook; Lower trace corresponds to the frequency-map according to Müller [25]. Ordinate: Animal in percent showing missing cell at a specific place along the organ of Corti. IHC: inner hair cell; OHC1: first row of outer hair cells; OHC2: second row; OHC3: third row.

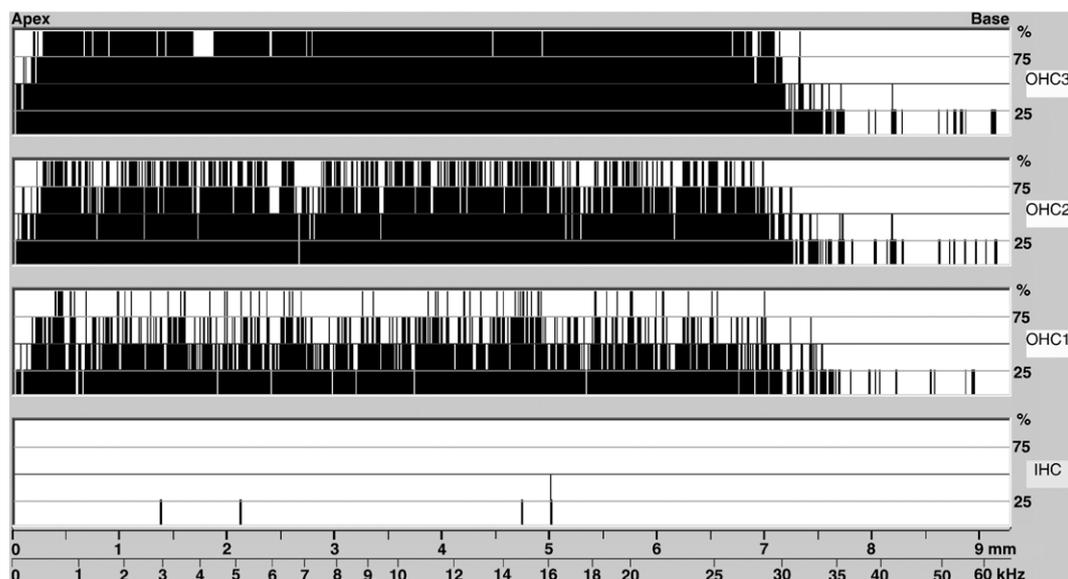


Fig. 4. Cochleogram obtained from four Long–Evans exposed to 1800-ppm *p*-xylene for 6 h/d, 5 d/wk, 3 wk. Abscissa: upper trace corresponds to length (mm) of the entire spiral course of the organ of Corti from the apex up to the bottom of the hook; Lower trace corresponds to the frequency-map according to Müller [25]. Ordinate: Animal in percent showing missing cell at a specific place along the organ of Corti. IHC: inner hair cell; OHC1: first row of outer hair cells; OHC2: second row; OHC3: third row.

and hearing loss is demonstrated by both functional and morphological findings illustrated in Figs. 2 and 4, respectively. Indeed, the electrophysiological data showed that the exposure to *p*-xylene caused a PTS of approximately 39 dB at frequencies ranging from 8 to 20 kHz (Fig. 2). The location of the electrophysiological deficit within the tested frequency range, in other terms the tonotopicity of the auditory deficit, can be considered as typical for solvent-induced hearing loss. For instance, such a tonotopicity was already reported in the literature for toluene, styrene [7,21] and ethyl benzene [6].

Owing to the PTSs measured by electrophysiology, we expected to find losses of OHCs and inner hair cells as well, as observed by [20]. Instead, only a severe destruction of the OHCs was obtained at the level of the three rows of the organ of Corti (Fig. 4). It is worthwhile to bear this histopathological diagnosis in mind because the inner hair cells remain the real transducers of the auditory information conveyed up to the IC by the spiral afferent fibers [14]. In the present experiment, although the auditory-evoked potentials were picked up from

the IC and despite the non-noticeable effects of the solvents on the spiral ganglion cells (Fig. 6), 30–40 dB PTSs were calculated by electrophysiology. This 30–40 dB PTSs were mainly caused by the destruction of the OHCs. It is therefore clear that the OHCs play a key role not only in the frequency discrimination but in the auditory sensitivity as well. By the way, these morphological results rank *p*-xylene like a chemical more ototoxic than toluene [21] but less ototoxic than styrene since significant spiral ganglion cell losses were already observable after a 1500-ppm styrene exposure carried out under comparable schedules [20]. Of course, the ototoxic potency of styrene depends also on the number of metabolites which are really noxious. If styrene, styrene oxide and styrene glycol are potentially neurotoxic [17,18], it is likely that only toluene and *p*-xylene are ototoxic, namely the parent molecule of these two solvents could be the only compound really ototoxic. There would be a close relation between the structure of the molecule and its ototoxicity potency. If the structure of the molecule plays a key role, the number of ototoxic metabolites derived from the

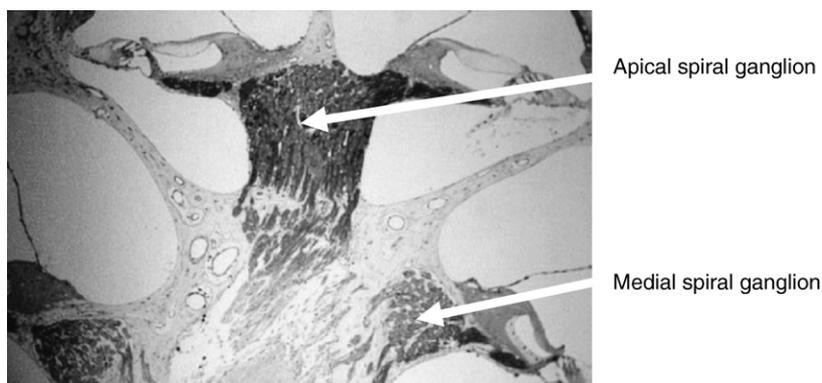


Fig. 5. Light micrograph of mid-modiolar cut cochleae. Apical and median spiral ganglia from a 6-month rat.

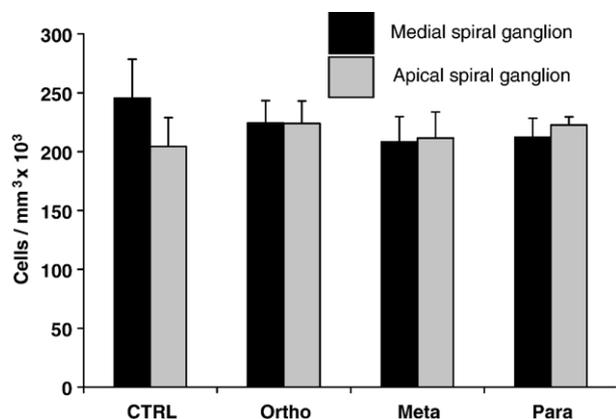


Fig. 6. Density of SGCs in the apical and middle turns of the rat cochlea ($n=5$). No distinction was made between type I and II SGCs.

parent molecules can also be a major determinant in the global ototoxic process.

As mentioned for other aromatic solvents, the OHCs constitute the primary targets of *p*-xylene or one of its metabolic intermediates. However, the basal part of the cochlea, the region of the organ of Corti discriminating the high-frequencies, seems to be less sensitive to the solvent. Anyway, it exists a histopathological signature inherent to *p*-xylene (OHC3>OHC2>OHC1 as illustrated in Fig. 4) which is quite close to that observed after exposure to toluene [16] or a styrene exposure [3]. Because of the location of the PTS and the histopathological signature, *p*-xylene-induced hearing loss is therefore comparable with that induced by other aromatic solvents such as toluene, styrene or ethyl benzene. Consequently, the understanding of the ototoxic process triggered by *p*-xylene and not by *o*- and *m*-xylene may help us to understand the general mechanism of solvent-induced hearing loss. And the hepatic detoxification process of xylenes might be part of the solution of the problem relating to solvent-induced hearing loss.

As expected, the concentrations of urinary *p*-, *o*- or *m*-MHA were greater than those obtained for MBAs (values max: 33.2 g/g vs. 6.2 g/g). As evidenced by the large differences [$F_{\text{isomer}}(3, 48)=202.68; p<0.001$] between the MHAs [*p*-MHA: 33.2 g/g vs. *o*-MHA: 7.8 g/g], and the MBAs [*o*-MBA: 6.2 g/g vs. *p*-MBA: 0.04 g/g], the hepatic metabolism depends a lot on the tested isomer. Despite our suspicions concerning the toxicity of the cysteine conjugates [24], the metabolic (*o*- and *m*-MBA: 6.2 and 0.03 g/g) and electrophysiological results (*o*-, *m*-xylene are not ototoxic as shown in Fig. 2) strongly suggest that they are probably innocuous. Indeed, the detoxification of *o*-xylene in the rat leads to MHA and MBA in close quantities (Fig. 7: 7.8 vs. 6.2 g/g). As a result, it is reasonable to claim that in the rat *o*-xylene is equivalently detoxified by the oxidative and conjugation pathways. Since, the *o*-xylene metabolism generates cysteine conjugates without being ototoxic, the metabolic data obtained in this study indicate that the cysteine conjugates are not mainly involved in the ototoxic process.

Of course, there are other reactive intermediates. For instance, based on the urinary concentrations of MHA (33.2 vs. 7.8 g/g),

there would be approximately 4 times more *p*-tolualdehyde than *o*-tolualdehyde, a reactive intermediate coming from the biotransformation of the methylbenzyl alcohol by the alcohol dehydrogenase [22]. Now, it is widely admitted that aldehydes are potentially toxic intermediates [10]. Therefore, the ototoxicity of *p*-xylene could stem from the greater amount of tolualdehyde compared to that generated by the two other isomers. However, the presence of large amounts of tolualdehyde does not seem to be sufficient to explain the clear-cut difference in ototoxicity observed between the three isomers. From Fig. 7 for instance, it is clear that the amount of *m*-MHA, and thereby of *m*-tolualdehyde, was not dramatically different from that of *p*-MHA. And, despite the low difference between these two metabolites, there is a striking difference in histological and electrophysiological data obtained in this study (Figs. 3 and 4).

An alternative hypothesis to explain the solvent ototoxicity could be the alteration of the CYP450 activities in the respiratory tract after exposure to *p*-xylene by a mechanism which is still unclear. Both *p*-xylene and *p*-tolualdehyde are capable of inactivating the pulmonary microsomal electron transport chain which is incontestably the first line of defence against volatile chemicals [27]. The role played by this first filter is sizeable, because in humans for instance up to 60% of inhaled *m*-xylene can be retained by the lungs during a 6-h exposure period [29]. This particularity of *p*-xylene to inactivate the CYP450 in the respiratory tract could explain why we obtained more urinary *p*-MHA than *o*- and *m*-MHA. So, it is likely that the significant difference between the *p*-MHA, *o*- and *m*-MHA can be the consequence of the inactivation of the CYP2E1 activities in lungs by both *p*-xylene and *p*-tolualdehyde. A corollary of this statement would be a larger inflowing of *p*-xylene in the arterial blood circulation. This mechanism requires that the parent molecule is involved in the ototoxic process.

To finish with the metabolic data, it seems difficult to ignore that there is a marked increase in the hepatic metabolism of the CYP2E1 after inhalation of xylene. According to [33], the two more potent inducers are the *o*- and *m*-xylenes. In other words, the extent of the inducing effect produced by *o*- and *m*-xylenes

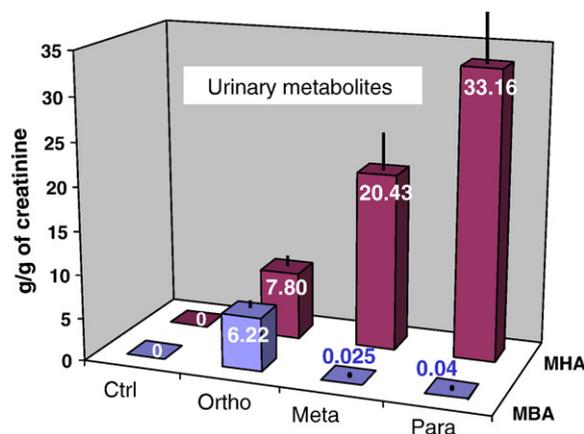


Fig. 7. Urinary concentrations of MHA and MBA after a 1800-ppm exposure to *o*-, *m*-, or *p*-xylene vapors for 6 h/d, 6h/d, 5d/wk 5 d/wk for 3 consecutive weeks. Each bin represents the mean ($n=5$).

are more pronounced than that elicited by *p*-xylene. What does that mean? Although the exposures to the three isomers were carried out in strictly identical conditions, it is likely that the concentrations of circulating *p*-xylene was higher in the arterial blood of the animals exposed to this isomer for the following reasons. Firstly, *p*-xylene inactivates the enzymes at the level of the lungs allowing a greater uptake of the solvent which can reach the target organ and secondly, the preferential induction of the hepatic CYP2E1 by *o*- and *m*-xylene shortens the half-life of these two isomers in the blood compartment with regard to *p*-xylene. Thus, differences in the pulmonary and hepatic metabolisms of the three isomers might explain the difference in ototoxicity, assuming that the parent molecule is the major toxic compound involved in the ototoxic process.

Nevertheless, we cannot reject the possibility that *p*-xylene may present a molecular arrangement which would be noxious, whereas the two other spatial configurations would be innocuous for the cochlea. In fact, this study does not allow the rejection of a structure/activity relationship between the parent molecule and a receptor within the cochlea. Under that hypothesis, *p*-xylene would double (CH₃- ϕ -CH₃) the same spatial characteristic than one molecule (CH₃- ϕ) of toluene, known to be ototoxic [21].

5. Conclusions

Among the three xylene isomers, only *p*-xylene can be considered a cochleotoxic solvent. Indeed, no significant difference was found between the controls and the *o*- and *m*-xylene-exposed rats. Therefore, the spatial structure of the molecule or more specifically the position of the two methyl groups around the benzene nucleus seems to play a key role in the ototoxic potency of the solvent. It is also noteworthy that *p*-xylene is cochleotoxic before being neurotoxic since no injury has been observed at the level of the spiral ganglion cells. *p*-Xylene and only this isomer can inactivate the pulmonary enzymatic barrier allowing greater uptake of the solvent into the body. Moreover, *o*- and *m*-xylene are much more efficient inducers of CYP2E1 than *p*-xylene. If the parent molecule is the compound involved in the ototoxic process, the difference in ototoxicity might stem from differences in the hepatic metabolism of the three isomers. Indeed, only *p*-xylene might reach the concentration required to cause cochleotoxic effects, whereas the other isomers would be eliminated faster. Although the metabolism of the three isomers plays a key role in the ototoxicity of *p*-xylene, this study does not allow the rejection of the possibility that structure/activity relationships between the parent molecule and a receptor within the cochlea determine the cochleotoxicity of the compound.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge T. Morata (NIOSH, Cincinnati), G.D. Chen and D. Henderson (Hearing Research centre, SUNY Buffalo) for their helpful comments on the manuscript and Christian Barthélémy, Benoît Rieger for their technical assistance.

References

- [1] ATSDR, Toxicological profile for xylene. Agency for toxic substances and disease registry, Atlanta, , 1993.
- [2] P. Campo, R. Lataye, P. Bonnet, No interaction between noise and toluene on cochlea in the guinea pig, *Acta Acustica* 1 (1993) 35–42.
- [3] P. Campo, R. Lataye, G. Loquet, P. Bonnet, Styrene-induced hearing loss: a membrane insult, *Hear. Res.* 154 (2001) 170–180.
- [4] P. Campo, V. Blachère, J.P. Payan, B. Cossec, P. Ducos, Toluene metabolism in the rat and guinea-pig: a comparative study, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21 (2006) 276–282.
- [5] N. Cappaert, S. Klis, H. Muijser, B. Kulig, Differential susceptibility of rats and guinea pigs to the ototoxic effects of ethyl benzene, *Neurotoxicol. Teratol.* 24 (2002) 503–510.
- [6] N. Cappaert, S. Klis, H. Muijser, B. Kulig, G. Smoorenburg, Simultaneous exposure to ethyl benzene and noise: synergistic effects on outer hair cells, *Hear. Res.* 16 (2001) 67–79.
- [7] K.M. Crofton, T. Lassiter, C. Rebert, Solvent-induced ototoxicity in rats: an atypical selective mid-frequency hearing deficit, *Hear. Res.* 80 (1994) 25–30.
- [8] R. Davis, W. Murphy, J. Snawder, C. Striley, Susceptibility to the ototoxic properties of toluene is species specific, *Hear. Res.* 166 (2002) 24–32.
- [9] L. Fechter, Effect of acute styrene and simultaneous noise exposure on auditory function in the guinea pig, *Neurotoxicol. Teratol.* 15 (1993) 151–155.
- [10] G. Furman, D. Silverman, R. Schatz, Inhibition of rat lung mixed function oxidase activity following repeated low-level toluene inhalation: possible role of toluene metabolites, *J. Toxicol. Environ. Health* 54 (1998) 633–645.
- [11] F. Gagnaire, B. Marignac, C. Langlais, P. Bonnet, Ototoxicity in rats exposed to *ortho*-, *meta*-, and *para*-xylene vapours for 13 weeks, *Pharmacol. Toxicol.* 89 (2001) 6–14.
- [12] F. Gagnaire, C. Langlais, Relative ototoxicity of 21 aromatic solvents, *Arch. Toxicol.* 79 (2005) 346–354.
- [13] H. Gundersen, P. Bagger, S. Evans, S. Korbo, L. Marcussen, N. Moller, A. Nielsen, The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis, *APMIS* 96 (1988) 857–881.
- [14] R. Hall, J.L. Massengill, The number of primary auditory afferents in the rat, *Hear. Res.* 103 (1977) 75–84.
- [15] M. Huang, C. Jin, Y. Liu, B. Li, Q. Qu, Y. Uchida, O. Inoue, H. Nakatsuka, T. Watanabe, M. Ikeda, Exposure of workers to a mixture of toluene and xylenes, *Occup. Environ. Med.* 51 (1994) 42–46.
- [16] A. Johnson, B. Canlon, Progressive hair cell loss induced by toluene exposure, *Hear. Res.* 75 (1994) 201–208.
- [17] J. Kohn, S. Minotti, H. Durham, Assessment of the neurotoxicity of styrene, styrene oxide, and styrene glycol in primary cultures of motor and sensory neurons, *Toxicol. Lett.* 75 (1995) 29–37.
- [18] O. Ladefoged, H. Lam, G. Ostergaard, E. Hansen, U. Hass, S. Lund, L. Simonsen, Toxicity of the styrene metabolite, phenylglyoxylic acid in rats after three months oral dosing, *Neurotoxicology* 19 (1998) 721–738.
- [19] R. Lataye, P. Campo, Combined effects of simultaneous exposure to noise and toluene on hearing function, *Neurotoxicol. Teratol.* 19 (1997) 373–382.
- [20] R. Lataye, P. Campo, C. Barthelemy, G. Loquet, P. Bonnet, Cochlear pathology induced by styrene, *Neurotoxicol. Teratol.* 23 (2001) 71–79.
- [21] G. Loquet, P. Campo, R. Lataye, Comparison of toluene-induced and styrene-induced hearing losses, *Neurotoxicol. Teratol.* 21 (1999) 689–697.
- [22] M. Miller, J. Edwards, Possible preferential metabolism of xylene isomers following occupational exposure to mixed xylenes, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 72 (1999) 89–97.
- [23] T. Morata, D. Dunn, Occupational exposure to noise and ototoxic organic solvents, *Arch. Environ. Health* 49 (1994) 359–365.
- [24] G. Morel, P. Bonnet, B. Cossec, S. Morel, C. Cour, A.M. Lambert, M.B. Roure, M.T. Brondeau, The role of glutathione and cysteine conjugates in the nephrotoxicity of *o*-xylene in rats, *Arch. Toxicol.* 72 (1998) 553–558.
- [25] M. Müller, Frequency representation in the rat cochlea, *Hear. Res.* 51 (1991) 247–254.

- [26] P. Nylén, M. Hagman, Function of the auditory and visual systems, and of the peripheral nerve, in rats after long-term combined exposure to *n*-hexane and methylated benzene derivatives. II. Xylene, *Pharmacol. Toxicol.* 74 (1994) 124–129.
- [27] J.M. Patel, C. Harper, T. Drew, The biotransformation of *p*-xylene to a toxic aldehyde, *Drug Metab. Dispos.* 4 (1978) 368–374.
- [28] G. Pryor, C. Rebert, D. Howd, Hearing loss in rats caused by inhalation of mixed xylenes and styrene, *J. Appl. Toxicol.* 7 (1987) 55–61.
- [29] V. Riihimäki, K. Savolainen, Human exposure to *m*-exposure. Kinetics and acute effects on the central nervous system, *Ann. Occup. Hyg.* 23 (1980) 411–422.
- [30] M. Sliwńska-Kowalska, E. Zamysłowska-Szmytko, W. Szymczak, P. Kotyło, M. Fiszer, W. Wesolowski, M. Pawlaczyk-Luszczynska, Ototoxic effects of occupational exposure to styrene and co-exposure to styrene and noise, *J. Occup. Environ. Med.* 45 (1) (2003) 15–24.
- [31] M. Tanaka, T. Noda, H. Moriwaki, Y. Tsujimoto, Synthesis and characterization of *m*- and *p*-methylbenzylmercapturic acids derived from *m*- and *p*-xylenes, *Chemosphere* 34 (1997) 2519–2523.
- [32] W. Tassaneeyakul, D. Birkett, J. Edwards, E. Veronese, W. Tassaneeyakul, R. Tukey, J. Miners, Human cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and *o*-, *m*- and *p*-xylene, *JPET* 276 (1996) 101–108.
- [33] R. Toftgard, O. Nilsen, Effects of xylene and xylene isomers on cytochrome P-450 and in vitro enzymatic activities in rat liver, kidney and lung, *Toxicology* 23 (1982) 197–212.
- [34] Ullmann, 1996. Xylenes. *Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry*, VCH. B. Elvers and S. Hawkins, vol. A28 5th edition, 433–445.
- [35] R. van Doorn, R. Bos, R. Brouns, C. Leijdekkers, P. Henderson, Effects of toluene and xylenes on liver glutathione and their urinary excretion as mercapturic acids in the rats, *Arch. Toxicol.* 43 (1980) 293–304.
- [36] I.A. Veliky, J.V. Cross, Process for preparing acyl derivatives of acylatable compounds, National Research Council of Canada PCI, Int. Appl. W091, vol. 12, 1991, p. 229, (CI. CO7C231/00) 22/08/91.

Research paper

Increase in cochlear microphonic potential after toluene administration

Robert Lataye, Katy Maguin, Pierre Campo *

Laboratoire de Neurotoxicité, Institut National de Recherche et de Sécurité, Avenue de Bourgogne, BP 27 Vandoeuvre, 54501 Cedex, France

Received 12 January 2007; received in revised form 15 March 2007; accepted 6 April 2007

Available online 24 April 2007

Abstract

Human and animal studies have shown that toluene can cause hearing loss. In the rat, the outer hair cells are first disrupted by the ototoxicant. Because of their particular sensitivity to toluene, the cochlear microphonic potential (CMP) was used for monitoring the cochlea activity of anesthetized rats exposed to both noise (band noise centered at 4 kHz) and toluene. In the present experiment, the conditions were specifically designed to study the toluene effects on CMP and not those of its metabolites. To this end, 100- μ L injections of a vehicle containing different concentrations of solvent were made into the carotid artery connected to the tested cochlea. Interestingly, an injection of 116.2-mM toluene dramatically increased in the CMP amplitude (\sim 4 dB) in response to an 85-dB SPL noise. Moreover, the rise in CMP magnitude was intensity dependent at this concentration suggesting that toluene could inhibit the auditory efferent system involved in the inner-ear or/and middle-ear acoustic reflexes. Because acetylcholine is the neurotransmitter mediated by the auditory efferent bundles, injections of antagonists of cholinergic receptors (AChRs) such as atropine, 4-diphenylacetoxy-*N*-methylpiperidine-methiodide (mAChR antagonist) and dihydro- β -erythroidine (nAChR antagonist) were also tested in this investigation. They all provoked rises in CMP having amplitudes as large as those obtained with toluene. The results showed for the first time in an *in vivo* study that toluene mimics the effects of AChR antagonists. It is likely that toluene might modify the response of protective acoustic reflexes. © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cochlear microphonic potential; Toluene; Solvent; Auditory efferent system

1. Introduction

Aromatic solvents are produced worldwide in large quantities for use in a variety of industrial and commercial applications (Meek and Chan, 1994; Huang et al., 1994). They are commonly used in paints, varnishes, printing inks, degreasers, adhesives, fuel additives, glues, thinners and plastics. Human and animal studies have shown that several aromatic solvents can provoke irreversible hearing

loss, the cochlea being considered as a target organ (Campo et al., 2001). It is known that toluene is harmful to hearing (Crofton et al., 1994) and that its combination with noise exposure should be avoided (Morata and Dunn, 1994; Lataye and Campo, 1997).

The notion of ototoxicity stemming from chemical agents is important, especially when people are concerned about potential workplace exposures (Morata and Campo, 2001). Aromatic solvents have been demonstrated to be ototoxicants that can even worsen the effects of noise in animals and humans (Lataye and Campo, 1997; Lataye et al., 2000; Sliwiska-Kowalska et al., 2003). Today, solvent-induced hearing loss (SIHL) can be accurately characterized. For instance, the pathological signature of the injury caused by solvents at the level of the organ of Corti has been described in the literature. Basically, the most sensitive cells within the organ of Corti are the outer hair cells

Abbreviations: Ach, acetylcholine; AchR, cholinergic receptor; mAChR, muscarinic receptor; nAChR, nicotinic receptor; CMP, cochlear microphonic potential; 4DAMP, 4-diphenylacetoxy-*N*-methylpiperidine-methiodide; DBE, dihydro- β -erythroidine hydrobromide; OHC, outer hair cell; MOCB, medial olivocochlear bundle; SOC, superior olivary complex; SIHL, solvent-induced hearing loss; RMS, root mean square

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 50 21 55; fax: +33 3 83 50 20 96.

E-mail address: Pierre.campo@inrs.fr (P. Campo).

(OHCs): the third row of OHCs being more sensitive than the second row which is itself more sensitive than the first row (Johnson and Canlon, 1994; Campo et al., 2001).

Despite all the descriptive knowledge about SIHL, we must admit that the cochleotoxic mechanism and the mechanism on the origin of the exacerbation of noise effects by solvents, or conversely, have not yet been clarified. Pulmonary uptake (Furman et al., 1998) and hepatic biotransformation of solvents play clearly a discreet role in the ototoxic process (Campo et al., 2006; Maguin et al., 2006), but they are not sufficient to explain the ototoxic process. If both pulmonary uptake and hepatic metabolism have to be taken into consideration to understand the whole ototoxic process, they are also a real drawback when one wants to study the cochleotoxic process of the parent molecule. Indeed, it is hard to study the cochleotoxic potency of one particular solvent without having any effect coming from one or several metabolites of the parent molecule. For these specific reasons, a toluene injection into the carotid artery was preferred to solvent inhalation in this series of experimental studies performed with rats. By this way, the parent molecule could reach the cochlea through the carotid, then the stapedia artery which supplies up to 30 percent of the cochlear blood flow (Yamamoto et al., 2003).

Since cochlear microphonic potential (CMP) is a good electrophysiological tool to record the electro-activity of the OHCs (Withnell, 2001), CMP measurements provide a easy way to test the responses of OHCs to bolus injection of toluene in anaesthetized rats. Toluene could act in four different ways. It could decrease CMP, if it is acutely toxic to OHCs or endocochlear potential. It could leave CMP unchanged if its primary target were inner hair cells, their synapses or auditory dendrites. It could increase CMP if for some reason it could affect either the endocochlear potential or the conductance of OHC membranes, or the way OHC stereocilia move. And last, it could affect the efferent pathways and/or the middle-ear muscle reflex, thereby killing their protective reflex action. Another advantage of the CMP is that it can be used as an indicator of the efferent system activity as well (Patuzzi et al., 1989).

From a general point of view, the efferent system has two important functional roles (1) it is involved in protection forms from high-intensity sounds (Puel et al., 1988; Pujol, 1994), (2) and it plays a role in modulating the active mechanism improving the cochlear contrast enhancement and frequency selectivity (Bonfils et al., 1986). Numerous efferent fibers, particularly those coming from the medial olivocochlear system terminate on OHCs (Guinan et al., 1983; Warr et al., 1986). As a result, their activation can be also assessed by the CMP measurement. Furthermore, the CMP allows the monitoring of the acoustic energy penetrating into the cochlea (Dancer and Franke, 1980) and thereby, the assessment of the role played by the middle-ear and inner-ear acoustic reflexes (Murata et al., 1986; Puel et al., 1988). Because of all these advantages, we decided to evaluate the solvent and noise effects on the

OHCs by recording the CMP magnitude before, during and after administration of toluene in the carotid artery of the rat.

In summary, the current project aims to evaluate the effects of solvent on the cochlea by recording the CMP amplitude from the promontory of the round window, while a bolus of vehicle containing toluene was injected into the carotid artery of the rat. Toluene was chosen as the reference solvent because of its basic structure (CH₃-φ) and its well-known cochleotoxic effects (Campo et al., 1998).

2. Material and methods

2.1. Animals

A total of 69 Sprague Dawley rats obtained from Charles River Laboratories in France was used throughout this investigation. The animals were randomly assigned to one of the different experiments. The weight of the animals was always over 350 g in this series of studies. Subjects were housed in individual cages (350 × 180 × 184 mm) with irradiated pinewood bedding (supplier: Special Diets Services, France, Ref: Gold cob 891180) two weeks before the start of the experiments. Food and tap water were available *ad libitum*. The animals were on a normal day/night cycle: lighting was on 12 h per day. The room temperature in the animal quarters was controlled at 22 ± 2 °C and the relative humidity at 55 ± 10%.

While conducting the research described in this article, the investigators adhered to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals, as promulgated by the French Conseil d'Etat through the decree n° 87– 848 published in the French Journal Officiel on October 20th, 1987.

2.2. Anesthesia

Half an hour prior to the surgical anesthesia, levomepromazine (12.5 mg/kg) was given to animals by *i.p.* injection. This premedication was done in order to minimize stress. Deep anesthesia was induced by injection of ketamine (50 mg/kg). During the anesthesia, the core temperature of the animals was maintained at 38 °C using a heating pad control system. Otoscopic examination was carried out to verify that the tympanic membranes were free from obstruction, infection or other abnormalities.

2.3. Surgery

2.3.1. Electrodes implantation

After a retro-auricular incision, the left otic capsule was exposed by cutting through the neck musculature. With the tip of a scalpel, a hole was drilled into the bony wall of the capsule. The recording electrode (insulated platinum wire) was inserted through a guide hole. When the electrode tip was on the edge of the round window, the electrode was anchored onto the otic capsule with dental cement. Then,

the vertex of the animals was cleared from tissue in order to receive the reference electrode, a copper screw placed above the olfactory bulbs. The measuring and reference electrodes were led to the vertex, fastened to a transistor socket and fixed with dental cement to the top of the skull. Finally, the retro-auricular incision was stitched up. This acute technique allows auditory-evoked potentials to be recorded from the cochlea with the bulla closed.

2.3.2. Catheter implantation

An incision of the neck was made ventrolaterally to expose the left carotid artery. The external branch of the carotid artery was ligated to drive the bolus toward the cochlea and the brainstem. A circular custom-made catheter [Te in polypropylene $\text{Ø}_i = 1.6$ mm extended with silicon catheters $\text{Ø}_i = 0.635$ mm] filled with a solution of NaCl 0.9% and heparin (50 UI/mL) was fitted into the common carotid trunk (Fig. 1). Such a catheter facilitated on the one hand, a normal bloodstream and on the other hand, the injection of the solvent.

2.4. Measurement of the cochlear microphonic potential (CMP)

The measures were performed inside a sound-attenuated chamber (Elstar, model MR <http://www.elstarprevention.com>). Animals were placed in a restraining device that ensured constant distance (15 cm) and orientation from the ipsilateral pinna to the speaker (JBL, 2405). The acoustic stimulus was generated with a Tucker–Davis technologies apparatus. That was a 2.6-s burst emitted every 12 s. Its spectrum was a band noise centered at 4 kHz (4 kHz-BN) as represented in Fig. 2. The CMP was amplified X5000 (Grass CP511) and filtered with a bandwidth from 2 to 8 kHz. The root mean square (RMS) value of the CMP

amplitude was measured with the amplifier BK 2636. The CMP values were expressed in dB Ref. 1 V (dBV). The generation and the acquisition of signals were driven by a custom-made software.

Each rat was equipped with a catheter before being exposed to noise bursts ranging in intensity from 65 to 95 dB SPL to determine the CMP values related to sound pressure levels. In other terms, an input–output curve was performed in order to establish the relationship between dB SPL and dBV to estimate an eventual impact of the catheter on the potential.

The acoustic calibration was carried out by measuring the sound pressure level emitted by the speaker (JBL 2405), when it was driven by a continuous noise (4 kHz-BN). The sound field was calibrated by positioning a 1/2 in. microphone BK Type 4133 at a point normally occupied by the center of the animal's head. The targeted intensity is obtained by adjusting the level of the continuous noise.

2.5. Vehicle and toluene injections

Then, the circular catheter was filled up with a vehicle called “intralipide” (10% of fat emulsion of purified soya oil and essentials fatty acids; Ref: 830513161 from Fresenius Kabi company). First, a 100- μ L bolus of the vehicle was injected at room temperature to check its non effect on the CMP. Then, 100- μ L of a freshly-prepared solution of vehicle containing toluene (Prolabo; Ref: 20675294) [CAS: 108 883] was injected. Based on pilot studies, three different concentrations of toluene were tested in this investigation with different groups of rats: 58.4 mM ($n = 5$), 116.2 mM ($n = 5$) and 229.5 mM ($n = 5$). Of course, these injected concentrations correspond to the concentrations inside the syringe, but not

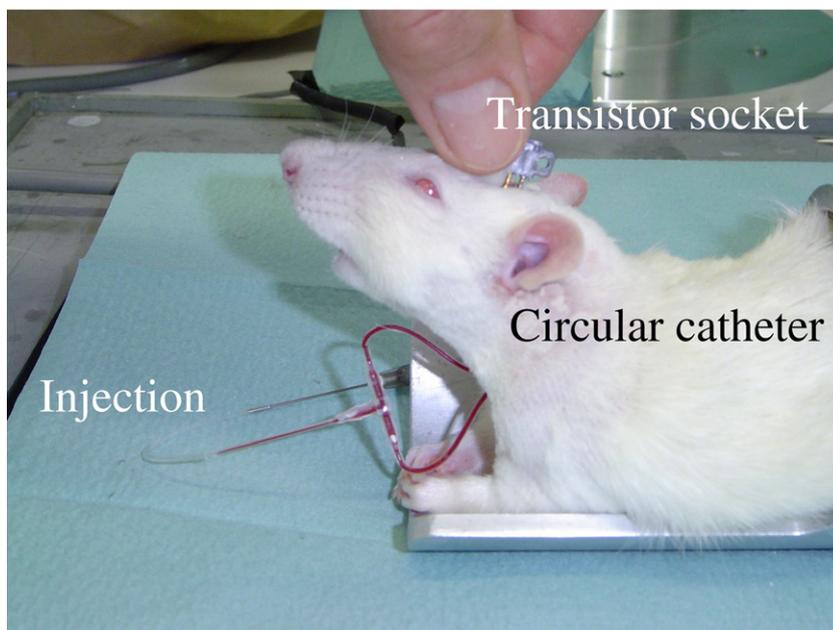


Fig. 1. Circular catheter allowing the injection of the solvent in the carotid artery.

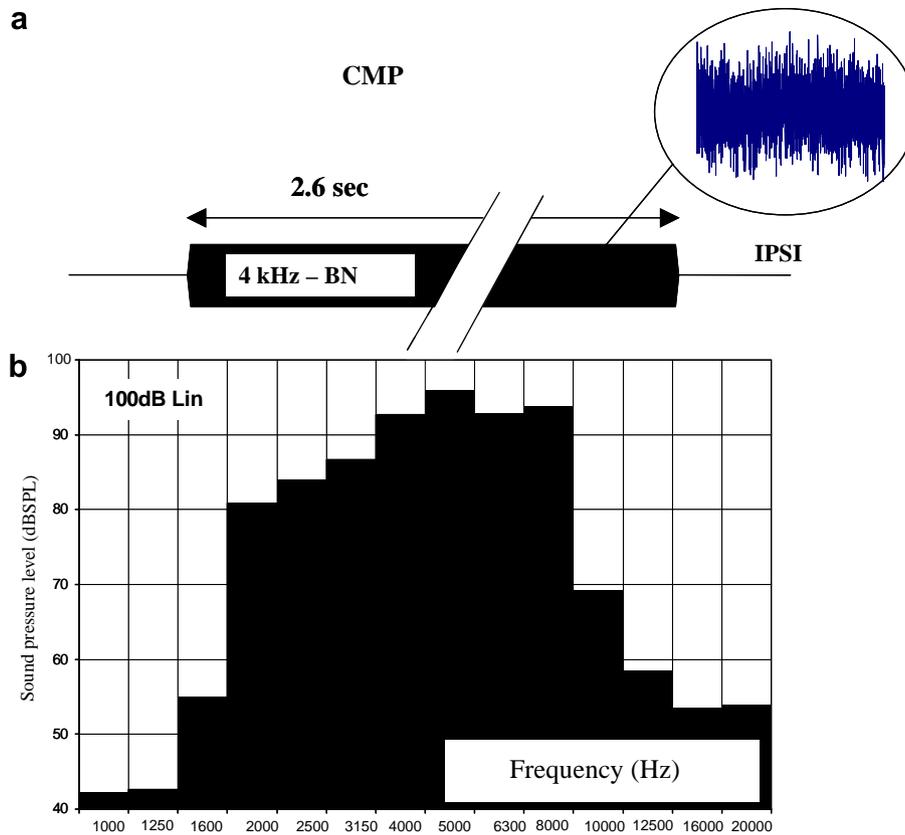


Fig. 2. Noise spectrum in the acoustic booth obtained for a 100-dB stimulation.

to the efficient concentrations on the site of action in the brain and/or in the cochlea. Each animal was tested with one single concentration. To sum up the experimental conditions, each animal received two 100 μ L-injections: an injection with the vehicle alone and an injection with vehicle containing solvent. The injections were always performed with a syringe pump calibrated in such a way that it delivered a 100- μ L bolus of vehicle over a 30-s period.

2.6. Competitive antagonist injections

Several competitive antagonists of cholinergic receptors (AChRs) were injected with the syringe pump calibrated as previously for toluene. Each injection lasted 30 s and delivered a 100- μ L bolus of vehicle containing the antagonist. A preliminary dose–response investigation allowed the efficient concentrations of each AChR antagonist to be determined for inducing in CMP changes comparable with those obtained with toluene.

2.6.1. Cholinergic receptor antagonists

The cholinergic receptor antagonists were mixed with the vehicle before injecting 100 μ L of it.

Three concentrations of atropine sulphate [CAS: 51 558]: 325, 487 or 691 μ M, were tested to assess the effects of a general cholinergic antagonist and to compare them to the toluene effects.

Then, three concentrations of 4-diphenylacetoxy-*N*-methylpiperidine-methiodide (4DAMP: Ref. D104 from Sigma) [CAS: 1952 15 4]: 44.3, 88.6 and 122 μ M, were tested to assess the effects of an antagonist of muscarinic receptors.

Finally, three concentrations of dihydro- β -erythroidine hydrobromide (DBE: Ref. D149 from Sigma) [CAS: 29734 68 7]: 100, 150 and 175 μ M, were tested to assess the effects of an antagonist of nicotinic receptors.

2.7. Gentamicin injections

A 100- μ L bolus of vehicle with 6.7-mM ($n = 4$) of gentamicin sulphate (Ref. G3632 from Sigma) [CAS: 1405 41 0] was injected to assess the effects of a blocker of the auditory efferent system.

3. Statistical analysis

The Statgraphics centurion software (version XV) was used to run all the statistical analyses. Due to the small size of the samples, the test of normality was not authorized. Thus, parametric tests were deemed not suitable in the present experimental context. Two main non-parametric tests were used in the present investigation. The Mann–Whitney (Wilcoxon: W) test was used on two samples to compare the effects of a vehicle injection with those of a solvent or a gentamicin injection on the CMP amplitude,

whereas the Kruskal–Wallis (K) test was used with several samples, like those obtained with the cholinergic antagonists. Alpha levels of 0.05 (significant at 95%) were used for the significance of the tests.

4. Results

4.1. Input–output function without toluene injection

Fig. 3 displays the linear relationship established between acoustic stimulations and RMS values of the CMP. These data ($n = 12$ rats) were obtained with a noise stimulation and without toluene administration. There was a major advantage to use a representation in which input and output data correspond to logarithmic values: dB SPL and dBV, respectively. With such a representation, we have a linear relationship between intensity and CMP amplitude:

$$y = 0.48x - 30.40; R^2 = 0.94.$$

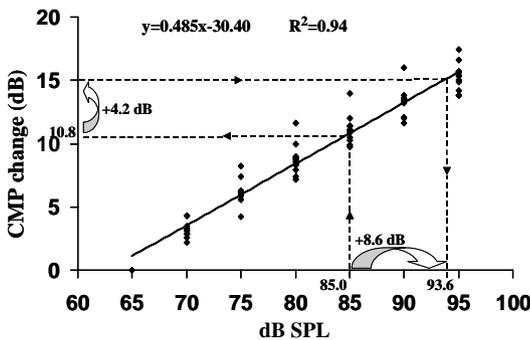


Fig. 3. Input–output curve of the CMP (RMS value) as a function of the sound pressure level. Noise spectrum: band noise centered at 4 kHz; Burst duration: 2.6 s. An example (rat # 41) of a CMP change of 4.2 dB in response to an injection of 116.2-mM toluene with a noise burst emitted at 85 dB SPL is illustrated.

Because we did not want to cause cochlear damage induced by noise, we limited the range of tested intensities from 65 to 95 dB SPL. The mean value obtained (1) at 65 dB SPL was -97.2 dBV or $13.8 \mu\text{V}$, (2) at 75 dB SPL the mean value was -93.7 dBV or $20.6 \mu\text{V}$, (3) at 85 dB SPL it was -89.8 dBV or $31.6 \mu\text{V}$ and finally (4) at 95 dB SPL, it was -86.5 dBV or $47.3 \mu\text{V}$.

Most of the experiments reported here was performed with an 85-dB SPL acoustic stimulation in order to measure CMP changes. Data (4.2-dB CMP change) reported in Fig. 3 were obtained with rat # 41. In this example, a 4.2-dB increase corresponds to a CMP response which would have been obtained with a 8.6-dB increase in the acoustic stimulation.

4.2. Toluene concentration effect on the CMP change

As shown by the insert (Fig. 4), the RMS values of the CMP obtained with an 85-dB SPL acoustic stimulation, were recorded before, during and after the toluene injection, which started at time 0 and lasted 30 s. In this graph, a 100- μL injection of intralipide containing a 116.2-mM concentration of toluene triggered a 4.2-dB rise in the CMP amplitude (data obtained with # 41), called *P* component. The rise in the CMP amplitude lasted approximately 100 s, and achieved a maximum at approximately 60 s. The increase was followed by a 1.6-dB decrease: the *N* component. The two mentioned components corresponded to a difference of RMS values.

The *P* component = Amplitude max (RMS)–Amplitude baseline (RMS).

The *N* component = Amplitude min–Amplitude baseline.

The bar chart of Fig. 4 shows the toluene-induced CMP changes (*P* and *N* components) as a function of increasing toluene concentrations [0 mM ($n = 5$), 58.4 mM ($n = 5$),

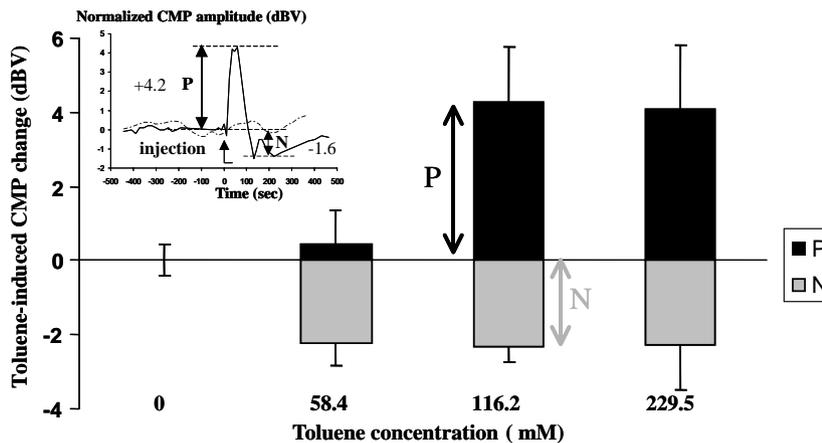


Fig. 4. Bar chart: Toluene-induced CMP (*P* and *N* components) change as a function of the toluene concentration. Noise spectrum: band noise centered at 4 kHz. Burst duration: 2.6 s. Burst rate: 1/12 s. Sound pressure level: 85 dB SPL. Injection of a 100- μL bolus of vehicle containing toluene. $N = 5$ for each concentration: 0 mM, 58.4 mM, 116.2 mM and 229.5 mM. Insert: CMP values (RMS) recorded before, during and after injection of vehicle (dotted line) or 116.2-mM of toluene (solid line). The acoustic stimulation is similar to that described for the bar chart. The injection started at point 0 and lasted 30 s. Data obtained with rat # 41.

116.2 mM ($n = 5$), and 229.5 mM ($n = 5$)]. In this series of experiments, the acoustic intensity was constant at 85 dB SPL.

4.2.1. P component change

There was a significant difference ($K = 13.59$; $p = 0.004$) between the amplitudes obtained for the four different concentrations. More accurately, the difference was significant between 58.4-mM and 116.2-mM toluene. However there was no significant difference between 0 mM (vehicle) and 58.4-mM toluene (0 ± 0.4 dB vs. 0.4 ± 0.9 dB) and between 116.2 mM and 229.5-mM toluene (4.3 ± 1.5 dB vs. 4.1 ± 1.7 dB) as well. As a result, the lowest concentration (116.2 mM) causing a significant increase of the P component amplitude (4.3 ± 1.5 dB) was chosen as the reference concentration to study the effects of sound intensity.

4.2.2. N component change

There was a significant ($K = 11.03$; $p = 0.012$) difference between the amplitudes obtained for the 4 different concentrations. However, there was no significant difference between the amplitudes obtained at 58.4, 116.2 and 229.5-mM concentrations, respectively -2.3 ± 0.4 , -2.2 ± 0.6 and -2.3 ± 1.2 dB. The only significant differ-

ence was between the vehicle (0 ± 0.4 dB) and the three concentrations of toluene.

4.3. Toluene-induced CMP change as a function of SPL

In this experiment, the findings were obtained with a 100- μ L injection of vehicle containing 116.2 mM of toluene: the reference concentration.

The bar chart in Fig. 5 shows the toluene-induced CMP changes (P and N components) as a function of increasing sound pressure levels [65 dB ($n = 5$), 75 dB ($n = 5$), 85 dB ($n = 5$) and 95 dB SPL ($n = 4$)]. No significant difference was obtained between the N component amplitudes, whatever the intensity tested. On the contrary, there was a large and significant ($K = 12.58$; $p = 0.006$) difference between the amplitudes obtained at 65, 75, 85 and 95 dB SPL, specifically between 75 dB SPL (1.2 ± 1.7 dB) and 85 dB SPL (4.3 ± 1.5 dB).

4.4. Effect of cholinergic antagonists on CMP amplitude

Table 1 summarizes the data obtained with the preliminary dose–response study to determine the targeted concentrations of the AchR antagonists capable of inducing

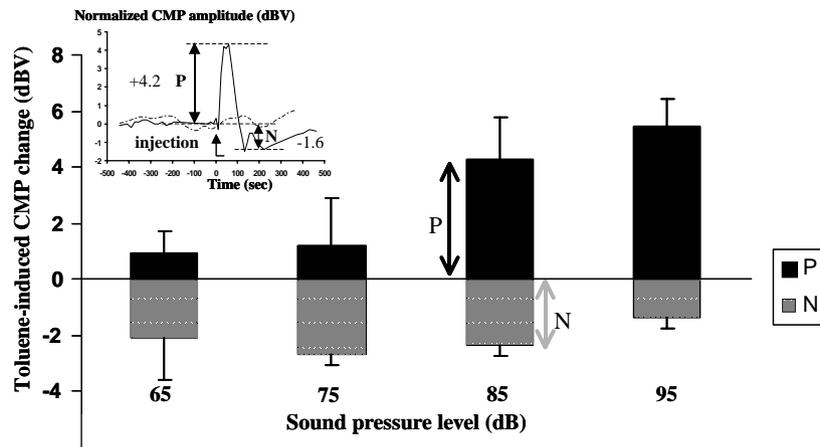


Fig. 5. Bar chart: Toluene-induced CMP (P and N components) change as a function of SPL. Noise spectrum: band noise centered at 4 kHz. Burst duration: 2.6 s. Burst rate: 1/12 s. Injection of a 100- μ L bolus of vehicle containing 116.2-mM toluene. $N = 5$ at 65 dB, $n = 5$ at 75 dB, $n = 5$ at 85 dB and $n = 4$ at 95 dB SPL. Insert: CMP values (RMS) recorded before, during and after injection of vehicle (dotted line) or 116.2-mM of toluene (solid line). The acoustic stimulation is 85 dB SPL. The injection started at point 0 and lasted 30 s. Data obtained with rat # 41.

Table 1

Dose–response study to determine the targeted concentrations of the AchR antagonists capable of inducing changes of the CMP amplitude comparable with that obtained with reference concentration of toluene

	Atropine sulphate			Dihydro- β -erythroidine hydrobromide			4-Diphenylacetoxy-N-methylpiperidine-methiodide		
Concentration (μ M)	325	487	691	100	150	175	44.3	88.6	122
Antagonist-induced CMP change (dB)	0.8	2.9	4.7	1.0	2.6	3.5	0.2	3.3	4.3
	1.0	0.6	4.3	1.2	3.2	3.2	-0.2	1.0	4.8
	-1.0	2.0	4.0	0.9	1.9	4.2	0.0	3.3	4.7
	0.2	2.0	5.1	0.8	1.1	5.0	2.0	3.0	3.5
Mean	0.3	1.9	4.5	1.0	2.2	4.0	0.5	2.7	4.3
SD	0.9	1.0	0.5	0.2	0.9	0.8	1.0	1.1	0.6

Ipsi-lateral stimulation [4 kHz-BN] emitted at 85 dB SPL. Injection of 100- μ L bolus of vehicle containing AchR antagonists.

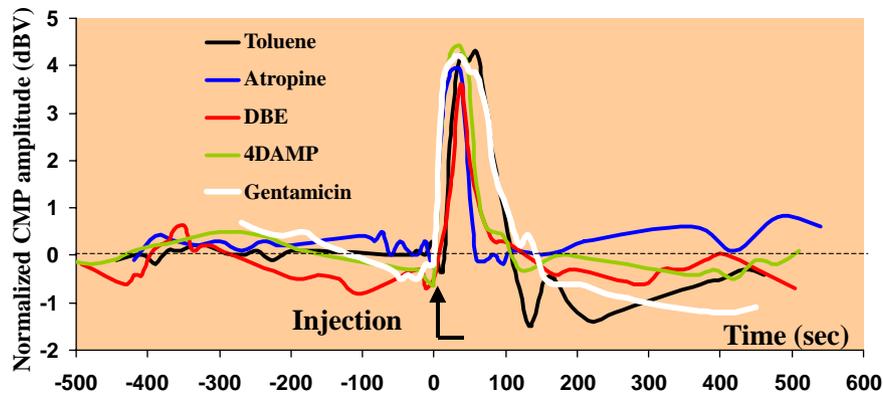


Fig. 6. Effects of cholinergic antagonists on CMP amplitude. The trace obtained with 116.2-mM toluene is reported for comparison. Noise spectrum: band noise centered at 4 kHz. Burst intensity: 85 dB SPL. Burst duration: 2.6 s. Burst rate: 1/12 s. Cholinergic receptor antagonists: atropine (691 μ M) is a general antagonist, 4DAMP (122 μ M) is a muscarinic antagonist, DBE (175 μ M) is a nicotinic antagonist. Gentamicin (6.7 mM) blocks the efferent system.

changes of the CMP amplitude comparable with that obtained with the reference concentration of toluene (~ 4 dB).

Fig. 6 displays the changes of CMP amplitude obtained before during and after a 100- μ L injection of AchR antagonists at the targeted concentrations. Each trace represents the data obtained with a single animal which was representative of each group. The *N* component response obtained with the three antagonists was significantly ($K = 12.6$, $p = 0.006$) different from that obtained with toluene. Conversely, the *P* component response (approximately 4.2 dB) obtained with the three antagonists was not significantly different from that obtained with toluene (4.3 dB). If the patterns of the *P* component responses obtained with the antagonists are similar to that obtained with toluene, the concentrations required to trigger the rise were different: 691 μ M for the atropine, 122 μ M for the 4DAMP and 175 μ M for the DBE.

4.5. Effects of gentamicin on CMP amplitude

Fig. 6 depicts the CMP changes obtained with rat # 09 before, during and after an injection of 6.7-mM gentamicin. As with toluene, a 100- μ L injection of gentamicin provoked amplitude changes in the *P* (4.4 ± 1.1 dB; $n = 4$) and *N* components (-1.8 ± 0.3 dB; $n = 4$) which were not significantly different from those obtained with toluene injection.

5. Discussion

The insertion of the custom-made circular catheter into the left carotid artery did not apparently disturb the physiological responses of the left cochlea. Indeed, the mean amplitude of CMP obtained at 65 dB SPL was 13.8 μ V, which is not very different from the CMP amplitude (approximately 6 μ V) reported by Crowley et al. (1965), or more recently by Lohuis et al. (2000) with a pure tone stimulation at 2, 4 and 8 kHz. Besides, the results reported

in Fig. 3 show that the sensitivity of the experimental protocol was sufficient to assess increases in CMP amplitudes in response to increasing sound pressure levels (SPLs). This input/output curve can be expressed by a linear function ($y = 0.48x - 30.40$; $R^2 = 0.94$) for acoustic stimulations ranging in intensity from 65 to 95 dB SPL. Therefore, there is an obvious and significant ($K = 12.58$; $p = 0.006$) intensity effect on the CMP responses.

Because it is now well documented that outer hair cells (OHCs) are susceptible to toluene in rat (Johnson and Cannon, 1994; Campo et al., 2001), we expected to obtain changes of the CMP amplitude by injecting toluene into the carotid artery. Indeed, it is important to bear in mind that the carotid artery is divided in several branches whose one of them: the stapedia artery, supplies up to thirty percent of the cochlear blood flow (Yamamoto et al., 2003). Our hypothesis was that a toluene injection into the carotid artery would convey a sufficient amount of solvent within the organ of Corti to make the CMP collapse. Instead of that, we found a striking increase (4.2 dB; Fig. 3) in the CMP amplitude and the phenomenon was clearly related to the toluene injection since:

- (1) the injection of the vehicle (intralipide: 0 mM of toluene) alone did not cause any significant change of the CMP amplitude (Fig. 4),
- (2) the temporary (duration ~ 100 s) increase in CMP amplitude was triggered by the injection onset of the solvent (Fig. 4) and,
- (3) we triggered the phenomenon three successive times (data not shown) with three repetitive injections.

Compared to the *P* component, the *N* component had a relative low amplitude (1.6 dB). Because of that, we mainly focused on the *P* component of the CMP in the current report.

In toxicology, a dose–response relationship is a customary approach to assess the noxious effect of a toxicant. In this investigation, the dose–response relationship was diffi-

cult to achieve (Fig. 4): the slope between 58.4 and 116.2 mM (injected concentrations) was so steep that it was impossible to accurately control the amount of solvent reaching the target organ. Indeed, blood pressure and the vascular network of the rats were factors that are important to take into consideration for evaluating the amount of solvent injected for 30 s and they were impossible to control in our experimental context. Moreover, it is possible that our limits of detection were not sufficient to measure changes between these two concentrations: 58.4 and 116.2 mM. Nevertheless, the dose–response histogram displayed in Fig. 4 shows a clear increase in the CMP amplitudes and the maximum of the CMP rise was obtained from a 116.2-mM concentration of toluene. In summary, Fig. 4 shows that a 30-s injection of a 116.2-mM concentration of toluene was required to see a temporary rise in the *P* component. Actually, this was the main reason for which we chose the abovementioned toluene concentration as the reference concentration for the rest of our experiments.

Since we used a noise stimulus to assess the microphonic potential during a toluene injection, a SPL – CMP amplitude investigation was also required. The data reported in Fig. 5 were obtained with the same amount of injected toluene: 100 μ L at 116.2-mM toluene. Fig. 5 demonstrates that the increase in the CMP amplitude in response to the reference concentration was significantly ($K = 12.58$; $p = 0.006$) intensity-dependent between 65 and 95 dB SPL. Owing to this latter characteristic, an action of toluene on the auditory efferent system which protects the cochlea from high-intensity sounds (Puel et al., 1988; Pujol, 1994) was strongly suspected.

Since the pioneering works of Warr et al. (1986), the anatomical basis for neurophysiological control of the cochlea by efferent innervation of the organ of Corti has been well documented. The efferent innervation of the rat cochlea originates in the superior olivary complex (SOC) and is divided into two systems, the lateral and the medial olivocochlear bundles (MOCB) (White and Warr, 1983). The MOCB is commonly reported as the efferent track involving in the inner-ear acoustic reflex which influences the OHC motility or cochlear micromechanics (Cooper and Guinan, 2003) and thereby the CMP amplitude (Patuzzi et al., 1989). There is also a second protective reflex involving the middle-ear muscles. The trigger of the middle-ear acoustic reflex is also intensity-dependent and it is driven by an efferent loop mediated by acetylcholine (Ach) (Lee et al., 2006; Murata et al., 1986). Both acoustic reflexes can limit the acoustic energy absorption by the cochlea. Whatever the reflex involved in the described phenomenon, it was clear that a cholinergic efferent innervation did play an active role in it. Indeed, an injection into the carotid artery allowed the solvent to reach the cochlea, but also the efferent system center located in the brainstem (Kastin et al., 1976). Several lines of evidence indicate that the efferent bundles whose bodies are located in the SOC are mediated by Ach (Eybalin and Pujol, 1987).

One way of testing the specific involvement of the efferent system in the phenomenon reported in this study was to interrupt the entire cochlear efferent innervation by sectioning it or by using AchR blockers. As far as we were concerned, the injection of AchR antagonists was the easiest way of inhibiting the efferent system. Toluene inhibition would be located at the level of the efferent system or underneath the OHCs (Smith et al., 1994; Yoshida et al., 1999), since 6.7-mM gentamicin provoked the same response as that obtained with toluene in similar experimental conditions. In the same manner, toluene could block the efferent system by acting on the Ach receptors.

Fig. 6 shows the effect of three major antagonists of AchRs. Atropine was first used to assess the effects of a general cholinergic antagonist on the CMP amplitude. The pattern of the curve obtained after the atropine injection was similar to that obtained with toluene. From this finding, it was reasonable to claim that toluene can mimic the action of AchR antagonists, even though the efficient concentrations of toluene and atropine were very different: 116.2 mM and 691 μ M, respectively. To identify the type of AchRs (muscarinic: mAChR vs. nicotinic: nAChR) involved in the phenomenon, both mAChRs and nAChRs were tested by measuring the inhibition potency of 4DAMP and DBE.

Injections of 122- μ M 4DAMP or 175- μ M DBE provoked the same CMP changes as 116.2-mM toluene. This difference of concentration between the AchR antagonists does not allow us to reach a conclusion as to which type of AchR toluene acts on. Owing to the toluene concentration (116.2 mM) required to cause a CMP response equivalent to that obtained with 4DAMP (122 μ M) or DBE (175 μ M), it is therefore too early to consider toluene as a competitive ligand having a high-affinity interaction with nicotinic receptor proteins, as suggested by Bale et al. (2005) using *in vitro* approach.

Based on the present *in vivo* investigation, it is likely that toluene modifies the membrane fluidity of the target tissue, and therefore the structure of the receptors. The possible mechanism of the inhibitory effect of toluene on the efferent system could be a lipid-mediated mechanism, as mentioned by Tsuga et al. (2002) and based upon *in vitro* observations.

In summary, the AchRs could be inhibited by diverse ligands, like toluene for instance, that disturb the neurotransmitter binding site at the level of the efferent system and thereby inhibit the acoustic protective reflexes. It is still too early to consider toluene as a competitive ligand and therefore to claim that there is a high-affinity interaction with cholinergic receptor proteins. Like ethanol, toluene could also establish nonspecific interactions with brainstem membranes although research has challenged this hypothesis over the past 25 years and demonstrated that volatile solvents can modulate the function of a variety of voltage and ligand-gated ion channels (Franks and Lieb, 1997; Woodward et al., 2004).

From a safety point of view, the consequences of these findings are important for people exposed to both noise and toluene. In case of confirmation of these results,

toluene could block the acoustic protective reflexes of solvent-exposed workers who would be thereby exposed to at least 4 dB louder sounds.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge Christian Barthélemy for his technical assistance.

References

- Bale, A., Meacham, A., Benignus, V., Bushnell, P., Shafer, T., 2005. Volatile organic compounds inhibit human and rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205, 77–88.
- Bonfils, P., Remond, M.C., Pujol, R., 1986. Effects of section of the medial efferent tract on cochlear frequency selectivity. *Hear. Res.* 24, 285–287.
- Campo, P., Lataye, R., Cossec, B., Villette, V., Roure, M., Barthelemy, C., 1998. Combined effects of simultaneous exposure to toluene and ethanol on auditory function in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 20, 321–332.
- Campo, P., Lataye, R., Loquet, G., Bonnet, P., 2001. Styrene-induced hearing loss: a membrane insult. *Hear. Res.* 154, 170–180.
- Campo, P., Blachère, V., Payan, J.P., Cossec, B., Ducos, P., 2006. Toluene metabolism in the rat and guinea-pig: a comparative study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 276–282.
- Cooper, N., Guinan, J., 2003. Separate mechanical processes underlie fast and slow effects of medial olivocochlear efferent activity. *J. Physiol.* 548, 307–312.
- Crofton, K.M., Lassiter, T., Rebert, C., 1994. Solvent-induced ototoxicity in rats: an atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.* 80, 25–30.
- Crowley, D., Hepp-Reymond, M.C., Tabowitz, D., Palin, J., 1965. Cochlear potentials in the albino rat. *J. Aud. Res.* 5, 307–316.
- Dancer, A., Franke, R., 1980. Intracochlear sound pressure measurements in guinea pigs. *Hear. Res.* 2, 191–205.
- Eybalin, M., Pujol, R., 1987. Choline acetyltransferase (ChAT) immunoelectron microscopy distinguishes at least three types of efferent synapses in the organ of Corti. *Exp. Brain Res.* 65, 261–270.
- Franks, N., Lieb, W., 1997. Anaesthetics set their sites on ion channels. *Nature* 389, 334–335.
- Furman, G., Silverman, D., Schatz, R., 1998. Inhibition of rat lung mixed function oxidase activity following repeated low-level toluene inhalation: possible role of toluene metabolites. *J. Toxicol. Environ. Health* 54, 633–645.
- Guinan, J.J., Warr, W.B., Norris, B.E., 1983. Differential olivocochlear projections from lateral versus medial zones of the superior olivary complex. *J. Comp. Neurol.* 21, 358–370.
- Huang, M., Jin, C., Liu, Y., Li, B., Qu, Q., Uchida, Y., Inoue, O., Nakatsuka, H., Watanabe, T., Ikeda, M., 1994. Exposure of workers to a mixture of toluene and xylenes. *Occup. Environ. Med.* 51, 42–46.
- Johnson, A., Canlon, B., 1994. Progressive hair cell loss induced by toluene exposure. *Hear. Res.* 75, 201–208.
- Kastin, A., Nissen, C., Nicolics, K., Medzihradsky, K., Coy, H., Teplan, I., Schally, A., 1976. Distribution of 3H-a-MSH in rat brain. *Brain Res. Bull.* 1, 19–26.
- Lataye, R., Campo, P., 1997. Combined effects of simultaneous exposure to noise and toluene on hearing function. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 373–382.
- Lataye, R., Campo, P., Loquet, G., 2000. Combined effects of noise and styrene exposure on hearing function. *Hear. Res.* 139, 86–96.
- Lee, D., De Venecia, R., Guinan, J., Brown, C., 2006. Central auditory pathways mediating the rat middle ear muscles reflexes. *Anat. Rec. Part A* 288, 358–369.
- Lohuis, P., Börjesson, P., Klis, S., Smoorenburg, G., 2000. The rat cochlea in the absence of circulating adrenal hormones: an electrophysiological and morphological study. *Hear. Res.* 143, 189–196.
- Maguin, K., Lataye, R., Campo, P., Cossec, B., Burgart, M., Wanusiow, D., 2006. Ototoxicity of the three xylene isomers in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 28, 648–656.
- Meek, M., Chan, P., 1994. Toluene: evaluation of risks to human health from environmental exposure in Canada. *Environ. Carcin. Eco. Rev.* C12, 507–515.
- Morata, T., Campo, P., 2001. Auditory function after single or combined exposure to styrene: a review. In: Henderson, D., Prasher, D., Kopke, R., Salvi, R., Hamernik, R. (Eds.), *Noise-induced hearing loss: basic mechanisms prevention and control*. Noise Research Network Publications, London, pp. 293–304.
- Morata, T., Dunn, D., 1994. Occupational exposure to noise and ototoxic organic solvents. *Arch. Environ. Health* 49, 359–365.
- Murata, K., Ito, S., Horikawa, J., Minami, S., 1986. The acoustic middle reflex in albino rats. *Hear. Res.* 23, 169–183.
- Patuzzi, R.B., Yates, G.K., Johnstone, B.M., 1989. Changes in cochlear microphonic and neural sensitivity produced by acoustic trauma. *Hear. Res.* 39, 189–202.
- Puel, J.L., Bobbin, R.P., Fallon, M.F., 1988. An ipsilateral cochlear efferent loop protects the cochlea during intense sound exposure. *Hear. Res.* 37, 65–70.
- Pujol, R., 1994. Lateral and medial efferents: a double neurochemical mechanism to protect and regulate inner and outer hair cell function in the cochlea. *Br. J. Audiol.* 28, 185–191.
- Sliwiska-Kowalska, M., Zamysłowska-Szmytko, E., Szymczak, W., Kotyło, P., Fiszer, M., Wesolowski, W., Pawlaczyk-Luszczynska, M., 2003. Ototoxic effects of occupational exposure to styrene and co-exposure to styrene and noise. *J. Occup. Environ. Med.* 45, 15–24.
- Smith, D., Erre, J.P., Aran, J.M., 1994. Rapid, reversible elimination of medial olivocochlear efferent function following single injections of gentamicin in the guinea pig. *Brain Res.* 652, 243–248.
- Tsuga, H., Haga, T., Honma, T., 2002. Effects of toluene exposure on signal transduction: toluene reduced the signalling via stimulation of human muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes in CHO cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 89, 282–289.
- Warr, W.B., Guinan, J., White, J., 1986. Organization of the efferent fibers: the lateral and medial olivocochlear systems. In: Altschuler, R.A., Hoffman, D.W., Bobbin, R.P. (Eds.), *Neurobiology of hearing: the cochlea*. Raven Press, NY, pp. 33–348.
- White, J., Warr, B., 1983. The dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 219, 203–214.
- Withnell, R.H., 2001. Brief report: the cochlear microphonic as an indication of outer hair cell function. *Ear Hearing* 22, 75–77.
- Woodward, J., Nowak, M., Davies, D., 2004. Effects of the abused solvent toluene on recombinant P2X receptors expressed in HEK293 cells. *Mol. Brain Res.* 125, 86–95.
- Yamamoto, H., Tominaga, M., Sone, M., Nakashima, T., 2003. Contribution of stapedial artery to blood flow in the cochlea and its surrounding bone. *Hear. Res.* 186, 69–74.
- Yoshida, N., Liberman, M.C., Brown, M.C., Sewell, W.F., 1999. Gentamicin blocks both fast and slow effects of olivocochlear activation in anesthetized guinea pigs. *Am. Physiol. Soc.* 82, 3168–3174.

Effects of Aromatic Solvents on Acoustic Reflexes Mediated by Central Auditory Pathways

Pierre Campo,¹ Katy Maguin, and Robert Lataye

Laboratoire de neurotoxicité, Institut National de Recherche et de Sécurité, Avenue de Bourgogne, BP 27 Vandoeuvre, 54501 cedex, France

Received May 24, 2007; accepted July 4, 2007

From previous *in vivo* investigations, it has been shown that toluene can mimic the effects of cholinergic receptor antagonists and may thereby modify the response of protective acoustic reflexes. The current study aimed to define the relative effects of aromatic solvents on the middle ear and inner ear acoustic reflexes. Toward this end, the cochlear microphonic (CMP) elicited with a band noise centered at 4 kHz, and the compound action potential (CAP) elicited with 4-kHz tone pips was measured in rats. Both potentials were recorded before, during, and after triggering the protective reflexes by a 110-dB SPL contralateral octave band noise centered at 12.5 kHz (12.5 kHz-OBN). In several rats, the middle ear muscles were severed to identify the relative effects of toluene on the two reflexes. While the reflex elicitor was capable of decreasing both the CMP and CAP amplitudes, an injection of 116.2mM toluene cancelled this suppressor effect induced by the contralateral sound. In the rats with nonfunctional middle ear muscles, a solvent injection did not modify the electrophysiological responses of the cochlea. Different solvents were tested to study the relationship of the chemical structure of the solvents on the acoustic reflexes. The present study showed that aromatic solvents can inhibit the action of the middle ear reflex by their anticholinergic effect on the efferent motoneurons. An aromatic nucleus and the presence of one side chain of no more than 3 C seem to be required in the solvent structure to inhibit the efferent motoneurons.

Key Words: solvents; ototoxicity; neurotoxicity; auditory efferent system; protective acoustic reflex.

Noise is clearly the predominant occupational hazard to hearing, but complex exposures that include chemical contaminants are not covered by the European (Directive 2003/10/EC) or American noise standards. The literature on noise and on hearing conservation research proves that noise is often present in occupational settings where chemical exposure also occurs (see review by Morata and Campo, 2001). Moreover, a wealth of laboratory animal experiments along with industrial epidemiological studies have identified several chemical contaminants that can cause hearing loss and exacerbate the effects of

occupational noise (Lataye *et al.*, 2000; Morata and Dunn, 1994; Sliwinska-Kowalska *et al.*, 2003). In a previous study, we showed that toluene, and not one of its metabolites, injected into the carotid artery can mimic the effects of acetylcholine receptor antagonists on the auditory efferent system (Lataye *et al.*, 2007).

In mammals, the auditory efferent system is a cholinergic descending pathway, which can be divided into two main sub-systems: the medial and lateral olivocochlear systems (Simmons, 2002; White and Warr, 1983). It is composed of crossed and uncrossed axons providing an efferent innervation to the organ of Corti. These axons originate bilaterally in the superior olivary complex located in the brainstem and mainly terminate on either outer hair cells (OHCs) or eight nerve dendrites beneath the inner hair cells (Pujol and Lenoir, 1986). These efferent olivocochlear neurons mediate the inner ear acoustic reflex. There are also efferent fibers originating in motoneurons located near the facial or the trigeminal nerve nuclei, which innervate either the stapedius or the tensor tympani middle ear muscles (Lee *et al.*, 2006). The efferent motoneurons mediate the middle ear muscle systems and, thereby, the middle ear acoustic reflex. Both reflexes are elicited by intense sounds (Murata *et al.*, 1986). One of the major roles played by both reflexes is to prevent cochlear damage by changing (1) the ossicular chain impedance in the middle ear (Borg *et al.*, 1984) and (2) the OHC properties so as to decrease their contribution to the amplification of the organ of Corti motion (Guinan, 1996). In fact, both reflexes contribute to modify either the penetration or the absorption of acoustic energy into the inner ear.

It has been demonstrated that an electrical (Fex, 1962) or a contralateral sound stimulation of the efferent olivocochlear pathway is capable of suppressing the activity of auditory nerve afferent fibers, even in anesthetized animals (Liberman, 1989). Thus, a contralateral sound stimulation may potentially influence activity in the opposite cochlea via the medial olivocochlear complex (Warren and Liberman, 1989) for the inner ear acoustic reflex or via the facial and trigeminal nerve nuclei for the middle ear acoustic reflex. One simple way of testing the intracochlear acoustic energy and indirectly the influence of the acoustic reflexes is to record the cochlear microphonic potential

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: +33-33-83-50-20-96. E-mail: Pierre.campo@inrs.fr.

(CMP) before, during, and after application of the chemical compound (Dancer and Franke, 1980). Besides, CMP gives a good electrophysiological image of OHC function, whereas the N1 wave of the compound action potential (CAPN1) is more suitable for testing inner hair cell function. For these reasons, both electrophysiological tools were used to test the impact of toluene (reference molecule) on the auditory efferent system in the current investigation.

Recently, we showed that toluene may act on the auditory efferent system and thereby inhibit the acoustic protective reflexes (Lataye *et al.*, 2007). If this hypothesis is true, a contralateral sound-induced suppression should be cancelled by an injection of toluene into the carotid artery as well. It would be interesting to define the relative importance of the intracochlear reflex with regard to that of the middle ear acoustic reflex in the phenomenon described in the present study. One approach for distinguishing the inhibitory effect of toluene on each reflex is to compare the CMP and CAPN1 responses in animals with intact or severed middle ear muscles.

In the current investigation, the reflexes were mainly elicited in one ear (the nonoperated ear) with an acoustic stimulus and their physiological effects measured in the other ear (operated ear). The contralateral sound suppression mediated by the olivocochlear and motoneuron efferent fibers was assessed by means of the CMP and CAPN1 recordings at the round window of the cochlea of the rat. The aims of the current project were on one hand to evaluate the relative impact of solvent on the two acoustic reflexes and on the other hand to study the relationship between the structure of the solvents and their inhibition potency on the efferent fibers.

This investigation should explain, at least partly, the mechanism at the origin of the synergistic effects of a combined exposure to noise and solvent on hearing. As a result, auditory consequences of combined exposures to noise and solvent are discussed in the present report.

MATERIALS AND METHODS

Animals

A total of 52 adult Sprague Dawley rats weighing over 350 ± 15 g and obtained from Charles River France were employed in these studies. They were housed in individual cages ($350 \times 180 \times 184$ mm) with pinewood bedding 2 weeks before the start of the experiments. Food and tap water were available *ad libitum*. The animals were on a normal day/night cycle, i.e., lighting was on 12 h per day. The room temperature in the animal quarters was controlled at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and the relative humidity at $55 \pm 10\%$.

While conducting the research described in this article, the investigators adhered to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals mandated by the French Conseil d'Etat in Decree n°87-848 published in the French Journal Officiel on October 20th, 1987.

Anesthesia

Half an hour prior to the surgical anesthesia, levomepromazine (12.5 mg/kg) was given to the animals by ip injection to minimize stress. Deep anesthesia

was induced by injection of ketamine (50 mg/kg), which is assumed not to influence middle ear muscle system (Van den Berge *et al.*, 1990). During anesthesia, core temperature was maintained at approximately 38°C using a heating pad in conjunction with a rectal probe.

Surgical Procedures

Middle Ear Muscle Section

The left tympanic bulla (tympanic cavity equivalent) was laterally exposed by incising the skin and the subcutaneous tissues with a cutting burr. Such an approach allows the outer ear canal to remain intact. A small portion of the bony capsule was removed to obtain a clear view of the middle ear muscles consisting of the tensor tympani and the stapedius muscles. The section of the tensor tympani muscle was performed in two phases. First, the tendon was cut from the eardrum with very fine scissors, just at the attachment of the tendon to the malleus. Second, the inferior insertion point of the tendon to the cochlea was severed. The bundle of stapedius fibers was severed by blunt dissection using the tip of a hypodermic needle. The opening of the bulla was then closed with dental cement to maintain the normal impedance of the middle ear.

Electrodes and Catheter Implantations

The implantation of electrodes was carried out as detailed in a previous report (Lataye *et al.*, 2007). Briefly, a platinum ball electrode was inserted through a small hole made in the bulla and placed at the rim of the round window niche, whereas the ground electrode was placed over the olfactory bulb. A circular custom-made catheter filled with a solution of 0.9% NaCl and heparin (50 UI/ml) was fitted into the common carotid trunk connected to the operated ear.

Auditory Sensitivity Measure

All measurements were performed inside a sound-attenuated chamber. Two types of acoustic stimuli were used in the current study, one type applied ipsilaterally for measuring the physiological responses of the cochlea and the other applied contralaterally for evoking the acoustic reflexes. The acoustic stimuli were generated and shaped by a Tucker-Davis Technologies apparatus equipped with Biosig software. The animals were placed in a custom headholder, which ensured a constant distance (15 cm) and orientation from the ipsilateral pinna to the speaker (JBL, 2405). The ipsilateral stimulus was therefore delivered by the speaker located in open field, whereas the contralateral stimulation or suppressor noise was transduced by a microphone (Etymotic, ER-4P) fitted into the external auditory canal and located in front of the tympanic membrane. With this specific stimulation, called "closed sound system," the authors wanted to avoid possible acoustic short circuits. In the same manner, the frequency of the suppressor noise was chosen to elicit both the middle ear reflex and the inner ear reflex and to minimize possible masking effects. The spectrum of the acoustic stimuli delivered ipsilaterally and contralaterally are depicted in Figure 1.

Cochlear Microphonic Potential

Ipsilateral acoustic stimulation (operated ear). As shown in Figure 2A, the acoustic stimulus was a narrow band noise centered at 4 kHz (4 kHz-BN) emitted either at 65 or 85 dB SPL for 2.6 s. The stimulus was used for measuring the CMPs. Each stimulation was repeated every 12 s. The lowest intensity, i.e., 65 dB SPL, was chosen so as not to trigger the acoustic reflexes.

Contralateral acoustic stimulation (nonoperated ear). The 110-dB SPL acoustic stimulus was an octave band noise centered at 12.5 kHz (12.5 kHz-OBN) emitted for 3.6 s. It began 0.5 s before the onset and ended 0.5 s after the end of the ipsilateral stimulation (Fig. 2A). The spectrum of the contralateral acoustic stimulation shown in Figure 1 was chosen to minimize the acoustic short circuit with the ipsilateral stimulus.

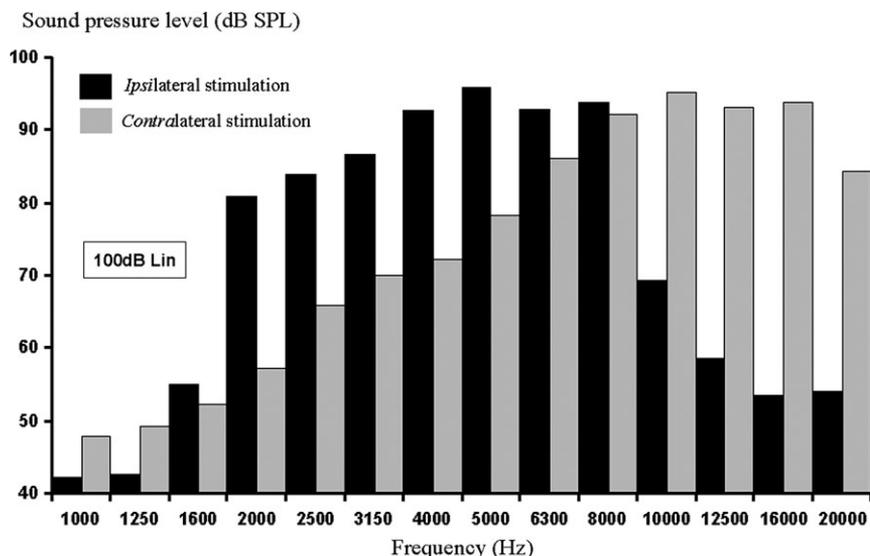


FIG. 1. Noise spectrum obtained in the acoustic booth with a 100-dB Lin stimulation. Ipsilateral stimulation: band noise centered at 4 kHz and contralateral stimulation: one-octave band noise centered at 12.5 kHz.

Bioelectrical activity recording. The CMP was amplified (Grass CP511) 5000 \times and filtered (bandwidth from 2 to 8 kHz). The CMP amplitude (root mean square value) was measured with a Bruel and Kjaer (BK) 2636 amplifier. The CMP values were expressed in dB ref. 1V (dBV) (Lataye *et al.*, 2007). The generation and the acquisition of signals were driven by custom-made software.

Compound Action Potential

Ipsilateral acoustic stimulation. CAPN1 was elicited with short-tone pips composed of sine-wave pulses (4 kHz) with trapezoidal envelopes shown in the inset in Figure 2B, i.e., 2 ms in duration, with 0.5 ms rise/fall times. The tone pips were repeated at 20/s. The sound pressure level of the stimulation was chosen at 85 dB SPL to have a good signal/noise ratio.

Contralateral acoustic stimulation. The acoustic stimulation (12.5 kHz-OBN) was emitted at 110 dB SPL. It lasted 4.2 s, but windows of 3.5 ms of silence were synchronized to the ipsilateral tone pip. The contralateral stimulus was turned off before and during the ipsilateral tone pips so as not to produce an electrical response measurement at the round window, even at levels significantly below those required for acoustic cross talk.

Bioelectrical activity recording. The electrical activity was amplified (5000 \times), filtered from 300 to 3000 Hz, and fed to an analogical/digital converter on the signal processing board. The amplitude (baseline-N1) of averaged auditory evoked potentials was measured from 20 presentations at 4 kHz.

Calibration

Calibration was carried out by measuring the sound pressure level emitted by a speaker JBL 2405, when driven either by a continuous noise (4 kHz-BN) or by a 4-kHz tone pip. The sound field was calibrated by positioning a BK Type 4133 1/2" microphone at a point normally occupied by the external auditory meatus. The targeted intensity was obtained by adjusting the level of the continuous noise or pure tone depending on the recorded potentials.

Solvent Injection

Animals were exposed to solvents with the aid of a circular custom-made catheter fitted into the common carotid trunk connected to the operated ear. The

catheter was filled up with a vehicle called "intralipide," which is a fat emulsion of purified soya oil and essential fatty acids (Fresenius Kabi, ref. 830513161). For the CMP, the injected volume of solvent was adjusted to 100 μ l. The injections were always performed with a syringe pump calibrated in such a way that it delivered a 100- μ l bolus of vehicle over a 30-s period. For the CAP, the volume required to obtain clear solvent effects in these experimental conditions was 200 μ l for 60 s.

Several aromatic solvents were tested in this experimental series. Table 1 is provided as a summary of the chemical formulas, the octanol-water logP ($\log P_{ow}$), the concentrations, and the Chemical Abstract Service numbers of the solvents tested. The authors would like to draw the readers' attention on the concentration of toluene: 116.2mM. As reported in a previous publication (Lataye *et al.*, 2007), this toluene concentration was required to induce a temporary rise in the CMP (approximately 4 dB). Of course, this injected concentration corresponded to the concentration inside the syringe, not to the efficient concentration on the site of action in the brain and/or in the cochlea. Concentrations of other solvents were related to this reference concentration, except those which did not induce rises in the CMP. For these latter solvents, a higher concentration was tested.

Benzene was the first aromatic solvent tested because of its simple structure, i.e., an aromatic ring. Toluene, which was the reference molecule (Lataye *et al.*, 2007), was the second molecule tested: an aromatic ring with a methyl group. Styrene provides a test of the consequences of a side chain with a double bond. Xylenes (*p*-, *o*-, *m*-) were used to test the effect of two methyl groups around the aromatic ring. The effectiveness of the addition of a C atom to the side chain was also examined. Last, the abilities of N-methyl-2-pyrrolidone (NMP, a cyclic amide solvent) and N, N-dimethylformamide (DMF, a noncyclic solvent) were tested to assess the effectiveness of nonaromatic solvents in suppressing the efferent system reflex.

STATISTICAL ANALYSIS

The Statgraphics centurion software (version XV) was used to run all the statistical analyses. Due to the size of samples, tests of normality were not appropriate. Thus, a nonparametric test, Kruskal-Wallis (*K*), was used to determine the statistical

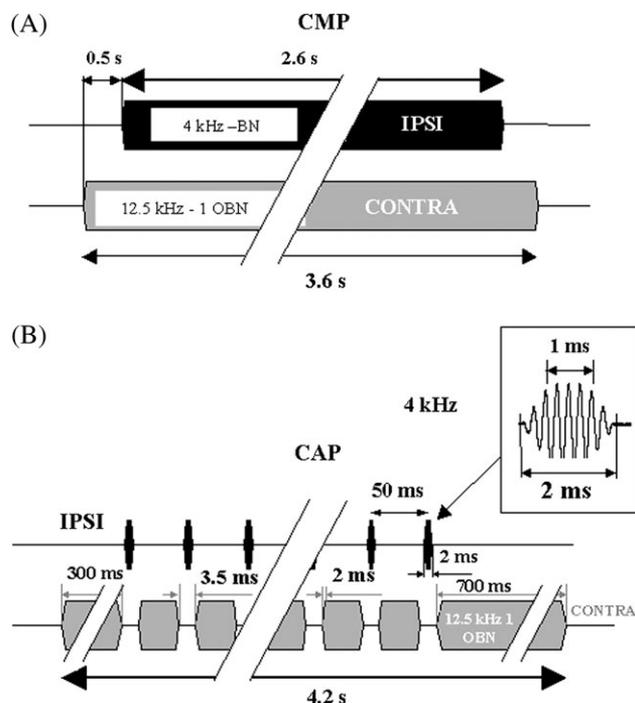


FIG. 2. Acoustic stimulus paradigms for measuring the root mean square value of the CMP and the baseline—N1 amplitude of the CAP. IPSI: the elicitor stimulation is emitted at 65 or 85 dB SPL. CONTRA: the suppressor stimulation triggering the protection reflexes is emitted at 110 dB SPL. (A) CMP paradigm—the elicitor (4 kHz-BN) at 65 or 85 dB SPL and suppressor (12.5 kHz-OBN) durations are 2.6 and 3.6 s, respectively. (B) CAP paradigm—the elicitor: 4-kHz tone pips; 2-ms rise/fall time at 20/s. The suppressor: 12.5 kHz-OBN; 4.2 s with 3.5 ms silent windows synchronized with the elicitor tone pips. The suppressor timing was set up to minimize the masking effects.

significance of the results. Alpha levels of 0.05 (significant at 95%) were used for the significance of the tests.

RESULTS

CMP Recording

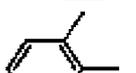
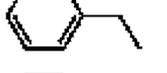
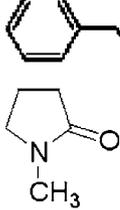
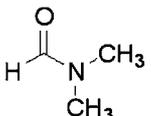
The dark line in Figure 3A illustrates the data obtained with a rat with functional middle ear muscles. The CMPs were obtained with a 4 kHz-BN presented at 65-dB SPL.

The 110-dB SPL OBN suppressor presented contralaterally produced a 7.9-dB decrease in CMP amplitude for this subject. The noise suppressor triggered the acoustic reflexes bilaterally and clearly synchronized the CMP variations (turn on/off: – 192/318 s).

The gray line represents the data obtained with severed middle ear muscles. With this animal, the suppressor stimulation did not provoke a significant variation in CMP amplitude.

The dark line in Figure 3B illustrates the data obtained with the rat having functional middle ear muscles and ipsilaterally stimulated at 85 dB SPL. The suppressor stimulation provoked

TABLE 1
List of Solvents Tested in This Experimental Series

Solvents	Chemical formula	Log P_{ow}	Concentration (mM)	CAS number
Benzene		2.13	138.9	71 43 2
Toluene		2.69	116.2	108 883
Styrene		3.00	107.4	100 42 5
<i>p</i> -Xylene		3.15	100.1	108 38 3
<i>o</i> -Xylene		3.12	102.3	95 47 6
<i>m</i> -Xylene		3.20	100.5	106 42 3
Ethylbenzene		3.15	101.2	100 41 4
Propylbenzene		3.85	110.1	103 65 1
Butylbenzene		4.35	117.9	104 51 8
NMP		0.46	115.4	872 50 4
DMF		0.87	315.2	68 12 2

Note. CAS, Chemical Abstract Service.

a 2.8-dB decrease in CMP, which was clearly synchronized with its turn on/off: – 282/384 s. The gray line confirms the fact that the suppressor stimulation did not provoke any significant variation in CMP amplitude in the animals with functional middle ear muscles.

Depending on the intensity of the ipsilateral stimulation, i.e., 65 versus 85 dB SPL, the averaged decreases in amplitude (5.8 ± 1.9 vs. 2.8 ± 0.1 dB; Table 2) induced by the suppressor stimulation were significantly ($K = 3.86$; $p = 0.049$) different.

In Figure 3A and 3B, the point 0 located on the abscissa corresponds to the onset of a 100- μ l injection of 116.2mM

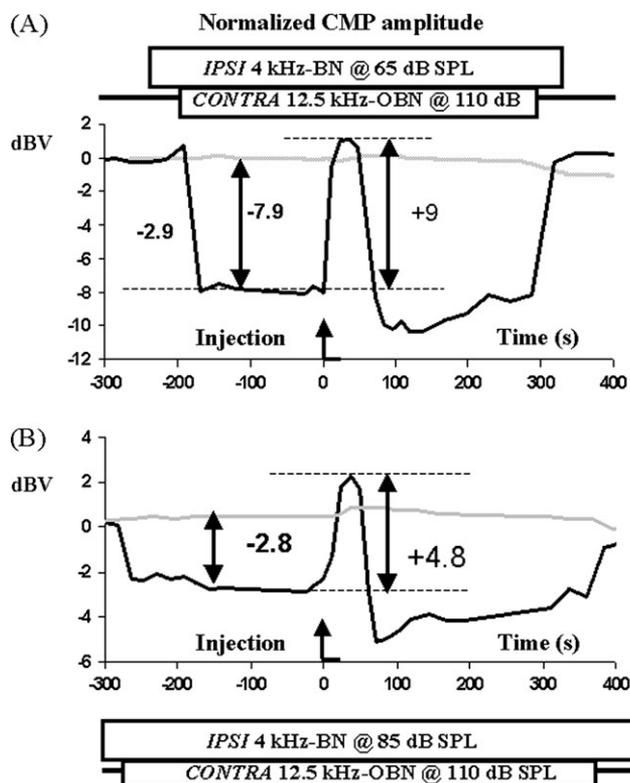


FIG. 3. Variations in CMP amplitude (root mean square) obtained before, during, and after an injection of a 100- μ l bolus of vehicle containing 116.2mM of toluene. The ipsilateral stimulation was a 4 kHz-BN emitted at either 65 (A) or 85 dB SPL (B). The contralateral stimulation or suppressor was a 12.5 kHz-OBN emitted at 110 dB SPL. The bolus was delivered with a syringe pump calibrated to deliver 100 μ l for 30 s. Black line indicates rat with intact middle ear muscles; gray line indicates rat without middle ear muscles.

toluene, considered as the reference concentration. Figure 3A shows that the toluene injection cancelled the protection triggered by the contralateral stimulation. The CMP increase reached a 9-dB peak at 36 s with this particular rat (mean: 6.4 ± 2.3 dB). The eliciting intensity was different in Figure 3B (85 vs. 65 dB SPL), and the amplitude obtained in the present example was also different: 4.8 dB (mean: 5.5 ± 1.7 dB) at 36 s. Although there was a striking difference between the responses depicted in Figure 3, the statistical difference was not significant between the two groups of animals (6.4 ± 2.3 vs. 5.5 ± 1.7 dB, see Table 2).

In summary, there was a clear ($K_{85 \text{ dB}} = 4.58$; $p = 0.032$) difference between the rats with (black line) or without (gray line) functional middle ear muscles in the described phenomenon.

CAP Recording

The dark line in Figure 4 illustrates the data obtained with a rat with functional middle ear muscles. It corresponds to the variations in CAPN1 amplitude obtained with a 4-kHz tone pip at 85 dB SPL. The suppressor noise (12.5 kHz-OBN at 110 dB

TABLE 2
CMP Variation Measured during a 116.2mM Toluene Injection in Rats with or without Efficient Middle Ear Muscles

No. of rats	Δ CMP ipsi + contra (dB)	Δ CMP + injection (dB)	Middle ear muscles	Intensity	
4	-7.9	9	Intact	65 dB	
5	-5.3	5.5			
6	-4.1	4.8			
Mean \pm SD	-5.8 ± 1.9	6.4 ± 2.3			
7	0.8	0.0			Severed
8	0.1	0.2			
9	-0.7	0.6			
Mean \pm SD	0.1 ± 0.8	0.3 ± 0.3			
10	-2.8	7.5	Intact	85 dB	
11	-2.9	4.3			
12	-2.7	4.8	Severed		
M \pm SD	-2.8 ± 0.1	5.5 ± 1.7			
32	0.5	0.4			
36	0.3	0.3			
37	-0.5	0.1			
38	0.2	0.4			
Mean \pm SD	0.1 ± 0.4	0.3 ± 0.1			

Note. Ipsilateral acoustic stimulation: (4 kHz-BN) emitted either at 65 or 85 dB SPL for 2.6 s. Contralateral acoustic stimulation: (12.5 kHz-OBN) at 110 dB SPL for 3.6 s.

SPL) provoked a 5.9-dB decrease in the CAPN1 amplitude. As with the CMP measures, the decrease in CAPN1 amplitude was well synchronized with the onset (-36 s) and offset (156 s) of the suppressor stimulus. As expected, the noise suppressor triggered the acoustic reflexes bilaterally. Point 0 corresponds to the onset of a 200- μ l injection of 116.2mM toluene. The toluene injection triggered an increase in CAPN1 amplitude, which reached a 4.7-dB peak at 36 s. As with the CMP, the toluene injection cancelled the protection triggered by the contralateral stimulation. However, the increase in CAPN1 (4.7) was smaller than the decrease [5.9] induced by the contralateral stimulation. The gray line represents the data obtained with a rat with nonfunctional middle ear muscles. Although the toluene injection was not as effective on CAPN1 measurements, the suppressor stimulation provoked a synchronized decrease in CAP amplitudes (-2.8 dB).

The data shown in Figure 4 were representative of the values collected in the group (see Table 3). In summary, the contralateral suppression and the injection effects were significantly ($K = 3.86$; $p = 0.049$) different between rats having functional or nonfunctional middle ear muscles in the described phenomenon.

Structure-Activity Relationship

To relate the effectiveness of aromatic solvents on suppressing two acoustic reflexes under study here, a simple ipsilateral acoustic stimulation at 85 dB SPL was used in the

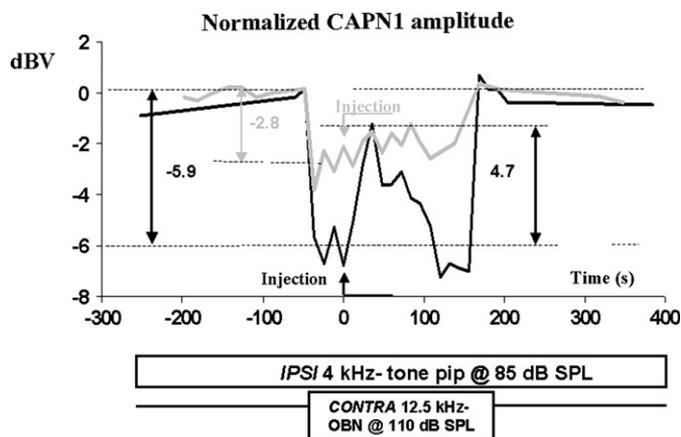


FIG. 4. Variations in CAP amplitude (baseline—N1) obtained before, during, and after an injection of 200- μ l bolus of vehicle containing 116.2mM of toluene. CAP was elicited with 4-kHz tone pips having 2-ms rise/fall times and presented at 85 dB SPL at 20/s. The contralateral acoustic stimulation was a 12.5 kHz-OBN emitted at 110 dB SPL. The timing and the spectrum of this suppressor stimulus were set up to minimize the acoustic masking. The bolus was delivered with a syringe pump whose the parameters were set to deliver 200 μ l for 1 min. Black line indicates rat with intact middle ear muscles; gray line indicates rat without middle ear muscles.

experimental protocol. It seemed to us that a contralateral stimulation would have been useless for a screening test and such an intensity is sufficient to trigger the middle ear acoustic reflex.

As shown by the bottom inset in Figure 5, a 100- μ l injection of intralipide containing a 116.2mM of toluene triggered a rise in the CMP amplitude, called P component (P component = amplitude max – amplitude baseline). The increase was followed by a decrease, the N component (N component = amplitude min – amplitude baseline). The top inset shows that a 100- μ l injection of intralipide containing a 115.4mM of NMP triggered only a decrease in the CMP amplitude, called N component.

TABLE 3

CAPN1 Variation Measured during a 116.2mM Toluene Injection with Rats with or without Efficient Middle Ear Muscles

No. of rats	Δ CAPN1 ipsi + contra (dB)	Δ CAPN1 + injection (dB)	Middle ear muscles	Intensity
21	- 4.5	4.5	Intact	85 dB
22	- 5.9	4.7		
29	- 5.1	3		
Mean \pm SD	- 5.2 \pm 0.7	4.1 \pm 0.9	Severed	
35	- 2.7	- 0.9		
37	- 2.8	0.9		
38	- 3.1	2.1		
Mean \pm SD	- 2.9 \pm 0.2	0.7 \pm 1.2		

Note. Ipsilateral acoustic stimulation: (tone pip at 4 kHz) at 85 dB SPL. Contralateral acoustic stimulation: (12.5 kHz-OBN) emitted at 110 dB SPL.

Figure 5 summarizes the CMP changes measured in the P and N components. Only toluene, styrene, xylene, and ethylbenzene gave P components ($K_{\text{solvents}} = 29.12$; $p < 0.001$). From a statistical point of view, toluene, styrene, and xylene had amplitudes, which were not significantly different, while the amplitude obtained with ethylbenzene was significantly different from the other solvents.

Although all the solvents tested gave an N component whose amplitude was statistically ($K = 29.38$; $p = 0.009$) significant, NMP was different from solvents except for benzene and propylbenzene.

On the other hand, the N component latency was different ($K = 26.36$; $p < 0.001$) depending on the nature of the solvent. Three groups of latencies could be identified: xylene and toluene with a latency > 100 s (N1), benzene, propylbenzene, butylbenzene, NMP, and DMF with a latency of less than 50 s (Ns), and an intermediate group composed of ethylbenzene and styrene with latencies ranging from 50 to 100 s. As shown in Figure 5, the Ns latency of NMP (top inset) was comparable to that of the P component induced by toluene (bottom inset). Table 4 summarizes the N component latencies obtained with all the solvents tested in this study.

DISCUSSION

The findings reported in these investigations have strong implications for understanding the synergistic effects of combined exposure to noise and toluene (Lataye and Campo, 1997; Morata and Dunn, 1994). If toluene, like several aromatic solvents, can inhibit or more likely disturb the efficiency of the acoustic reflexes in real conditions, at the workplace for instance, it could exacerbate the harmfulness of noise exposure as well. Of course, the toluene-induced inhibition of the cholinergic receptors present on efferent fibers (Bale *et al.*, 2005; Lataye *et al.*, 2007) is unrelated to the ototoxic process within the organ of Corti. While the cochleotoxic effects of an exposure to noise and solvent have been extensively studied in the rat (Brandt-Lassen *et al.*, 2000; Lataye and Campo, 1997; Lataye *et al.*, 2000), investigations focused on the neurotoxic effects of such exposure are rarer, although the peripheral or central mechanisms are still not clearly understood. Today, it is well known that olivocochlear efferent fibers mediate the inner ear acoustic reflex, whereas efferent motoneurons mediate the middle ear acoustic reflex. Both of them ensure the hearing protection.

One way of evaluating the relative impact of toluene on these reflexes was to sever the tensor-tympanic and stapedius muscles (middle ear muscles) to isolate one reflex from the other. The current experiment was inspired by Liberman's protocol in which the authors activated the crossed efferent fibers with a contralateral acoustic suppressor applied to the nonoperated ear, while the effects of protective reflexes were evaluated on the operated/tested ear (Liberman, 1989). A closed

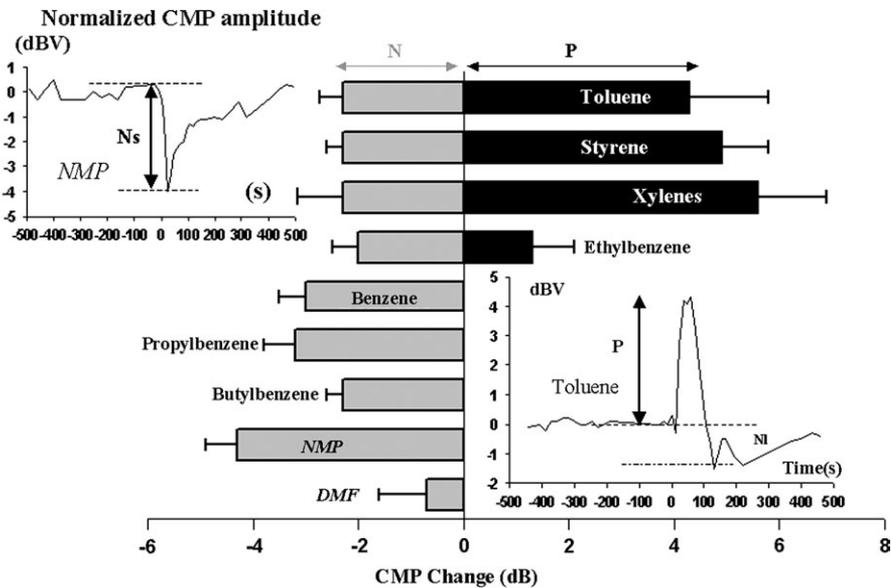


FIG. 5. Average solvent-induced CMP (amplitude rise: P component and amplitude decrease: N component) changes obtained with aromatic solvents: toluene (116.2mM), styrene (107.4 M), xylenes (100.5mM), ethylbenzene (101.2mM), benzene (138.9mM), propylbenzene (110.1mM), butylbenzene (117.9mM), and with nonaromatic solvents: NMP (115.4mM) and DMF (315.2mM). Top inset: CMP values (root mean square [RMS]) recorded before, during, and after injection of NMP; bottom inset: CMP values (RMS) recorded before, during, and after injection of toluene. Depending on the duration of the apparition, the N component can be declined in Ns (short latency) and NI (late latency). Noise was presented at 85 dB SPL, the spectrum was a band noise centered at 4 kHz. Injection of 100 μ l of solvent in the carotid artery.

sound system and the parameters of the contralateral acoustic suppressor were chosen in order to activate the medial olivocochlear system (inner ear acoustic reflex) and the motoneurons coming from the caudal part of the superior olivary complex (middle ear acoustic reflex). The olivocochlear complex and the efferent motoneurons are located in the brainstem and correspond, respectively, to the nervous centers of the inner ear (Rouiller *et al.*, 1989) and middle ear acoustic reflexes (Lee *et al.*, 2006).

Figure 3A and 3B showed a reversible and clear decrease in CMP amplitude, either 7.9 or 2.8 dB depending on the intensity of the ipsilateral stimulation. The suppressor effects were well synchronized with the onset and offset of the contralateral acoustic stimulation, so the contralateral noise (12.5 kHz-OBN at 110 dB SPL) can be considered as effective. However, the

amplitude decreases (5.7 ± 1.9 vs. 2.8 ± 0.1 dB) were significantly different depending on the intensity of the ipsilateral stimulation.

How can we explain such a difference in the suppressor effect of the contralateral stimulation?

According to Lataye *et al.* (2007), 65 dB SPL is an intensity, which does not trigger the acoustic reflexes. As a result, the decrease in CMP amplitude depicted in Figure 3A corresponds to the trigger of the acoustic reflex in response to the 110-dB contralateral stimulation alone. In contrast, the 85-dB SPL can be considered as an intensity capable of triggering the acoustic reflexes, at least partly (Pilz *et al.*, 1997). Thus, the 2.8-dB decrease in CMP amplitude reported in Figure 3B corresponded only to the complementary effects induced by the 110-dB contralateral stimulation with regard to the 85-dB ipsilateral stimulation.

Now, the effect of the solvent injection reported in Figure 3A and 3B provides undisputable evidence that a 116.2mM toluene injection can rapidly (approximately 36 s from the onset of the injection) cancel the suppressor effect driven by the crossed and the uncrossed efferent fibers. This statement is not invalidated by the CAPN1 responses reported in Figure 4, even though the sensitivity of the CAPN1 was different from that obtained with the CMP. Indeed, 200 μ l instead of 100 μ l of 116.2mM toluene were needed to clearly assess the phenomenon. This can be easily explained from a physiological point of view. CMP reflects the activity of the OHCs whose basal poles are directly connected with efferent nerve terminals

TABLE 4

Latency of N Components Measured with Different Solvents

Solvents	Short	Solvents	Long	Solvents	Latencies
	latency, < 50 s		latency, > 100 s		
Propylbenzene	20 \pm 6.9	Toluene	127.2 \pm 40.3	Ethylbenzene	87 \pm 11.5
Butylbenzene	36 \pm 17	Xylene	134.4 \pm 27.4	Styrene	72 \pm 12
Benzene	40 \pm 6.9				
NMP	28 \pm 6.9				
DMF	32 \pm 18.3				

(Pujol and Lenoir, 1986). In contrast, CAPN1 reflects more specifically inner hair cell function, which are not directly connected to efferent fibers. In this respect, CMP is a more suitable electrophysiological potential for measuring the effect of toluene on cholinergic efferent systems. Besides, CAPN1 is more sensitive to uncontrolled masking noise than CMP. Despite the specific timing of the suppressor stimulation (Fig. 2B) and the difference between the spectrums of the ipsi and contralateral stimulations (Fig. 1), it was difficult not to consider a likely mechanical propagation of the contralateral sound from one ear to the other (acoustic cross talk). The sound conduction, which could occur via the air or through the bones of the skull cannot be overlooked. Regardless, the pattern of the curve obtained with CAPN1 (Fig. 4) is not very different from that obtained with CMP (Fig. 3) and could be discussed in the same way: the clear decrease in CAPN1 amplitude (5.9 dB) shows that the contralateral acoustic stimulus (12.5 kHz-OBN) at 110 dB SPL was sufficiently efficient to elicit acoustic reflexes. Indeed the CAPN1 variations were well synchronized with the contralateral stimulation, demonstrating that the suppressor effects were temporary and reversible. The increase in CAPN1 amplitude set off by the toluene injection shows that the solvent rapidly cancelled the suppression effect driven by the crossed and uncrossed efferent fibers. As expected, the increase in the CAPN1 response induced by toluene was maximum: 4.7 dB and, therefore, in agreement with previous CMP data. However, the increase in CAPN1 amplitude was smaller (4.7) than that of the decrease (15.9) triggered by the contralateral sound. The totality of the decreased amplitude cannot be explained physiologically. It is likely that the suppressor stimulation induced (1) triggering of the acoustic reflexes and (2) a sound masking effect. Despite the difficulties in cancelling the acoustic artifact on the CAPN1 measurements, these data confirm the phenomenon assessed with the CMP: the suppressive effect of the contralateral acoustic stimulation can be transiently cancelled by toluene.

The results presented in Figures 3 and 4 (gray line) show that the middle ear reflex plays a major role in the phenomenon described in the current and prior reports. Indeed, the animals with severed middle ear muscles did not respond to the toluene injection. For instance, the CMP data were steady during the contralateral stimulation and the toluene injection did not bring any change. The decrease in CAPN1 magnitude, which persists after the section of the middle ear muscles could reflect an intracochlear suppressive effect or, more likely, a sound masking effect in this protocol. In our opinion, the persistent effect was rather a masking effect since this phenomenon was not observed with the CMP measures.

In summary, several lines of evidence argue in favor of a predominant role of the middle ear reflex in mediating the suppression phenomenon documented in this study. First, the decrease in CMP amplitude was cancelled when middle ear muscles were severed. Second, the contralateral level was above the required thresholds for triggering the middle ear

reflex at this frequency (10 kHz at 77 dB SPL, according to Pilz *et al.*, 1997). Of course, we are aware that a contralateral sound, which activates the middle ear reflex may also trigger the inner ear reflex. Actually, the intracochlear reflex effects are likely to be masked by those of the middle ear reflex in these experimental conditions. Owing to the vicinity of the facial and trigeminal nerve nuclei and the superior olivary complex, it is hard to think that the toluene effects are accurately localized at the level of one nucleus without disturbing the others. Anyway, this study clearly shows that toluene can inhibit the cholinergic efferent system in an *in vivo* experiment.

Finally, it would appear that contrary to the LogP_{ow} of the solvents (Table 1), the structure of the solvent itself can play a key role in the inhibition phenomenon. For instance, although all the aromatic solvents can provoke an N component at comparable concentrations, only toluene, styrene, xylenes, and ethylbenzene provoke both N and P components. Besides, the N component is obviously complex (Table 4). The N component can appear with a short ($N_s < 50$ ms) or with a latency > 50 ms when the P component is present. They likely correspond to different mechanisms, which deserve to be studied in the near future.

Only four of the solvents tested have generated a P component, and they required at least one methyl group attached to the aromatic ring. If the presence of a side chain seems to be necessary to generate a P component, the addition of a supplementary C atom on this side chain seems to reduce the inhibition potency of the solvents: ethylbenzene would be an intermediate between the solvents inducing a P component and those inducing only a N component. In summary, the structure-activity relationship studied in the current study allows us to say that an aromatic ring and the presence of one side chain of no more than 3 C atoms are required to inhibit the efferent system. To finish up with the structure-activity relationship, we have to clearly mention that there is no straightforward correlation between ototoxic potency and our output measurements (i.e., ethylbenzene did not produce a bigger effect than styrene than did toluene) (Fig. 5). Similarly, there was no difference between the isomers of xylene although only *p*-xylene is ototoxic (Maguin *et al.*, 2006). As a result, this test cannot be used to screen the ototoxic potency of solvents. If this investigation does not bring new insights into the cochleotoxic process, it does help understand the underlying mechanism responsible for the synergistic effects on hearing of a simultaneous exposure to noise and solvent.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the team members of the European NoiseChem project for their comments on the manuscript and Christian Barthélémy from Institut National de Recherche et de Sécurité for his technical assistance.

REFERENCES

- Bale, A., Meacham, A., Benignus, V., Bushnell, P., and Shafer, T. (2005). Volatile organic compounds inhibit human and rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **205**, 77–88.
- Borg, E., Counter, S. A., and Rösler, G. (1984). Theories of middle-ear muscle function. In *The Acoustic Reflex* (Silman, Ed.), pp. 63–99. Academic Press, Orlando, FL.
- Brandt-Lassen, R., Lund, S. P., and Jepsen, G. B. (2000). Rats exposed to toluene and noise may develop loss of auditory sensitivity due to synergistic interaction. *Noise Health* **3**, 33–44.
- Dancer, A., and Franke, R. (1980). Intracochlear sound pressure measurements in guinea pigs. *Hear. Res.* **2**, 191–205.
- Fex, J. (1962). Auditory activity in centrifugal and centripetal cochlear fibers in the cat. *Acta Physiol. Scand.* **55**(189), 1–58.
- Guinan, J. J. (1996). The physiology of olivocochlear efferents. In *The Cochlea* (Dallos, Popper, Fay, Eds.), pp. 435–502. Springer-Verlag, New York.
- Lataye, R., and Campo, P. (1997). Combined effects of simultaneous exposure to noise and toluene on hearing function. *Neurotoxicol. Teratol.* **19**, 373–382.
- Lataye, R., Campo, P., and Loquet, G. (2000). Combined effects of noise and styrene exposure on hearing function. *Hear. Res.* **139**, 86–96.
- Lataye, R., Campo, P., Barthelemy, C., Loquet, G., and Bonnet, P. (2001). Cochlear pathology induced by styrene. *Neurotoxicol. Teratol.* **23**, 71–79.
- Lataye, R., Maguin, K., and Campo, P. (2007). CMP amplitude increase after toluene administration. *Hear. Res.* doi: 10.1016/j.heares.2007.04.002.
- Lee, D. J., de Venecia, R. K., Guinan, J. J., and Brown, M. C. (2006). Central auditory pathways mediating the rat middle ear muscle reflexes. *Anat. Rec.* **288**, 358–369.
- Liberman, M. C. (1989). Rapid assessment of sound-evoked olivocochlear feedback: Suppression of compound action potentials by contralateral sound. *Hear. Res.* **38**, 47–56.
- Maguin, K., Lataye, R., Campo, P., Cossec, B., Burgart, M., and Waniusiow, D. (2006). Ototoxicity of the three xylene isomers in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* **28**, 648–656.
- Morata, T., and Dunn, D. (1994). Occupational exposure to noise and ototoxic organic solvents. *Arch. Environ. Health* **49**, 359–365.
- Morata, T., and Campo, P. (2001). Auditory function after single or combined exposure to styrene: A review. In *Noise-Induced Hearing Loss: Basic Mechanisms, Prevention and Control* (Henderson, Prasher, Kopke, Salvi, Hamernik, Eds.), pp. 293–304.
- Murata, K., Ito, S., Horikawa, J., and Minami, S. (1986). The acoustic middle reflex in albino rats. *Hear. Res.* **23**, 169–183.
- Pilz, P., Ostwald, J., Kreiter, A., and Schnitzer, H. (1997). Effect of the middle ear reflex on sound transmission to the inner ear of rat. *Hear. Res.* **105**, 171–182.
- Pujol, R., and Lenoir, M. (1986). The four types of synapses in the organ of Corti. In *Neurobiology of Hearing: The Cochlea* (Altschuler, Hoffman, Bobbin, Eds.), pp. 161–171. Raven Press, New York.
- Rouiller, E. M., Capt, M., Dolivo, M., and De Ribaupierre, F. (1989). Neuronal organization of the stapedius reflex pathways in the rat: A retrograde HRP and viral transneuronal tracing study. *Brain Res.* **476**, 21–28.
- Simmons, D. (2002). Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. *J. Neurobiol.* **53**, 228–250.
- Sliwiska-Kowalska, M., Zmyslowska-Szmytko, E., Szymczak, W., Kotylo, P., Fiszler, M., Wesolowski, W., and Pawlaczyk-Luszczynska, M. (2003). Ototoxic effects of occupational exposure to styrene and co-exposure to styrene and noise. *J. Occup. Environ. Med.* **45**, 15–24.
- Van den Berge, H., Kingma, H., Kluge, C., and Marres, E. (1990). Electrophysiological aspects of the middle ear muscle reflex in the rat: Latency, rise time and effect on sound transmission. *Hear. Res.* **48**, 209–220.
- Warren, E. H., and Liberman, M. C. (1989). Effects of contralateral sound on auditory-nerve responses. I. Contributions of cochlear efferent. *Hear. Res.* **37**, 89–104.
- White, J., and Warr, W. B. (1983). The dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* **219**, 203–214.

SOLVENT-INDUCED HEARING LOSS: MECHANISMS AND PREVENTION STRATEGY

PIERRE CAMPO AND KATY MAGUIN

Laboratoire de Neurotoxicité, Institut National de Recherche et de Sécurité
Vandoeuvre-les-Nancy, France cédex

Abstract

While noise exposure is the most significant contributor to occupational hearing loss, over the past 10 years, evidence has pointed to organic solvents as additional contributors to occupational hearing disorders. Despite the implications of this finding, no significant measure has been undertaken to limit exposure to occupational solvents or to occupational solvents and noise, within the European community. Guidelines for improving hearing protection of people exposed to solvents, or to solvents and noise are addressed in the present article. Recently, it has been shown that the lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL) of styrene was 300 ppm in active (working wheel) rats, and that the same amount of styrene-induced hearing loss (SIHL) can be obtained with styrene concentrations difference of 200 ppm between active and sedentary (inactive) rats. Supported by a reasonable safety factor (SF) of 10, the authors proposed to decrease the French threshold limit value of styrene from 50 to 30 ppm ($RfD = LOAEL/SF$) to ensure a high level of protection for human hearing.

It is widely acknowledged that outer hair cells in the organ of Corti can be considered as the first target tissue of solvents, while little is known about the action of aromatic solvents on the auditory efferent system. In a recent experiment using both the cochlear microphonic and compound action potentials, the authors have shown that toluene can inhibit the action of the middle ear reflex by modifying the cholinergic receptors. It is likely that toluene disturbs the cholinergic receptors at the brainstem level. By its anticholinergic-like effect, toluene could allow higher acoustic energy penetration into the cochlea exposed to both noise and solvent. Based on this phenomenon, the authors recommend the use of hearing protection for the lower exposure action value: $Lex_{sh} = 80$ dB(A) in noisy environments polluted by solvents.

Key words:

Toluene, Neurotoxicity, Ototoxicity, Auditory efferent system, Middle-ear acoustic reflex, Inner-ear acoustic reflex

INTRODUCTION

Despite massive efforts to eliminate hazardous noise sources in many factories, noise-induced hearing loss (NIHL) continues to be a significant health problem in France, but also throughout the world. Most research on the etiology of occupational hearing loss has focused on the damaging effects of noise on hearing. While noise exposure is undoubtedly the most significant contributor to occupational hearing loss, over the past 10 years several reports have pointed to organic or aromatic solvents as additional significant contributors to occupational hearing disorders. Both human studies [1–3] and animal experiments have

shown that toluene, styrene, xylene [4,5], and ethylbenzene [6] can provoke irreversible hearing loss, the cochlea being considered as a target organ for the solvents [7,8].

Despite the implications of this evidence, no significant measure has been undertaken to limit occupational solvent exposures or, occupational solvent and noise exposures, within the European or American community. The recent European legislation (Directive 2003/10/EC-6 February 2003) did not bring striking changes to the establishment of permissible noise limits when workers are also exposed to noise and solvents.

We acknowledge that the concept of solvent-induced hearing loss (SIHL) has still not received adequate attention

Received: April 2, 2007. Accepted: August 10, 2007.

The paper was presented at the Workshop “Health effects of exposure to noise and chemicals — Ototoxicity of organic solvents” that was organized in Łódź on 15–16 November under the 6th European Framework Programme, the Marie Curie Host Fellowship for the Transfer of Knowledge “NoiseHear” Project (Contract No. MTKD-CT-2004-003137 — “Noise pollution effects on auditory organ — pathogenesis, risk assessment, prevention and treatment”).

Address reprint requests to: P. Campo, Laboratoire de neurotoxicité, Institut National de Recherche et de Sécurité, Avenue de Bourgogne, BP27, 54501 Vandoeuvre-les-Nancy, France cédex (e-mail: pierre.campo@inrs.fr).

from the decision makers who enact sets of rules or procedural guidelines, still called standards. With this short review, we would like to draw the attention of those responsible for hearing conservation programs to the concept of ototoxicity.

Guidelines for improving the hearing protection of people exposed to solvents, or to solvents and noise, are rare. For this reason, some suggestions for improving the prevention strategy are addressed at the end of this brief and non-exhaustive review.

The aims of this review are double. First, to make the concept of SIHL as clear as that of NIHL in order to delineate and disseminate information on the risk encountered by workers exposed to solvents. Second, to propose scientific arguments based on studies performed with animal models in order to give policy makers a basis to examine permissible exposure limits, and thereby to facilitate future prevention strategies.

COCHLEOTOXICITY OF AROMATIC SOLVENTS

The notion of ototoxicants linked to chemical agents is important, especially when potential workplace exposures are concerned [1,2]. Aromatic solvents have been demonstrated to be ototoxicants, and some can even worsen the effects of noise in animals [9,10] and more alarming, in humans [3].

Today, the different features of SIHL can be accurately characterized. Contrary to aminoglycosides, cisplatin, or most of the drugs, the infiltration of the solvents inside the cochlea is due to tissue contamination rather than to contamination of the inner-ear fluids [11]. This is not really surprising since aromatic solvents are miscible in lipid-rich tissues, but are hardly water-soluble (see logP of organic solvents).

Conveyed by the whole blood, the aromatic solvents come from the *stria vascularis*, or from the spiral prominence, and diffuse through the lipid-rich membranes of the cubic cells constituting the *outer sulcus* before impairing the organ of Corti. Observations of disrupted membranes, as well as chemical analyses have revealed that aromatic solvents use the *outer sulcus* as the main intoxication route to

reach the outer hair cells (OHCs) [8]. Actually, to be more accurate, we should specify that the Hensen's cells must be considered as the first *supporting* tissue impaired by the solvents, whereas the OHCs as the first *sensorial* tissue injured within the organ of Corti.

Because of the solvent progression through the organ of Corti from the *vascular system*, the third row of OHCs (*the closest from the stria vascularis*) is logically more vulnerable than the second row, which is itself more sensitive than the first row [8,12].

Despite the fact that significant progress has been made in defining the morphological aspects of solvent ototoxicity, and that several epidemiological surveys have confirmed the ototoxic potency in humans over the past 10 years, the molecular mechanisms underlying this kind of toxicity are not well known. Recently, the implication of reactive oxygen species, or free radicals, has been brought up in the general cochleotoxic process induced by solvents, but to the best of our knowledge, no data have been published yet.

What is the most likely scenario of the cochleotoxic process?

First, an alteration of the supporting cells [8], like the Deiters and Hensen's cells, which may affect the ionic K^+ concentrations around OHCs by modifying the re-uptake of K^+ from the corticolymph. Actually, the disturbances of these supporting cells could generate an excessive K^+ build-up beneath the OHCs, which would cause their poisoning [13,14].

Second, the lipid peroxidation of the membranous structures follows, leading to serious disturbances of the cytoplasmic membrane of the OHCs.

Because such toxic responses are triggered by an exogenous agent, because these responses are rapid, involve cellular injuries, cell swelling, and early loss of cytoplasmic membrane integrity, we contend that the general mechanism of the cochleotoxic process is rather a necrotic than an apoptotic phenomenon. Once the necrosis and then the apoptotic processes are triggered, Deiters' cells, which are adjacent supporting cells, appear capable of phagocytosing and clearing cell debris within the sensitive epithelium. Therefore, Deiters' cells are responsible for the cleaning and the sealing of the luminal surface to make phalangeal

scars [15]. Since the ototoxic process comes from the synaptic pole of the OHCs, the stereocilia at the top of the cells remain intact till the end of the scaring process.

NEUROTOXICITY OF AROMATIC SOLVENTS

Due to the lipid-rich content of the nervous tissue, the aromatic solvents can cause severe impairments to the central nervous system [16,17]. More recently, Bale et al. [18] showed with an *in vitro* experiment that the cholinergic and, more specifically, the nicotinic receptors were sensitive to toluene.

In a recent experiment, we confirmed their results with an *in vivo* experimental approach (unpublished data). Besides, we showed that toluene, like most of the aromatic solvents, can mimic the effects of antagonists of the cholinergic receptors (AChRs) and thereby inhibit the action of both the protective reflexes: the inner-ear and middle-ear acoustic reflexes. The anticholinergic-like effect of solvents are quite important to highlight because they can explain, at least partly, the synergistic effects of a simultaneous exposure to noise and solvent observed in animals [6,9,10] and human studies [3].

Indeed, the protective reflexes have their nervous center located in the brainstem [19–21]. By inhibiting the AChRs in the brainstem, the aromatic solvents might disturb the function of the efferent pathways and thereby the function of the acoustic reflexes. As a result, in the case of combined exposure to noise and solvent, a higher level of acoustic energy might penetrate into the imperfectly-protected cochlea. In other words, a combined exposure to noise and solvent would correspond to a noise-alone exposure with a higher acoustic energy.

In summary, in the case of a combined exposure to noise and solvent, the same acoustic energy would be more harmful for two main reasons:

1. The solvent would modify the membranous structures of the OHCs, making them more fragile and vulnerable.
2. The solvent would reduce the protective role played by the middle-ear, allowing the penetration of more acoustic energy.

PREVENTION STRATEGIES BASED ON STUDIES CARRIED OUT WITH ANIMAL MODELS

An important issue, which is not adequately addressed in the occupational noise standards within the European communities, is the criteria for combined exposures. None of the current standards contains explicit requirements for this kind of exposure. Although noise is an undisputable risk factor, aromatic solvents also deserve to be considered as a potential risk factor for the occurrence of significant hearing loss. In this respect, our challenge will be:

1. To persuade legislators to recognize and integrate aromatic solvents as identified work-related ototoxic substances.
2. To obtain adjustable noise/solvent standards depending on occupational exposure conditions.

In Europe, the recent directive (2003/10/EC-6 February 2003) timidly recommended that employers pay attention to occupational noise monitoring in the case of co-exposure with work-related ototoxic substances, without mentioning them. In our opinion, this advice is hard to implement and far from being efficient to protect workers' hearing against aromatic solvents or other ototoxic agents. Obviously, there is still a huge gap between the recognition of risk given to noise compared to that given to ototoxicants, like solvents, which are responsible for occupational hearing loss. This statement emphasizes the continuing need for research in this direction.

The concept of NIHL has been well described in animals and extensively studied in humans exposed to workplace noise. Due to health problems, and the social and economic costs of occupational deafness, the legislators promulgated exposure limits of exposure to protect workers against NIHL. As mentioned previously, the concept of SIHL is less clear than that of NIHL and we must admit that there are still questions raised throughout the scientific literature.

For instance, why is SIHL species dependent?

The hearing impairments provoked by aromatic solvents were observed in rats, but not in guinea pigs [22,23], nor in chinchillas [24]. A corollary of this statement is:

Are humans sensitive to solvents, like rats?

We must find answers to these pertinent questions if we want to be more persuasive and establish aromatic solvents as an indisputable work-related ototoxic substance in the European hearing conservation program or, if this not possible, in several legislations within the European communities.

Several scientific responses can be easily brought to these questions.

The gas/blood partition coefficient, the uptake and the hepatic metabolism of solvents can explain the difference in susceptibility observed between animal species [24]. It is, of course, impossible to collect such information in humans, but the development of potent physiologically based pharmacokinetic models [25] demonstrated the utility of these models in the prediction of the kinetics of several aromatic solvents in humans and rats. Based on these studies, rat appears to be an excellent model for humans. Besides, non-invasive studies of urinary metabolites showed that human beings, like rats, detoxify the solvents using exactly the same process. Obviously the rat metabolism seems to use the oxidative and the conjugation pathways to get rid of the solvent [26], whereas the guinea pig metabolism prioritizes the oxidative and the *o*-cresol routes [27]. There are almost no urinary mercapturic acids in the guinea pig, while the amounts of these metabolites are significant in human [28]. In this respect, the metabolism of rats appears closer to that of humans. In summary, justifying the choice of the animal model yields the answer to the aforementioned questions.

In spite of these rational arguments, some remain skeptical about the ototoxic potency of solvents. Most of the time, these people will contest the data obtained with animals because of the high concentrations of solvent used in this kind of investigation.

Actually, by studying SIHL, we have to face the recurrent and traditional criticisms formulated against experimental toxicology:

Are the experimental conditions realistic for humans?

Are data obtained with animals transferable to humans?

For investigators, it does not make sense to test real-world conditions which are often defined as realistic by detractors. For example, how could experiments replicate the

life-long exposures to solvents encountered by workers? It would take forever, and an immoral number of animals would be needed to assess the phenomenon.

One conventional way to get round this problem is to draw dose-effect relationships of toxicants and, then to use toxicological tools for evaluating what could happen in more realistic conditions.

Here, it is important to clearly enunciate certain fundamental concepts of toxicology in order to evaluate, from data obtained with animals, a reference dose which could be proposed, for instance, as a permissible time-weighted average (TWA in the USA or VME_{sh} in France) for humans:

1. The notion of NOAEL (no-observed-adverse-effect level), or if this cannot be easily established the notion of LOAEL (lowest-observed-adverse-effect level) or the calculation of a benchmark dose [29].
2. The notion of safety factor (SF) which corresponds to the uncertainty. Usually, a safety Factor of 10 is used for the presumed greater sensitivity in humans, another 10 for variability in sensitivity in humans, and another 10 when LOAEL is used instead of NOAEL.

These aforementioned concepts will help us define a reference dose (RfD) as following: $RfD = NOAEL/SF$ or $RfD = LOAEL/SF$.

Workers are exposed to numerous chemicals which are difficult to study individually. In a recent experiment, we have narrowed our investigations to styrene as a representative aromatic solvent, because of its wide use in many factories [30] and because workers are commonly exposed to styrene fumes in a working environment where noise pollution is also present [2].

We showed that a 300 ppm exposure to styrene (6 hours/day, 5 days/week, 4 weeks) was already ototoxic with "working" rats (see [31] for details). A cochleotoxic effect was clearly observed at the level of the third row of OHCs.

In an attempt to provide a strategy for revising the current VME_{sh} of styrene in France, we decided to use the LAOEL rather than the NOAEL concept to establish a RfD. The LAOEL concept seemed to be more difficult to discredit. Likewise, we chose the less severe safety factor: $SF = 10$. With a value as low as 10, nobody could reproach us to

overestimate the SF in order to excessively protect the workers.

Presently, the styrene VME_{8h} in France is 50 ppm. Based on our investigation, the reference dose was equal to 30 ppm [NAOEL = 300 / SF = 10]. Therefore, we proposed to decrease the French VME_{8h} for styrene to ensure a high level of protection for human hearing.

I hope our strategy will pay off and that we will obtain a rapid decrease in the French VME_{8h} for styrene. Of course, such a strategy could be used for other suspected chemicals.

It becomes more difficult to deal with the occupational conditions of a co-exposure to noise and solvent, for instance. To simplify the problem, let us imagine that the French VME_{8h} of styrene is brought down to 30 ppm. In that case, we must consider the standards: $Lex_d = 85$ dB(A) (upper exposure action value) and $VME = 30$ ppm, as two values which should not be transcended. Now, in the case of a co-exposure, these two values are not adequate anymore, because of the risk of synergy.

One simple way to reduce the risks encountered by people exposed to both noise and solvent (measured $VME_{8h} \geq 30$ ppm at the workplace) could be:

1. To bring down the VME_{8h} to 30 ppm at workplace, if necessary, and,
2. To require hearing protectors from the lower exposure action value: $Lex_{8h} = 80$ dB(A).

We are aware that these propositions must be considered as the starting point for a more general and consensual debate. There is still room for constructive suggestions.

We do hope that this short review will help people in their approach to make the solvent or noise standards evolve towards a safer work environment within the European communities.

REFERENCES

1. Morata T, Dunn D, Sieber WK. *Occupational exposure to noise and ototoxic organic solvents*. Arch Environ Health 1994;49:359–65.
2. Morata T, Campo P. *Auditory function after single or combined exposure to styrene: a review*. In: Henderson D, Prasher D, Kopke R, Salve R, Hamernik R, editors. *Noise-induced hearing loss: basic mechanisms, prevention and control*. London: nRn Publications; 2001. pp. 293–304.
3. Sliwinska-Kowalska M, Zamyslowska-Szmytko E, Szymczak W, Kotylo P, Fiszer M, Wesolowski W, et al. *Ototoxic effects of occupational exposure to styrene and co-exposure to styrene and noise*. J Occup Environ Med 2003;45:15–24.
4. Gagnaire F, Marignac B, Langlais C, Bonnet P. *Ototoxicity in rats exposed to o-, m-, and p-xylene vapours for 13 weeks*. Pharmacol Toxicol 2001;89:6–14.
5. Maguin K, Lataye R, Campo P, Cossec B, Burgart M, Waniusiow D. *Ototoxicity of the three xylene isomers in the rat*. Neurotox Teratol 2007; In Press, Corrected Proof, Available online 1 September 2006.
6. Cappaert N, Klis S, Muijser H, Kulig B, Smoorenburg G. *Simultaneous exposure to ethyl benzene and noise: synergistic effects on outer hair cells*. Hear Res 2001;162:67–79.
7. Crofton KM, Lassiter T, Rebert C. *Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit*. Hear Res 1994;80:25–30.
8. Campo P, Lataye R, Loquet G, Bonnet P. *Styrene-induced hearing loss: a membrane insult*. Hear Res 2001;154(1/2):170–80.
9. Lataye R, Campo P. *Combined effects of simultaneous exposure to noise and toluene on hearing function*. Neurotox Teratol 1997;19:373–82.
10. Lataye R, Campo P, Loquet G. *Combined effects of noise and styrene exposure on hearing function*. Hear Res 2000;139:86–96.
11. Campo P, Loquet G, Blachère V, Roure M. *Toluene and styrene intoxication route in the rat cochlea*. Neurotox Teratol 1999;21(4):427–34.
12. Johnson A, Canlon B. *Progressive hair cell loss induced by toluene exposure*. Hear Res 1994;75:201–8.
13. Spicer S, Schulte A. *The fine structure of spiral ligament cells relates to ion return to the stria and varies with place-frequency*. Hear Res 1996;100:80–100.
14. Spicer S, Schulte A. *Evidence for a medial K+ recycling pathway from inner hair cells*. Hear Res 1998;118:1–12.
15. Abrashkin K, Izumikawa M, Miyazawa T, Wang C, Crumling M, Raphael Y. *The fate of outer hair cells after acoustic or ototoxic insults*. Hear Res 2006 218:20–9.
16. Gospe S, Calaban M. *Central nervous system distribution of inhaled toluene*. Fund Appl Tox 1988;11:540–5.

17. Greenberg M. *The central nervous system and exposure to toluene. A risk characterization.* Environ Res 1997;72:1–7.
18. Bale A, Meacham A, Benignus V, Bushnell P, Shafer T. *Volatile organic compounds inhibit human and rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in Xenopus oocytes.* Toxicol Appl Pharmacol 2005;205:77–88.
19. Pujol R. *Lateral and medial efferent: a double neurochemical mechanism to protect and regulate inner and outer hair cell function in the cochlea.* Br J Audiol 1994;28:185–91.
20. Murata K, Ito S, Horikawa J, Minami S. *The acoustic middle reflex in albino rats.* Hear Res 1986;23:169–83.
21. Lee D, De Venecia R, Guinan J, Brown C. *Central auditory pathways mediating the rat middle ear muscles reflexes. The anatomical record part A.* Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2006;288:358–69.
22. Campo P, Lataye R, Bonnet P. *No interaction between noise and toluene on cochlea in the guinea pig.* Acta Acustica 1993;1:35–42.
23. Fechter L. *Effect of acute styrene and simultaneous noise exposure on auditory function in the guinea pig.* Neurotox Teratol 1993;15:151–5.
24. Davis R, Murphy W, Snawder J, Striley C. *Susceptibility to the ototoxic properties of toluene is species specific.* Hear Res 2002;166:24–32.
25. Tardif R, Charest-Tardif G, Brodeur J, Krishnan K. *Physiologically based pharmacokinetic modeling of a ternary mixture of alkyl benzenes in rats and humans.* Toxicol Appl Pharmacol 1997;144:120–34.
26. Commandeur JN, Stijntjes GJ, Vermeulen NP. *Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics.* Pharmacol Rev 1995;47(2):271–330.
27. Campo P, Blachère V, Payan JP, Cossec B, Ducos P. *Toluene toxicokinetics and metabolism parameters in the rat and guinea pig.* Environ Toxicol Pharmacol 2006;21:276–82.
28. Ramsey J, Andersen M. *A physiologically based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rats and humans.* Toxicol Appl Pharmacol 1984;73(1):159–75.
29. Slikker W, Crump KS, Anderson ME, Bellinger D. *Biologically based, quantitative risk assessment of neurotoxicants.* Fund Appl Toxicol 1996;29:18–30.
30. Miller R, Newhook R, Poole A. *Styrene production, use, and human exposure.* Crit Reviews in Toxicol 1994;24(S1):1–10.
31. Lataye R, Campo P, Loquet G, Morel G. *Combined effects of noise and styrene on hearing: comparison between active and sedentary rats.* Noise Health 2005;27:49–64.

Nom : Mademoiselle MAGUIN

Prénom : Katy

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

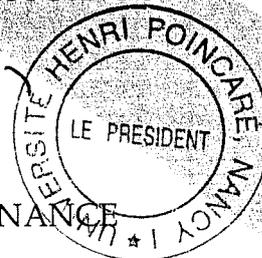
Spécialité : *BIOLOGIE CELLULAIRE ET NUTRITION*

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°

Nancy, le 12 février 2008

Le Président de l'Université


Jean-Pierre FINANCE



Une co-exposition au bruit et au toluène a des effets plus néfastes pour l'audition que la somme de ceux induits par chacun des facteurs. L'objectif de cette thèse était d'étudier les mécanismes périphériques et centraux à l'origine de la synergie des effets des solvants aromatiques sur ceux induits par le bruit. Puisque les cellules ciliées externes sont la cible des solvants, le potentiel microphonique cochléaire (PMC) a été utilisé pour suivre l'activité électrique de ces cellules sur des rats exposés à la fois au bruit et au toluène. L'administration intra-carotidienne d'un bolus d'Intralipide contenant du toluène a provoqué une augmentation transitoire de l'amplitude du PMC (~9 dB SPL) déclenchée par un bruit *ipsi*-latéral de 85 dB SPL. Etant donné que l'augmentation du PMC était dépendante de l'intensité de la stimulation sonore, il était raisonnable de penser que le centre nerveux des réflexes de protection acoustique, le tronc cérébral, pouvait être également une cible du solvant. Cette hypothèse a été confortée par des expériences réalisées sur des rats dont les réflexes de protection avaient été déclenchés par un bruit *contra*-latéral. Alors que le déclenchement des réflexes s'est traduit par une chute du PMC, le toluène a inhibé les effets des réflexes et plus précisément ceux du réflexe de l'oreille moyenne (ROM). Par ailleurs; des antagonistes des récepteurs cholinergiques ont engendré des augmentations de PMC comparables à celles engendrées par le toluène. Le toluène inhiberait donc les récepteurs cholinergiques des voies efférentes impliquées dans le ROM. L'inhibition du ROM pourrait expliquer la synergie des effets d'une co-exposition au bruit et aux solvants.

Mots-clés : Toluène / Solvants aromatiques / Co-exposition / Réflexes de protection acoustique / Neurotoxicité / Potentiel microphonique cochléaire.

Study of the auditory effects of combined exposure to noise and aromatic solvents: peripheral and central mechanisms.

Combined exposure to noise and toluene has more harmful auditory effects than the sum of those caused by each factor. The goal of this thesis was to study the peripheral and central mechanisms responsible for the synergy between the effects of the solvent and those induced by noise. Since the outer hair cells are the sensitive targets of solvents, the cochlear microphonic potential (CMP) was used to monitor the electrical activity of these cells on rats exposed to both noise and toluene. The intra-carotidial injection of a bolus of intralipid containing toluene provoked a transient increase in CMP magnitude (~9 dB SPL) triggered by a 85-dB SPL *ipsi*-lateral noise. Given that the CMP increase was dependent on the intensity of the acoustic stimulation, it was reasonable to think that the nervous center of the acoustic reflexes, the brainstem, might have been targeted by the solvent. This assumption was confirmed by investigations performed with rats whose acoustic reflexes had been triggered with a *contra*-lateral noise. While triggering the reflexes caused a CMP decrease, the toluene injection inhibited the effects of the acoustic reflexes, and more precisely those of the middle ear reflex (MER). In addition, injections of antagonists of cholinergic receptors provoked increases in CMP similar to those generated by toluene. Toluene may therefore inhibit the cholinergic receptors of the efferent pathways involved in the MER. The MER inhibitory could explain the synergy of the effects of combined exposure to noise and solvents.

Key-words: Toluene / Aromatic solvents / Combined exposure / Acoustic reflexes / Neurotoxicity / Cochlear microphonic potential.

Laboratoire de Neurotoxicité et d'Immunotoxicité. Institut National de Recherche et de Sécurité – BP27 – 54501 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex.