



**HAL**  
open science

# Effets ototoxiques du toluène et ses spécificités métaboliques (phase I et II) chez le rat et le cobaye

Delphine Waniusiow

► **To cite this version:**

Delphine Waniusiow. Effets ototoxiques du toluène et ses spécificités métaboliques (phase I et II) chez le rat et le cobaye. Sciences pharmaceutiques. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10020 . tel-01748488

**HAL Id: tel-01748488**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748488>**

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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



Institut National de Recherche et de Sécurité.  
Rue du Morvan  
54 500 Vandoeuvre-Les-Nancy



Université Henri Poincaré – Nancy I  
U.F.R. de biologie santé  
54 000 Nancy

## ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

### Spécialité : Pharmacologie

### Thèse présentée par Delphine WANIUSIOW

pour l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université Henri Poincaré en Pharmacologie

Soutenue publiquement le 30 avril 2009

## EFFETS OTOTOXIQUES DU TOLUÈNE ET SES SPÉCIFICITÉS MÉTABOLIQUES (PHASE I et II) CHEZ LE RAT ET LE COBAYE

### Membres du Jury :

- Rapporteur : **M. GARNIER Robert**, Maître de conférences des Universités-Praticien Hospitalier, Centre Antipoison et de Toxicovigilance de Paris.
- Rapporteur : **Mme FERRARY Evelyne**, Directeur de recherche à l'Inserm, Paris.
- Examineur : **Mme PARIETTI-WINKLER Cécile**, Praticien Hospitalier Universitaire, Nancy.
- Examineur : **M. AVAN Paul**, Professeur, Université de Clermont-Ferrand.
- Co-directeur de thèse : **M. FERRARI Luc**, Maître de conférences en Toxicologie, Université de Nancy.
- Directeur de thèse : **M. CAMPO Pierre**, Responsable d'étude à l'INRS, Nancy.

Je dédie cette thèse à,

Ma Grand-Mère

Mes Parents

Mon Frère

Cyrille

L'Education Nationale, l'administration française, l'armée française, d'une manière générale la France est ainsi faite qu'il est inconcevable de ne pas se référer à une hiérarchie pour quelque action que ce soit. Aussi, je commencerai par remercier :

**La Direction de l'INRS** pour m'avoir accueillie au sein de son entreprise,

Puis, **Mme Brondeau**, responsable du département Polluants et Santé, qui m'a accueillie dans son service, et dont tout un chacun saura apprécier son écoute et ses qualités diplomatiques, garantissant une parfaite cohésion des équipes de recherche dans son service,

Enfin, **M. Gagnaire**, responsable du laboratoire de neurotoxicologie et immunologie, pour sa disponibilité.

Je tiens également à remercier tout naturellement mes mentors hiérarchiques et scientifiques :

**M. Campo**, avec qui j'ai partagé cette aventure humaine et scientifique que compose la thèse. Cette aventure a été menée avec rigueur, en évitant et contournant embûches et obstacles parsemés le long de notre chemin. La route qui nous a conduit à toutes ses publications écrites et futures n'a pas été un long fleuve tranquille, mêlant désaccords et contradictions scientifiques mais aboutissant toujours à une stratégie de recherche ingénieuse. Ensemble, nous avons rencontré, joie et déception, qui était le voyageur clandestin de notre périple, mais nous avons su l'intégrer et en tirer des enseignements tout au long de la thèse. Merci, Pierre, pour cette aventure,

Et, **M. Cossec**, responsable de laboratoire de chimie et nostalgique de l'intégrateur manuel, pour m'avoir sensibilisé aux techniques de chimie analytique et inculqué les secrets de la chromatographie liquide haute performance.

Je ne puis remercier que très chaleureusement : **M. Ferrari, M. Avan, Mme Parietti-Winkler, Mme Ferrary, M. Garnier**, membres du jury qui m'ont accordé leur confiance, et sacrifié de leur précieux temps à mon travail, et qui auront, par le regard critique, su améliorer la qualité de mon mémoire.

Enfin, je remercie **Messieurs Payan, Langlois, Pierre**, responsables de laboratoire, pour la confiance et l'indépendance qu'ils m'ont accordé au sein de leur laboratoire dès le début de ma thèse ainsi que pour leur autorisation à travailler en étroite collaboration avec leurs techniciens en fonction de mes besoins.

Je remercie particulièrement les techniciens et techniciennes de l'équipe de bioacoustique, dont l'étroite participation technique et scientifique jusqu'au « bout du bout du dernier jour ultime de ma thèse », m'aura été sincèrement précieuse :

**Robert Lataye**, Yoda retraité aux mots précieux,

**Christian Barthelemy**, véritable synthèse de Taz et du Loup de Tex Avery,

**Benoit Rieger**, « yes-man » addict au produit vaisselle,

**Thomas Venet**, dont l'intellect n'a d'égal que sa discrétion et sa propension à étiqueter tout ce qui lui passe sous la main,

**Chantal Cour** qui, bien que nouvelle arrivante, n'hésite pas à soulever la membrane tectoriale afin de dévoiler l'intimité de la cochlée,

**Catherine Boiteux**, véritable effet hypotenseur par son calme, sa gentillesse et son sourire.

Je remercie également toute l'équipe « chocolat-dépendante de la fosse », fort sympathique et d'une efficacité redoutable :

**Xavier Sentenac**, jeffdebrugéologue et aquariophile,

**Samuel Müller**, deneuvillologue, particulièrement stimulé par : « Excellent, Herr Müller !! »,

**Anne-Marie Lambert-Xaolin**, bien sûr, pour sa disponibilité et la qualité de ses enseignements techniques, et pour son immense savoir en matière de léonidasologie.

Comment ne pas remercier :

**Véronique Blachère**, technicienne au grand cœur, pour sa confiance, sa disponibilité, sa patience et son sourire légendaire,

**Dominique Beydon**, cytochromophile averti, qui m'a transmis sa passion pour la chasse enzymatique et qui a m'a prêté fort aimablement ses appâts,

**Manuella Burgart** et **Stéphane Grossman** pour leurs conseils techniques en chimie et en ski.

Je remercie également toute l'équipe de l'animalerie :

**Marie-Josèphe Décret**, flamand rose pour sa grâce et caméléon pour sa faculté d'adaptation aux aléas de l'expérimentation animale,

**Lionel Dussoul**, raie manta pour sa discrétion et labrador pour sa gentillesse,

**Sylvie Michaux**, panda pour sa douceur mais néanmoins bucheron, fourmi pour sa sociabilité, et enfin abeille pour son entraide et sa cohésion naturelles. Merci à toi,

« Michaux », qui a été un véritable soutien de tous les instants et qui a toujours su trouver les mots justes ou le bon parfum de thé pour m'encourager.

Enfin je remercie tous ceux que j'ai côtoyés à l'INRS, avec qui j'ai partagé un café, développé une pensée philosophique, ou tout simplement échangé des Panini : Stéphane, Katy, Aurélie, Rudy, Patrice, Shadia, Monique, Odile, Alexandre, ...

Comment ne pas remercier ma famille et mes ami(e)s qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mon travail :

Merci à ma **jolie famille** pour avoir partagé des moments dominicaux choucroutiens rythmés par des combats de Looping Louis et des sorties nocturnes à la Buée : c'est la qu'on danse à Sion.

Merci aussi à toi **Elian**, bouille d'ange au regard analgésiant, petit bonhomme rempli de sourire obtenu par recombinaison génétique entre **Aude** et **Sébastien**, merci également à vous deux pour les bons moments de détente passés ensemble.

Merci à vous, **Famille Frey**, pour votre chaleur et votre soutien. J'en profite pour signaler que ma voiture fait un clic-clic au niveau de la roue gauche quand je mets le clignotant droit mais juste par temps de pluie, est-ce que c'est le débitmètre ? Merci à vous pour tous les petits soins apportés à Bravounette. Votre disponibilité et votre professionnalisme m'ont permis d'avancer sereinement sur la route du doctorat.

Merci aux **familles Montjouvent** et **Monné** qui n'ont cessé de m'encourager « postalement » et couvert de sympathie pendant toutes ces années studieuses.

Merci à **Monique Ranou**, **William Saurin**, **Père Dodu**, et bien d'autres, dont les spécialités culinaires rapides à avaler m'ont permise d'être ultra-performante dans la rédaction de ce mémoire.

Merci à **Pat'**, mentor badmintonique, qui m'a autorisée à décompresser chaque soir dans son gymnase, à lui adresser des smaches dévastateurs pour mon bien-être moral, et qui m'a appris l'amorti slicé de fond de court efficace au plus haut point contre les vétérans 3<sup>ème</sup> dan.

Je n'oublierai pas de remercier **Isa** et bien-entendu **Tontinou** pour les encouragements et le soutien qu'il a toujours porté à sa nièce préférée, au fait : « I win ,...ah, tu t'es encore fait avoir »...

Je tiens à remercier, **Chouchou** et **Copine** ; qu'il vente, qu'il pleuve, mes plus fidèles supporters seront toujours là. Merci Copine pour ton réconfort « mailien », tes petits mots de soutien, pour les parties de cricket et de cranium, et surtout pour tes fourires incontrôlés. Un GRAND merci à toi Chouchou, pour ta présence dans les moments difficiles tels une défaite badmintonienne à domicile : 21-3/19-21/24-25, comme dans les moments uniques lors d'une partie de Dringo. Ta gentille folie, ton humour décalé, ta joie de vivre, tes instants grognons et tes petits bras font de toi un être de grande qualité, un modèle exceptionnel, qui a toujours su aider sa petite sœur à avancer.

Je tiens à remercier chaleureusement et tendrement **Cyrille**, alias Bernard, pour sa patience, sa compréhension, son accompagnement et son soutien quotidien au cours de ma thèse. Je t'adresse personnellement un « chapeau bas » pour avoir supporté : ma mauvaise humeur lors des partiels, mon désarroi lors de la mort prématurée de mes cobayes, mon impatience wordienne, mon chant casserolique lors des soirées RockBand...la liste est encore longue et non exhaustive...nous aurons tout le temps de la compléter ensemble au cours des années à venir...

Enfin, MERCI à **mes parents**, sans qui rien n'aurait été possible, qui ont toujours suivi et encouragé mes choix professionnels, se sacrifiant, parfois silencieusement, pour ma réussite personnelle et professionnelle. Je tiens à m'excuser auprès de mon **Papa** pour avoir passé trois ans à essayer et réussir à rendre sourd des cobayes, « pardon Vati, je ne recommencerai plus ». Comment ne pas remercier Pimpin, Cocolle, la mère, ou tout simplement **Maman**, pour son dévouement entier à l'avenir et à la réussite de ses enfants. Merci à toi, d'une part, pour m'avoir offert le coffret microscope 2000 pour mes 10 ans et d'autre part, pour avoir toujours cru en mes capacités et en ma passion profonde pour les sciences. Papa et Maman, je ne sais comment vous remercier ..., mes remerciements n'égalent jamais vos qualités humaines...

Je remercie également la **famille Schpoutzib**, et ses enfants **Ulysse** et **Katsu** pour leur douceur et leurs ronrons indispensables en fin de journée.

Enfin, cette thèse ne comportant pas de partie prévue au service après vente, je remercierai globalement toutes les personnes qui m'ont accompagnée et soutenue sincèrement tout au long de ma thèse, pour ne pas être poursuivie en justice pour manquement aux remerciements. J'en profite pour adresser un remerciement spécial à **Mme Henry**, **M.Fleury**, **M.Bondeau**, **Mme Potet**, **Mme Lepoint**, **Mme Leroux**, professeurs de grande classe.

Pour terminer, j'adresserai un dernier mot à quelques anciens professeurs : **M. Bernard**, **Mme Cazet**, **Mme Blaise**, **Mme Farcy** : « Je l'ai fait, chuis cap' ».

# Sommaire

Abréviations	1
Liste des tableaux	2
Liste des figures	3
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>8</b>
<b>Introduction Étude A : Phénobarbital. Induction des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène chez le rat</b>	<b>17</b>
I- Choix de l'inducteur des voies oxydative et de conjugaison	17
II- Évaluation de l'induction	18
III- Protocole expérimental	19
IV- Groupes expérimentaux	20
<b>Introduction Étude B : Ethanol. Inhibition compétitive entre le toluène et l'éthanol chez le rat</b>	<b>21</b>
I- Choix de l'inhibiteur compétitif des voies d'oxydation et de conjugaison	21
II- Évaluation de l'inhibition	22
III- Protocole expérimental	22
IV- Groupes expérimentaux	23
<b>Introduction Étude C : Acivicine. Inhibition de la voie de conjugaison du toluène chez le rat</b>	<b>24</b>
I- Choix de l'inhibiteur de la voie de conjugaison	24
II- Évaluation de l'inhibition	25
III- Protocole expérimental	25
IV- Groupes expérimentaux	26
<b>Introduction Étude D : SKF 525-A et régime hypoprotéiné à 7%. Inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène chez le rat</b>	<b>27</b>
I- Choix de l'inhibiteur des voies d'oxydation et de conjugaison	27
II- Évaluation de l'inhibition	29
III- Protocole expérimental	30
IV- Groupes expérimentaux	31
<b>Introduction Étude E : SKF 525-A et régime hypoprotéiné à 7%. Inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène chez le cobaye</b>	<b>33</b>
I- Choix de l'inhibiteur des voies oxydative et de conjugaison	33
II- Évaluation de l'inhibition	34
III- Protocole expérimental	34
IV- Groupes expérimentaux	35

<b>MATERIELS ET MÉTHODES</b>	<b>37</b>
<b>Animaux</b>	<b>37</b>
<b>Électrophysiologie</b>	<b>38</b>
I- Anesthésie des animaux	38
I-1. Anesthésie des rats	38
I-2. Anesthésie des cobayes	38
II- Préparation des animaux	38
II-1. Implantation des électrodes chez les rats	38
II-2. Implantation des électrodes chez les cobayes	40
III- Audiométrie chez le rat et le cobaye	41
<b>Exposition au toluène</b>	<b>42</b>
<b>Histologie</b>	<b>43</b>
I- Cochléogramme	43
I-1. Prélèvement des cochlées chez le rat et le cobaye	43
I-2. Préparation de surface de cochlées	43
I-3. Comptage cellulaire	44
II- Observation de coupes de cochlée chez le cobaye	44
II-1. Préparation des cochlées	44
II-2. Coupes semi-fines	44
<b>Analyse des métabolites</b>	<b>45</b>
I- Recueil des urines	45
II- Métabolites urinaires	45
II-1. Dosage de l'acide hippurique	45
II-2. Dosage de l'acide benzylmercapturique	47
III- Toluène veineux	48
III-1. Etude pilote	48
III-2. Prélèvement de sang veineux	48
III-3. Dosage du toluène veineux	48
IV- Toluène artériel	49
IV-1. Implantation des cathéters	49
IV-2. Prélèvement de sang artériel et dosage du toluène sanguin	49
V- Créatinine	50
VI- Protéines	50
VII- $\gamma$ -glutamyltransférases	51
VIII- Cytochromes P450	51
VIII-1. Préparation des microsomes	51
VIII-2. Cytochromes P450 totaux	52
VIII-3. Activité des CYP 2E1	53
IX- Glutathion	54
<b>Traitement statistique</b>	<b>56</b>



**RESULTATS****57****Résultats Étude A : Phénobarbital. Induction des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène chez le rat** **57**

I-	Efficacité du traitement au phénobarbital	57
II-	Contrôle des poids des animaux	58
III-	Audiométrie	59
	III-1. Seuils auditifs avant exposition	59
	III-2. Déplacement permanent de seuils auditifs	60
IV-	Histologie de la cochlée	61
V-	Mesure des métabolites urinaires	63
	V-1. Acide hippurique	63
	V-2. Acide benzylmercapturique	64
VI-	Récapitulatif des résultats de l'étude A	65

**Résultats Étude B : Ethanol. Inhibition compétitive entre le toluène et l'éthanol chez le rat** **66**

I-	Efficacité du gavage à l'éthanol sur le toluène circulant	66
II-	Contrôle des poids des animaux	67
III-	Audiométrie	68
IV-	Histologie de la cochlée	69
V-	Mesure des métabolites urinaires	70
	V-1. Acide hippurique	70
	V-2. Acide benzylmercapturique	71
VI-	Récapitulatif des résultats de l'étude B	72

**Résultats Étude C : Acivicine. Inhibition de la voie de conjugaison du toluène chez le rat** **73**

I-	Efficacité du traitement à l'acivicine	73
II-	Contrôle des poids des animaux	74
III-	Audiométrie	75
	III-1. Seuils auditif avant exposition	75
	III-2. Déplacement permanent de seuils auditifs	76
IV-	Histologie de la cochlée	77
V-	Mesure des métabolites urinaires et du toluène sanguin	78
	V-1. Acide hippurique	78
	V-2. Acide benzylmercapturique	79
	V-3. Toluène veineux	80
VI-	Récapitulatif des résultats de l'étude C	81

**Résultats Étude D : SKF 525-A et régime hypoprotéiné à 7%. Inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène chez le rat** **82**

I-	Efficacité du traitement au SKF	82
	I-1. Activité des CYP 2E1	82
	I-2. Toluène artériel	83
II-	Contrôle des poids des animaux	84
III-	Audiométrie	85
	III-1. Seuils auditifs avant exposition	85
	III-2. Déplacement permanent de seuils auditifs	86
IV-	Histologie de la cochlée	87

V- Métabolisme	89
V-1. Acide hippurique	89
V-2. Acide benzylmercapturique	90
V-3. Cytochromes P450 totaux	91
V-4. Activité des CYP 2E1	92
V-5. Glutathion	93
VI- Récapitulatif des résultats de l'étude D	94
<b>Résultats Étude E : SKF 525-A et régime hypoprotéiné à 7%. Inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène chez le cobaye</b>	<b>96</b>
I- Efficacité du traitement au SKF	96
II-1. Activité des CYP 2E1	96
II-2. Toluène artériel	97
II- Contrôle des poids des animaux	98
III- Audiométrie	99
IV- Histologie	100
IV-1. Cochlée	100
IV-2. Fibres nerveuses	102
IV-3. Strie vasculaire	103
IV-4. Organe de Corti	104
V- Métabolisme	105
V-1. Acide hippurique	105
V-2. Acide benzylmercapturique	106
V-3. Cytochromes P450 totaux	106
V-4. Activité des CYP 2E1	107
V-5. Glutathion	108
VI- Récapitulatif des résultats de l'étude E	109
<b><u>DISCUSSION</u></b>	<b>111</b>
<b><u>CONCLUSION</u></b>	<b>120</b>
<b><u>LISTE DES PUBLICATIONS</u></b>	<b>121</b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>122</b>

ABM :	acide benzylmercapturique	HCl :	acide chlorhydrique
Aci :	acide $\alpha$ -Amino-3-chloro-4,5-dihydro-5- isoxazoleacétique	<i>i.p.</i> :	intra péritonéal
AcOH :	acide acétique	<i>i.v.</i> :	intraveineuse
ADH :	alcool déshydrogénase	N-AT :	N-acétyltransférase
AH :	acide hippurique	NC :	nitrocatéchol
ALDH :	aldéhyde déshydrogénase	NP :	nitrophénol
ANOVA :	analyse de variance		
AP :	aminopeptidase	OsO <sub>4</sub> :	acide osmique
CCE :	cellules ciliées externes	PhB :	5-éthyl-5-phényl-2,4,6 (1H, 3H, 5H)-pyrimidinetrione
CCI :	cellules ciliées internes	PO <sub>4</sub> :	phosphate
CGP :	chromatographie en phase gazeuse	PTS :	déplacement permanent de seuil auditif
CI :	colliculus inférieur	<i>s.c.</i> :	sous cutané
CLHP :	chromatographie liquide haute performance	SKF 525A :	2,2-diphénylpentanoate de 2- (diéthylamino)-éthyle
CYP450 :	cytochrome P450	SSA :	acide 5-sulfosalicylique
CYP 2E1 :	cytochrome P450 2E1	ST :	sulfotransférase
dB :	décibel	TOL :	toluène
DEP :	régime hypoprotéiné à 7%	Tr/min :	tour par minute
DMSO :	diméthylsulfoxyde	Ul/g :	unité internationale par gramme
DO :	densité optique	vs. :	versus
DTNB :	acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)	v/v :	volume à volume
DTT :	dithiotréitol		
EDTA :	éthylène diamine tétracétique		
EtOH :	éthanol		
GSH :	glutathion réduit		
GSSG :	glutathion oxydé		
$\gamma$ -GT :	$\gamma$ -glutamyltransférase		
GST :	glutathion S-transférase		
$\lambda$ :	longueur d'onde		
$\lambda_{em}$ :	longueur d'onde d'émission		
$\lambda_{exc}$ :	longueur d'onde d'excitation		
MeOH :	méthanol		
MO :	microscope optique		

## INTRODUCTION ÉTUDE D

Tableau 1 : Composition des deux régimes utilisés lors de l'étude D et E : régime standard, régime hypoprotéiné. 29

## RESULTATS ÉTUDE A

Tableau 2 : Comparaison des résultats obtenus lors d'une induction par le phénobarbital des voies d'oxydation et de conjugaison chez le rat. Les animaux atteints d'une surdité sont visualisés en orange. 65

## RESULTATS ÉTUDE B

Tableau 3 : Comparaison des résultats obtenus lors d'une inhibition compétitive entre toluène et éthanol chez le rat. Les animaux atteints d'une surdité sont visualisés en orange. 72

## RESULTATS ÉTUDE C

Tableau 4 : Variation de l'activité urinaire des  $\gamma$ -GT (UI/g de créatinine) au cours de la semaine chez des rats traités à 5 mg/kg d'acivicine (Aci), lundi matin et mercredi soir. M : mardi, Me : mercredi, J : jeudi, V : vendredi. Exposition à 1750 ppm de toluène. 73

Tableau 5 : Comparaison des résultats obtenus lors d'une inhibition par l'acivicine de la voie de conjugaison chez le rat. Les animaux atteints d'une surdité sont visualisés en orange. 81

## RESULTATS ÉTUDE D

Tableau 6 : Comparaison des résultats obtenus lors d'une inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison par un traitement à 50 mg/kg s.c. de SKF et par un régime hypoprotéiné à 7% chez le rat. Les animaux atteints d'une surdité sont visualisés en orange. 94

## RESULTATS ÉTUDE E

Tableau 7 : Comparaison des résultats obtenus lors d'une inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison après un traitement à 50 mg/kg s.c. de SKF et un régime hypoprotéiné à 7 % chez le cobaye. Les animaux atteints d'une surdité sont visualisés en orange. 109

## INTRODUCTION

<u>Figure 1</u> : Anatomie des oreilles externes, moyennes et internes.	9
<u>Figure 2</u> : Cochlée décortiquée (A), canal cochléaire (B).	10
<u>Figure 3</u> : Organe de Corti de rat vu au microscope électronique à balayage.	10
<u>Figure 4</u> : « Onde propagée » au niveau de la membrane basilaire.	11
<u>Figure 5</u> : Profil métabolique du toluène. CYP450 : cytochrome P450, ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, ST : sulfotransférase, GSH : glutathion, GST : glutathion S-transférase, $\gamma$ -GT : $\gamma$ -glutamyltransférase, AP : aminopeptidase, N-AT : N-acétyltransférase.	13
<u>Figure 6</u> : Induction des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène par le phénobarbital (PhB) chez le rat. CYP450 : cytochrome P450, ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, ST : sulfotransférase, GST : glutathion S-transférase, $\gamma$ -GT : $\gamma$ -glutamyltransférase, AP : aminopeptidase, N-AT : N-acétyltransférase.	18
<u>Figure 7</u> : Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines : 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Traitement : injection de Phénobarbital (PhB : 50 mg/kg s.c.). CI : colliculus inférieur.	19
<u>Figure 8</u> : Groupes expérimentaux. TOL : toluène (1750 et 2000 ppm), PhB : phénobarbital (50 mg/kg).	20
<u>Figure 9</u> : Inhibition compétitive entre éthanol et toluène chez le rat. CYP450 : cytochrome P450, ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, ST : sulfotransférase, GST : glutathion S-transférase, $\gamma$ -GT : $\gamma$ -glutamyltransférase, AP : aminopeptidase, N-AT : N-acétyltransférase.	21
<u>Figure 10</u> : Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines : 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Gavage à 4 g/ kg d'éthanol. CI : colliculus inférieur.	22
<u>Figure 11</u> : Groupes expérimentaux. TOL : toluène (1750 ppm), EtOH : Ethanol (4g/kg).	23
<u>Figure 12</u> : Inhibition de la voie de conjugaison du toluène par l'acivicine chez le rat. CYP450 : cytochrome P450, ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, ST : sulfotransférase, GST : glutathion S-transférase, $\gamma$ -GT : $\gamma$ -glutamyltransférase, AP : aminopeptidase, N-AT : N-acétyltransférase.	24
<u>Figure 13</u> : Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines : 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Traitement : acivicine (5 mg/kg <i>i.p.</i> ). CI : colliculus inférieur.	25
<u>Figure 14</u> : Groupes expérimentaux. TOL : toluène (1750 ppm), Aci : Acivicine (5 mg/kg).	26
<u>Figure 15</u> : Inhibition aspécifique des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène par le SKF525-A chez le rat. CYP450 : cytochrome P450, ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, ST : sulfotransférase, GST : glutathion S-transférase, $\gamma$ -GT : $\gamma$ -glutamyltransférase, AP : aminopeptidase, N-AT : N-acétyltransférase.	28
<u>Figure 16</u> : Exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Traitement au SKF-525A : 50 mg/kg s.c., régime hypoprotéiné 7%. CI : colliculus inférieur.	30
<u>Figure 17</u> : Groupes expérimentaux. TOL : toluène (1500 ppm), SKF : 50 mg/kg.	31
<u>Figure 18</u> : Groupes expérimentaux. TOL : toluène (1500 ppm), SKF : 50 mg/kg, DEP : régime hypoprotéiné à 7%.	32
<u>Figure 19</u> : Inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène par le SKF525-A chez le cobaye. CYP450 : cytochrome P450, ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, ST : sulfotransférase, GST : glutathion S-transférase, $\gamma$ -GT : $\gamma$ -glutamyltransférase, AP : aminopeptidase, N-AT : N-acétyltransférase.	33
<u>Figure 20</u> : Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Traitement au SKF-525A : 50 mg/kg s.c., régime hypoprotéiné 7%.	34
<u>Figure 21</u> : Groupes expérimentaux. TOL : toluène (1500 ppm), SKF : 50 mg/kg.	35
<u>Figure 22</u> : Groupes expérimentaux. TOL : toluène (1500 ppm), SKF : 50 mg/kg, DEP : régime hypoprotéiné à 7%.	36

## MATERIELS ET METHODES

<u>Figure 23</u> : Localisation des craniotomies chez le rat.	39
<u>Figure 24</u> : Microconnecteur permettant le recueil des potentiels auditifs évoqués provenant du colliculus inférieur.	39
<u>Figure 25</u> : Localisation de la craniotomie chez le cobaye en vue de l'insertion de l'électrode de référence.	40
<u>Figure 26</u> : Connexions des électrodes au microconnecteur permettant le recueil des signaux électrophysiologiques.	40
<u>Figure 27</u> : Rat et cobaye en contention pendant le recueil de potentiels auditifs évoqués.	41
<u>Figure 28</u> : Stimulus acoustique émis (en haut) et potentiel évoqué auditif résultant (en bas).	41
<u>Figure 29</u> : Système d'exposition : vaporisation chimique par système de barbotage.	42
<u>Figure 30</u> : Coupe axiale d'une cochlée de cobaye passant par le modiolus.	44
<u>Figure 31</u> : Organe de Corti de cobaye.	44
<u>Figure 32</u> : Cages à métabolisme permettant le recueil d'urine réfrigérée.	45
<u>Figure 33</u> : Chromatogramme du dosage de l'AH par HPLC. AH : acide hippurique, étalon interne : acide 3-méthyl hippurique (1 g/L).	46
<u>Figure 34</u> : Chromatogramme du dosage des ABM par HPLC. ABM : acide benzylmercapturique.	47
<u>Figure 35</u> : Chromatogramme du dosage de toluène sanguin chez le rat (Volts=f(temps)).	49
<u>Figure 36</u> : Spectre d'absorbance des CYP420 et CYP450 en fonction de la longueur d'onde.	52
<u>Figure 37</u> : Principe du dosage du glutathion total (GSSG : glutathion oxydé et GSH : glutathion réduit) par l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB), $\lambda=412$ nm.	54
<u>Figure 38</u> : Dosage du glutathion en microplaque. Gamme étalon : 1,56 à 100 $\mu$ moles/L..	55

## RESULTATS ETUDE A

<u>Figure 39</u> : Concentrations moyennes de toluène sanguin chez le rat, une heure et trois heures après gavage à 1,5 g/kg toluène. PhB : Phénobarbital : 50 mg/kg, s.c. pendant une semaine et 0,1% dans l'eau de boisson durant le week-end. Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs).	57
<u>Figure 40</u> : Évolution des poids des rats au cours de l'étude A. Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines et à 2000 ppm pendant 2 semaines : 6 heures par jour, 5 jours par semaine. PhB : Phénobarbital 50 mg/kg/j s.c.. Barre d'erreur : écart type.	58
<u>Figure 41</u> : Intensité sonore requise pour obtenir une amplitude de 15 $\mu$ V des potentiels auditifs évoqués, avant exposition au toluène, PhB : phénobarbital 50 mg/kg/j, s.c.. Barre d'erreur : écart type.	59
<u>Figure 42</u> : Variation des déplacements permanents de seuils auditifs chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines et à 2000 ppm pendant 2 semaines : 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. PhB : phénobarbital 50 mg/kg/j, s.c.. Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs).	60
<u>Figure 43</u> : Pertes de cellules ciliées chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines et à 2000 ppm pendant 2 semaines : 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. PhB : Phénobarbital 50 mg/kg/j, s.c.. Témoin (n=6), PhB (n=6), TOL (n=6), TOL PhB (n=6).	61
<u>Figure 44</u> : Vue de l'organe de Corti au microscope électronique à balayage. CCI : cellules ciliées internes, CCE : cellules ciliées externes. Flèches jaunes : cicatrices cochléaires.	62
<u>Figure 45</u> : Concentrations urinaires d'acide hippurique chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. PhB : Phénobarbital 50 mg/kg/j, s.c.. Témoin (n=5), PhB (n=5), TOL (n=5), TOL PhB (n=5). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Anova à 1 facteur).	63
<u>Figure 46</u> : Concentrations urinaires d'acide benzylmercapturique chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. PhB : Phénobarbital 50 mg/kg/j, s.c.. Témoin (n=5), PhB (n=5), TOL (n=5), TOL PhB (n=5). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95%, (Anova à 1 facteur).	64

RESULTATS ETUDE B

<u>Figure 47</u> : Variations des concentrations artérielles de toluène (µg/g sang) chez le rat gavé à 4 g/kg d'éthanol. Toluène : injection intra-jugulaire d'un bolus de 300 µL d'intralipide contenant 14 µL de toluène. Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs).	66
<u>Figure 48</u> : Evolution des poids des rats au cours de l'étude B. Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 6 heures par jour, 5 jours par semaine, 4 semaines. EtOH : 4 g/kg/j <i>p.o.</i> . Barre d'erreur : écart type.	67
<u>Figure 49</u> : Variations des déplacements permanents des seuils auditifs chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 6 heures par jour, 5 jours par semaine, 4 semaines, et après 4 semaines de récupération. EtOH : 4 g/kg/j <i>p.o.</i> . Témoin (n=8), EtOH (n=8), TOL (n=8), TOL EtOH (n=8). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95 % (Anova 2 facteurs), test des étendues multiples par rapport au groupe Témoin.	68
<u>Figure 50</u> : Pertes de cellules ciliées chez les rats après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 6 heures par jour, 5 jours par semaine, 4 semaines, et après 4 semaines de récupération. EtOH : 4 g/kg/j <i>p.o.</i> . TOL (n=5), TOL EtOH (n=5).	69
<u>Figure 51</u> : Concentrations urinaires d'acide hippurique chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 6 heures par jour, 5 jours par semaine, 4 semaines. EtOH : 4 g/kg/j <i>p.o.</i> . Témoin (n=8), EtOH (n=8), TOL (n=8), TOL EtOH (n=6). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).	70
<u>Figure 52</u> : Concentrations urinaires d'acide benzylmercapturique chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 6 heures par jour, 5 jours par semaine, 4 semaines. EtOH : 4 g/kg/j <i>p.o.</i> . Témoin (n=8), EtOH (n=8), TOL (n=8), TOL EtOH (n=6). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).	71

RESULTATS ETUDE C

<u>Figure 53</u> : Évolution des poids des rats au cours de l'étude C. Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Aci : acivicine 5 mg/kg, <i>i.p.</i> . Barre d'erreur : écart type.	74
<u>Figure 54</u> : Intensité sonore requise pour obtenir une amplitude de 15 µV des potentiels auditifs évoqués, avant exposition au toluène, Aci : acivicine 5 mg/kg, <i>i.p.</i> Barre d'erreur : écart type.	75
<u>Figure 55</u> : Variations des déplacements permanents des seuils auditifs chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. Aci: acivicine 5 mg/kg, <i>i.p.</i> . Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs), test des étendues multiples par rapport au groupe Témoin.	76
<u>Figure 56</u> : Pertes de cellules ciliées chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. Aci : acivicine 5 mg/kg, <i>i.p.</i> . TOL (n=6), TOL Aci (n=6).	77
<u>Figure 57</u> : Concentrations urinaires d'acide hippurique chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Aci : acivicine 5 mg/kg, <i>i.p.</i> . Témoin (n=5), Aci (n=5), TOL (n=5), TOL Aci (n=5). Barre d'erreur : écart type. NS : différence non significative (Kruskal-Wallis).	78
<u>Figure 58</u> : Concentrations urinaires d'acide benzylmercapturique chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Aci : acivicine 5 mg/kg, <i>i.p.</i> . Témoin (n=8), Aci (n=8), TOL (n=8), TOL Aci (n=8). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).	79
<u>Figure 59</u> : Concentrations sanguines de toluène chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Aci : acivicine 5 mg/kg, <i>i.p.</i> . Témoin (n=8), Aci (n=8), TOL (n=8), TOL Aci (n=8). Barre d'erreur : écart type. NS : différence non significative (Kruskal-Wallis).	80

## RESULTATS ETUDE D

<u>Figure 60</u> : Activité hépatique des CYP 2E1 (pmole/min/mg protéine) chez le rat. SKF : 50 mg/kg, s.c.. Témoin (n=4), SKF (n=4). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).	82
<u>Figure 61</u> : Variations des concentrations artérielles du toluène (µg/g sang) chez le rat traité à 50 mg/kg, s.c. de SKF. Toluène : injection intrajugulaire d'un bolus de 300 µL d'intralipide contenant 28 µL de toluène. Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95%, NS : différence non significative (Anova à 2 facteurs).	83
<u>Figure 62</u> : Evolution des poids des rats au cours de l'étude D. Exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. SKF : 50 mg/kg, s.c.. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs), test des étendues multiples par rapport au groupe Témoin.	84
<u>Figure 63</u> : Intensité sonore requise pour obtenir une amplitude de 15 µV des potentiels auditifs évoqués, avant exposition au toluène. SKF : 50 mg/kg, s.c. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Barre d'erreur : écart type.	85
<u>Figure 64</u> : Variation des déplacements permanents des seuils auditifs chez le rat après exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c., DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Barre d'erreur : écart type. différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs), test des étendues multiples par rapport au groupe Témoin(*), NS : différence non significative, test des étendues multiples par rapport au groupe TOL.	86
<u>Figure 65</u> : Pertes de cellules ciliées chez le rat après exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c.. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. TOL (n=5), TOL SKF (n=5), TOL DEP (n=5), TOL SKF DEP (n=5).	87
<u>Figure 66</u> : Concentrations urinaires d'acide hippurique chez le rat après exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. SKF : 50 mg/kg, s.c.. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=5), SKF (n=5), DEP (n=5), SKF DEP (n=5), TOL (n=5), TOL SKF (n=5), TOL DEP (n=5), TOL SKF DEP (n=5). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Kruskal-Wallis), NS : différence non significative.	89
<u>Figure 67</u> : Concentrations urinaires d'acide benzylmercapturique chez le rat après exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. SKF : 50 mg/kg, s.c.. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=5), SKF (n=5), DEP (n=5), SKF DEP (n=5), TOL (n=5), TOL SKF (n=5), TOL DEP (n=5), TOL SKF DEP (n=5). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Kruskal-Wallis) ; NS : différence non significative.	90
<u>Figure 68</u> : Concentrations hépatiques des CYP450 (pmole/mg protéine) chez le rat après exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=4), SKF (n=5), DEP (n=5), SKF DEP (n=4), TOL (n=5), TOL SKF (n=7), TOL DEP (n=6), TOL SKF DEP (n=9). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Kruskal-Wallis), NS : différence non significative.	91
<u>Figure 69</u> : Activité hépatique des CYP 2E1 (pmole/min/mg protéine) chez le rat après exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=4), SKF (n=5), DEP (n=5), TOL (n=5), TOL SKF (n=7), TOL DEP (n=6), SKF DEP (n=4), TOL SKF DEP (n=9). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).	92
<u>Figure 70</u> : Concentrations hépatiques du glutathion (µmole/g foie) chez le rat exposé à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c.. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=5), SKF (n=5), DEP (n=5), SKF DEP (n=4), TOL (n=5), TOL SKF (n=6), TOL DEP (n=8), TOL SKF DEP (n=8). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Anova à 1 facteur), NS : différence non significative.	93



## RESULTATS ETUDE E

<u>Figure 71</u> : Activité hépatique des CYP 2E1 (pmole/min/mg protéine) chez le cobaye. SKF : 50 mg/kg, s.c. Témoin (n=4), SKF (n=4). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).	96
<u>Figure 72</u> : Variations des concentrations artérielles du toluène ( $\mu\text{g/g}$ sang) chez le cobaye. DEP : régime hypoprotéiné à 7%, SKF : 50 mg/kg, s.c., TOL : Injection intrajugulaire d'un bolus de 300 $\mu\text{L}$ d'intralipide contenant 14 $\mu\text{L}$ de toluène. Barre d'erreur : écart type. NS : différence non significative (Anova à 2 facteurs).	97
<u>Figure 73</u> : Evolution des poids des cobayes au cours de l'étude E. Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine. SKF : 50 mg/kg, s.c.. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Kruskal-Wallis) comparaison des boîtes à moustaches par rapport aux autres groupes testés.	98
<u>Figure 74</u> : Intensité sonore requise pour obtenir une amplitude de 15 $\mu\text{V}$ des potentiels auditifs évoqués chez le cobaye, après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c., DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs), test des étendues multiples par rapport au groupe Témoin.	99
<u>Figure 75</u> : Cochléogramme moyen (n=4) du groupe « Témoin » obtenu chez le cobaye (gauche). Apex de l'organe de Corti de cobaye observé au microscope électronique (droite).	100
<u>Figure 76</u> : Pertes de cellules ciliées chez le cobaye après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. TOL (n=4), TOL SKF (n=4), TOL DEP (n=4), TOL SKF DEP (n=4).	101
<u>Figure 77</u> : Fibres nerveuses observées au microscope optique chez le cobaye exposé à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF 50 mg/kg s.c, DEP : régime hypoprotéiné à 7%.	102
<u>Figure 78</u> : Strie vasculaire observée au microscope optique chez le cobaye exposé à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF 50 mg/kg s.c. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Flèches rouges : vaisseaux sanguins.	103
<u>Figure 79</u> : Coupe sagittale des organes de Corti observés au microscope optique chez le cobaye exposé à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg s.c.. DEP : régime hypoprotéiné à 7%.	104
<u>Figure 80</u> : Concentrations urinaires d'acide hippurique chez le cobaye après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine. SKF : 50 mg/kg, s.c. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=4), SKF (n=5), DEP (n=6), SKF DEP (n=8), TOL (n=8), TOL SKF (n=6), TOL DEP (n=9), TOL SKF DEP (n=7). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95 % (Kruskal-Wallis), NS : différence non significative.	105
<u>Figure 81</u> : Concentrations hépatiques des CYP450 totaux (pmole/mg protéine) chez le cobaye après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg. DEP : régime hypoprotéiné à 7 %. Témoin (n=3), SKF (n=5), DEP (n=4), SKF DEP (n=8), TOL (n=7), TOL SKF (n=4), TOL DEP (n=8), TOL SKF DEP (n=6). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).	106
<u>Figure 82</u> : Activité hépatique des CYP 2E1 (pmole/min/mg protéine) chez le cobaye après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg de SKF. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=5), TOL (n=6), SKF (n=5), TOL SKF (n=4), DEP (n=4), TOL DEP (n=7), SKF DEP (n=6), TOL SKF DEP (n=6). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Kruskal-Wallis), NS : différence non significative.	107
<u>Figure 83</u> : Concentrations hépatiques du glutathion ( $\mu\text{mole/g}$ foie) chez le cobaye après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=5), TOL (n=6), SKF (n=5), TOL SKF (n=4), DEP (n=4), TOL DEP (n=6), SKF DEP (n=8), TOL SKF DEP (n=6). Barre d'erreur : écart type. * différence significative à 95% (Kruskal-Wallis), NS : différence non significative.	108

# **INTRODUCTION**

En dépit des efforts fournis pour éliminer les sources de bruit nocives présentes en milieu professionnel, la surdité professionnelle reste encore l'une des maladies professionnelles les plus communes en France (3ème rang). La majorité des recherches sur l'étiologie des surdités professionnelles s'est concentrée sur les effets nocifs du bruit sur l'audition. En 1997, l'enquête SUMER 94 a montré que plus de 3 millions de salariés étaient encore exposés à des nuisances sonores (Heran-Le Roy et Sandret, 1997). Pour protéger les personnes contre les risques d'une dégradation de leur acuité auditive au cours de leur carrière professionnelle, des dispositions réglementaires européennes et françaises, ont été prises (directive 2003/10/CE). A ce sujet, il faut préciser que les mesures de protection collective ne permettent pas toujours de réduire suffisamment le bruit. Dans ce cas, une protection individuelle contre le bruit doit être mise à disposition pour les personnes exposées pendant 8 heures, à plus de 80 dB (A).

Bien que l'exposition au bruit soit indubitablement le contributeur majeur de la surdité professionnelle, des études récentes ont montré que les solvants aromatiques et leurs interactions avec le bruit pourraient contribuer significativement à la surdité professionnelle (Morata *et al.*, 1993 ; 1995 ; 2002 ; Sliwinska-Kowalska *et al.*, 2001 ; 2003 ; 2007). Récemment, des études chez l'animal ont même souligné l'impact des solvants aromatiques sur le réflexe de protection de l'oreille moyenne (Maguin *et al.*, 2006). Ces études confirment la toxicité des solvants sur le système nerveux central (Rosenberg, 1988 ; Gatley, 1991 ; Airlien-Søborg, 1992 ; Greenberg, 1997).

Des valeurs limites moyennes d'exposition (VME) ont été définies par le ministère du Travail pour limiter l'exposition des salariés aux solvants aromatiques. Comme pour le bruit, elles prennent en compte les effets d'une exposition pendant 8 heures. Il est à noter que les VME restent définies par 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>).

Les solvants aromatiques sont très largement utilisés dans l'industrie. Par exemple, le toluène (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>), un solvant liquide, incolore, volatil, d'odeur aromatique, lipophile, est utilisé comme intermédiaire de synthèse pour la fabrication de nombreux produits : benzène, xylène, phénol, nitrotoluène..., comme constituants des encres d'imprimeries, des peintures, des laques, des colles, des dégraissants et des détachants (Meek et Chan, 1994 ; Vincent, 2005) et comme solvant d'extraction dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique. Le toluène a une faible toxicité aiguë, sa cible première est le système nerveux central. Il est irritant pour la peau, les yeux et le système respiratoire. En exposition prolongée ou répétée, le toluène provoque, chez le rat et la souris, une augmentation de poids de nombreux organes, une modification du taux de neurotransmetteurs, une neurotoxicité au niveau de l'hippocampe et du cervelet (Fiche toxicologique FT74, 2008). Aujourd'hui, de nombreuses études ont déjà clairement démontré que le toluène, en endommageant préférentiellement la cochlée (Johnson et Canlon, 1994 ; Campo *et al.*, 1997) pouvaient causer des pertes auditives (Morata, *et al.*, 1995). Pour comprendre l'action des solvants sur l'audition, rappelons brièvement la physiologie de l'oreille, récepteur neurosensoriel très complexe.

Rappels physiologiques

L'oreille est divisée en trois parties (Figure 1) : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne.

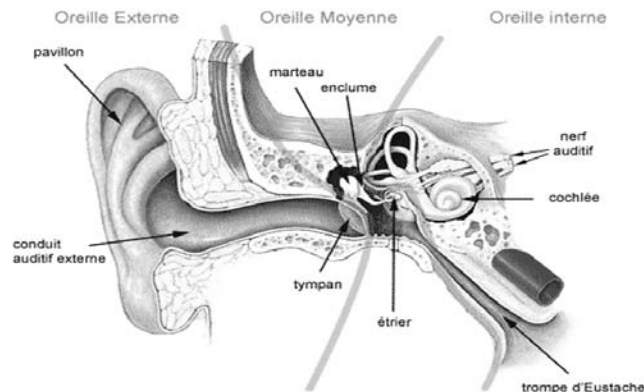


Figure 1 : Anatomie des oreilles externes, moyennes et internes.

L'oreille externe comprend le pavillon, le conduit auditif externe et la face latérale du tympan. Le rôle de l'oreille externe est de diriger les ondes sonores vers le tympan.

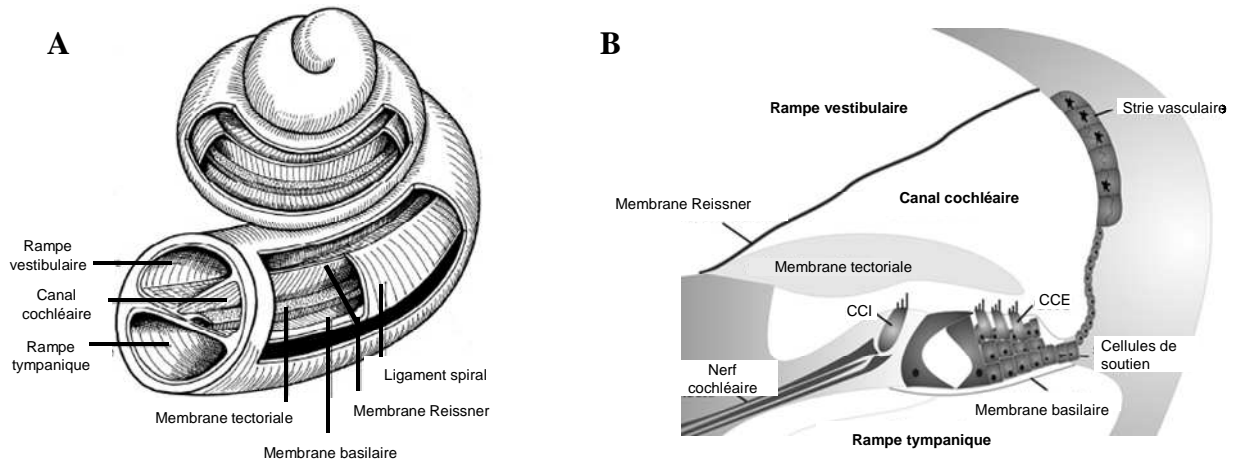
L'oreille moyenne est composée d'un ensemble de cavités aériennes, avec en avant la cavité du tympan qui communique avec le nez par la trompe d'Eustache, et en arrière les cellules mastoïdiennes. La trompe d'Eustache a deux rôles : elle assure la ventilation maintenant l'équilibre des pressions entre l'oreille moyenne et le milieu extérieur et assure également la clairance muco-ciliaire.

Dans la caisse du tympan, il existe trois osselets articulés les uns aux autres :

- le marteau inséré dans le tympan,
- l'enclume,
- l'étrier inséré dans la fenêtre ovale.

La chaîne tympano-ossiculaire transforme les vibrations aériennes en variation de pression dans les liquides de l'oreille interne. Cette transformation, sans déperdition énergétique, est possible grâce à l'oreille moyenne qui joue le rôle d'adaptateur d'impédance. La chaîne des osselets compense le rapport entre l'impédance élevée des liquides de la cochlée et celle beaucoup plus faible de la membrane tympanique.

L'oreille interne renferme l'organe noble de la cochlée : l'organe de Corti qui est l'épithélium neurosensoriel. L'organe de Corti est localisé au niveau du canal cochléaire (Figure 2A), compartiment qui est séparé :- de la rampe tympanique par la membrane basilaire, insérée sur le bord libre de la lame osseuse spirale. - de la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner, attachée sur la strie vasculaire, tendue obliquement vers la lame spirale.



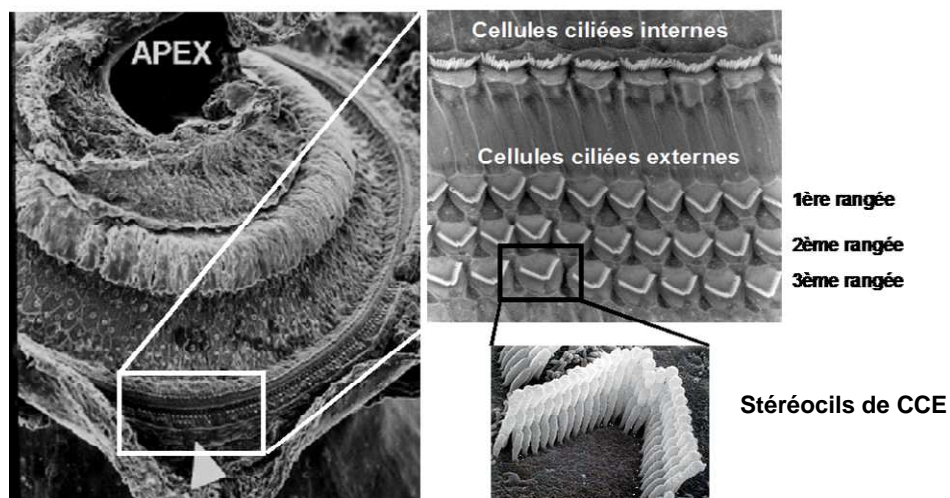
*Figure 2 : Cochlée décortiquée (A), canal cochléaire (B).*

La structure de l'organe de Corti est particulièrement complexe et comprend :

- des cellules non neurosensorielles : les cellules de soutien telles que les cellules de Hensen et de Deiters, qui participent au recyclage des ions (Spicer et Schulte, 1998) et des neurotransmetteurs entre les différents compartiments et permettent également la cicatrisation structurale de l'organe de Corti après un éventuel traumatisme (Raphael et Altschuler, 1991) (Figure 2B),

- des cellules neurosensorielles : les cellules ciliées internes (CCI) et externes (CCE) coiffées de stéréocils à l'apex.

Les CCE, en forme de poire, sont disposées en 3 rangées de taille croissante baignant dans la corticolymphé. L'extrémité des CCE est coiffée d'une centaine de stéréocils baignant dans l'endolymphé et formant un W à leur surface (Figure 3). Quant aux CCI, de forme cylindrique, elles sont présentes uniquement sur une seule rangée. L'implantation des stéréocils, contrairement aux CCE, est disposée en palissade (Figure 3).

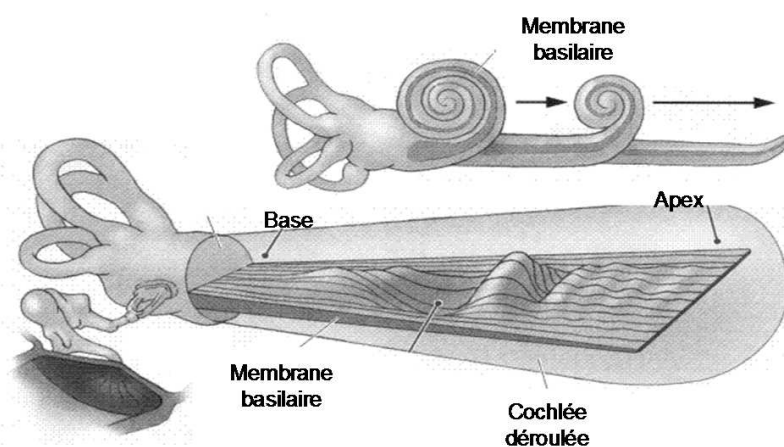


*Figure 3 : Organe de Corti de rat vu au microscope électronique à balayage.*

Rappels physiologiques

Les CCE et CCI diffèrent par leur nombre, leur structure mais aussi par leur innervation. Bien que le nombre de CCI soit trois fois moins élevé que celui des CCE, 95% des fibres spirales (afférentes) sont connectées avec les CCI contre 5% (efférentes) pour les CCE. Les différences de structures entre les CCE et les CCI leur confèrent des rôles distincts : les CCE assurent le couplage mécanique entre la membrane basilaire et la membrane tectoriale tandis que les CCI assurent la transduction mécano-électrique.

Le pôle apical des CCE se prolonge au-delà de la lame réticulaire dans l'endolymphe pour s'enchaîner solidairement dans la membrane tectoriale. Ainsi, lors de la perception sonore, le tympan vibre entraînant des oscillations de la membrane basilaire, transmises par la chaîne des osselets, appelées « onde propagée » (Figure 4).



*Figure 4 : « Onde propagée » au niveau de la membrane basilaire.*

En 1960, Von Békésy a démontré que le mouvement de l'endolymphe fait ployer la membrane basilaire à sa base, en initiant une onde qui se propage à l'apex. Avec les hautes fréquences, la base plus rigide de la membrane vibre considérablement, en dépensant beaucoup d'énergie, et l'onde ne se propage pas très loin. En revanche, les ondes sonores de basses fréquences se propagent jusqu'à l'apex flexible de la membrane basilaire, avant que toute l'énergie ne soit épuisée.

Transformation d'une vibration mécanique en messages nerveux : transduction mécano-sensorielle

La vibration de la membrane basilaire engendre un mouvement de cisaillement des stéréocils entre les membranes réticulaire et tectoriale. Cette déflexion ciliaire provoque l'ouverture de canaux cationiques non sélectifs situés à l'apex des stéréocils (Hackney et Furness, 1995). Le  $K^+$  entre dans les CCE et les dépolarise. Cette dépolarisation entraîne l'activation des propriétés électromotrices des CCE leur permettant, par l'intermédiaire des protéines motrices situées le long de la membrane plasmique, de se contracter ou de s'allonger. Les contractions rapides des CCE sont à l'origine d'une amplification sélective du mouvement de la membrane basilaire. Les CCE sont à la base des propriétés fondamentales de l'appareil auditif périphérique : elles assurent la sensibilité et la discrimination en fréquence de l'organe de Corti. En revanche, ce sont les CCI stimulées qui donnent

naissance aux potentiels d'action au niveau de la cochlée. La déflexion ciliaire crée un courant ionique intra-cellulaire avec libération de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. Cette libération de  $\text{Ca}^{2+}$  permet l'exocytose des vésicules synaptiques contenant le neurotransmetteur : le glutamate. La fixation du glutamate sur les récepteurs des fibres afférentes provoque des influx nerveux qui se propagent le long des fibres du nerf auditif jusqu'aux aires corticales auditives.

#### Cochléotoxicité des solvants aromatiques

Les mécanismes inhérents à la transduction neurosensorielle peuvent être perturbés par des solvants aromatiques tels que le styrène, l'éthylbenzène, le p-xylène ainsi que le toluène (Rebert *et al.*, 1983 ; Crofton *et al.*, 1994).

Chez l'animal, les effets cochléotoxiques dus à une exposition aux solvants ont été mis en exergue par des tests comportementaux : test d'évitement ou de discrimination de sons (Pryor *et al.*, 1983 ; Crofton *et al.*, 1994) et par des techniques électrophysiologiques telles que les potentiels auditifs évoqués enregistrés au niveau du cortex cérébral (Sullivan *et al.*, 1988) ou du colliculus inférieur (Campo *et al.*, 1997). Les dysfonctionnements cochléaires ont été confirmés par des analyses morphologiques de l'organe de Corti (Campo *et al.*, 1997 ; Sullivan *et al.*, 1988 ; Gagnaire et Langlais, 2005).

Si le mécanisme responsable de l'ototoxicité des solvants aromatiques n'est pas encore totalement connu, néanmoins de nombreuses données sont disponibles dans la littérature.

Les CCE ont été identifiées comme la cible privilégiée des solvants aromatiques (Johnson et Canlon, 1994). Leur perte s'étend de la troisième à la première rangée (Sullivan *et al.*, 1988), tandis que les CCI semblent être préservées (Campo *et al.*, 2001). Il apparaît également que les ganglions spiraux sont peu sensibles à la toxicité des solvants (Lataye *et al.*, 2001). Pour finir, les dommages engendrés par les solvants aromatiques ototoxiques affectent la région cochléaire qui code les fréquences moyennes : 16-20 kHz (Mattsson *et al.*, 1990 ; Crofton *et al.*, 1994 ; Lataye *et al.*, 1999) correspondant à la gamme de meilleure sensibilité auditive chez le rat.

Les solvants transportés par le sang circulant parviendraient à l'organe de Corti par diffusion membranaire au niveau de la strie vasculaire. Ils progresseraient au travers du sulcus externe avant d'endommager les cellules de soutien : cellules de Hensen et de Deiters, puis les CCE (Campo *et al.*, 1999 et 2001 ; Chen *et al.*, 2007). L'altération de ces CCE aurait deux origines possibles.

La première serait due à la perturbation du recyclage du  $\text{K}^+$  assuré par les cellules de Hensen et de Deiters (Spicer et Schulte, 1998). L'accumulation de  $\text{K}^+$  dans la corticolympe 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).

Tous ces mécanismes de toxicité proposés par la littérature sont le fruit d'études réalisées chez le rat. Cependant certains auteurs ont montré que l'ototoxicité des solvants dépendait de l'espèce animale : la cochlée du rat, contrairement à celle du cobaye, est sensible aux solvants aromatiques (Campo *et al.*, 1993 ; Fechter, 1993 ; Lataye *et al.*, 2002). A ce propos, la littérature

apporte peu de réponses quant à la stratégie de protection élaborée par le cobaye lors d'une exposition aux solvants. Quelques pistes ont néanmoins été proposées pour tenter d'expliquer une telle différence. La spécificité de la toxicité des solvants pourrait s'expliquer par des différences toxicocinétiques et métaboliques : absorption pulmonaire, coefficient de partition air/sang et clairance (Campo *et al.*, 2006 ; 2008), concentration sanguine de solvant (Gagnaire *et al.*, 2007), activité des cytochromes P450 (CYP450) (Davis *et al.*, 2002), concentration de glutathion (Lautermann *et al.*, 1997). Ces différences constatées entre le rat et le cobaye laissent penser que le métabolisme hépatique pourrait jouer un rôle primordial dans l'ototoxicité des solvants.

Afin d'évaluer l'impact du métabolisme hépatique sur l'ototoxicité induite par le toluène, il est essentiel de connaître les différentes étapes de sa biotransformation (Figure 5).

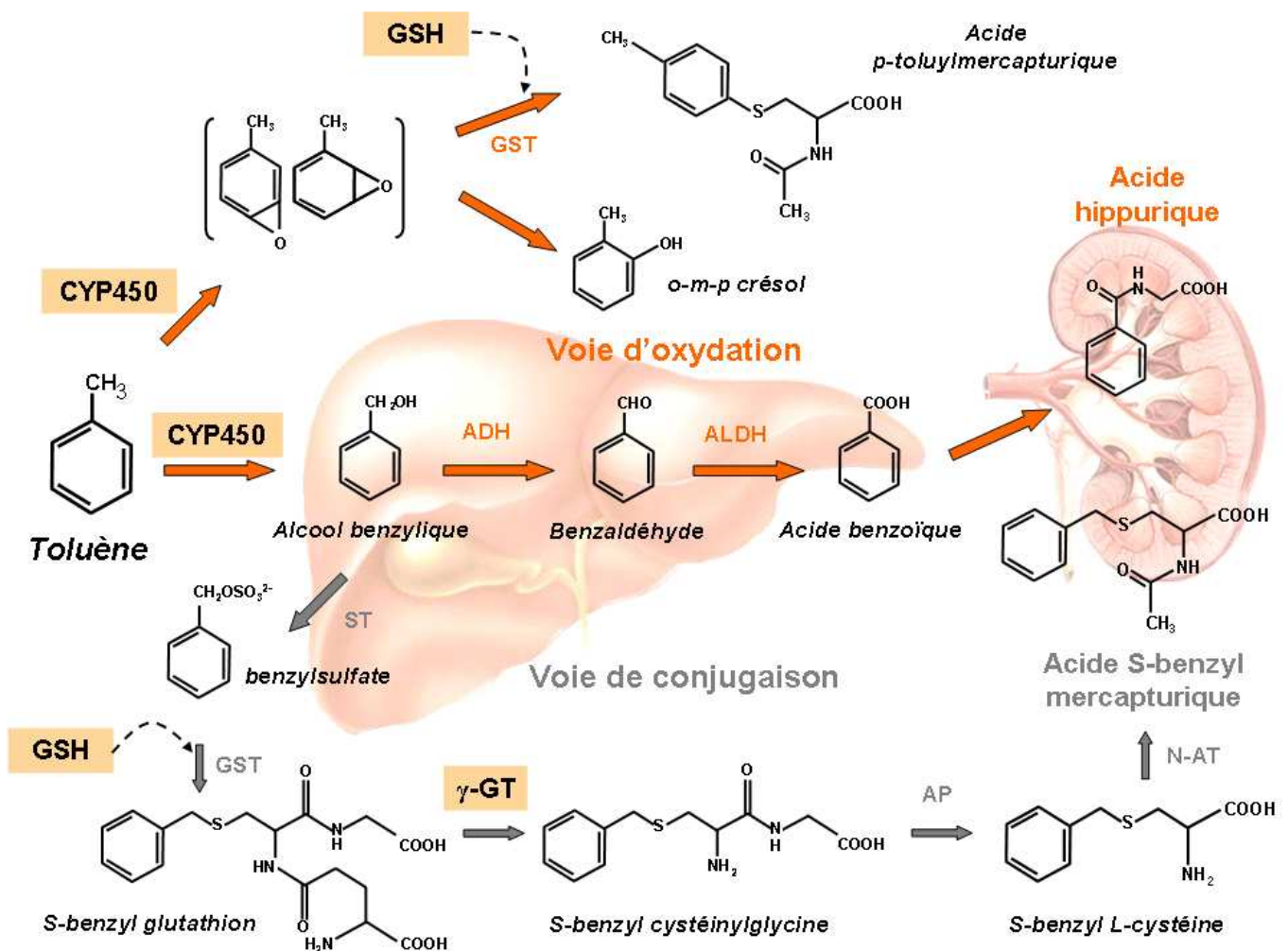


Figure 5 : Profil métabolique du toluène. CYP450 : cytochrome P450, ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, ST : sulfotransférase, GSH : glutathion, GST : glutathion S-transférase,  $\gamma$ -GT :  $\gamma$ -glutamyltransférase, AP : aminopeptidase, N-AT : N-acétyltransférase.



Le processus de détoxification du toluène chez le rat se décline en deux voies principales :

- la voie d'oxydation (ou phase I) qui met en jeu les CYP450 (activité monooxygénase, oxydase, réductase, ou peroxydase) conduisant principalement à la formation d'acide hippurique (80%) et secondairement à l'acide toluylmercapturique et aux *o*-, *m*-, *p*- crésols (1-2%),
- la voie de conjugaison (ou phase II) qui met en jeu le glutathion pour former les dérivés cystéinés puis l'acide benzylmercapturique (20%) (Figure 5).

Le rôle principal de ces réactions d'oxydation et de conjugaison est de promouvoir l'élimination des métabolites en favorisant leur transfert au travers des membranes intestinales, hépatiques ou rénales.

Lors de la phase I (Figure 5), le toluène est oxydé en alcool benzylique par une superfamille d'hémoprotéines : les CYP450. Ces enzymes, principalement hépatiques, sont impliquées dans le métabolisme de nombreux composés endogènes ou exogènes en raison de la grande flexibilité de leur site actif héminique (Anzenbacherova *et al.*, 2005). Trois familles principales sont nécessaires à la détoxification du toluène : CYP450 1, 2, 3 et plus particulièrement dans l'ordre d'importance les sous-familles suivantes : CYP 2E1, 2B1/2, 2C6/11, 1A1/2, 2A1 et 3A1/2 (Nakajima et Wang, 1994 ; Parkinson, 1996 ; Shimada *et al.*, 1997). Le rôle joué par ces sous-familles dépend du composé ou du xénobiotique à transformer. Par exemple, les CYP 2E1 induisent la transformation du toluène en alcool benzylique. Le métabolite terminal de la voie des alcool et aldéhyde déshydrogénases est l'acide benzoïque qui est secondairement conjugué avec la glycine et éliminé dans les urines sous forme d'acide hippurique (AH) (Wrighton et Stevens, 1992). D'autres métabolites secondaires sont également excrétés dans les urines : les crésols et l'acide toluylmercapturique qui proviennent de l'oxydation du cycle benzénique du toluène sous l'action des CYP450.

La phase II, quant à elle, est initiée par la sulfotransférase qui transfère un groupement sulfate sur l'alcool benzylique aboutissant au benzylsulfate (Van Doorn *et al.*, 1981). Ce groupement sulfate subit ensuite une attaque nucléophile par la fonction thiol du glutathion (GSH) formant ainsi le S-benzyl glutathion. Puis, apparaissent les dérivés cystéinés (ou S-conjugués) qui aboutissent à l'acide benzylmercapturique (ABM) (Tassaneeyakul *et al.*, 1996). La dégradation du toluène en ABM reste un processus complexe faisant intervenir plusieurs organes (Sano *et al.*, 2001). Dans ce processus, le rein est le premier site de conversion du benzyl sulfate en S-benzyl glutathion. Puis la  $\gamma$ -glutamyltransférase ( $\gamma$ -GT) catalyse l'hydrolyse de la liaison entre l'acide glutamique et le conjugué cystéiné libérant ainsi le premier dérivé cystéiné : le S-benzyl cystéinylglycine (Hinchmann et Ballatori, 1990). Le S-benzyl cystéinylglycine est à son tour hydrolysé par l'aminopeptidase qui élimine la glycine terminale donnant ainsi le deuxième dérivé cystéiné : le S-benzyl L-cystéine. Ce dernier dérivé cystéiné est transporté de nouveau en direction du foie où il subit une N-acétylation aboutissant au métabolite terminal de la voie de conjugaison : l'acide benzylmercapturique qui est excrété dans les urines (Lash, 1994 ; Sano *et al.*, 2001).

L'étude de Pryor *et al.* (1991) a révélé qu'une altération du métabolisme hépatique pouvait modifier les propriétés ototoxiques des solvants chez le rat. En effet, Pryor a montré que le

5-éthyl-5-phényl-2,4,6 (1H, 3H, 5H)-pyrimidinetrione (phénobarbital ou PhB) pouvait clairement réduire l'ototoxicité du toluène en modifiant le métabolisme hépatique du rat. Bien que pionnière, l'étude de Pryor présentait quelques faiblesses : les résultats audiométriques étaient limités à une seule fréquence 16 kHz, aucune analyse histologique et métabolique n'avait été réalisée. L'auteur était donc dans l'impossibilité de circonscrire la gamme des fréquences endommagées et d'évaluer l'impact de la molécule mère par rapport à ses métabolites. Afin de pallier ce manque de données, l'induction des voies d'oxydation et de conjugaison par le PhB a été réalisée lors de l'**étude A** présentée ci-après. Cependant, comme le soulignent Okey (1990) ainsi que Waxman et Azaroff en 1992, un traitement au PhB peut induire les enzymes de détoxification de la voie oxydative comme celles de la voie de conjugaison. Par conséquent, le PhB n'augmente pas seulement la clairance de la molécule mère mais également celle des métabolites, notamment les dérivés cystéinés contenus dans le système circulatoire.

Ainsi, pour vérifier l'hypothèse du rôle ototoxique de la molécule de toluène chez le rat, une autre approche serait d'éprouver l'impact de la compétition inhibitive du métabolisme hépatique du solvant sur son pouvoir ototoxique. Une étude de compétition inhibitive entre toluène et éthanol avait été déjà réalisée par Campo *et al.* (1998). Cependant, les auteurs n'avaient pas étudié d'une part, les variations de la concentration urinaire d'ABM et d'autre part, les variations de la concentration sanguine de toluène. Pour cette raison, l'**étude B** a été entreprise pour évaluer l'influence des variations du métabolisme hépatique lors d'une compétition inhibitive entre le toluène et l'éthanol. Cependant, bien que l'étude de l'inhibition compétitive entre éthanol et toluène nous permette d'analyser l'impact d'une augmentation de la concentration du toluène sanguin, elle ne permet pas d'écarter d'éventuels effets ototoxiques des dérivés cystéinés sur le récepteur auditif.

De ce fait, le rôle possible de la voie de conjugaison ne doit pas être négligé. Le glutathion ( $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyglycine), tripeptide présent en grande quantité dans la plupart des cellules, participe à bon nombre de réactions de défense au sein de l'organisme (Rana *et al.*, 2002). Mais, la conjugaison du glutathion avec certains xénobiotiques peut, dans certains cas, engendrer des métabolites cytotoxiques (Bakke, 1990 ; Lash, 1994). Par exemple, les dérivés cystéinés de certaines substances chimiques sont plus néphrotoxiques que la molécule mère proprement dite (Nash *et al.*, 1984 ; Anders *et al.*, 1988 ; Morel *et al.*, 1998). En outre, les dérivés cystéinés de certains agents, tels que les antibiotiques de la famille des aminosides, sont également ototoxiques (Rybak, 1993 ; Humes, 1999 ; Selimoglu, 2007).

Par conséquent, il nous est apparu nécessaire d'étudier l'impact des dérivés cystéinés issus du métabolisme du toluène sur l'audition, afin d'évaluer leur potentiel ototoxique. D'autant plus qu'une étude récente avait montré que la phase de conjugaison du métabolisme du toluène était différente chez le rat et le cobaye (Campo *et al.*, 2006). Dans cette étude, le rat éliminait de l'ABM dans ses urines après une exposition au toluène, alors que ce métabolite n'était pas détectable chez le cobaye. Il se trouve également que l'audition du rat est sensible au toluène mais pas celle du cobaye. Par conséquent, la présence des dérivés cystéinés chez le rat, et non chez le cobaye, pourrait expliquer l'ototoxicité du toluène chez le rat. De ce fait, le rôle toxique des dérivés cystéinés a été analysé au cours de l'**étude C**. Les  $\gamma$ -GT, enzymes impliquées dans l'apparition des dérivés cystéinés au cours de

la phase II, ont été inhibées par l'acide  $\alpha$ -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacétique (acivicine) (Smith *et al.*, 1995).

Pour finir, il fallait envisager l'inhibition des CYP450 pour étudier l'impact de la molécule mère par rapport aux métabolites des voies d'oxydation et de conjugaison. Un inhibiteur global des CYP450 : le 2,2-diphénylpentanoate de 2-(diéthylamino)-éthyle (SKF 525-A) a été choisi lors de l'étude D. L'inhibition globale des CYP450 a été couplée avec un régime hypoprotéiné afin de renforcer l'inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison. Ce régime imposé aux animaux était appauvri en protéines pour réduire les CYP450 mais il était également appauvri en acides aminés soufrés indispensables à la synthèse du glutathion. De ce fait, ce régime permettrait de jouer à la fois sur la quantité des CYP450 et sur la disponibilité du glutathion dans l'organisme.

Enfin, pour expliquer la différence de vulnérabilité au solvant entre le rat et le cobaye, l'**étude E**, similaire à l'étude D, a été également réalisée chez le cobaye. Rappelons que l'objectif de cette étude était de déterminer si la molécule mère ou l'un des métabolites du toluène étaient un agent cochléotoxique chez le cobaye tout comme chez le rat. En effet, on est en droit de se demander si le métabolisme du cobaye est qualitativement semblable à celui du rat car de nombreuses différences fondamentales et métaboliques existent entre ces deux espèces. Des études préliminaires ont révélé des différences fondamentales entre les impacts de l'exposition au toluène chez le rat et chez le cobaye traité au SKF. Par exemple, la dose de SKF supportée par le cobaye était moins élevée que celle supportée par le rat. De plus, à ces différences protocolaires s'ajoutent des divergences métaboliques chez le cobaye que sont : l'absence d'ABM urinaire, une concentration hépatique des CYP450 deux fois plus élevée et une concentration cochléaire de glutathion huit fois plus élevée par rapport au rat.

De ce fait, si l'inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison engendre une augmentation du toluène circulant chez le cobaye et que celui-ci présente une surdité ainsi que des pertes cellulaires ; alors cette surdité aura certainement été créée par le toluène en tant que molécule mère. Ainsi, la toxicité auditive induite par le toluène serait semblable chez le rat et le cobaye. Par ailleurs, l'étude E devait permettre de dévoiler la stratégie de protection du cobaye lors d'une exposition prolongée au toluène.

En résumé, les objectifs principaux de cette série d'investigations étaient :

- d'étudier l'impact d'une modification des phases I et II du métabolisme hépatique du toluène sur son pouvoir ototoxique,
- d'évaluer la responsabilité des dérivés cystéinés du toluène sur son pouvoir ototoxique,
- d'évaluer les effets ototoxiques relatifs à la molécule mère par rapport à ceux de ses métabolites,
- de comparer le métabolisme hépatique du toluène du rat par rapport à celui du cobaye,
- et enfin, de mieux comprendre les mécanismes de défense du cobaye contre l'ototoxicité du toluène.

## Étude A : Phénobarbital.

### Induction des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène chez le rat

#### I- Choix de l'inducteur des voies oxydative et de conjugaison

La première réaction d'oxydation du toluène par les CYP450 et plus particulièrement les CYP 2E1 a pour but d'augmenter le caractère hydrophile du xénobiotique pour faciliter son excrétion.

Il existe un grand nombre d'inducteurs des CYP 2E1 car leur site actif s'adapte à différentes variétés de substrat du fait d'une grande flexibilité du site actif héminique (Anzenbacherova *et al.*, 2005). Les inducteurs des CYP 2E1 connus sont l'éthanol (Tsutsumi *et al.*, 1993), l'acétone (Song *et al.*, 1989), l'isoniazide (Poloyac *et al.*, 2004), le pyrazole (Winters et Cederbaum, 1992) et le phénobarbital (Ejiri *et al.*, 2005). Parmi ces inducteurs, certains ne pouvaient être utilisés dans notre contexte expérimental.

De part sa fonction alcool, l'éthanol suit le même processus de détoxification que le toluène. L'inhibition compétitive entre l'éthanol et le toluène écartait donc l'utilisation de cet inducteur potentiel dans notre étude.

Les animaux étant exposés au toluène par inhalation, l'utilisation d'un second solvant tel que l'acétone n'aurait pas permis de discerner les effets induits par le toluène de ceux induits par l'acétone.

Bien que spécifique des CYP 2E1, l'utilisation de l'isoniazide peut provoquer une altération auditive (Altiparmak *et al.*, 2002), excluant d'emblée son utilisation dans notre contexte expérimental.

Le pyrazole est lui aussi un inducteur spécifique des CYP 2E1, mais il inhibe l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), enzyme qui intervient dans la phase I du métabolisme.

Contrairement au pyrazole, le phénobarbital présente l'avantage d'induire les enzymes essentielles du processus de détoxification : les CYP450, l'ALDH, l'alcool déshydrogénase (ADH) et la glutathion S-transférase (GST) et les  $\gamma$ -glutamyltransférases ( $\gamma$ -GT) (Figure 6).

L'induction de cette série d'enzymes est primordiale car elle permet de réduire la demi-vie du toluène et de ses métabolites dans l'organisme et de tester ainsi l'impact du métabolisme hépatique sur son pouvoir ototoxique.

Compte tenu des avantages du PhB et de sa non toxicité hépatique et auditive, il a été choisi comme inducteur dans l'étude A.

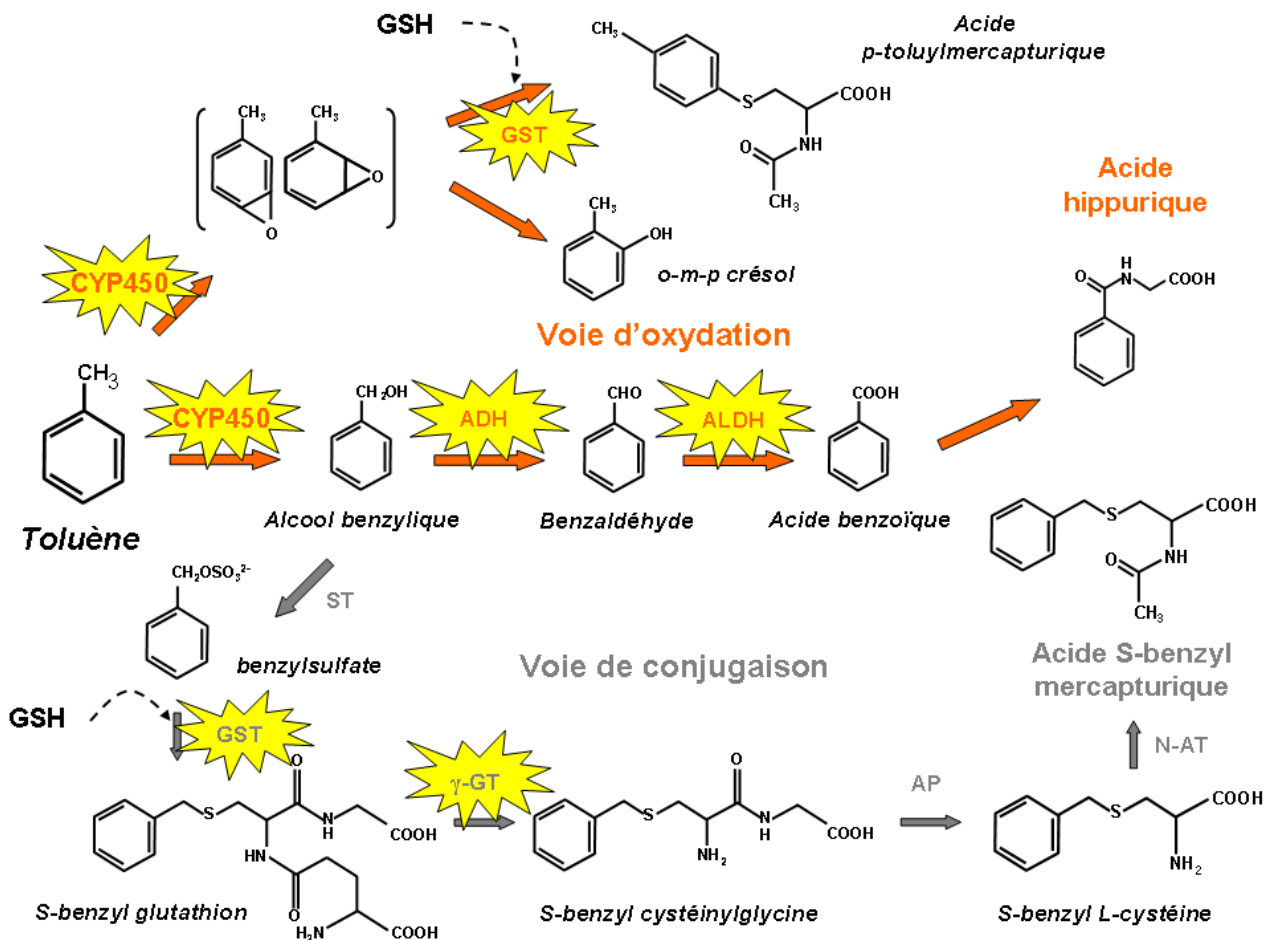


Figure 6 : Induction des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène par le phénobarbital (PhB) chez le rat. CYP450 : cytochrome P450, ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, ST : sulfotransférase, GST : glutathion S-transférase,  $\gamma$ -GT :  $\gamma$ -glutamyltransférase, AP : aminopeptidase, N-AT : N-acétyltransférase.

## II- Évaluation de l'induction

L'induction des voies de détoxification du toluène par le PhB a été estimée en dosant le toluène sanguin après traitement avec l'inducteur lors d'une étude pilote.

Au cours de l'étude A décrite ci-après, les dosages des métabolites urinaires (AH et ABM) ont été effectués pour contrôler l'efficacité de l'induction au cours de l'exposition au toluène.

### III- Protocole expérimental

L'étude A a été réalisée selon le protocole illustré par la figure 7.

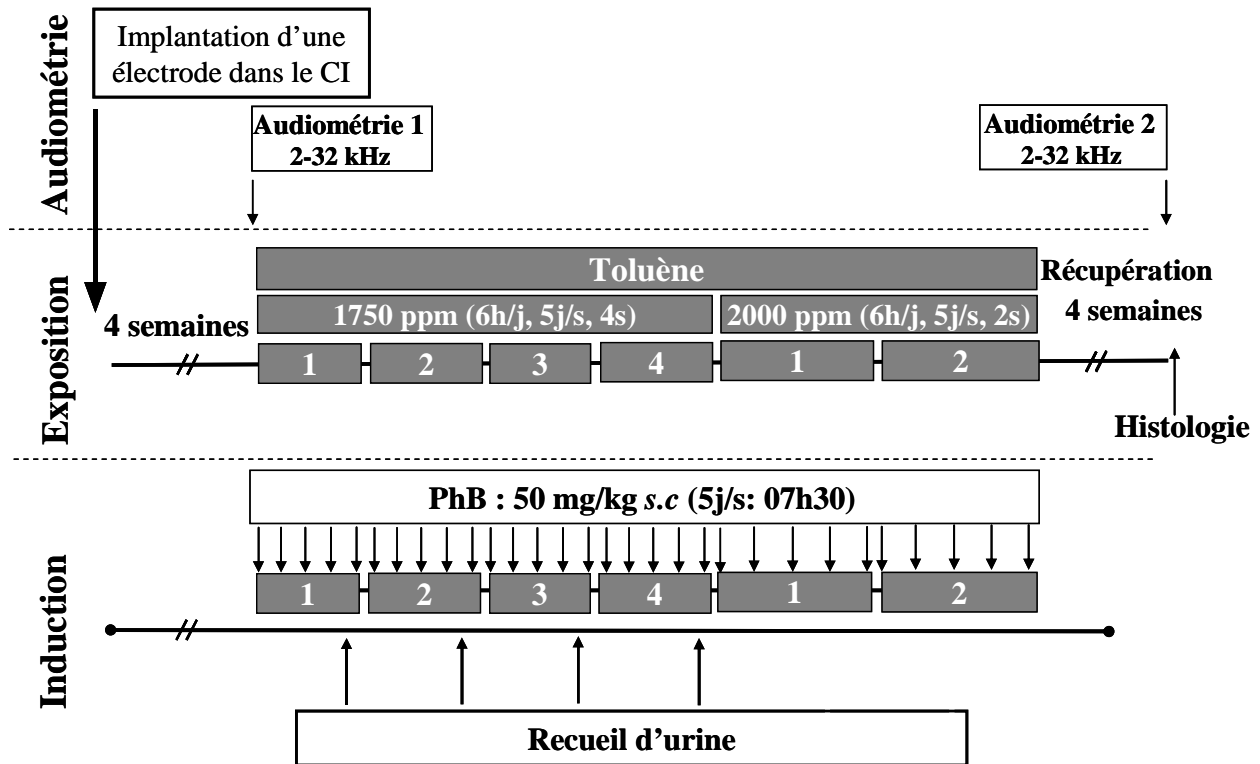


Figure 7 : Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines : 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Traitement : injection de Phénobarbital (PhB : 50 mg/kg s.c). CI : colliculus inférieur.

#### Audiométrie :

Les animaux étaient équipés d'une électrode dans le colliculus inférieur. Après 4 semaines de récupération postopératoire, un premier audiogramme était réalisé sur une gamme de fréquences s'échelonnant de 2 à 32 kHz. Les mesures audiométriques étaient de nouveau effectuées 4 semaines après la fin de l'exposition au toluène.

#### Exposition :

Les animaux étaient exposés à 1750 ppm de toluène durant quatre semaines puis à 2000 ppm pendant deux semaines, six heures par jour pendant cinq jours consécutifs.

#### Induction :

Au cours de l'exposition, les rats étaient traités quotidiennement (5j/s) par une injection sous-cutanée de 50 mg/kg de PhB. Durant le week-end, le PhB était ajouté à l'eau de boisson (0,1%) pour maintenir l'induction pendant la période d'expérimentation.

#### IV- Groupes expérimentaux

L'expérimentation a été effectuée avec quatre groupes d'animaux (Figure 8) :

- un groupe « Témoin » (n=8)
- un groupe « PhB », les rats étaient traités seulement au phénobarbital (n=8)
- un groupe « TOL », les rats étaient exposés au toluène (n=8)
- un groupe « TOL PhB », les animaux étaient traités au phénobarbital puis exposés au toluène (n=8).

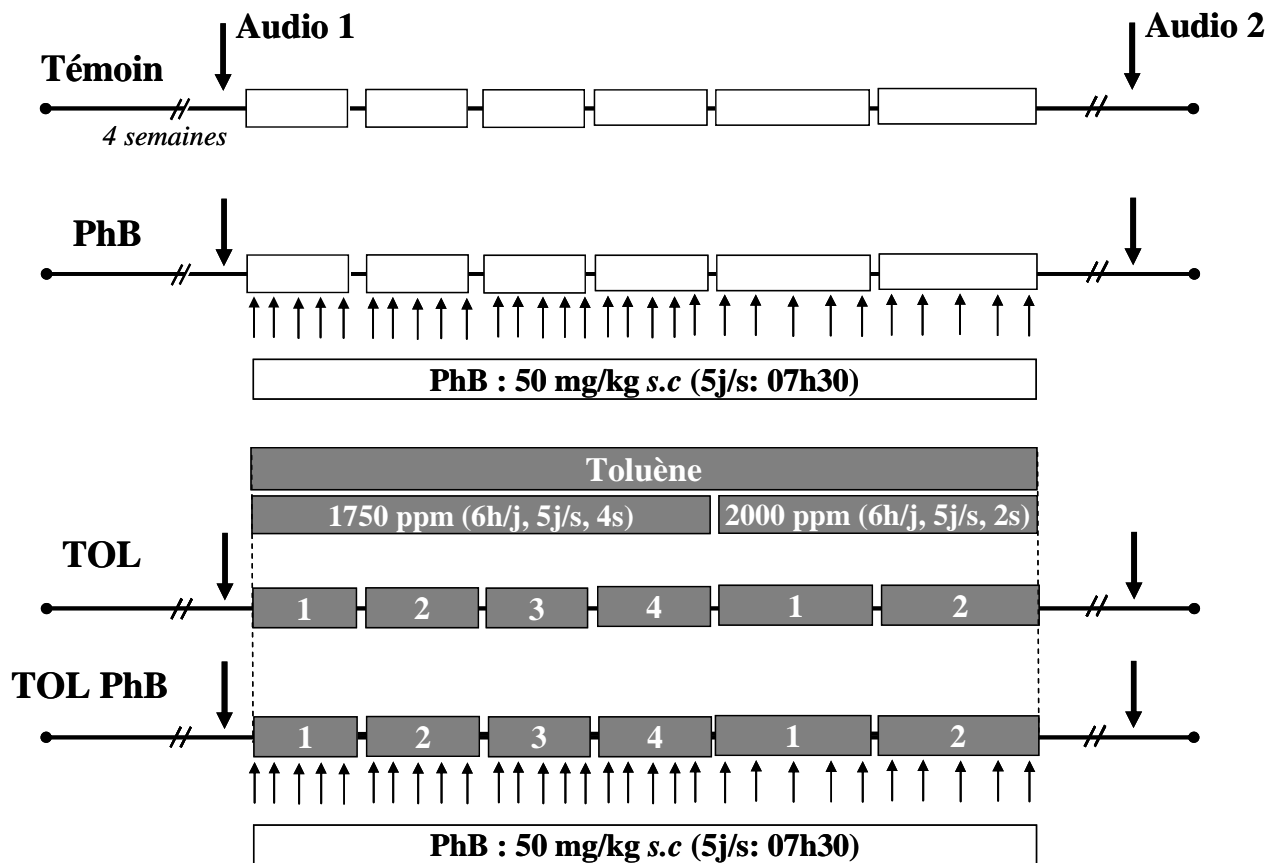


Figure 8 : Groupes expérimentaux. TOL : toluène (1750 et 2000 ppm), PhB : phénobarbital (50 mg/kg).

## Étude B : Ethanol.

### Inhibition compétitive entre toluène et éthanol chez le rat

#### I- Choix de l'inhibiteur compétitif des voies d'oxydation et de conjugaison

L'éthanol peut interférer avec le catabolisme d'un solvant aromatique inhalé comme le toluène (Waldron *et al.*, 1983 ; Wallen *et al.*, 1984 ; Manzo *et al.*, 1994). De telles interférences ont été expliquées par l'inhibition des enzymes impliquées dans le métabolisme de détoxification par le solvant (Sato *et al.*, 1980 ; 1981 ; Hjelm *et al.*, 1994). En fait, une absorption aiguë d'éthanol lors d'une exposition à un solvant aromatique ralentit la clairance de ce dernier et prolonge sa présence dans le sang circulant (Römer *et al.*, 1986 ; Cherry, 1993 ; Watanabe *et al.*, 1993). Ce phénomène pourrait augmenter la toxicité du solvant.

Étant donné que l'éthanol exerce une compétition inhibitive sur les voies de métabolisation du toluène, il a été naturellement choisi comme inhibiteur de référence (Figure 9).

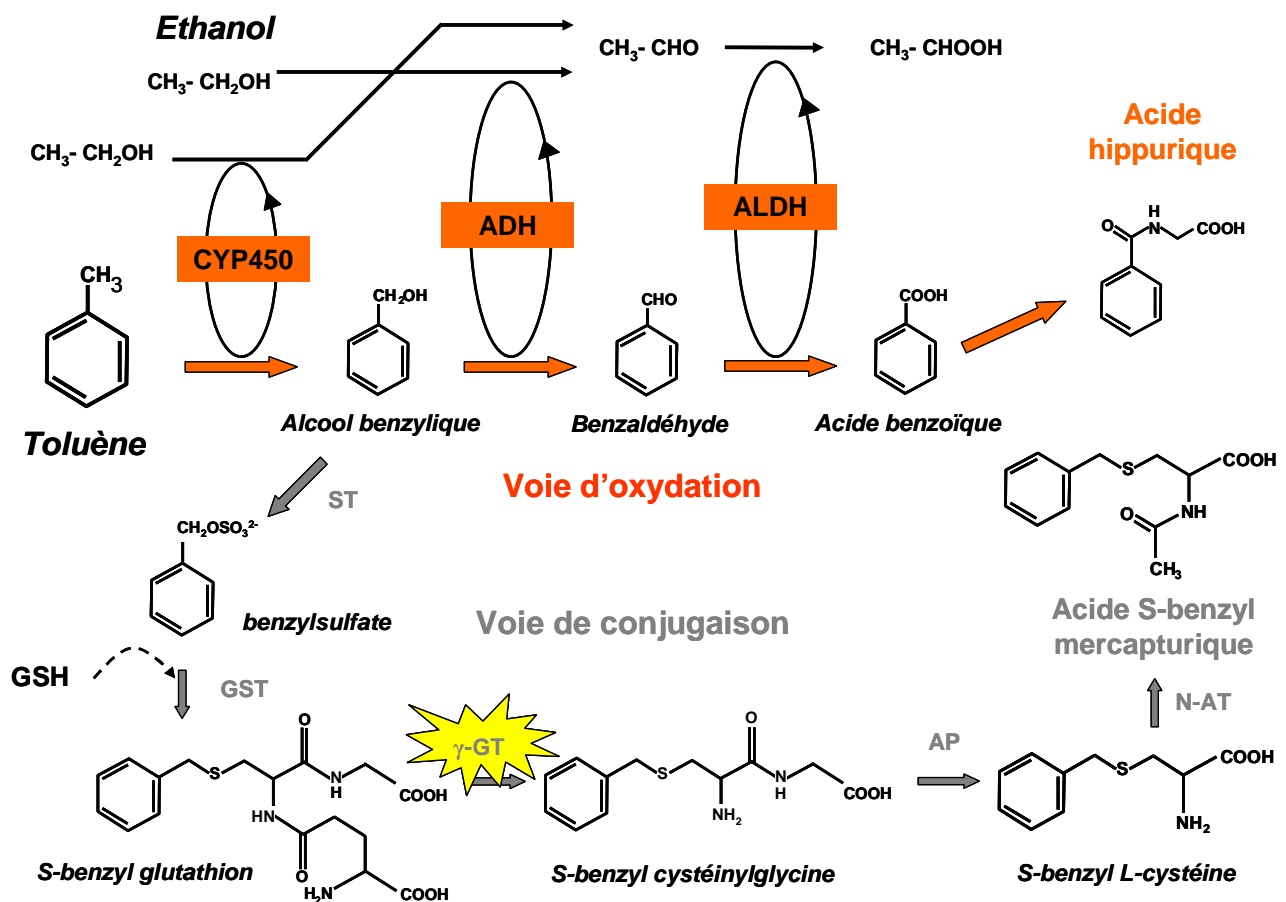


Figure 9 : Inhibition compétitive entre éthanol et toluène chez le rat. CYP450 : cytochrome P450, ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, ST : sulfotransférase, GST : glutathion S-transférase,  $\gamma$ -GT :  $\gamma$ -glutamyltransférase, AP : aminopeptidase, N-AT : N-acétyltransférase.



## II- Évaluation de l'inhibition

L'inhibition compétitive des voies de détoxication du toluène par l'éthanol a été évaluée en comparant les variations de toluène sanguin dans deux groupes d'animaux. Le premier recevait un bolus de 300 µL de véhicule (intralipide) contenant 14 µL de toluène, tandis que le second était gavé à l'éthanol, à raison de 4 g/kg, avant de recevoir l'injection du bolus par voie intra-jugulaire.

Au cours de l'étude B décrite ci-après, les concentrations des métabolites urinaires (AH et ABM) ont été mesurées pour contrôler l'efficacité de l'inhibition compétitive au cours de l'exposition au toluène.

## III- Protocole expérimental

L'étude B a été réalisée selon le protocole illustré par la figure 10.

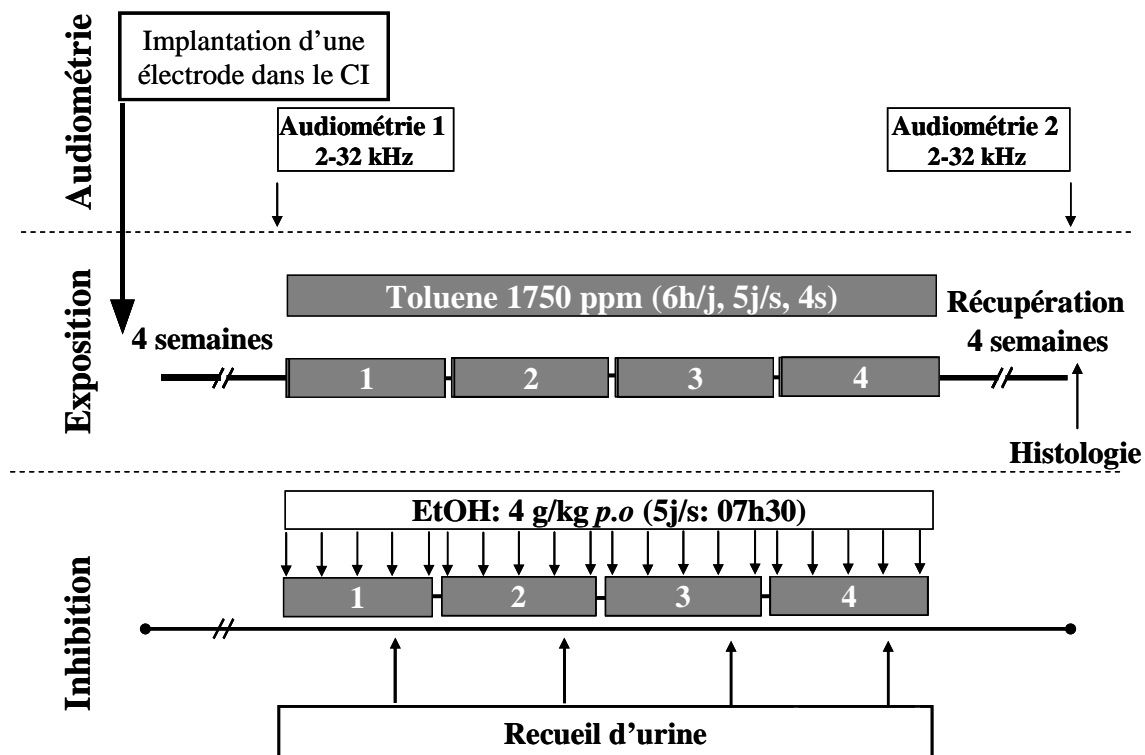


Figure 10 : Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines : 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Gavage à 4 g/kg d'éthanol. CI : colliculus inférieur.

Audiométrie :

Les animaux étaient équipés d'une électrode dans le colliculus inférieur. Après 4 semaines de récupération postopératoire, un premier audiogramme était réalisé sur une gamme de fréquences s'échelonnant de 2 à 32 kHz. Les mesures audiométriques étaient de nouveau effectuées 4 semaines après la fin de l'exposition au toluène.

Exposition :

Les animaux étaient exposés à 1750 ppm de toluène pendant quatre semaines, six heures par jour, pendant cinq jours consécutifs.

Inhibition compétitive :

Au cours de l'exposition, les rats étaient gavés quotidiennement (5j/sem) avec une solution d'éthanol à raison de 4g/kg, une heure avant le début de l'exposition au toluène.

**IV- Groupes expérimentaux**

L'expérimentation a été effectuée avec quatre groupes d'animaux (Figure 11) :

- un groupe « Témoin » (n=8)
- un groupe « EtOH », les rats étaient gavés à l'éthanol à raison de 4g/kg (n=8)
- un groupe « TOL », les rats étaient exposés au toluène (n=8)
- un groupe « TOL EtOH », les animaux étaient gavés à l'éthanol puis exposés au toluène (n=8).

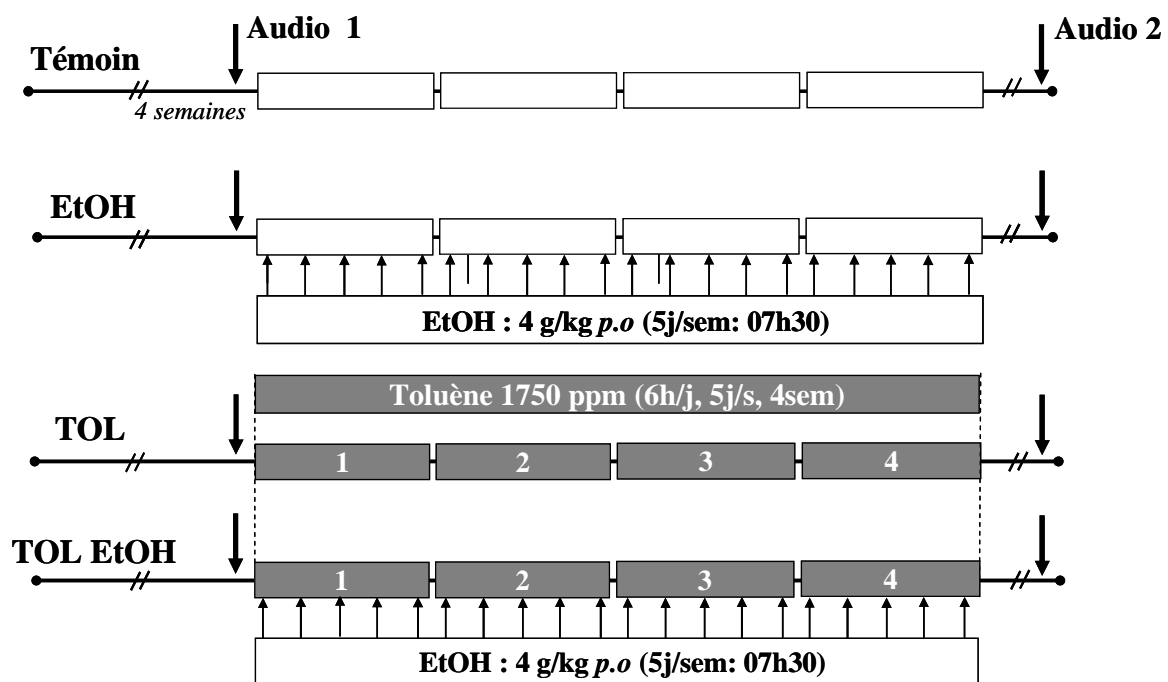


Figure 11 : Groupes expérimentaux. TOL : toluène (1750 ppm), EtOH : Ethanol (4g/kg).

## Étude C : Acivicine.

### Inhibition de la voie de conjugaison du toluène chez le rat

#### I- Choix de l'inhibiteur de la voie de conjugaison

Puisque l'objectif de l'étude C était d'étudier l'impact des dérivés cystéinés sur l'ototoxicité, l'inhibition de la voie de conjugaison s'est limitée à celle des  $\gamma$ -GT.

Le complexe Ser-Borate aurait pu être employé pour inhiber les  $\gamma$ -GT (Suresh *et al.*, 1978). Ce complexe, de part la fonction alcool de la sérine, interagit avec le groupement carboxylique des  $\gamma$ -GT formant un ester. Mais l'inhibition par le complexe Ser-Borate est un processus réversible ; dès lors, l'enzyme regagne son activité. Par conséquent il n'aurait pas été judicieux de choisir un inhibiteur réversible pour une étude chronique car la durée d'inhibition ne pouvait pas être maîtrisée.

L'acide  $\alpha$ -Amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacétique (Aci), antibiotique anti-tumoral (Poster *et al.*, 1981), est un inhibiteur des  $\gamma$ -GT (Stole *et al.*, 1994) qui se fixe au niveau du site actif de l'enzyme. Tout comme le complexe Ser-Borate, l'Aci se lie à l'enzyme par une réaction d'estérification. Mais contrairement au complexe Ser-Borate la liaison avec l'Aci est irréversible, ce dernier occupant le site actif des  $\gamma$ -GT rend impossible le transport du peptide lors de la phase de conjugaison (Figure 12).

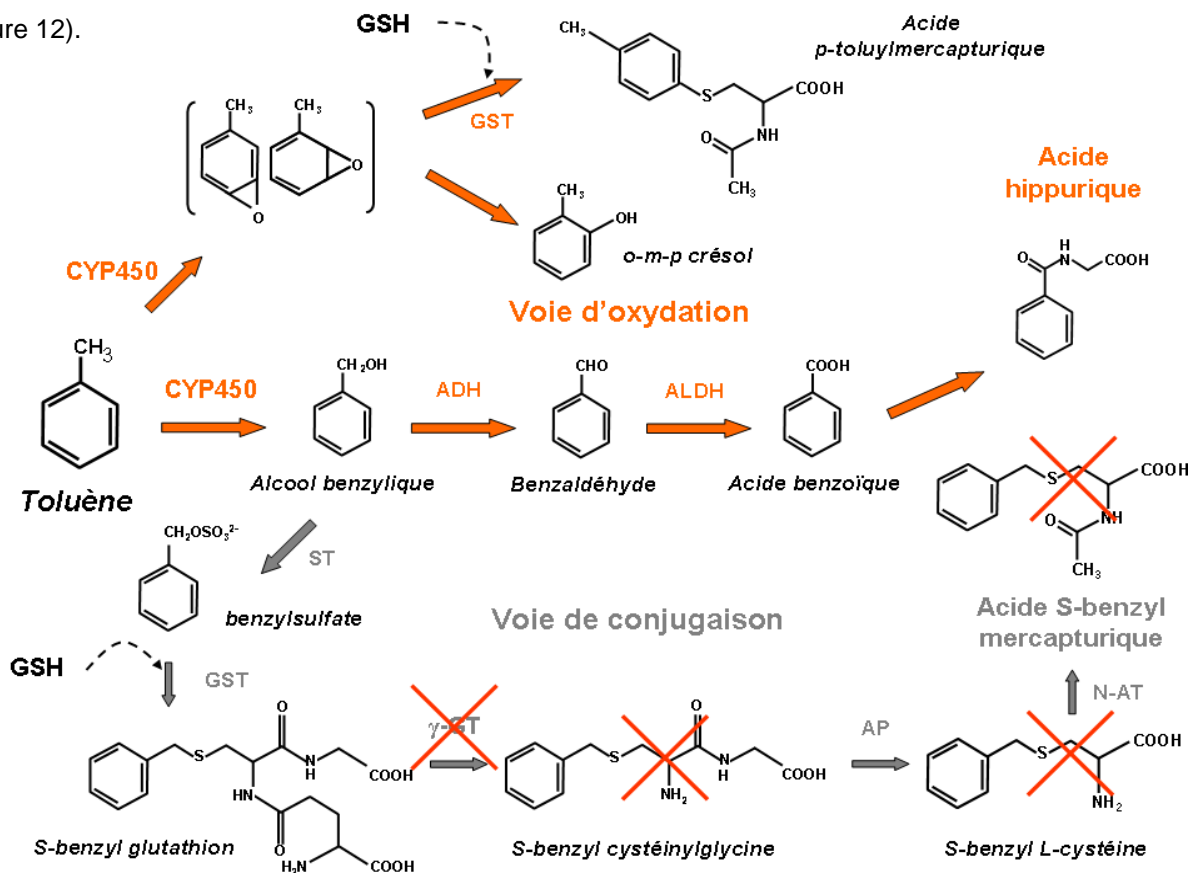


Figure 12 : Inhibition de la voie de conjugaison du toluène par l'acivicine chez le rat. CYP450 : cytochrome P450, ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, ST : sulfotransférase, GST : glutathion S-transférase,  $\gamma$ -GT :  $\gamma$ -glutamyltransférase, AP : aminopeptidase, N-AT : N-acétyltransférase.

## II- Évaluation de l'inhibition

L'efficacité de l'inhibition de la voie de conjugaison a été mesurée par dosage des  $\gamma$ -GT urinaires lors d'une étude pilote. Puis, au cours de l'exposition, les dosages d'AH et d'ABM urinaires ont permis de contrôler l'impact d'un traitement à l'Aci sur l'équilibre entre la voie oxydative et la voie de conjugaison.

## III- Protocole expérimental

L'étude C a été réalisée selon le protocole illustré par la figure 13.

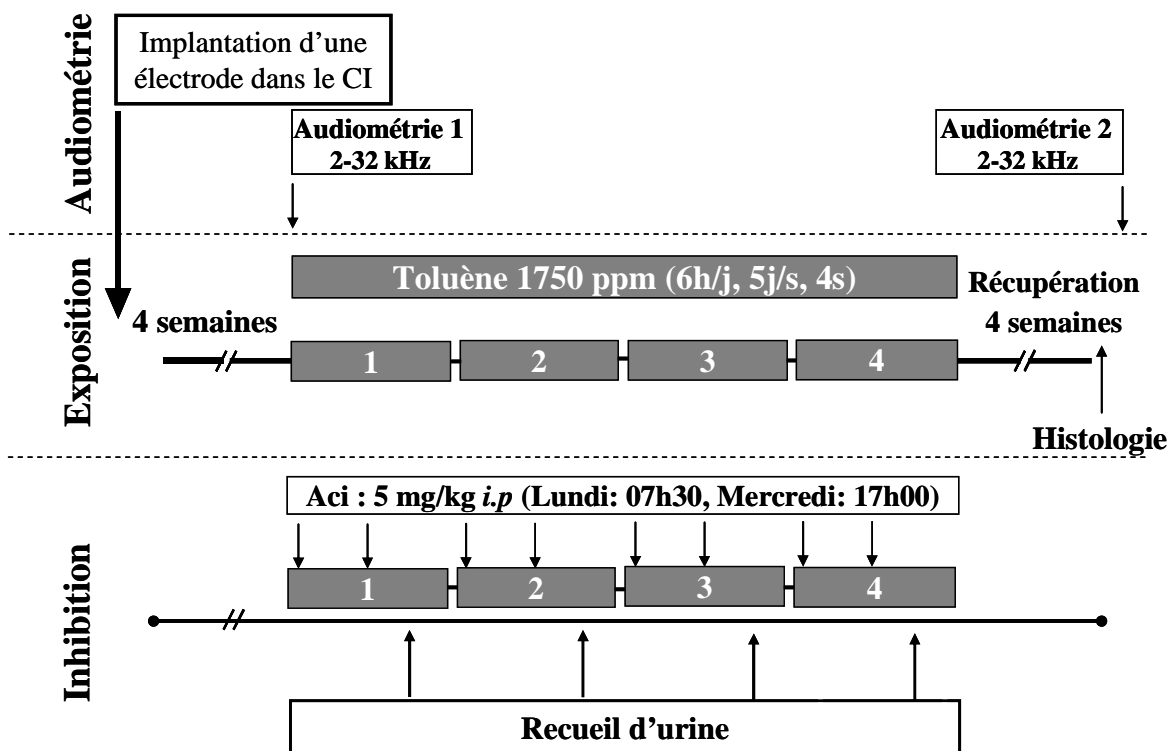


Figure 13 : Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines : 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Traitement : acivicine (5 mg/kg *i.p.*). CI : colliculus inférieur.

### Audiométrie :

Les animaux étaient équipés d'une électrode dans le colliculus inférieur. Après quatre semaines de récupération postopératoire, un premier audiogramme était réalisé sur une gamme de fréquences s'échelonnant de 2 et 32 kHz. Les mesures audiométriques étaient de nouveau effectuées 4 semaines après la fin de l'exposition au toluène.

Exposition :

Les animaux étaient exposés à 1750 ppm de toluène durant quatre semaines six heures par jour pendant cinq jours consécutifs.

Inhibition :

Au cours de l'exposition, les rats recevaient une injection *i.p.* d'Aci à raison de 5 mg/kg le lundi matin à 7h30 et le mercredi soir à 17h30.

**IV- Groupes expérimentaux**

Comme lors de l'étude précédente, l'expérimentation a été effectuée avec quatre groupes d'animaux (Figure 14) :

- un groupe « Témoin » (n=8)
- un groupe « Aci », les rats recevaient seulement l'acivicine (n=8)
- un groupe « TOL », les rats étaient exposés au toluène (n=8)
- un groupe « TOL Aci », les rats recevaient l'acivicine puis étaient exposés au toluène (n=8).

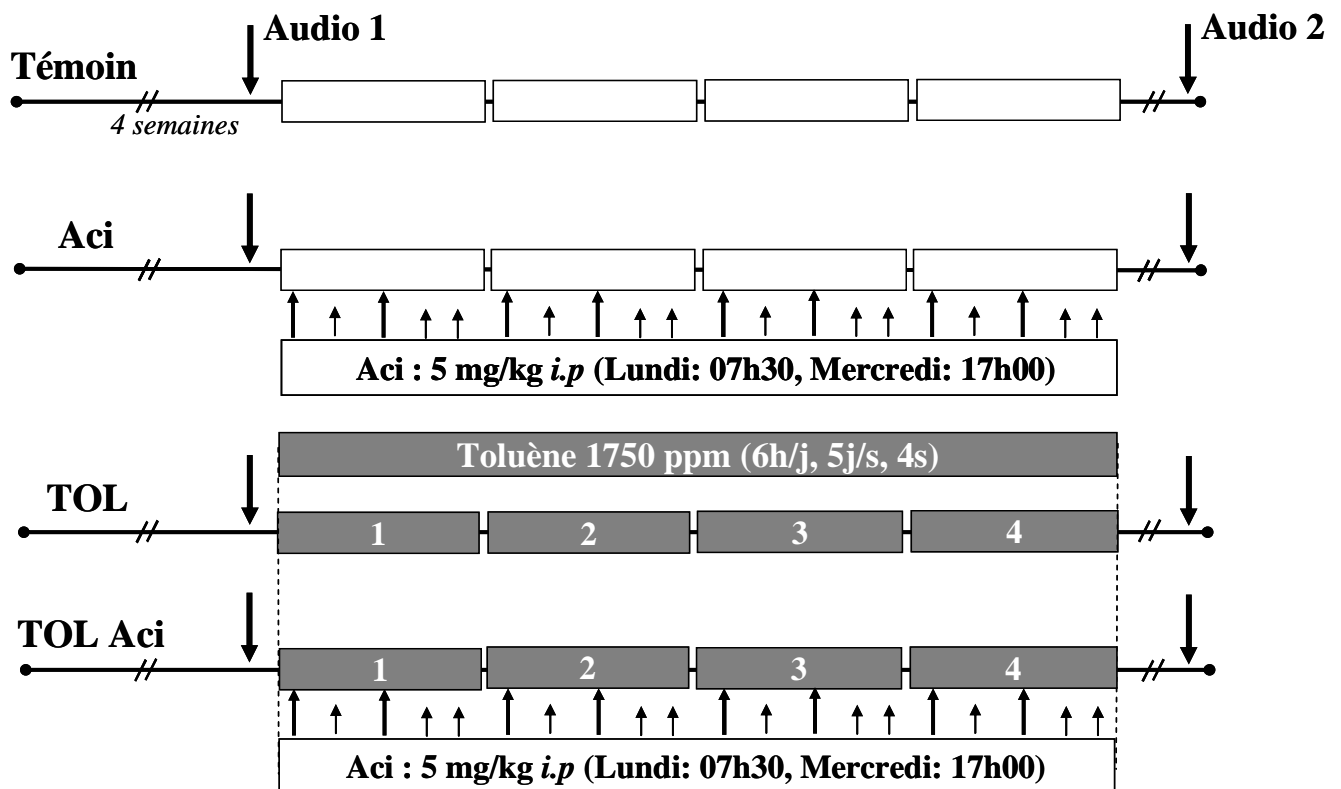


Figure 14 : Groupes expérimentaux. TOL : 1750 ppm, Aci : Acivicine (5 mg/kg).

## **Étude D : SKF 525-A et régime hypoprotéiné à 7%. Inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène chez le rat**

### **I- Choix de l'inhibiteur des voies d'oxydation et de conjugaison**

Pour évaluer l'impact de la molécule mère sur l'ototoxicité du toluène, une étude préalable des inhibiteurs des CYP450 s'est révélée indispensable.

L'alcool déshydrogénase aurait pu être inhibée par le méthylpyrazole (Chen *et al.*, 1995) ou l'aldéhyde déshydrogénase par le 4-hydroxynonanal (Mitchell *et al.*, 1991), mais ces enzymes interviennent après la formation de l'alcool benzylique. Il était donc plus efficace d'inhiber directement les CYP450 dont les plus importants sont les CYP 2E1.

Plusieurs inhibiteurs des CYP 2E1 étaient disponibles mais certains ne pouvaient être utilisés dans notre contexte expérimental.

Le propofol est un inhibiteur compétitif des CYP 2E1 (Lejus *et al.*, 2002). Il est utilisé en clinique mais modifie les potentiels auditifs évoqués (Nishiyama, 2005). En conséquence, le propofol n'a pas été retenu pour notre investigation.

Le dithiocarbamate est connu pour son action inhibitrice des CYP 2E1 et des ALDH (Saadeddin *et al.*, 2004), mais il crée des lésions au niveau de la muqueuse olfactive (Deamer *et al.*, 1995) pouvant modifier l'absorption du toluène inhalé lors de l'exposition : le dithiocarbamate était donc incompatible avec notre étude.

Enfin, le malotilate utilisé comme agent anti-cirrhotique (Takase *et al.*, 1989), diminue également l'expression des CYP 2E1. Le mécanisme d'action du malotilate est encore mal connu. Il semblerait qu'il altère soit l'efficacité de la traduction, soit l'activation de l'enzyme (Kim *et al.*, 1994). Le malotilate n'a pas été retenu car l'inhibition des CYP 2E1 peut être contrebalancée par l'utilisation d'autres CYP450. Ne voulant pas prendre le risque d'induire d'autres CYP450 que les CYP 2E1 lors de notre expérimentation, nous avons privilégié un inhibiteur aspécifique des CYP450 : le 2,2-diphénylpentanoate de 2-(diéthylamino)-éthyle [SKF 525-A] (Figure 15).

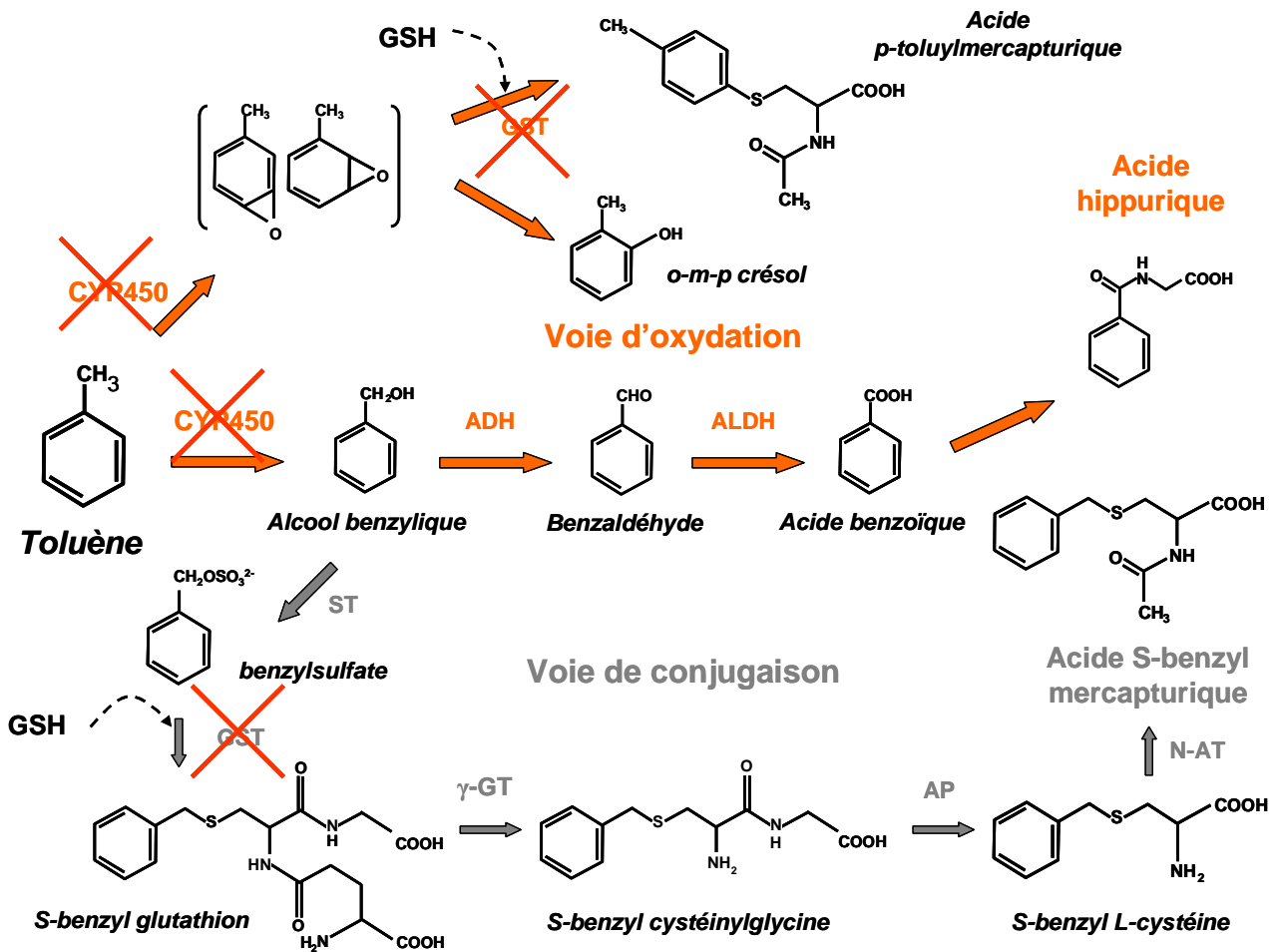


Figure 15: Inhibition aspécifique des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène par le SKF525-A chez le rat. CYP450 : cytochrome P450, ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, ST : sulfotransférase, GST : glutathion S-transférase,  $\gamma$ -GT :  $\gamma$ -glutamyltransférase, AP : aminopeptidase, N-AT : N-acétyltransférase.

Le SKF 525-A est couramment utilisé lors d'études métaboliques axées principalement sur la voie oxydative (Yamamoto *et al.*, 1983 ; Cummings *et al.*, 2001), ou lors d'études pharmacocinétiques pour étudier le profil métabolique de certaines molécules thérapeutiques (Bu *et al.*, 2000). Le SKF est moins connu pour son action sur la voie de conjugaison. Pourtant, il a été démontré que le SKF inhibait l'activité des glutathion S-transférases (Fromowicz *et al.*, 1987). Le mode d'action du SKF n'est pas encore connu, il peut se comporter comme un inhibiteur compétitif, non compétitif ou substrat mimétique, cela dépend beaucoup de la molécule qui lui est associée : barbital, aniline, o-nitroanisole (Anders, 1971).

Pour renforcer l'inhibition aspécifique des CYP450 par le SKF, un régime hypoprotéiné lui a été associé. Tout au long de l'expérimentation, les rats ont été alimentés par un régime hypoprotéiné à 7% (tableau 1) qui avait également pour vertu d'inhiber la voie de conjugaison de part sa composition appauvrie en acides aminés soufrés (Lautermann *et al.*, 1995b).

Tableau 1 : Composition des deux régimes utilisés lors de l'étude D et E : régime standard, régime hypoprotéiné.

%	Régimes	
	Standard	Hypoprotéiné
Protéines	16.0	7.0
Glucides assimilables	50.5	50.0
Fibres	13.3	26.0
Minéraux	6.0	4.0
Lipides	3.5	6.0
Humidité	10.0	7.0
Méthionine	0.21	0.09
Cystéine	0.25	0.10

Le régime standard se compose de 16% de protéines et de 13,3% de fibres. Tandis que le régime hypoprotéiné ne comporte que 7% de protéines, cet appauvrissement en protéines est contrebalancé par un apport supplémentaire en fibres de 26%. Ce régime contient également deux fois moins d'acides aminés soufrés (méthionine, cystéine) qui sont indispensables à la synthèse du glutathion. Leur diminution dans l'alimentation a pour conséquence de réduire le stock de glutathion disponible pour la détoxification par conjugaison (Lautermann *et al.*, 1995a).

Il est à noter que les animaux suivaient ces différents régimes quatre semaines avant l'exposition au toluène.

## II- Évaluation de l'inhibition

Au cours d'une étude pilote, l'inhibition de la voie oxydative a été vérifiée par les dosages de l'activité des CYP 2E1 hépatiques et du toluène circulant pour mettre en évidence l'efficacité du SKF. Puis au cours de l'exposition, les dosages d'AH et d'ABM urinaires ont été effectués pour contrôler l'inhibition des voies oxydative et de conjugaison. Enfin, les dosages des CYP450 hépatiques totaux et du glutathion hépatique ont été réalisés pour évaluer l'incidence du régime appauvri en acides aminés soufrés sur la synthèse des CYP450 et du glutathion.



### III- Protocole expérimental

L'étude D a été réalisée selon le protocole illustré par la Figure 16.

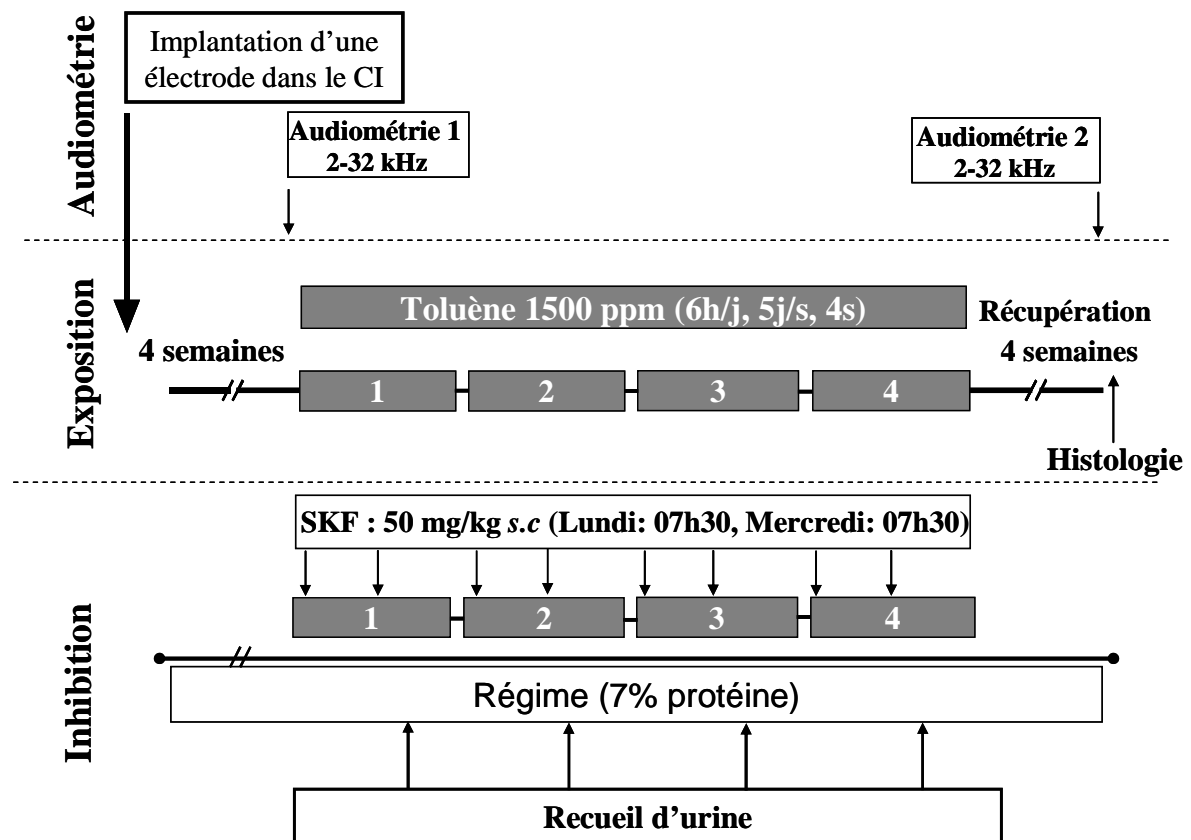


Figure 16 : Exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Traitement : SKF-525A (50 mg/kg s.c), régime hypoprotéiné 7%. CI : colliculus inférieur.

#### Audiométrie :

Les animaux étaient équipés d'une électrode dans le colliculus inférieur. Après quatre semaines de récupération post-opératoire, un premier audiogramme était réalisé sur la gamme de fréquences s'échelonnant de 2 et 32 kHz. Les mesures audiométriques étaient de nouveau effectuées quatre semaines après la fin de l'exposition au toluène.

#### Exposition :

Les animaux étaient exposés à 1500 ppm de toluène durant quatre semaines six heures par jour pendant cinq jours consécutifs. Lors de l'étude D, la concentration de toluène a été diminuée par rapport aux études A, B et C car on s'attendait, par le traitement au SKF inhibant l'activité des CYP450, à augmenter les surdités et pertes cellulaires par rapport aux animaux exposés seulement au toluène. De ce fait, la concentration d'exposition au toluène a été diminuée pour éviter une saturation.

#### Inhibition :

Au cours de l'exposition, les rats étaient traités deux fois par semaine (lundi et mercredi) au SKF (50 mg/kg, s.c.) et suivaient un régime hypoprotéiné à 7% au cours de l'expérimentation.

## IV- Groupes expérimentaux

L'expérimentation a été effectuée avec huit groupes d'animaux soumis au :

Régime standard à 16% de protéines (Figure 17) :

- un groupe « Témoin », (n=5)
- un groupe « SKF », les rats étaient seulement traités au SKF (n=5)
- un groupe « TOL », les rats étaient seulement exposés au toluène (n=5)
- un groupe « TOL SKF », les rats étaient traités au SKF et étaient exposés au toluène (n=8).

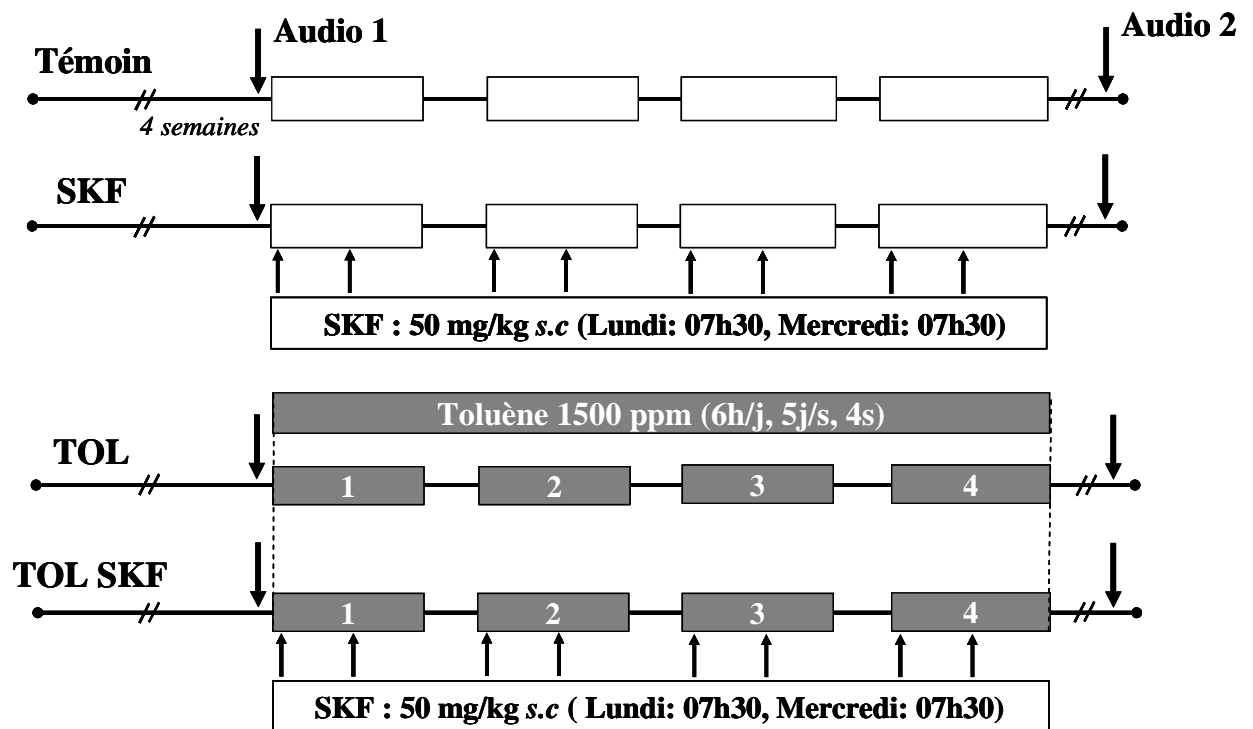


Figure 17 : Groupes expérimentaux. TOL : toluène (1500 ppm), SKF : 50 mg/kg.

## Régime hypoprotéiné à 7% (Figure 18) :

- un groupe « DEP », les rats suivaient seulement un régime (n=5)
- un groupe « SKF DEP », les rats étaient traités au SKF et suivaient un régime (n=5)
- un groupe « TOL DEP », les rats suivaient un régime et étaient exposés au toluène (n=8)
- un groupe « TOL SKF DEP », les rats étaient traités au SKF, suivaient un régime et étaient exposés au toluène (n=8).

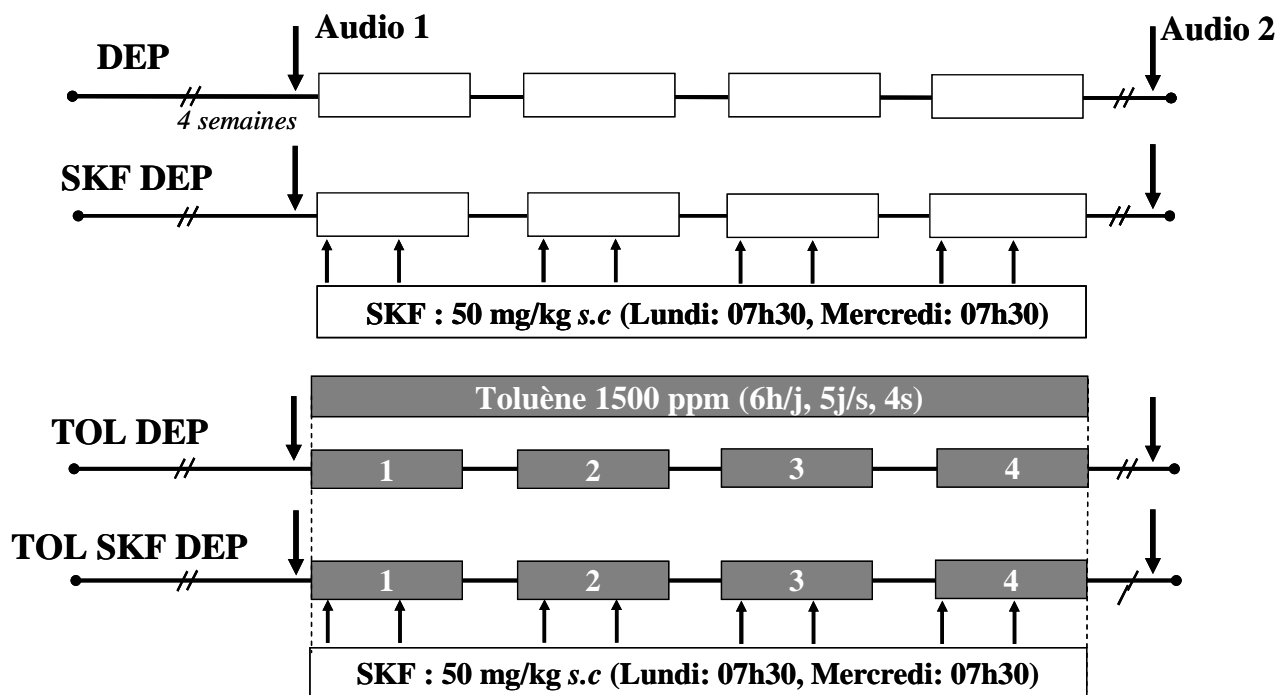


Figure 18 : Groupes expérimentaux. TOL : toluène (1500 ppm), SKF : 50 mg/kg, DEP : régime hypoprotéiné à 7%.

## Étude E : SKF-525A et régime hypoprotéiné à 7%. Inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène chez le cobaye

### I- Choix de l'inhibiteur des voies oxydative et de conjugaison

Pour les mêmes raisons énoncées lors de l'étude D, le choix de l'inhibiteur des voies d'oxydation et de conjugaison s'est porté sur un traitement au 2,2-diphénylpentanoate de 2-(diéthylamino)-éthyle (SKF 525-A). Les animaux suivaient également un régime hypoprotéiné à 7% pour renforcer l'inhibition des voies oxydative et de conjugaison (Figure 19).

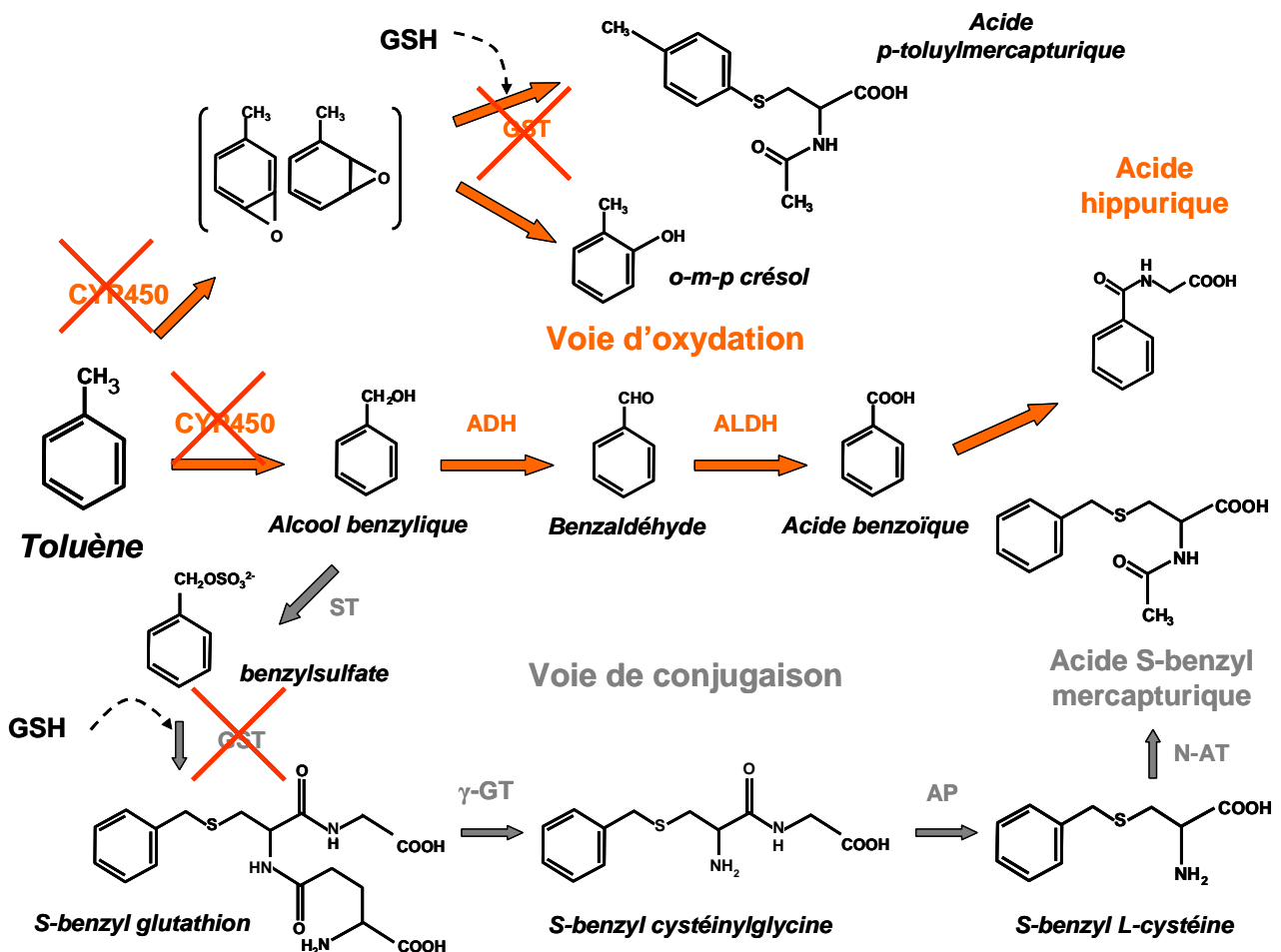


Figure 19 : Inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène par le SKF525-A chez le cobaye. CYP450 : cytochrome P450, ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, ST : sulfotransférase, GST : glutathion S-transférase, γ-GT : γ-glutamyltransférase, AP : aminopeptidase, N-AT : N-acétyltransférase.

## II- Évaluation de l'inhibition

Comme précédemment, l'inhibition de la voie oxydative a été vérifiée d'une part, par le dosage des CYP450 hépatiques totaux pour apprécier l'efficacité du régime et d'autre part, par le dosage de l'activité des CYP 2E1 pour confirmer l'efficacité du traitement au SKF. De plus, le dosage *a posteriori* du glutathion hépatique a été réalisé pour évaluer la perturbation de la synthèse du glutathion engendrée par le régime appauvri en acides aminés soufrés.

Enfin, des dosages d'AH et d'ABM urinaires ont été effectués pour contrôler l'inhibition des voies oxydative et de conjugaison au cours de l'exposition.

## III- Protocole expérimental

L'étude E a été réalisée selon le protocole illustré par la Figure 20.

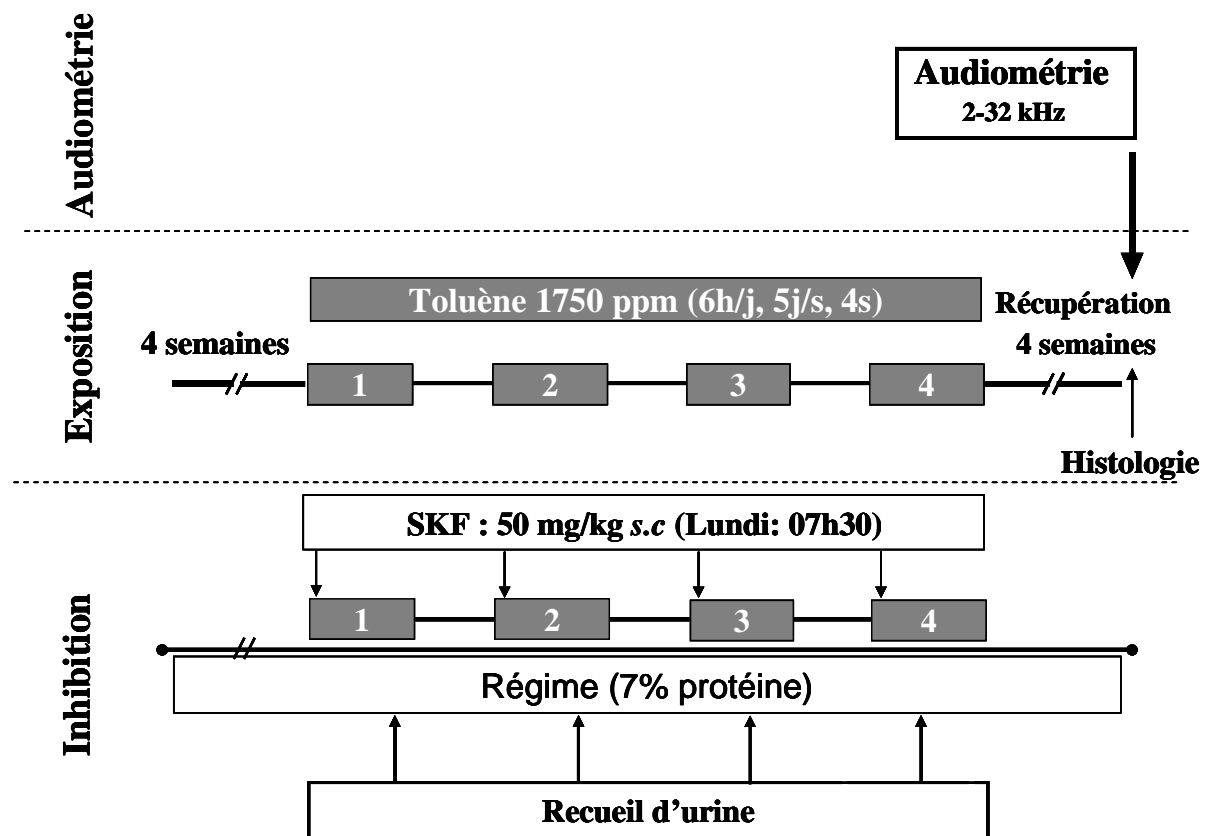


Figure 20 : Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Traitement : injection de SKF-525A (50 mg/kg s.c), régime hypoprotéiné 7%.

Audiométrie :

Au terme des quatre semaines de récupération, les animaux étaient équipés d'une électrode sur la fenêtre ronde pour déterminer leurs seuils auditifs sur une gamme de fréquences s'échelonnant de 2 à 32 kHz.

Exposition :

Les animaux étaient exposés à 1750 ppm de toluène pendant quatre semaines, une semaine sur deux, six heures par jours pendant cinq jours consécutifs.

Inhibition :

Au cours de l'exposition, les cobayes étaient traités par une injection s.c. de 50 mg/kg de SKF. Les cobayes ont suivi un régime hypoprotéiné à 7% au cours de l'expérimentation pour maintenir une inhibition constante des voies oxydative et de conjugaison.

**IV- Groupes expérimentaux**

L'expérimentation a été effectuée avec huit groupes d'animaux soumis au :

Régime standard à 16% de protéines (Figure 21) :

- un groupe « Témoin » (n=5)
- un groupe « SKF », les cobayes étaient seulement traités au SKF (n=5)
- un groupe « TOL », les cobayes étaient seulement exposés au toluène (n=5)
- un groupe « TOL SKF », les cobayes étaient traités au SKF et étaient exposés au toluène (n=5).

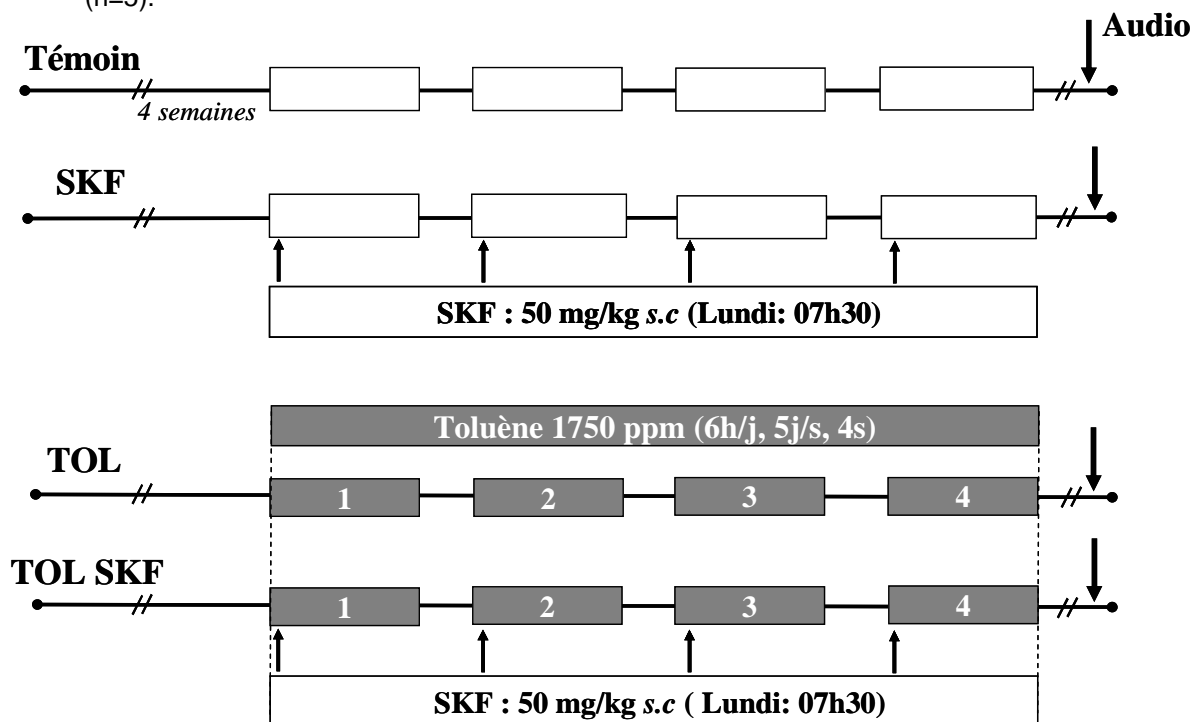


Figure 21 : Groupes expérimentaux. TOL : toluène (1500 ppm), SKF : 50 mg/kg.

## Régime hypoprotéiné à 7% (Figure 22) :

- un groupe « DEP », les cobayes suivaient seulement un régime (n=5)
- un groupe « SKF DEP», les cobayes étaient traités au SKF et suivaient un régime (n=8)
- un groupe « TOL DEP », les cobayes suivaient un régime et étaient exposés au toluène (n=10)
- un groupe « TOL SKF DEP », les cobayes étaient traités au SKF, suivaient un régime et étaient exposés au toluène (n=7).

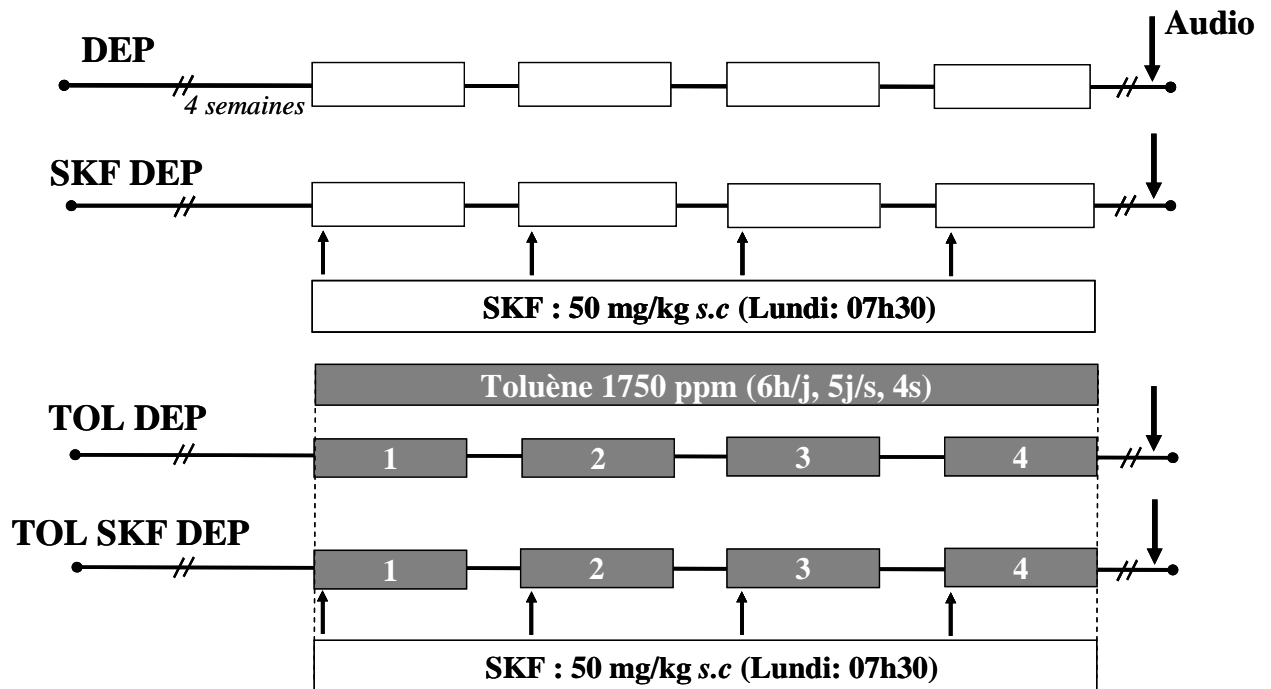


Figure 22 : Groupes expérimentaux. TOL : toluène (1500 ppm), SKF : 50 mg/kg, DEP : régime hypoprotéiné à 7%.

# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**



## Animaux



Les expériences ont été réalisées sur des rats Long-Evans (250-300g) et des rats OFA (300-350g) provenant des Laboratoires Janvier (Le Genest, France). Pendant toute la durée de l'expérimentation, les animaux étaient maintenus en cages (350 x 180 x 184 mm) individuelles en polycarbonate garnies de rafles de maïs (LAB COB 12, irradié, Dietex), d'une alimentation standardisée (UAR A04, safe) et d'eau à volonté.

Les expériences ont également été réalisées sur des cobayes Dunkin Hartley (350-400g) provenant des laboratoires Charles River (France). Comme les rats, les cobayes étaient placés en cages (405 x 255 x 197) individuelles en polycarbonate garnie de rafles de maïs, avec une alimentation standardisée (106-10, safe) et de l'eau à volonté. Pour les études D et E, l'alimentation standardisée chez les rats et les cobayes était remplacée par une alimentation spécifique moins riche en protéines pour les groupes déplétés (§ IV p32 et § IV p36). Lorsque les animaux étaient soumis à un régime hypoprotéiné, leur litière était remplacée par une litière à base de cellulose (alpha dri, irradié, Dietex) afin d'éviter tout apport externe de protéines dissimulé dans la composition de la litière à base de rafles de maïs.



Le local de stabulation était éclairé tous les jours de 7h00 à 19h00 et maintenu à une température de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . L'humidité relative de l'air était de 50 à 55%. La santé des animaux était étroitement surveillée notamment par une pesée quotidienne des rats et des cobayes. Les animaux étaient également examinés tout au long des expérimentations : respiration, tonus musculaire, aspect de la peau et du pelage, fèces. Les expériences ont été menées dans le respect de la Convention Européenne de 1986 sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à des fins scientifiques.

# Électrophysiologie

## I- Anesthésie des animaux

### I-1. Anesthésie des rats

Les rats étaient préanesthésiés avec une injection intra-péritonéale (*i.p.*) d'une solution composée de lévomépromazine (20 mg/kg) et de sulfate d'atropine (0,15 mg/kg). Dix minutes plus tard, l'anesthésie était induite par injection en *i.p.* d'un mélange de kétamine (45 mg/kg) et de xylazine (6 mg/kg). Pendant toute la durée de l'anesthésie, la température du rat était maintenue à 36 °C à l'aide d'une couverture chauffante.

### I-2. Anesthésie des cobayes

Contrairement au rat, les tests audiométriques se sont déroulés sous anesthésie générale chez le cobaye. Les cobayes étaient préanesthésiés avec une injection en *i.p.* d'une solution composée de chlorhydrate de médétomidine et de sulfate d'atropine (0,15 mg/kg). Puis, l'anesthésie était induite par injection en *i.p.* d'un mélange de kétamine (45 mg/kg) et de xylazine (6 mg/kg). Pendant toute la durée de l'anesthésie, la température du cobaye était maintenue à 37 °C à l'aide d'une couverture chauffante.

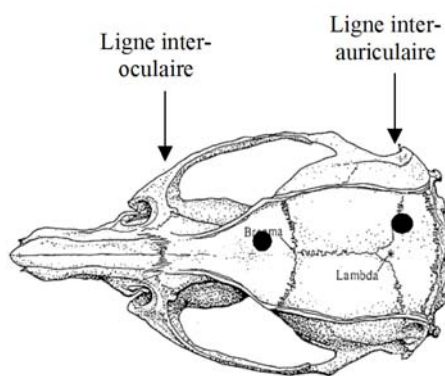
Avant l'implantation des électrodes, les rats comme les cobayes anesthésiés ont subi un examen otoscopique pour déceler une éventuelle anomalie tympanique.

## II- Préparation des animaux

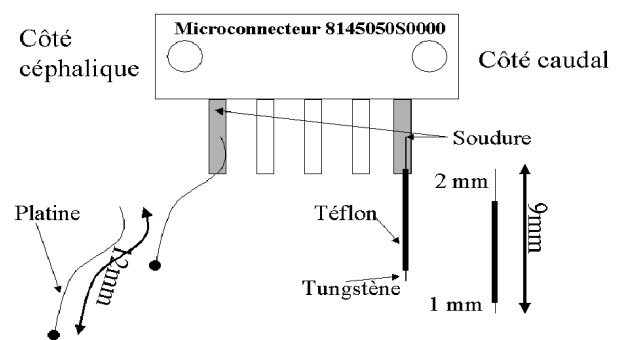
### II-1. Implantation des électrodes chez le rat

Les rats anesthésiés étaient tondu sur le crâne et autour des oreilles pour éviter que des poils de l'animal ne viennent ensuite contaminer les berges de la plaie. La zone de chirurgie obtenue était badigeonnée avec de la bétadine. Une incision cutanée antéro-postérieure était pratiquée de la ligne inter-oculaire à la ligne inter-auriculaire. Les résidus musculo-aponévrotiques étaient éliminés puis le périoste gratté à l'aide d'une rugine. L'os apparent était nettoyé avec de l'eau oxygénée à 3% et dévitalisé par application d'une solution de nitrate d'argent. Le crâne ainsi préparé était recouvert d'une fine couche de colle cyanoacrylate.

L'animal était ensuite placé sur une table stéréotaxique, maintenu par la pièce de gueule et les barres d'oreilles équipées d'entretoises en polyéthylène afin de ne pas blesser le tympan de l'animal. Une craniotomie ( $\varnothing = 1$  mm environ) était ensuite réalisée avec une fraise chirurgicale munie d'une tête diamantée (Dentsply type 012, réf. E012314001200), au-dessus des lobes olfactifs, à l'endroit indiqué sur la Figure 23. Une première électrode en platine (électrode de référence) était placée sur la dure-mère recouvrant les lobes olfactifs. Tandis qu'une seconde (électrode active), en tungstène gainée de Téflon®, était implantée dans le colliculus inférieur droit aux coordonnées suivantes par rapport au bregma : antéro-postérieure : -8,5 mm, latérale : 1,6 mm, profondeur : 4,5 mm. Les deux électrodes avaient été préalablement soudées à un microconnecteur (Figure 24).



*Figure 23* : Localisation des craniotomies chez le rat.



*Figure 24* : Microconnecteur permettant le recueil des potentiels auditifs évoqués provenant du colliculus inférieur.

Pendant la descente du complexe connecteur-électrodes, une stimulation acoustique était appliquée à l'extrémité de la barre gauche. L'ajustement de la profondeur de descente de l'électrode se faisait à l'aide d'un montage expérimental comprenant un amplificateur différentiel universel (Gain=500 mV ; filtres : LF = 10 Hz ; HF = 100 Hz) associé à un oscilloscope (Gain = 0,1 mV ; base de temps = 10 ms). Le signal évoqué était donc amplifié puis visualisé sur l'oscilloscope. La descente de l'électrode s'arrêtait lorsque l'amplitude du signal acoustique était maximale.

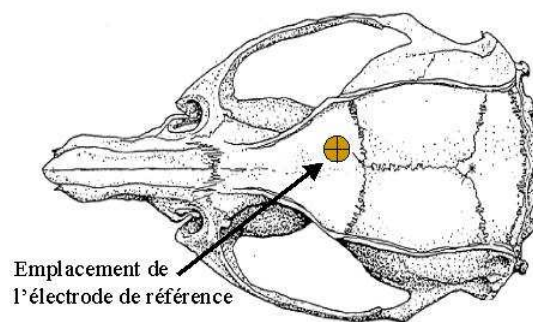
Puis le crâne de l'animal était scellé avec du ciment dentaire pour constituer un casque céphalique. Après polymérisation totale du ciment dentaire, les berges de la plaie étaient recouvertes d'une crème antiseptique (béta-septigen®, Schering-Plough) afin d'éviter toute infection post-opératoire.

Les animaux étaient ensuite placés en ambiance chaude (25 °C) pendant une nuit puis replacés à l'animalerie pour quatre semaines de convalescence.

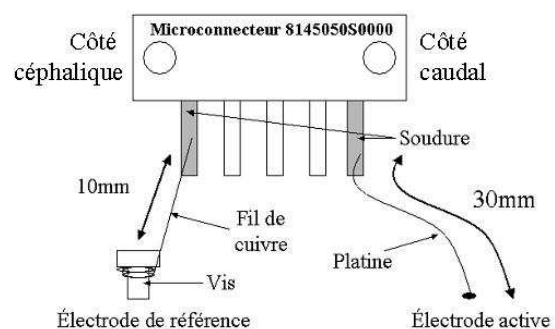
## II-2. Implantation des électrodes chez le cobaye

Afin d'enregistrer des potentiels cochléaires, deux électrodes étaient 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.

Pour ce faire, 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 pour faciliter le maintien du ciment dentaire enrobant le connecteur. Une craniotomie ( $\varnothing = 1$  mm environ) était ensuite réalisée avec une fraise chirurgicale munie d'une tête diamantée, au-dessus des lobes olfactifs, à l'endroit indiqué sur la Figure 25, 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, Figure 26).



*Figure 25 :* Localisation de la craniotomie chez le cobaye en vue de l'insertion de l'électrode de référence.



*Figure 26 :* Connexions des électrodes au microconnecteur permettant le recueil des signaux électrophysiologiques.

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 splénius 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.

Une électrode de 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 avait été préalablement passée sous la flamme d'un chalumeau afin de former une boule.

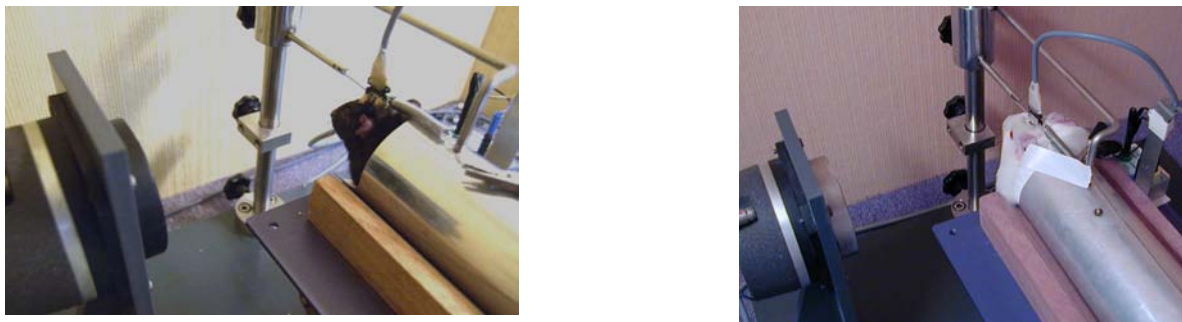
Une fois placée, l'électrode était collée à la bulle et le trou refermé avec du ciment dentaire. L'extrémité libre de l'électrode de mesure était ensuite soudée au microconnecteur et l'incision suturée. Pour finir, le microconnecteur était solidarisé sur le crâne de l'animal avec du ciment dentaire. Les potentiels électrocochléographiques provenant de la fenêtre ronde de la cochlée pouvaient alors être enregistrés avec la bulle tympanique fermée.

### III- Audiométrie chez le rat et le cobaye

Les animaux bio-instrumentés recevaient, par voie *i.p* une dose de lévomépromazine (20 mg/kg) pour limiter le stress de l'animal et faciliter les mesures audiométriques.

L'audiométrie était réalisée dans une cabine insonorisée. Pendant le test, l'animal était placé dans un tube en aluminium maintenu par un système de contention, garantissant une distance constante entre le haut parleur (JBL 2405) et l'oreille testée.

Le stimulus acoustique se faisait selon une incidence perpendiculaire à l'axe sagittal (Figure 27).

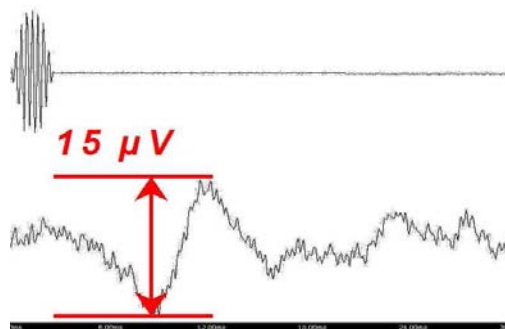


*Figure 27 : Rat et cobaye en contention pendant le recueil de potentiels auditifs évoqués.*

Les stimuli acoustiques étaient des clics filtrés de durée variable (rampes : 2 périodes, plateau : 4 périodes) émis par un équipement acoustique Tucker-Davis-Technologies (TDT, Systeme II). Sept fréquences ont été testées : 2, 4, 8, 12, 16, 20, 32 kHz.

Le signal électrophysiologique était analysé sur une fenêtre de 30 ms pour le rat équipé d'une électrode au niveau du colliculus inférieur et sur une fenêtre de 10 ms pour le cobaye équipé d'une électrode sur la fenêtré ronde. Le signal était amplifié (X 2000), filtré (30-3000 Hz) et moyenné avec 260 acquisitions.

Une amplitude de 15  $\mu V$  du potentiel évoqué auditif était considérée comme le seuil auditif à la fréquence testée (Figure 28).



*Figure 28 : Stimulus acoustique émis (en haut) et potentiel évoqué auditif résultant (en bas).*

## Exposition au toluène

L'exposition des animaux était réalisée dans des chambres d'inhalation de 200 L, dans lesquelles circulaient un flux d'air continu chargé en vapeur de toluène (pureté 99%). Les chambres étaient maintenues sous pression négative (5 mm H<sub>2</sub>O) afin d'éviter d'éventuelles fuites vers l'extérieure. L'air était filtré et conditionné à une température de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ . L'humidité relative de l'air était maintenue à un taux de  $50 \pm 5\%$ .

Chaque chambre pouvait accueillir une cage grillagée en acier inoxydable divisée en huit compartiments individuels (130 x 92 x 200 mm). Au cours des expérimentations, les animaux ne recevaient ni eau ni nourriture. Les animaux témoins étaient placés dans des chambres similaires ventilées à l'air frais. Les vapeurs de toluène étaient obtenues par barbotage du solvant (Figure 29).

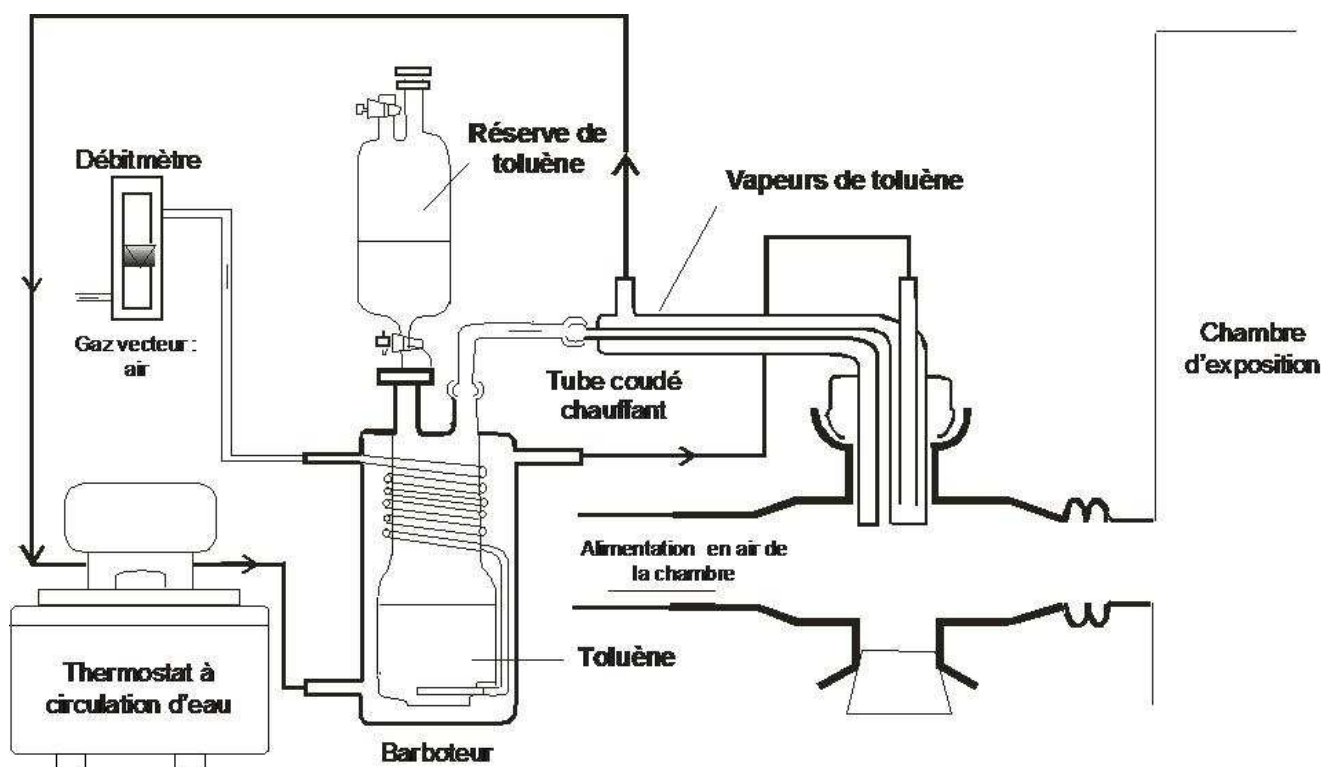


Figure 29 : Système d'exposition: vaporisation chimique par système de barbotage.

L'air comprimé (1 bar, 1 L/min) était envoyé vers le barboteur maintenu à  $80^\circ\text{C}$  par bain-marie où il se chargeait en vapeur de toluène. Ces vapeurs se mélangeaient à l'air conditionné qui véhiculait le toluène dans les chambres d'exposition. La concentration de solvant de consigne (1500, 1750 ou 2000 ppm) était réglée en ajustant le débit d'air qui traversait le barboteur ou en variant la température du barboteur. La concentration de toluène à l'intérieur des chambres était contrôlée toutes les 30 secondes par une mesure faite par un chromatographe en phase gazeuse (Shimadzu, GC 8A) équipé d'un injecteur automatique et d'un détecteur à ionisation de flamme.

# Histologie

## I- Cochléogramme

### I-1. Prélèvement des cochlées chez le rat et le cobaye

Les animaux profondément anesthésiés (pentobarbital sodique, 47 mg/kg) étaient perfusés par voie intracardiaque avec :

- 50 mL d'une solution de NaCl 9% à température ambiante additionnée d'héparine (1%, 5000 UI/mL)
- puis 350 mL de fixateur trialdéhyde (3% de glutaraldéhyde, 2% de formaldéhyde, 1% d'acroléine et 2,5% de diméthyl sulfoxyde), dans du tampon cacodylate (0,08 M, pH 7,4) à température ambiante.

Après fixation de l'animal, les cochlées étaient prélevées puis perfusées à nouveau par voie intra-labyrinthique. Après 24 heures, les cochlées étaient rincées avec du tampon cacodylate (0,1M pH=7,4) puis perfusées par une solution de tétraoxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$  2% pour les rats et  $\text{OsO}_4$  1% pour les cobayes) pendant 15 minutes. Au terme de la fixation les cochlées étaient lavées avec du tampon.

Les cochlées étaient ensuite fraisées dans une solution d'éthanol à 70% jusqu'à obtention d'une fine couche osseuse. A ce stade, les cochlées pouvaient être conservées à + 4°C dans une solution d'éthanol à 70%.

### I-2. Préparation de surface des cochlées

Les cochlées étaient disséquées sous loupe binoculaire dans de l'éthanol à 70%. La cochlée osseuse était écaillée à l'aide d'un pic, puis les membranes de Reissner et tectoriale ainsi que la strie vasculaire étaient retirées. L'organe de Corti était alors minutieusement désolidarisé de la lame spirale osseuse, tour après tour, en commençant par l'apex de la cochlée. L'organe de Corti était monté entre lame et lamelle dans une goutte de glycérine. La préparation histologique obtenue permettait le comptage des cellules ciliées.

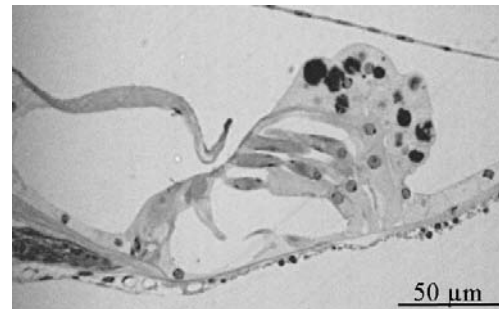
### **I-3. Comptage cellulaire**

A l'aide d'un microscope optique (G X400), les CCI et CCE étaient comptées à partir de l'apex jusqu'à la base de l'organe de Corti. Les critères de comptage reposaient sur la présence ou l'absence des plaques cuticulaires, des stéréocils ou des noyaux cellulaires. Les pertes cellulaires des différentes rangées étaient exprimées en pourcentage et représentées sous forme d'un cochléogramme. La localisation en fréquence (cobaye : Greenwood, 1990 ; rat : Müller, 1991) était superposée à la longueur de l'organe de Corti.

## **II- Observation de coupes de cochlée chez le cobaye**

### **II-1. Préparation des cochlées**

Les cochlées étaient décalcifiées durant 8 heures dans une solution d'éthylène diamine tétra-acétate (10% dilué avec de l'éthanol à 70%), puis déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante : 70, 80, 90, 100%. Les échantillons étaient ensuite inclus dans la résine (Epon 25, 3%, dodécényl succinic anhydride 55,8%, Araldite 15,2%, dibutyl phtalate 2%, et 2, 4, 6-tridiméthylaminométhyl phénol 1,7%). Enfin, les cochlées étaient placées à 30°C pendant 15 heures, puis à 60°C durant 24 heures. Les blocs de résine polymérisée, étaient ensuite débités à l'ulratrim (Leica) dans l'axe du modiulus jusqu'à voir apparaître le nerf auditif au centre de la cochlée (Figure 30)



*Figure 30 : Coupe axiale d'une cochlée de cobaye passant par le modiulus. Figure 31 : Organe de Corti de cobaye.*

### **II-2. Coupes semi-fines**

Pour une observation au microscope optique (Olympus BX 51 WI), les blocs de résines étaient débités au microtome (Microm HM 355S) en coupes de 2,5 µm d'épaisseur. Ces dernières étaient montées entre lame et lamelle dans une goutte de crésyl violet (Figure 31).



## Analyse des métabolites

### I- Recueil des urines

Après exposition au toluène, les rats et les cobayes séjournèrent pendant 18h dans des cages à métabolisme (220 x 220 x 180 mm). Les animaux pouvaient boire et manger à volonté. Un système de refroidissement maintenait les urines à +4°C (Figure 32) et évitait ainsi la prolifération microbienne. Les urines étaient ensuite stockées à -20°C dans des Eppendorfs puis décongelées juste avant le dosage des métabolites.

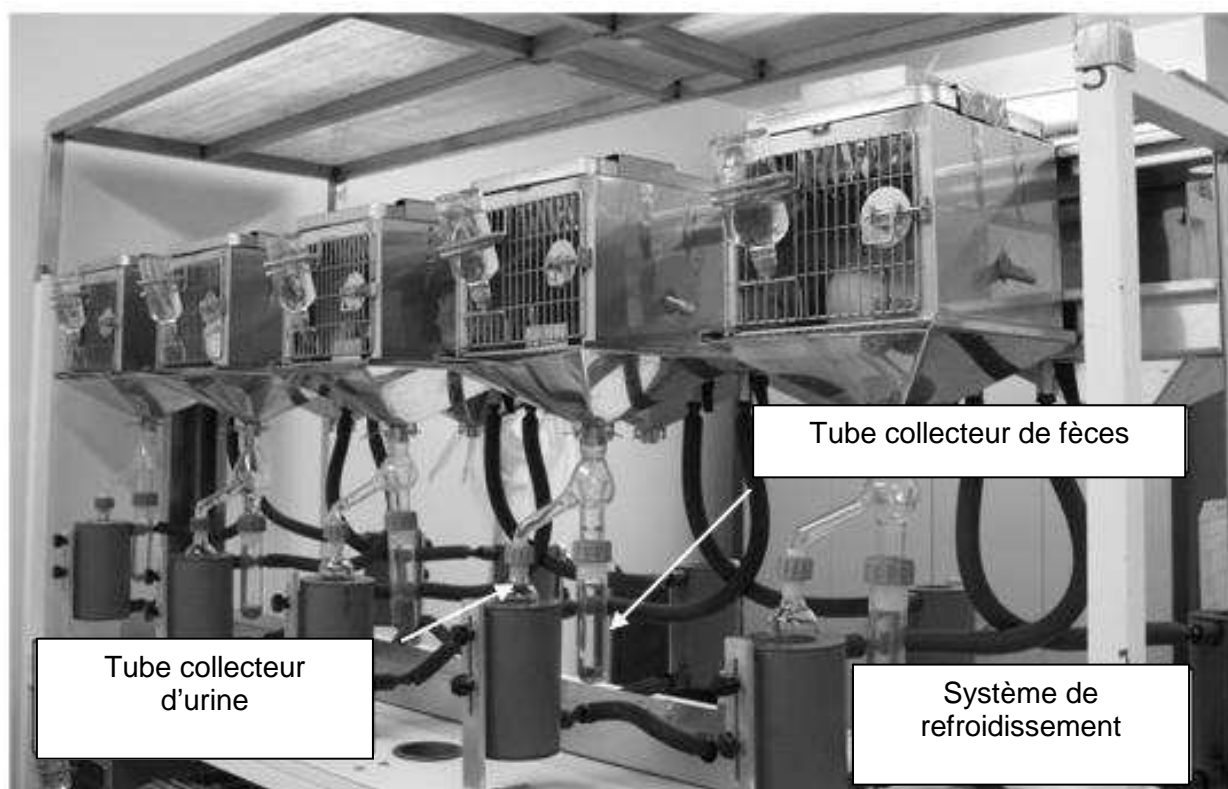


Figure 32 : Cages à métabolisme permettant le recueil d'urine réfrigérée.

### II- Métabolites urinaires

#### II-1. Dosage de l'acide hippurique

Après décongélation et homogénéisation, les urines étaient centrifugées (1750 x g) pendant 10 minutes à 10°C. La séparation de l'AH du milieu urinaire était réalisée en utilisant des colonnes SPE (extraction sur phase solide) de type SAX (BondElut, Varian).

Avant le dépôt des échantillons, les colonnes étaient activées par 3 mL de méthanol (MeOH) puis 3 mL d'eau. Puis, les échantillons à doser étaient préparés par dépôt de :

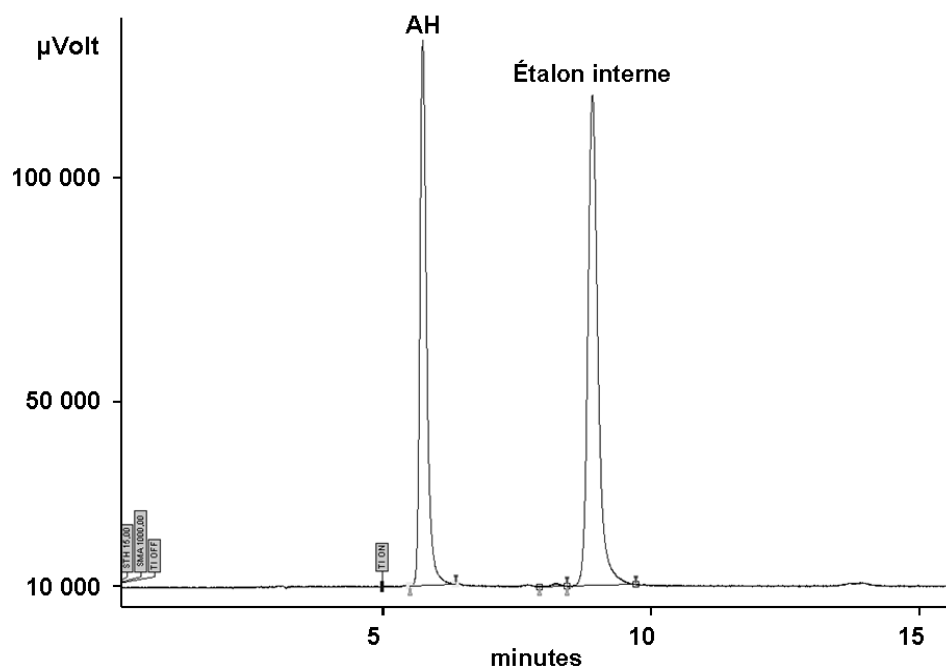
- 60  $\mu$ L d'urine de rat ou de cobaye,
- 800  $\mu$ L d'acide 3-méthyl hippurique (1 g/L, Aldrich 99%) et
- 100  $\mu$ L d'eau.

En parallèle aux échantillons à doser, des standards d'extraction étaient préparés par dépôt de :

- 60  $\mu$ L d'AH (solution aqueuse à 10 g/L, Aldrich 99%),
- 800  $\mu$ L d'acide 3-méthyl hippurique (1 g/L, Aldrich 99%) utilisé comme étalon interne et
- 100  $\mu$ L d'eau.

Après le dépôt, les colonnes étaient lavées avec 3 mL d'eau. Enfin, l'étalon et l'AH étaient récupérées par élution avec 3 mL d'un mélange MeOH/acide acétique (9/1 ; v/v). Les tubes de récupération des éluations étaient rincés avec 1 mL de MeOH. Les éluats d'extraction étaient ensuite concentrés à sec sous azote pendant 45 minutes dans un bain thermostaté à 70 °C. Après agitation au vortex, les résidus étaient repris dans 4 mL d'éluant HPLC (H<sub>2</sub>O/MeOH/Acide acétique : 60/40/1 ; v/v/v) et placés dans des flacons scellés d'injecteur automatique.

Le dosage était réalisé à l'aide de 10  $\mu$ L d'échantillon injectés (injecteur Perkin Elmer ISS 101) dans une colonne de type Lichrospher C8 (250 mm x 4,6 mm DI, 5  $\mu$ m). La détection était réalisée avec un détecteur UV (Shimadzu SPD 10 AVp) à une longueur d'onde de  $\lambda=254$  nm et le signal de sortie était visualisé sur un intégrateur Spectra Physics SP 4290 (Figure 33).



*Figure 33* : Chromatogramme du dosage de l'AH par HPLC. AH : acide hippurique, étalon interne : acide 3-méthyl hippurique (1 g/L).

## II-2. Dosage de l'acide benzylmercapturique

Les urines étaient décongelées et homogénéisées. Puis, après centrifugation des urines (1750 x g) pendant 10 minutes à 10°C, les acides benzylmercapturiques étaient séparés du milieu urinaire à l'aide d'une double purification sur colonne SPE : une colonne C8 SPE puis SAX SPE (Isolute cartridges, Argonaut). Les éluions finales étaient concentrées à sec. Les résidus isolés étaient repris en milieu aqueux et déacétylés enzymatiquement à l'aide d'une solution d'acylase à 4mg/mL (Sigma). Finalement, les résidus étaient déprotéinés par centrifugation à 7000 tr/min pendant 45 min sur des filtres Ultracell YM 10 (Microcon, Millipore). Une partie du filtrat (55 µL) était ensuite dérivé par un mélange composé de 5 µL d'o-phthaldialdéhyde (OPA, Fluka, 4,2 µg/mL de MeOH) et de 5 µL de 2-mercaptoéthanol (MCE, Fluka, 25 mg/mL de tampon).

Les échantillons dérivés étaient injectés automatiquement et séparés dans une colonne de type C18 Supelcosil (150 mm x 4,6 mm DI ; 3 µm). L'éluant (0,8 mL/min) utilisé était un mélange tampon/MeOH (48/52, v/v). Le tampon était composé de 1% de tétrahydrofurane (THF), 0,05 M d'acétate de sodium pH=6,5 et 0,83 g/L de tétraéthylammoniumchloride.

La détection était effectuée à l'aide d'un détecteur à fluorescence ( $\lambda_{exc}=330$  nm,  $\lambda_{em}=440$  nm, Waters 470). La concentration d'ABM des échantillons urinaires (Figure 34) était déterminée à l'aide d'une gamme étalon.

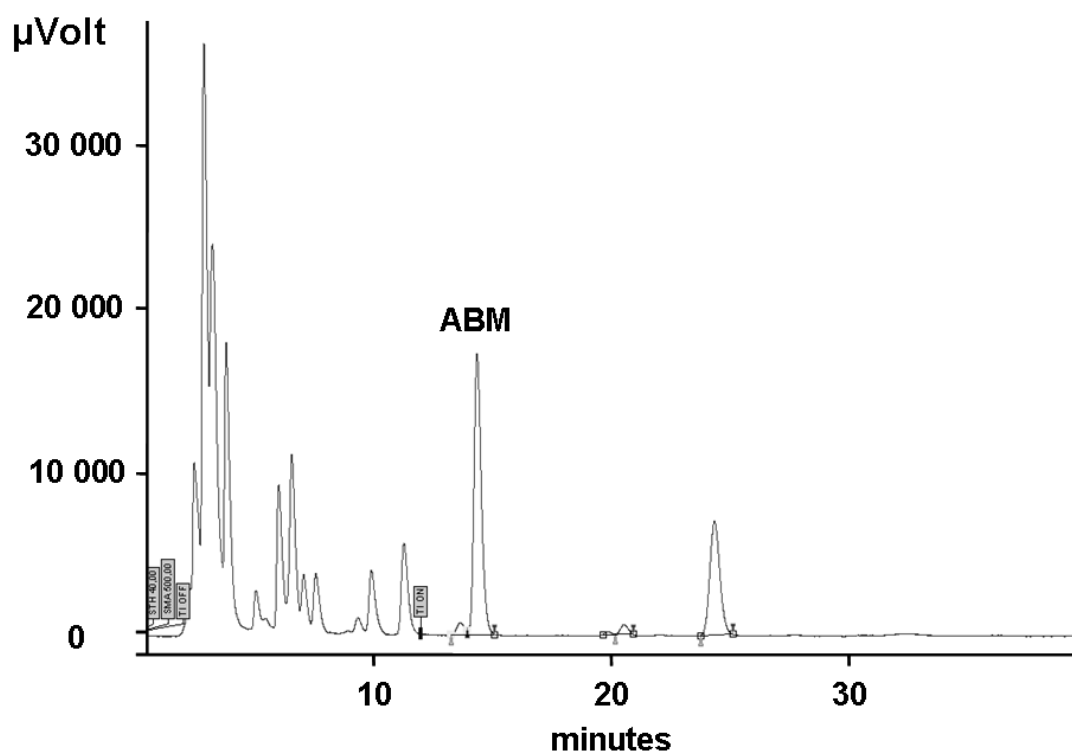


Figure 34 : Chromatogramme du dosage des ABM par HPLC. ABM : acide benzylmercapturique.

### **III- Toluène veineux**

#### **III-1. Étude pilote**

Les animaux étaient gavés au toluène à raison de 1,5 g/kg dilué dans de l'huile d'olive (3 mL). Des prélèvements de sang étaient effectués une heure et trois heures après l'administration de toluène.

#### **III-2. Prélèvement de sang veineux**

La queue du rat était trempée dans une eau thermostatée à 30°C pour dilater les vaisseaux sanguins. L'extrémité de la queue était sectionnée avec un scalpel, plongée dans une solution de xylocaïne puis massée afin de collecter 400 µL de sang dans des flacons héparinés. Les échantillons de sang étaient ensuite conservés à -20°C.



#### **III-3. Dosage du toluène veineux**

Les échantillons de sang étaient décongelés à température ambiante. Le toluène présent dans le sang était quantifié par étalonnage interne à l'aide d'une solution de référence contenant 17,4 µg de toluène et 17,3 µg de m-xylène par mL de CS<sub>2</sub>. L'extraction se faisait avec 1 mL de CS<sub>2</sub>. Une quantité connue de solution contenant l'étalon interne (10 µL d'une solution à 1,73 mg m-xylène/mL CS<sub>2</sub>) était ajoutée à l'échantillon.

Après agitation, les échantillons étaient centrifugés à 1500 x g pendant 15 min à -4°C. Le surnageant composé du sérum et des cellules sanguines était éliminé. La phase inférieure de CS<sub>2</sub> contenant le toluène était transvasée dans un flacon à sertir puis analysée (Figure 35) par chromatographie en phase gazeuse (appareil Shimadzu GC-17A).

Les composés étaient séparés sur une colonne en silice fondue dont la phase stationnaire est constituée de 20 % méthyl, 80 % phénylsilicone (Colonne Quadrex, 30 mètres ; diamètre interne 0.53 mm ; épaisseur du film 0,5 µm) réglée à une température de 60°C avec un débit de gaz vecteur (Hélium) de 4,2 mL/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient réglées à 240°C.

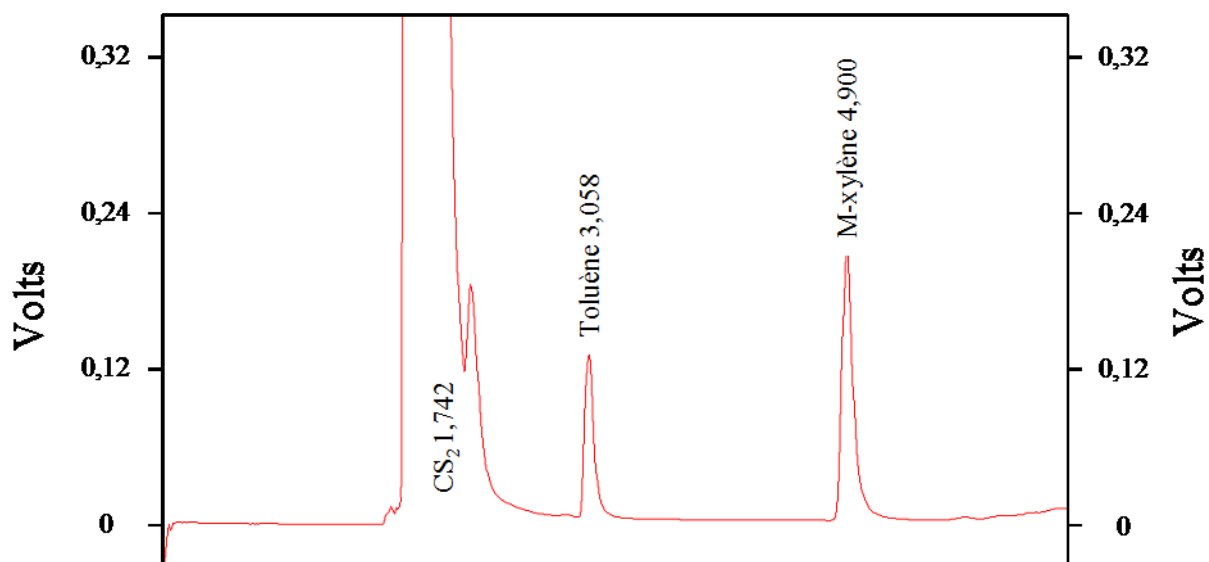


Figure 35 : Chromatogramme du dosage de toluène sanguin chez le rat (Volts=f(temps)).

## IV. Toluène artériel

### IV-1. Implantation des cathéters

L'implantation des cathéters se faisait sur des animaux anesthésiés. Un cathéter en polypropylène ( $\varnothing$  0,58 mm) était inséré dans la veine jugulaire servant de voie d'injection au toluène. Un autre cathéter était introduit dans l'artère carotidienne pour collecter le sang artériel tout au long de l'expérimentation. Un premier échantillon de référence (300  $\mu$ L) était collecté dans un flacon hépariné avant l'injection de toluène. Puis un bolus de 300  $\mu$ L d'intralipide (référence 830513161, Fresenius kabi) contenant 14  $\mu$ L de toluène pour l'étude B ou 28  $\mu$ L de toluène pour l'étude D et E, était injecté dans la veine jugulaire sur une période de 1,5 minutes pour les rats et 3 minutes pour les cobayes. La période d'injection était plus lente pour le cobaye car sa pression artérielle est plus faible que celle du rat, une injection trop rapide aurait risqué de perturber ses paramètres cardiovasculaires.

### IV-3. Prélèvement de sang artériel et dosage du toluène sanguin

A intervalle de temps régulier des prélèvements de sang (300  $\mu$ L) étaient réalisés et collectés dans des flacons héparinés. Ceux-ci étaient ensuite congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  et conservés jusqu'à dosage du toluène. La technique du dosage du toluène artériel est identique à celle du toluène veineux (§ III-3, p48).

## V- Créatinine

La créatinine est une substance azotée issue du métabolisme protéique et son taux d'excrétion urinaire est relativement constant au cours du temps. Elle est classiquement utilisée comme base de calcul pour évaluer les quantités de métabolites urinaires (exprimés en g/g de créatinine) et les corriger en fonction des variations de volumes urinaires.

Par ailleurs, la créatinine ne subit ni réabsorption, ni sécrétion au niveau du rein et constitue de ce fait un indicateur du fonctionnement glomérulaire. Le dosage de la créatinine était réalisé par colorimétrie ( $\lambda=500$  nm) sur des urines centrifugées. Le principe repose sur la méthode de Jaffe (Jaffe, 1886) dans laquelle la créatinine réagit avec l'acide picrique pour donner un complexe de couleur jaune-rouge en milieu alcalin.

Le photomètre intégré de l'automate (rx daytona, Randox) permet de déterminer la concentration de créatinine par rapport à un calibrateur : sérum contrôle humain Level2 (HN1530, Randox) en effectuant le calcul suivant :

$$[\text{créatinine}] = \frac{\Delta \text{DO}_{\text{échantillon}}}{\Delta \text{DO}_{\text{calibrateur}}} \times [\text{calibrateur}] \quad \Delta \text{DO} : \text{variation de densité optique}$$

A chaque série de dosages, des contrôles qualité étaient effectués à l'aide d'un échantillon d'urine contrôle dit « normale » (AU2352, Randox) ou « pathologique » (AU 2553, Randox) de concentration connue en créatinine.

## VI- Protéines

Le principe de dosage des protéines repose sur la méthode colorimétrique de Lowry. Cette méthode apprécie avec une grande sensibilité le nombre de liaisons peptidiques -CO-NH-. Ce dosage nécessite deux réactifs particuliers :

- réactif cuprique : sulfate de cuivre 2 ‰, tartrate de potassium et de sodium 4 ‰
- réactif phosphotungstomolybdique de Folin et Ciocalteu.

Des complexes cuivre-protéines se forment au niveau des liaisons peptidiques et développent une coloration bleue en milieu acide proportionnelle à leur concentration. La lecture de l'absorbance se fait à 600 nm.

## VII- $\gamma$ -glutamyltransférases

Cette enzyme a été dosée à l'aide d'une méthode colorimétrique enzymatique (Persijn et Vanderslik, 1976) reposant sur la mesure de la formation de l'acide 5-amino-2-nitrobenzoïque dans la réaction suivante :

L -  $\gamma$  - glutamyl - 3 - carboxy - 4 - nitroanilide + glycylglycine



La formation de l'acide 5-amino-2-nitrobenzoïque, détectée à  $\lambda=580$  nm, est directement proportionnelle à l'activité de la  $\gamma$ -GT.

## VIII- Cytochromes P450

### VIII-1. Préparation des microsomes

La préparation des microsomes nécessite l'utilisation de trois solutions tampon différentes :

Solution I :	Tampon éthylène diamine tétraacétique (EDTA) 0,005 M Ajuster à pH = 7,4 avec NaOH à 1 N qsp 100 mL eau distillée
Solution II :	Na <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 100 mM EDTA 10 mM Dithiothréitol (DTT) 0,1 mM Ajuster à pH=7,4 avec HCl concentré
Solution III :	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM DTT 1 mM EDTA 1 mM Glycérol 20%

Les foies des animaux étaient décongelés dans un bêcher contenant 50 mL de solution I. Puis les foies, découpés en petits morceaux, étaient homogénéisés au Potter à 1200 tr/min. Les homogénats étaient répartis dans des tubes Nalgen et centrifugés 10 min à 4000 tr/min puis 20 min à 9000 tr/min. Le surnageant était ultra centrifugé 1 heure à 38 000 tr/min.

Après cette première ultracentrifugation, le surnageant était écarté. Le culot était remis en suspension avec 7 mL de solution II. La suspension obtenue était homogénéisée au petit Potter à 600 tr/min puis ultra centrifugée 1 heure à 38 000 tr/min.

Après cette deuxième ultracentrifugation, le culot était lavé avec 5 mL de solution III. La suspension obtenue était homogénéisée au petit Potter à 600 tr/min et répartie dans des tubes Eppendorfs puis stockée à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## VIII-2. Cytochromes P450 totaux

La mesure de la quantité de CYP450 présente dans les microsomes hépatiques repose sur la différence d'absorption à 450 nm entre la forme réduite et la forme combinée du pigment au monoxyde de carbone (Omura et Sato, 1964).

Les microsomes de foies (2g/L) étaient mixés avec de la poudre de dithionite de sodium. Un premier spectre entre 400 et 500 nm (Perkin Elmer) était réalisé afin de déterminer le spectre de référence. Puis un spectre différentiel était obtenu lorsque le monoxyde de carbone (CO) était « bullé » dans le mélange microsomes / dithionite. Le pic spécifique à 450 nm traduit la présence de CYP450 dans le mélange grâce à la liaison entre le pigment CYP450 et le CO (Figure 36).

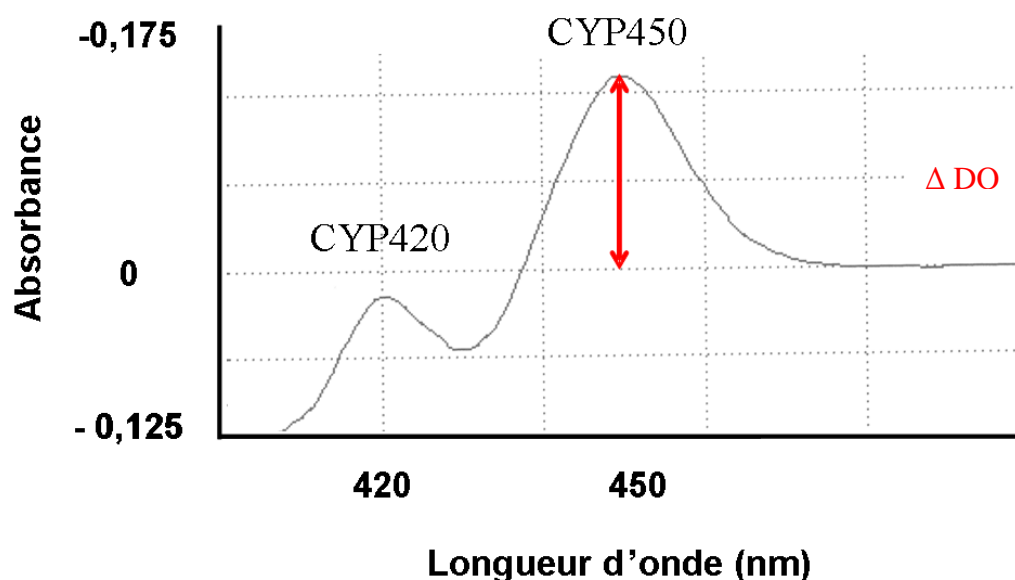


Figure 36 : Spectre d'absorbance des CYP420 et CYP450 en fonction de la longueur d'onde.



La quantité de CYP450 était déterminée grâce à la formule ci-dessous, en fonction de la quantité en protéines : nmole/mg de protéines.

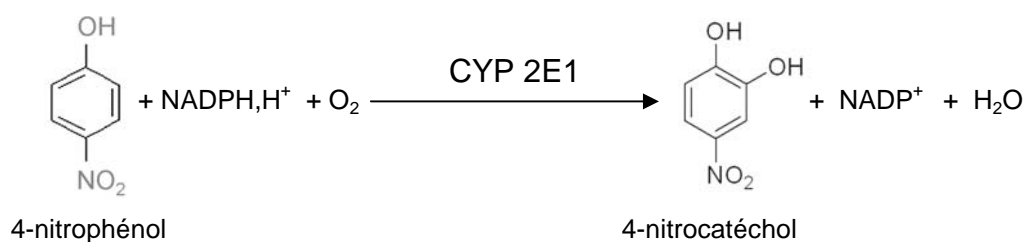
$$\frac{(\Delta \text{DO} \times \text{dilution}) \times 1000}{\epsilon_{\text{P450}} \times [\text{protéine}] \text{ mg/mL}} = [\text{P450}] \text{ nmole/mg de protéine}$$

$\epsilon_{\text{P450}}$  : coefficient d'extinction molaire des CYP450 :  $91 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$\Delta \text{DO}$  :  $\text{DO } 490 \text{ nm} - \text{DO } 450 \text{ nm}$

### VIII-3. Activité des CYP 2E1

L'activité des CYP 2E1 était mesurée sur des microsomes de foie par une méthode colorimétrique. Les CYP 2E1 oxydant le 4-nitrophénol (4-NP) en 4-nitrocatéchol (4-NC). De ce fait, l'activité des CYP 2E1 est déterminée par quantification de la formation du 4-NC.



NADP<sup>+</sup> : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NADPH, H<sup>+</sup> : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit

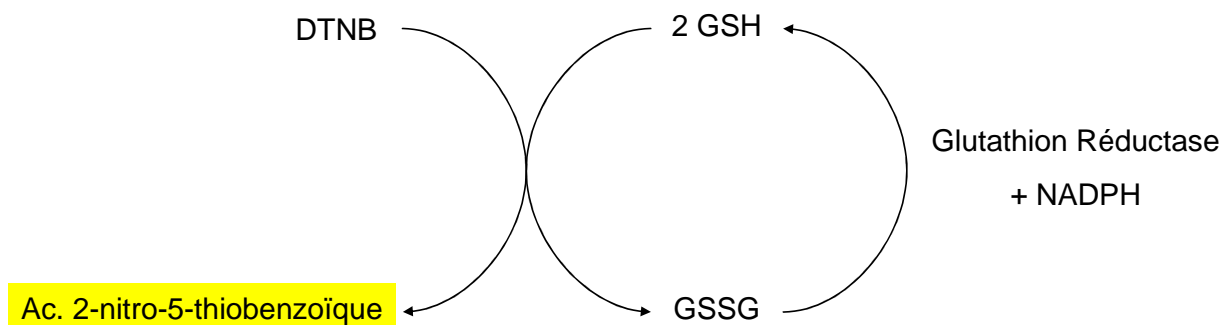
Les microsomes (1 mg/mL) étaient mélangés avec une solution de cofacteurs (MgCl<sub>2</sub> 3 mM, G-6-P 5 mM, G-6-P déshydrogénase 1 U/mL, NADP<sup>+</sup> 1 mM) puis préincubés à 37°C pendant 30 minutes. La réaction enzymatique était ensuite enclenchée par l'ajout du substrat : le 4-NP (100 µM dilué dans du tampon PO<sub>4</sub> à 0,1 M, pH=7,4). Après une incubation de 4 heures à 37 °C dans un bain-marie sous agitation, la réaction était stoppée avec 100 µL d'acide perchlorique (11 N).

Les échantillons étaient ensuite congelés à -20°C pendant 15 minutes afin d'optimiser la précipitation des protéines qui signait la fin de la réaction enzymatique, puis centrifugés à 20 000 x g pendant 5 min . 1 mL du surnageant était transféré dans un tube Eppendorf dans lequel on ajoutait 200 µL d'une solution de NaOH (10 N) afin de révéler la réaction colorimétrique. La formation du 4-NC était déterminée à 518 nm à partir d'une courbe étalon d'une gamme de 4-NC standard. Enfin, la linéarité de la production de 4-NC par les cytochromes était vérifiée dans ces conditions expérimentales (concentration, température, temps) pour avoir le droit d'exprimer les résultats en µmoles 4-NC / mg protéines / minutes.

## IX- Glutathion

Le glutathion, tripeptide antioxydant indispensable à la défense cellulaire, existe sous deux formes : une forme oxydée (GSSG) et une forme réduite (GSH). Le glutathion réduit, est le composé le plus abondant de toutes les molécules à fonction thiol (SH) dans le tissu animal.

La concentration de glutathion hépatique réduit et oxydé a été déterminée à l'aide d'un kit de dosage (Total Glutathione Quantification Kit, Dojindo laboratories). La forme oxydée du glutathion était réduite par la glutathion réductase en GSH (Figure 37).

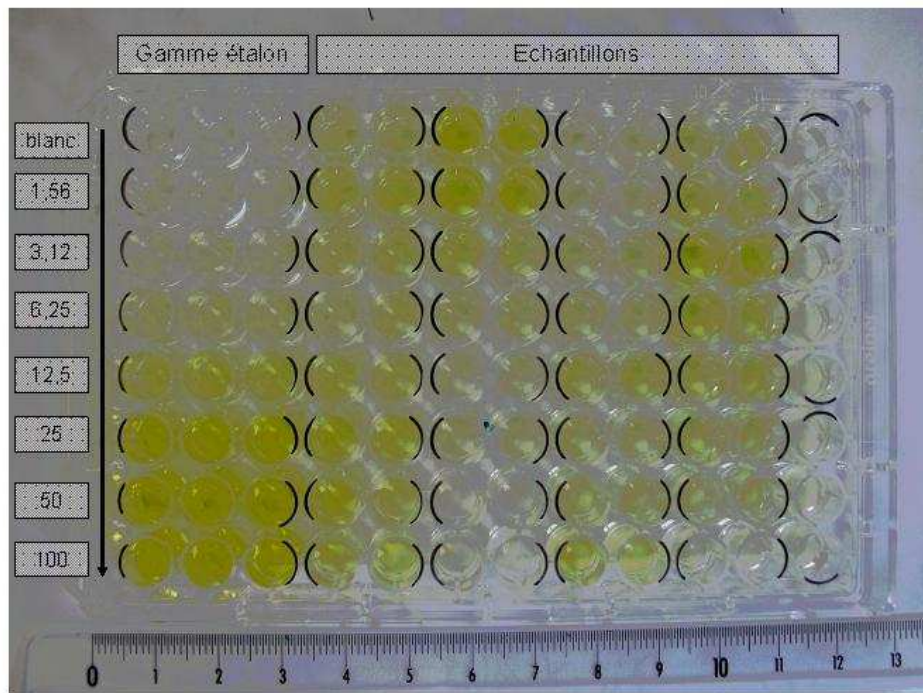


*Figure 37 : Principe du dosage du glutathion total (GSSG : glutathion oxydé et GSH : glutathion réduit) par l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB),  $\lambda=412$  nm.*

Un échantillon de foie (100 mg) était homogénéisé avec 1 mL d'acide 5-sulfosalicylique (SSA) et centrifugé à 8000 x g pendant 10 minutes. Seul le surnageant était utilisé pour le dosage du glutathion total.

Le glutathion total était quantifié après l'incubation de 20  $\mu$ L de glutathion réductase, 20  $\mu$ L de coenzyme (NADPH) et 20  $\mu$ L de substrat : l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB), à 37°C pendant 20 minutes. Dans ces conditions, le GSH réagit avec le substrat pour produire l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque ainsi que le glutathion dissulfide (GSSG).

L'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque est un produit de coloration jaune. La concentration du glutathion total était déterminée à l'aide d'une gamme étalon à 412 nm (Figure 38).



*Figure 38* : Dosage du glutathion en microplaque. Gamme étalon : 1,56 à 100 µmoles/L.

## Traitement statistique

L'analyse statistique des résultats a été effectuée en utilisant des analyses de la variance (Anova) à un ou deux facteurs. Elles sont présentées sous la forme  $[F(k-1, N-k)=\text{valeur} ; p]$  et  $[F(p-1, npq-1)=\text{valeur} ; p]$  où  $k-1$  et  $p-1$  sont le nombre de degré de liberté inter-classes et  $N-K$  le nombre de degré de liberté intra-classe et  $npq-1$  est le nombre de degré de liberté de la somme des carrées totale.  $P$  est le niveau de signification du  $F$  observé.

Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a également été utilisé lorsque les données obtenues ne suivaient pas une loi Normale ou lorsque la petite taille de l'échantillon ne permettait pas une analyse statistique à l'aide de tests paramétriques. Les résultats de ce test étaient représentés de la manière suivante :  $[F=\text{valeur} ; p]$ .

# **RÉSULTATS**

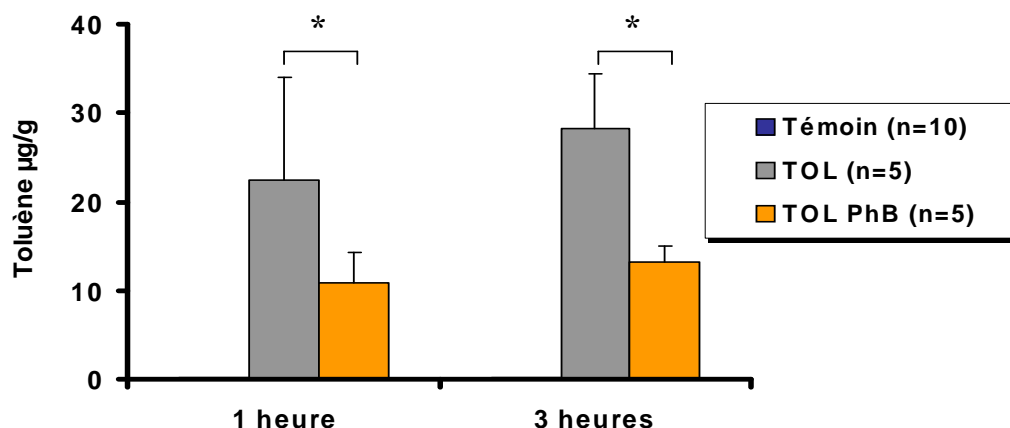
---

## Étude A : Phénobarbital.

### Induction des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène chez le rat

#### I- Efficacité du traitement au Phénobarbital

Dans cette étude pilote, le toluène était administré par gavage (1,5 g/kg) chez les rats traités au 5-éthyl-5-phényl-2,4,6 (1H, 3H, 5H)-pyrimidinetrione (phénobarbital ou PhB) : groupe « TOL PhB », et chez les rats non traités : groupe « TOL ». Le traitement au PhB était de 50 mg/kg/j pendant une semaine et 0,1% dans l'eau de boisson durant le week-end. L'histogramme (Figure 39) représente l'effet d'une semaine de traitement au PhB sur la concentration de toluène sanguin.



*Figure 39: Concentrations moyennes de toluène sanguin chez le rat, une heure et trois heures après gavage à 1,5 g/kg toluène. PhB : Phénobarbital : 50 mg/kg, s.c, pendant une semaine et 0,1% dans l'eau de boisson durant le week-end. Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs).*

Les animaux (n=5) du groupe « TOL » ont une concentration sanguine de toluène de  $22 \pm 11,7$  µg/g une heure après le gavage ; cette concentration croît à  $28 \pm 6,2$  µg/g (n=5) trois heures après le gavage. Quant aux rats (n=5) du groupe « TOL PhB », la concentration de toluène est de  $11 \pm 3,5$  µg/g une heure après le gavage et de  $13 \pm 1,8$  µg/g trois heures après le gavage. Quel que soit le groupe testé, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les concentrations sanguines de toluène mesurée à 1 et 3 heures. L'absorption du toluène se faisant par gavage, la concentration de toluène circulant dépend essentiellement de l'absorption gastrique et intestinale du solvant. Elle varie sensiblement entre les deux points de prélèvement : 1 et 3 heures.

Cette expérience montre que le traitement au PhB a permis de réduire de 50% [ $F_{\text{groupe}}(2,69)=155,27$  ;  $p<0,001$ ] la concentration sanguine de toluène.

## II- Contrôle des poids des animaux

Le contrôle des poids permet d'évaluer l'état de santé des animaux. La figure 40 illustre l'évolution du poids des différents groupes d'animaux en fonction de leur traitement respectif.

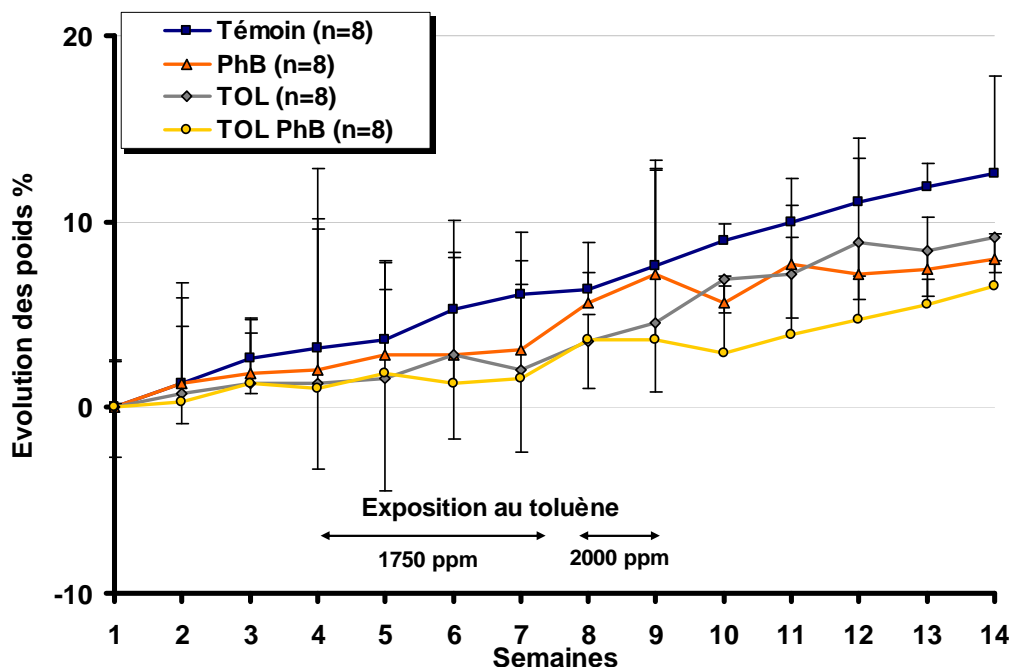


Figure 40 : Évolution des poids des rats au cours de l'étude A. Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines et à 2000 ppm pendant 2 semaines : 6 heures par jour, 5 jours par semaine. PhB : Phénobarbital 50 mg/kg/j s.c.. Barre d'erreur : écart type.

Les courbes des poids relatives aux quatre groupes testés ne révèlent pas de différence significative [ $K=7,05$  ;  $p=0,070$ ]. Quel que soit le groupe, la croissance des animaux est régulière au cours de l'expérimentation, même si l'on note une croissance légèrement plus faible pour les rats du groupe « TOL PhB ». L'exposition au toluène et le traitement au PhB n'ont pas significativement modifié les poids des rats. Il est à noter également qu'après la chirurgie pratiquée au cours de la semaine 1, la croissance des rats n'a pas été perturbée par l'implantation des électrodes. Quel que soit le groupe testé, les écarts-types des semaines 4 à 9 sont plus élevés par rapport à ceux des autres semaines. L'exposition au toluène pourrait être responsable de ces variations de poids mais les variations également constatées chez les témoins plaident en faveur d'un effet majeur de la mise à jeun sur les variations des poids des rats.

### III- Audiométrie

#### III-1. Seuils auditifs avant exposition

Avant l'exposition au toluène (Figure 41), le recueil des seuils de potentiels auditifs évoqués au niveau du colliculus inférieur a été réalisé pour des fréquences allant de 2 à 32 kHz. Ces premières mesures audiométriques correspondent à l'audio 1 : audiogramme de référence mesuré avant exposition au solvant (Figure 7, p19).

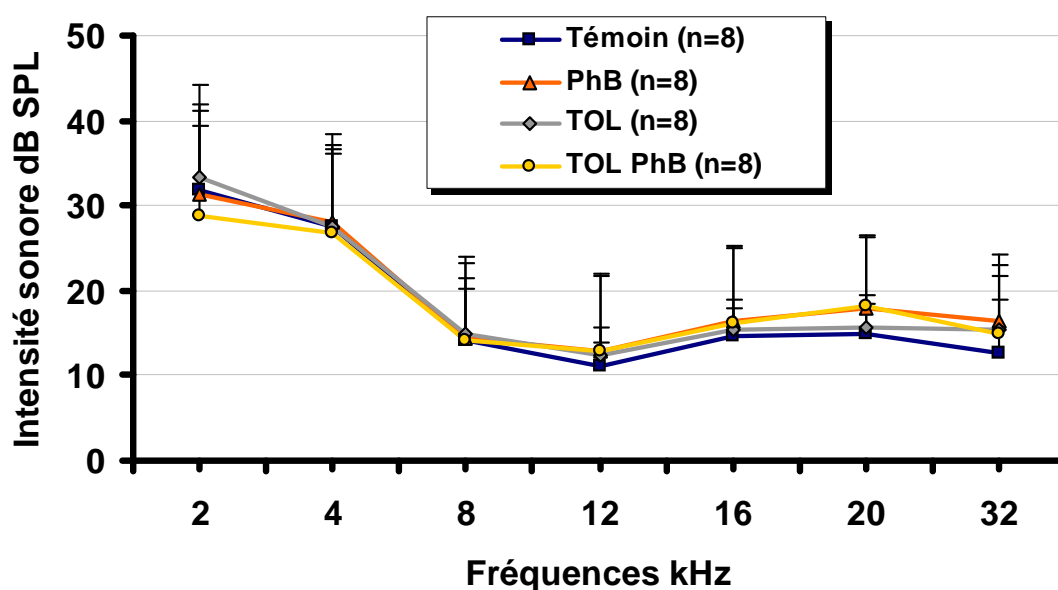


Figure 41 : Intensité sonore requise pour obtenir une amplitude de 15  $\mu$ V des potentiels auditifs évoqués, avant exposition au toluène, PhB : phénobarbital 50 mg/kg/j, s.c.. Barre d'erreur : écart type.

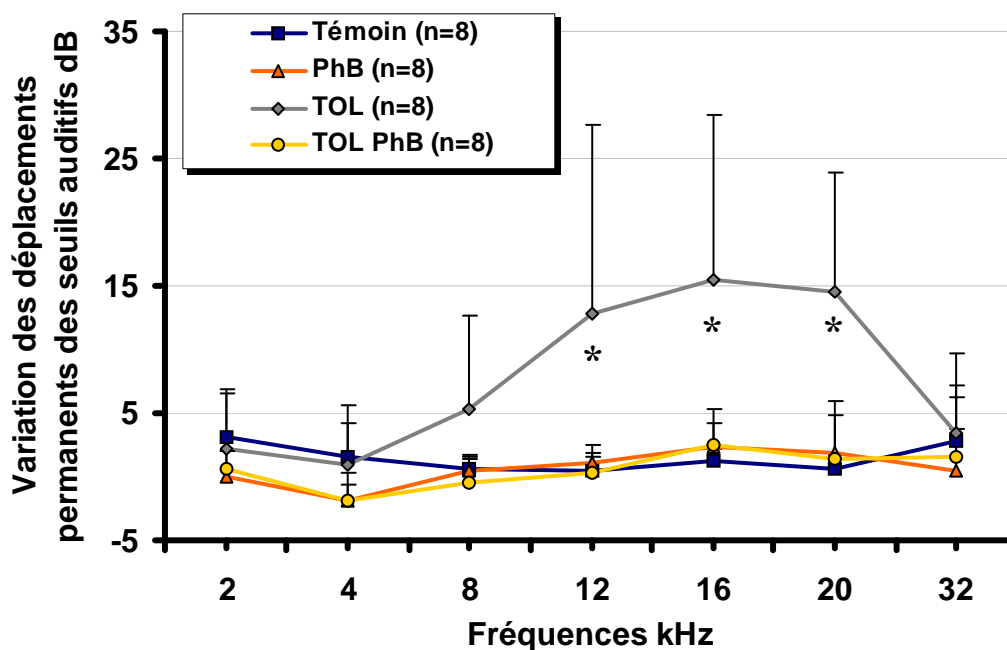
Avant exposition au toluène, il n'y avait pas de différence entre intensités sonores obtenues pour les différents groupes [ $F_{\text{groupe}}(3,8)=1,47$  ;  $p=0,222$ ] et quelle que soit la fréquence testée [ $F_{\text{groupe} \times \text{fréquence}}(24,287)=0,88$  ;  $p=0,633$ ].

D'un point de la sensibilité en fréquence, les intensités requises pour obtenir une amplitude de 15  $\mu$ V des potentiels auditifs évoqués sont similaires entre 8 et 32 kHz.



### III-2. Déplacement permanent de seuils auditifs

Au terme des quatre semaines d'exposition au toluène et des quatre semaines de récupération, un second audiogramme était effectué. La différence des seuils auditifs (Audio 2- Audio 1), comme illustré sur le protocole expérimental illustré par la Figure 7, page 19, donne le déplacement permanent des seuils auditifs correspondant aux pertes auditives moyennées (Figure 42).



*Figure 42* : Variation des déplacements permanents de seuils auditifs chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines et à 2000 ppm pendant 2 semaines : 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. PhB : phénobarbital 50 mg/kg/j, s.c.. Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs).

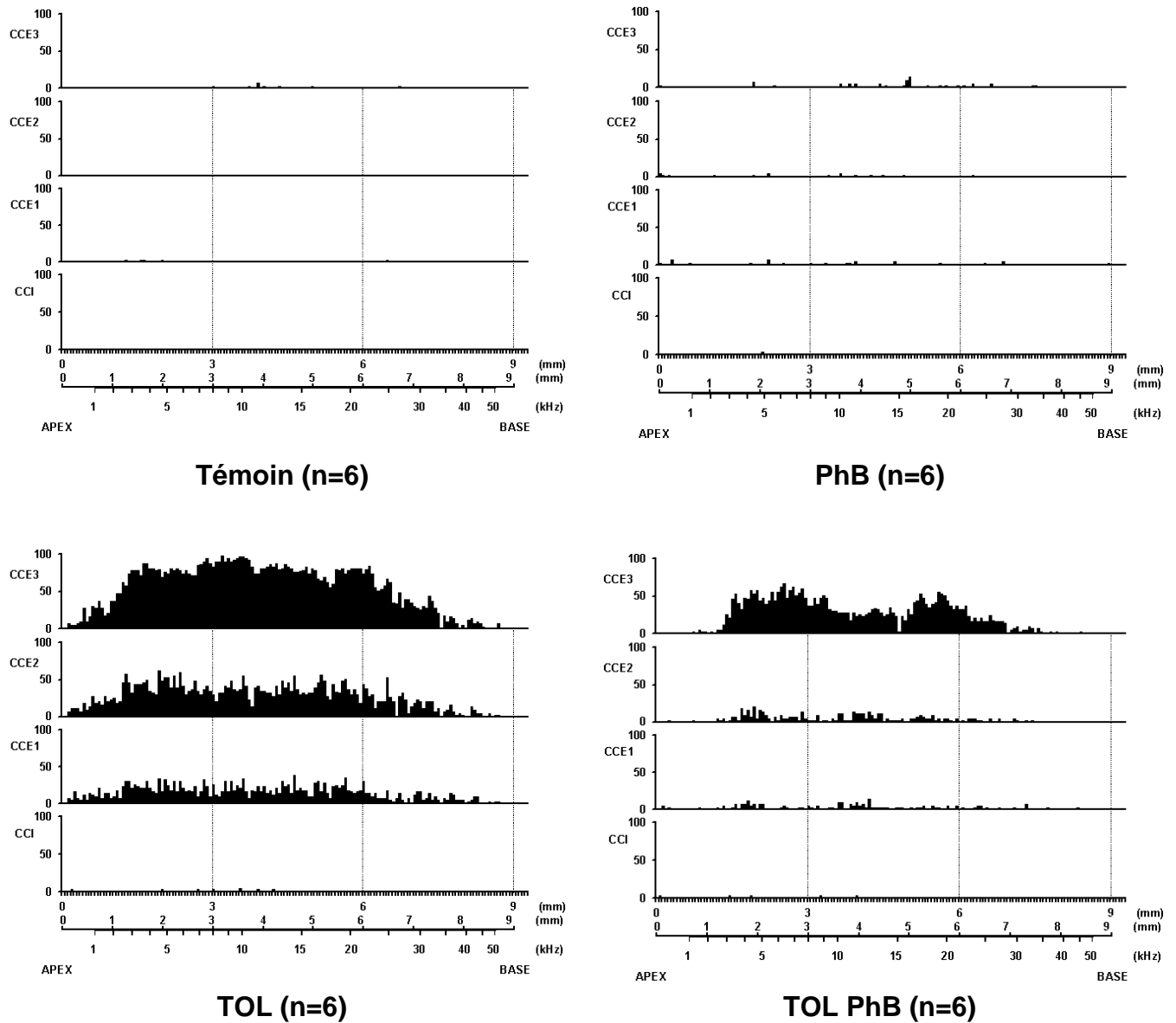
Seul les animaux du groupe « TOL » (n=8), montrent une élévation des seuils auditifs [ $F_{\text{groupe}}(3,189)=21,03$  ;  $p<0,001$ ]. En effet, les rats exposés au toluène souffrent d'une perte auditive de 15 dB entre 12 et 20 kHz [ $F_{\text{groupe} \times \text{fréquence}}(18,189)=2,31$  ;  $p=0,003$ ].

Quant aux rats appartenant aux groupes « Témoin » (n=8), « PhB » (n=8) et « TOL PhB » (n=8), ils ne présentent pas de variation significative des seuils auditifs.

Le traitement au PhB a permis de réduire l'ototoxicité du toluène.

#### IV- Histologie de la cochlée

Les cochléogrammes de la Figure 43 illustrent le pourcentage de pertes de cellules ciliées en fonction de la carte en fréquence définie par Müller (1991), le long de l'organe de Corti.



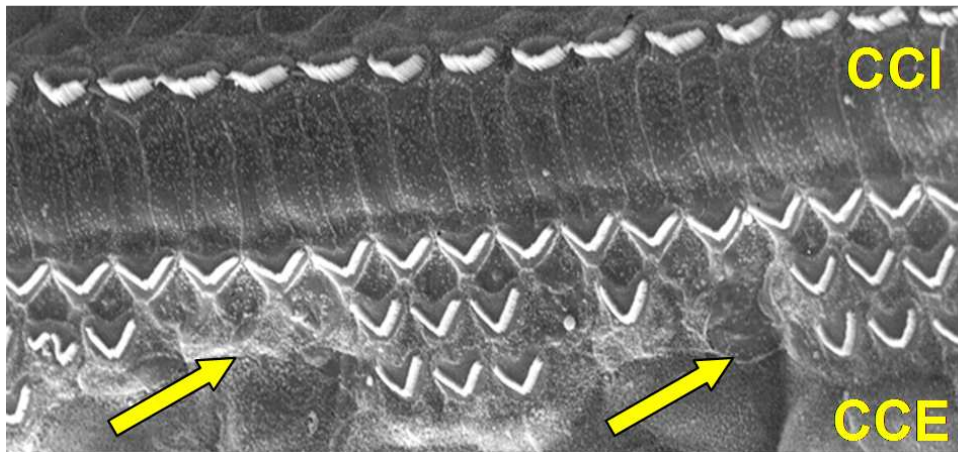
*Figure 43 : Pertes de cellules ciliées chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines et à 2000 ppm pendant 2 semaines : 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. PhB : Phénobarbital 50 mg/kg/j, s.c.. Témoin (n=6), PhB (n=6), TOL (n=6), TOL PhB (n=6).*

Les animaux des groupes « Témoin » et « PhB » ne souffrent pas de pertes de cellules ciliées. En revanche, les rats du groupe « TOL » révèlent une perte de 78 à 86 % des CCE3 à 2 et 25 kHz. Dans cette gamme de fréquences, 28 % des CCE2 et 15% des CCE1 sont absentes. Au-delà de 30 kHz, les cellules ciliées semblent préservées.

Enfin, les rats du groupe « TOL PhB » montrent une perte de 44 et 37 % des CCE3 à 8 et 20 kHz. A ces fréquences, les pertes sont respectivement de 3 et 2 % pour les CCE2 et CCE1.

Le traitement au PhB a diminué les pertes de cellules ciliées externes induites par une exposition au toluène.

L'observation au microscope électronique à balayage des cellules ciliées (Figure 44) illustre les pertes cellulaires mises en évidence par les cochléogrammes. Les CCE sont la cible privilégiée du toluène, les pertes cellulaires des CCE (flèche jaune, Figure 44) s'étendent très clairement de la troisième vers la première rangée ; tandis que les cellules ciliées internes semblent préservées.

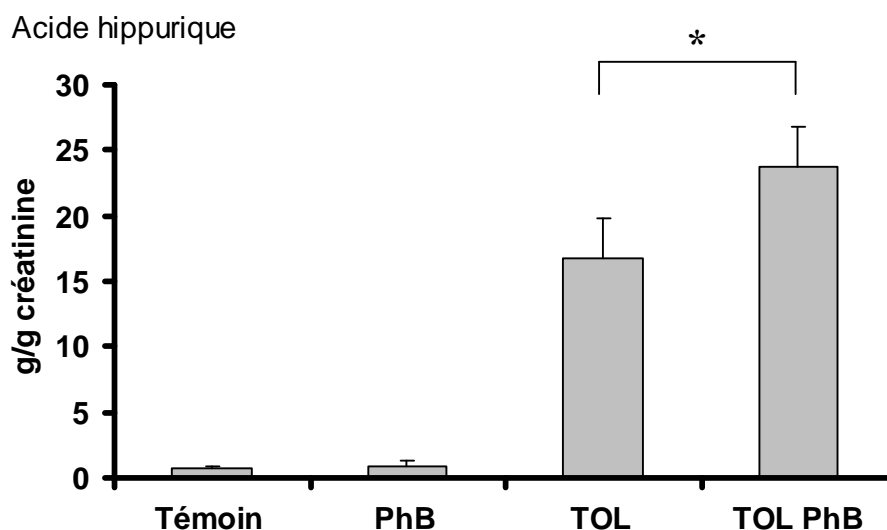


*Figure 44* : Vue de l'organe de Corti au microscope électronique à balayage. CCI : cellules ciliées internes, CCE : cellules ciliées externes. Flèches jaunes : cicatrices cochléaires.

## V- Mesures des métabolites urinaires

### V-1. Acide hippurique

L'acide hippurique (AH) a été dosé après 2, 3 et 4 semaines d'exposition à 1750 ppm de toluène. Etant donné qu'aucune variation n'a été observée entre les différentes semaines, seule la concentration des AH de la 4<sup>ème</sup> semaine a été représentée en Figure 45.



*Figure 45* : Concentrations urinaires d'acide hippurique chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. PhB : Phénobarbital 50 mg/kg/j, s.c.. Témoin (n=5), PhB (n=5), TOL (n=5), TOL PhB (n=5). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Anova à 1 facteur).

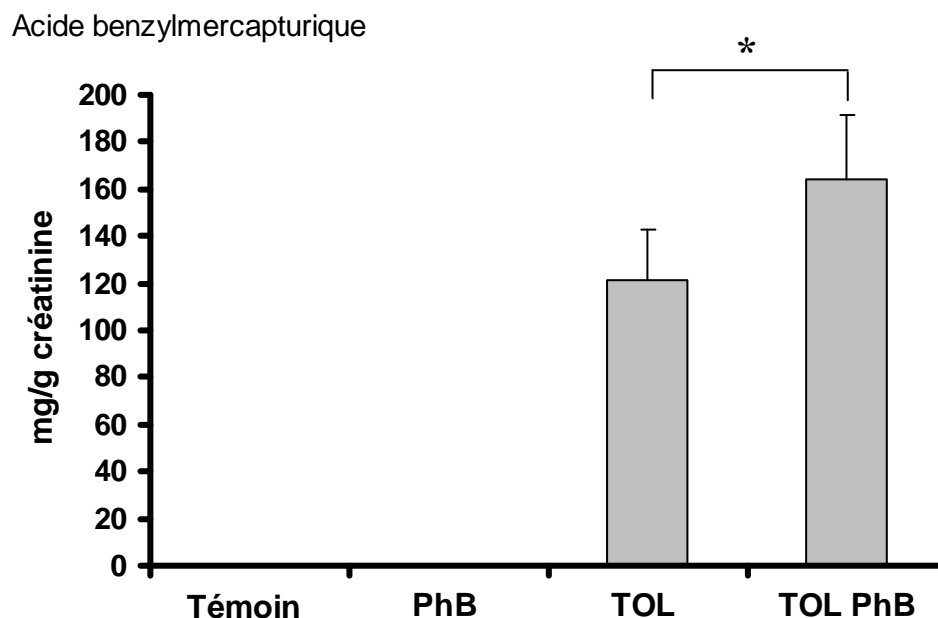
La concentration d'AH mesurée chez les animaux des groupes « Témoin » (n=5) et « PhB » (n=5) correspond à la concentration endogène, soit  $1 \pm 0,3$  g/g de créatinine en moyenne.

Les animaux du groupe « TOL » révèlent une concentration élevée d'AH de l'ordre de  $16,7 \pm 3,1$  g/g de créatinine (n=5).

Enfin, pour les rats (n=5) du groupe « TOL PhB », la concentration est plus élevée de 42 %, [ $F_{\text{groupe}}(3,45)=374,39$  ;  $p<0,001$ ] soit  $23,7 \pm 3,1$  g/g de créatinine.

## V-2. Acide benzylmercapturique

Comme pour l'AH, la constance des concentrations en ABM urinaire nous autorise à ne représenter que la concentration obtenue après quatre semaines d'exposition au toluène (Figure 46).



*Figure 46 : Concentrations urinaires d'acide benzylmercapturique chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. PhB : Phénobarbital 50 mg/kg/J, s.c.. Témoin (n=5), PhB (n=5), TOL (n=5), TOL PhB (n=5). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Anova à un facteur).*

Les résultats de la Figure 46 montrent une absence d'ABM urinaire chez les groupes « Témoin » (n=5) et « PhB » (n=5). Les rats (n=5) exposés au toluène présentent une concentration d'ABM de  $121,2 \pm 21,9$  mg/g de créatinine.

Lorsque les animaux (n=5) sont préalablement traités au PhB et exposés au toluène, la concentration d'ABM urinaire est augmentée [ $F_{\text{groupe}}(3,30)=205,99$ ;  $p<0,001$ ]. Elle passe de 42,7 mg/g pour atteindre une concentration de  $163,9 \pm 27,3$  mg/g de créatinine. Les rats traités au PhB excrètent 35% de plus d'ABM que les rats exposés au toluène seul.

## VI- Récapitulatif des résultats de l'étude A.

Le tableau 2 présente le récapitulatif des résultats de l'étude A.

*Tableau 2 : Comparaison des résultats obtenus lors d'une induction par le phénobarbital des voies d'oxydation et de conjugaison chez le rat. Les animaux atteints d'une surdité sont visualisés en orange.*

	Toxicocinétique	Audiométrie	Histologie	Biochimie	
	[Toluène] Sanguin µg/g	Elévation des seuils dB	Perte CCE2 % à 8 kHz	[AH] g/g	[ABM] mg/g
<b>Témoin</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>PhB</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>TOL</b>	<b>28</b>	<b>8</b>	<b>28</b>	<b>17</b>	<b>121</b>
<b>TOL PhB</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>24</b>	<b>164</b>

Les animaux du groupe « PhB » ne montrent aucune modification audiométrique, histologique et biochimique par rapport aux rats du groupe « Témoin », ce qui prouve l'inocuité du traitement au PhB.

Les rats du groupe « TOL » montrent une élévation de seuils audiométriques ainsi que des pertes de cellules ciliées. On remarque également une augmentation de la concentration des AH et des ABM par rapport au groupe « Témoin ».

Enfin, les animaux du groupe « TOL PhB », révèlent d'une part, une diminution de la concentration sanguine de toluène et d'autre part, une augmentation des concentrations urinaires des AH et des ABM par rapport au groupe « TOL ». De plus, ces rats traités au PhB et exposés au toluène ne présentent pas d'élévation de seuils audiométriques et montrent une faible perte de cellules ciliées par rapport au groupe « TOL ».

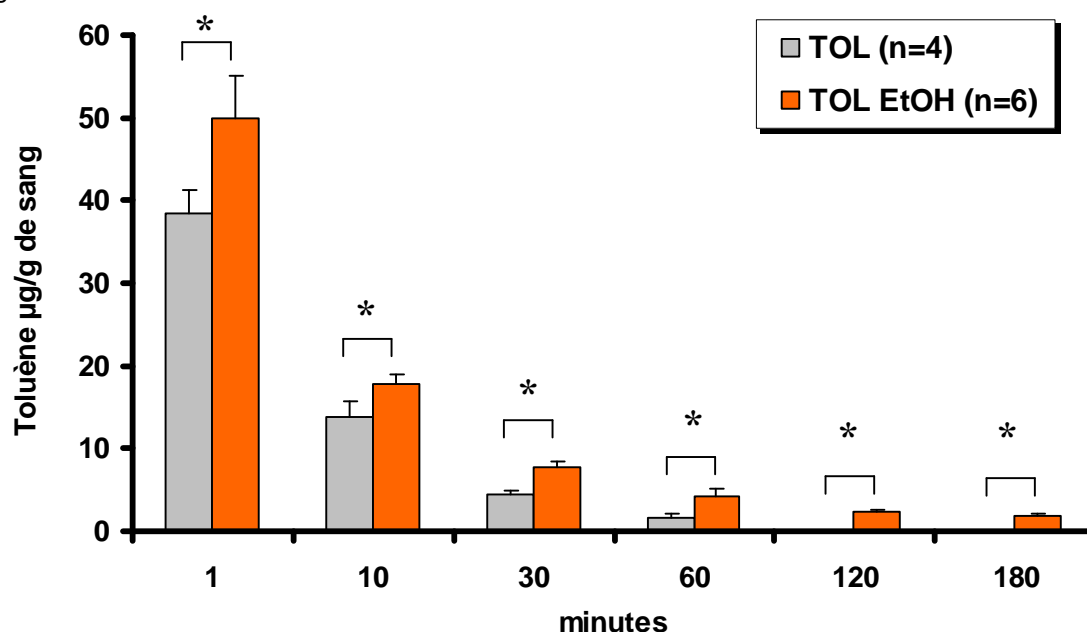
**L'ototoxicité du toluène a donc été réduite par le traitement au PhB.** En effet, le PhB a diminué les pertes auditives et cellulaires engendrées par le toluène. L'augmentation des concentrations d'AH et d'ABM urinaire témoigne d'une augmentation de l'efficacité des voies de détoxification.

## Étude B : Éthanol.

### Inhibition compétitive entre toluène et éthanol chez le rat

#### I- Efficacité du gavage à l'éthanol sur le toluène circulant

Dans cette étude pilote, 4 g/kg d'éthanol (EtOH) étaient administrés par gavage chez les rats, une heure avant l'injection d'un bolus de 300  $\mu$ L d'intralipide contenant 14  $\mu$ L de toluène. L'histogramme de la Figure 47 représente l'effet du gavage à l'EtOH sur la concentration de toluène sanguin.



*Figure 47: Variations des concentrations artérielles de toluène ( $\mu$ g/g sang) chez le rat gavé à 4 g/kg d'éthanol. Toluène : injection intra-jugulaire d'un bolus de 300  $\mu$ L d'intralipide contenant 14  $\mu$ L de toluène. Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs).*

Les animaux du groupe « TOL » (n=4) ont, une minute après l'injection de toluène, une concentration sanguine moyenne de 38,5  $\mu$ g de toluène par gramme de sang. Cette concentration diminue jusqu'à atteindre 1,8  $\mu$ g/g au bout de 60 minutes. Quant aux rats (n=6) du groupe « TOL EtOH », une minute après l'injection de toluène, la concentration de solvant est de 49,8  $\mu$ g/g, soit une augmentation de 29,3 % par rapport au groupe « TOL ». Dans ce même groupe « TOL EtOH », le toluène est encore présent au bout de 180 minutes.

Le gavage à l'éthanol a permis d'augmenter [ $F_{\text{groupe}}(1,56)=29,34$  ;  $p<0,001$ ] la concentration sanguine de toluène par rapport aux rats du groupe « TOL », et cela, jusqu'à 180 minutes après l'administration de toluène [ $F_{\text{groupe} \times \text{temps}}(6,56)=4,0$  ;  $p<0,001$ ].

## II- Contrôle des poids des animaux

Le contrôle des poids a permis d'évaluer l'état de santé des animaux. La figure 48 illustre l'évolution du poids des différents groupes d'animaux en fonction de leur traitement respectif.

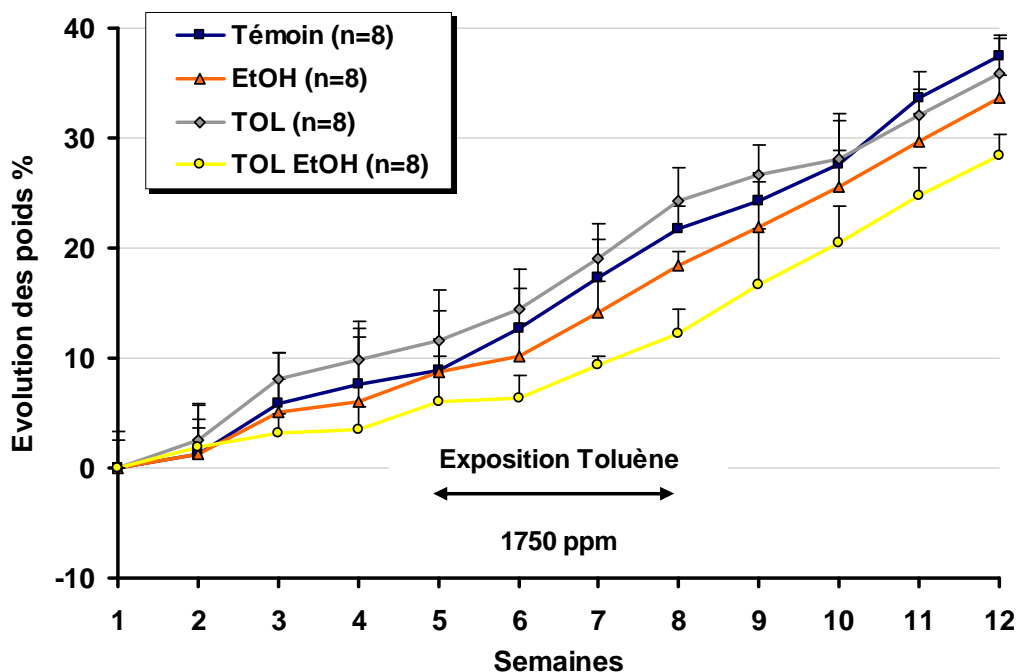


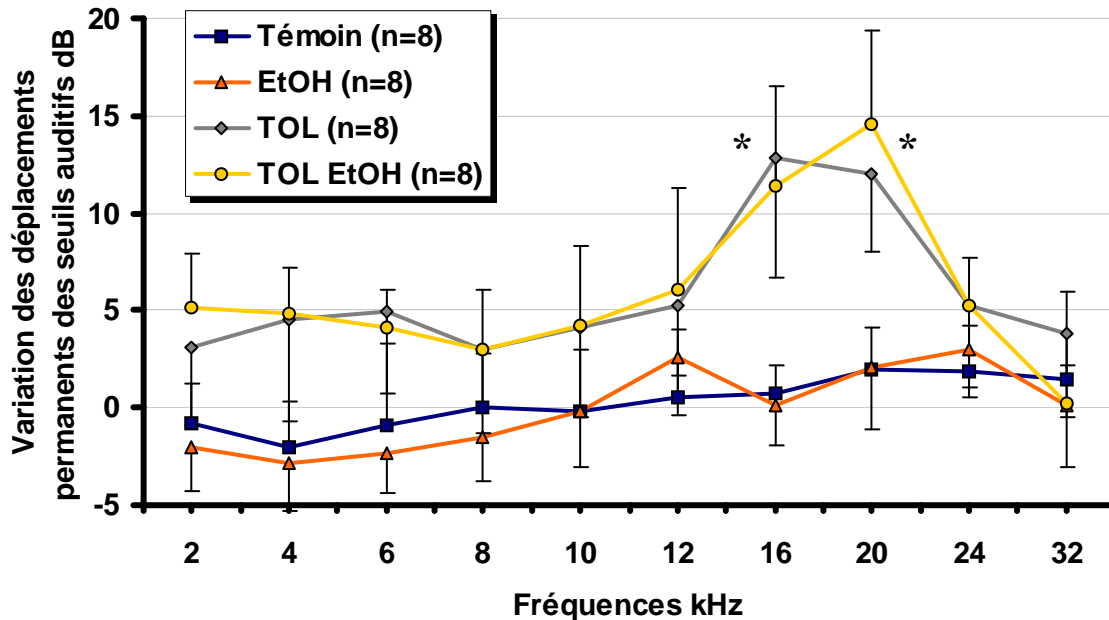
Figure 48 : Evolution des poids des rats au cours de l'étude B. Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 6 heures par jour, 5 jours par semaine, 4 semaines. EtOH : 4 g/kg/j p.o.. Barre d'erreur : écart type.

Les courbes des poids relatives aux quatre groupes d'animaux testés ne révèlent pas de différence [ $F_{\text{groupe}} (3,47=0,80 ; p=0,5)$ ]. Quel que soit le groupe, la croissance des animaux est régulière au cours de l'expérimentation, même si l'on note une croissance légèrement plus faible pour les rats du groupe « TOL EtOH ».



### III- Audiométrie

Les mesures audiométriques, lors d'une inhibition compétitive entre éthanol et toluène, ont déjà été déterminées au laboratoire de bioacoustique de l'INRS. Les résultats obtenus lors de l'étude Campo et al., (1998) ont été reportés sur la Figure 49.



*Figure 49* : Variations des déplacements permanents des seuils auditifs chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 6 heures par jour, 5 jours par semaine, 4 semaines, et après 4 semaines de récupération. EtOH : 4 g/kg/j p.o.. Témoin (n=8), EtOH (n=8), TOL (n=8), TOL EtOH (n=8). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95 % (Anova 2 facteurs), test des étendues multiples par rapport au groupe Témoin.

Les rats des groupes « Témoin » et « EtOH » ne présentent pas de variations des déplacements permanents des seuils auditifs, quelle que soit la fréquence testée. Le gavage à l'éthanol n'a pas engendré de perte auditive.

Les rats (n=8) du groupe « TOL » et ceux (n=8) du groupe « TOL EtOH » révèlent une variation semblable des déplacements permanents de seuils auditifs et montrent une augmentation significative des déplacements permanents des seuils auditifs de 14 dB à 16 et 20 kHz par rapport au groupe « Témoin ».

L'inhibition compétitive entre l'éthanol et le toluène n'a pas modifié les déplacements permanents des seuils auditifs chez les rats exposés au toluène.

#### IV- Histologie de la cochlée

Les cochléogrammes obtenus pour les rats des groupes « TOL » et « TOL EtOH » ont également été réalisés au laboratoire de bioacoustique de l'INRS (Campo et al., 1998). Ils sont reportés sur la Figure 50.

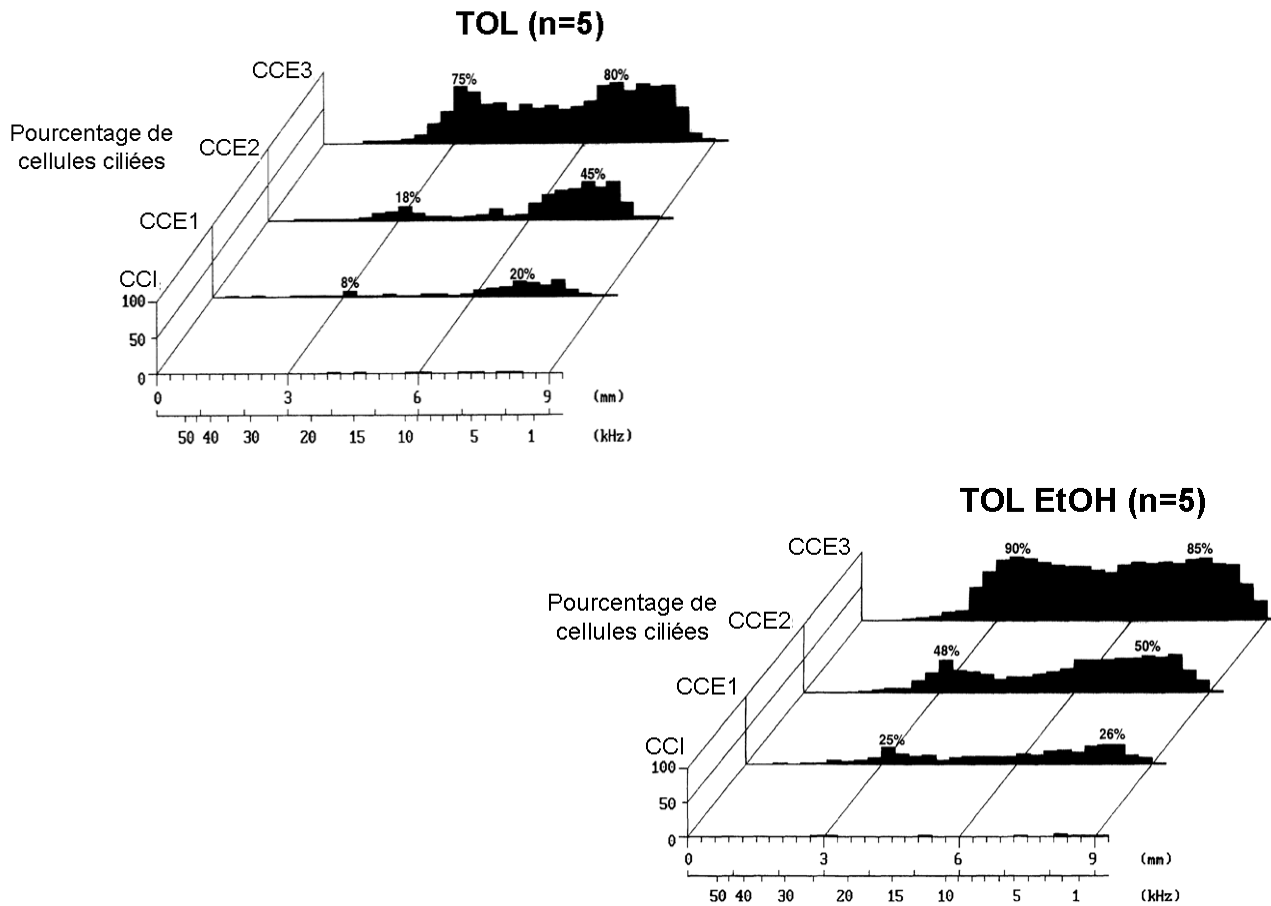


Figure 50 : Pertes de cellules ciliées chez les rats après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 6 heures par jour, 5 jours par semaine, 4 semaines, et après 4 semaines de récupération. EtOH : 4 g/kg/j p.o.. TOL (n=5), TOL EtOH (n=5).

Les rats des groupes « Témoin » et « EtOH » ne souffrent pas de pertes de cellules ciliées. Le gavage à 4 g/kg d'EtOH n'ayant pas engendré de pertes cellulaires, le cochléogramme n'a donc pas été représenté (Figure 43).

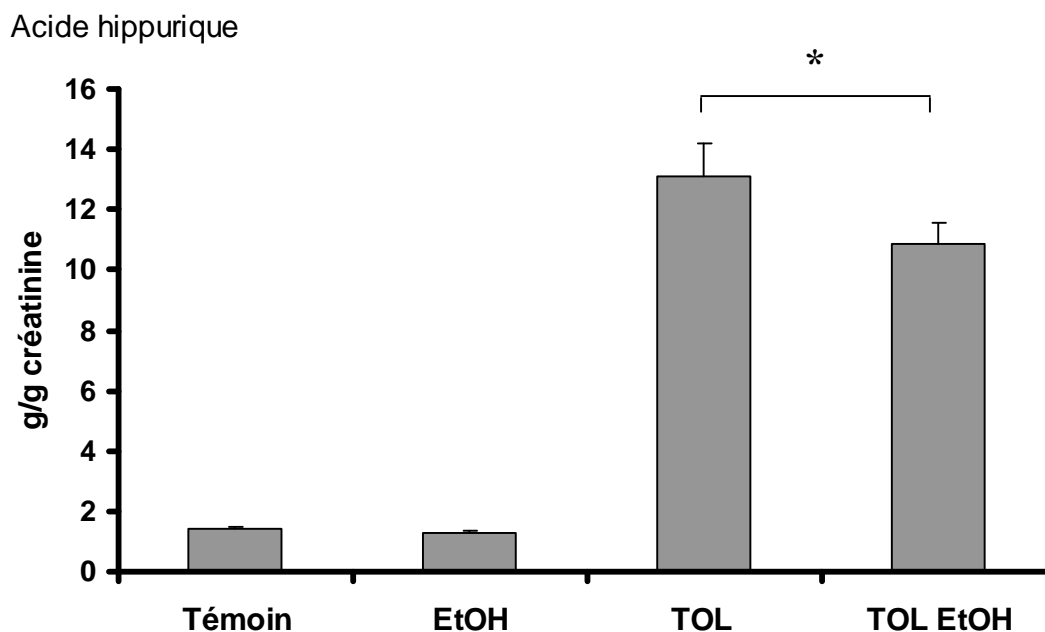
En revanche, les rats du groupe « TOL » révèlent une perte de 80 % des CCE3 à 4 kHz et de 75 % à 20 kHz. À 4 et 20 kHz, les pertes de CCE2 sont respectivement de 45% et 18 %, tandis qu'elles sont de 20 et 8 % pour les CCE1.

Enfin, les rats du groupe « TOL EtOH » montrent des pertes de cellules ciliées plus élevées : 85 et 90 % de perte des CCE3 à 4 et 20 kHz. À ces mêmes fréquences, les pertes sont respectivement de 50 et 48 % pour les CCE2 et de 26 et 25 % pour les CCE1. Le gavage à l'éthanol a augmenté les pertes de cellules ciliées externes induites par une exposition au toluène, plus particulièrement à 20 kHz.

## V- Mesure des métabolites urinaires

### V-1. Acide hippurique

L'acide hippurique (AH) a été dosé après 2, 3 et 4 semaines d'exposition à 1750 ppm de toluène. Etant donné qu'aucune variation n'a été observée entre les différentes semaines, seule la concentration des AH de la 4<sup>ème</sup> semaine a été représentée sur la Figure 51.



*Figure 51 : Concentrations urinaires d'acide hippurique chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 6 heures par jour, 5 jours par semaine, 4 semaines. EtOH : 4 g/kg/j p.o.. Témoin (n=8), EtOH (n=8), TOL (n=8), TOL EtOH (n=6). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).*

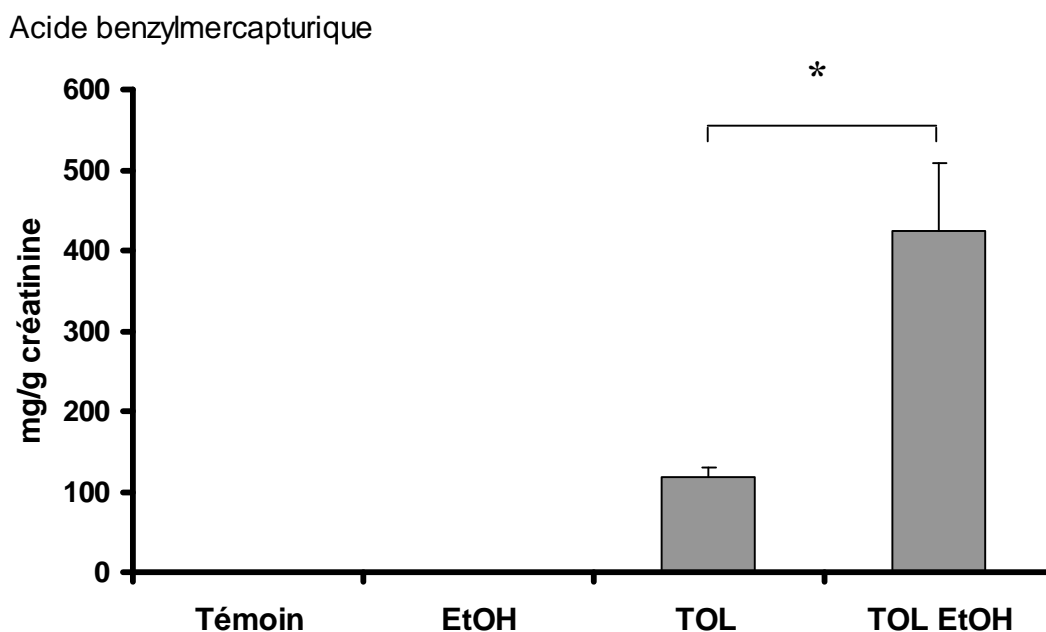
La concentration d'AH mesurée chez les rats des groupes « Témoin » (n=8) et « EtOH » (n=8) correspond à la concentration endogène, soit  $1,3 \pm 0,09$  g/g de créatinine en moyenne.

Les rats (n=8) du « TOL » révèlent une concentration d'AH de  $13,1 \pm 1,1$  g/g de créatinine. En revanche, les rats (n=6) du groupe « TOL EtOH » montrent une concentration plus basse de  $10,8 \pm 0,8$  g/g de créatinine.

Les rats gavés à l'éthanol et exposés au toluène ont excrété 17,4 % de moins d'AH que les rats exposés au toluène seul [K=24,99 ; p<0,001].

## V-2. Acide benzylmercapturique

Etant donné qu'aucune variation des concentrations des acides benzylmercapturiques (ABM) urinaires n'a été observée entre les différentes semaines d'exposition, seule la concentration des ABM de la quatrième semaine a été représentée dans le Figure 52.



*Figure 52* : Concentrations urinaires d'acide benzylmercapturique chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 6 heures par jour, 5 jours par semaine, 4 semaines. EtOH : 4 g/kg/j p.o. Témoin (n=8), EtOH (n=8), TOL (n=8), TOL EtOH (n=6). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).

Les résultats montrent une absence d'ABM urinaire chez les rats des groupes « Témoin » et « EtOH ». Les rats (n=8) exposés au toluène ont une concentration d'ABM de  $118,7 \pm 11,1$  mg/g de créatinine. Lorsque les animaux (n=6) étaient préalablement gavés à l'éthanol puis exposés au toluène, la concentration d'ABM urinaire augmentait [ $K=28,09$  ;  $p<0,001$ ] pour atteindre une concentration de  $423,6 \pm 84,1$  mg/g de créatinine.

Les rats gavés à l'éthanol et exposés au toluène ont excrété 3,6 fois plus d'ABM urinaire que les rats exposés au toluène seul.

## VI- Récapitulatif des résultats de l'étude B.

Le tableau 3 présente le récapitulatif des résultats de l'étude B.

*Tableau 3 : Comparaison des résultats obtenus lors d'une inhibition compétitive entre toluène et éthanol chez le rat. Les animaux atteints d'une surdité sont visualisés en orange.*

	Toxicocinétique	Audiométrie	Histologie	Biochimie	
	[Toluène] Sanguin µg/g	Elévation des seuils dB	Perte CCE2 % à 20 kHz	[AH] g/g	[ABM] mg/g
<b>Témoin</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>EtOH</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>TOL</b>	<b>38</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	<b>118</b>
<b>TOL EtOH</b>	<b>49</b>	<b>14</b>	<b>48</b>	<b>11</b>	<b>423</b>

Les rats du groupe « EtOH » ne montrent aucune modification audiométrique, histologique et biochimique par rapport aux rats du groupe « Témoin », ce qui prouve l'inocuité d'une dose administrée par voie orale de 4g/kg d'EtOH chez le rat.

Les rats du groupe « TOL » révèlent une élévation de 12 dB des seuils audiométriques ainsi que 18% des pertes de cellules ciliées. On remarque également une augmentation, par rapport au groupe « Témoin », de la concentration des AH et des ABM pour atteindre respectivement : 13 g/g et 118 mg/g de créatinine.

Enfin, chez les animaux du groupe « TOL EtOH », la concentration sanguine de toluène est augmentée par rapport au groupe « TOL ». De plus, les rats gavés à l'éthanol et exposés au toluène présentent la même élévation de seuils audiométriques mais une perte plus élevée de cellules ciliées par rapport au groupe « TOL ». Enfin les concentrations des AH urinaires sont inférieures aux rats du groupe « TOL » tandis que les concentrations des ABM urinaires sont 4 fois plus élevées. L'éthanol a augmenté les pertes des cellules ciliées malgré l'augmentation de l'excrétion des ABM urinaires.

**L'inhibition compétitive entre l'éthanol et le toluène a induit une plus forte cochléotoxicité induite par le toluène chez le rat.**

## Etude C : Acivicine.

### Inhibition de la voie de conjugaison du toluène chez le rat

#### I- Efficacité du traitement à l'acivicine

Une expérience préliminaire a permis d'étudier l'efficacité du traitement à l'acide  $\alpha$ -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacétique (acivicine ou Aci). Les rats ont été exposés à 1750 ppm de toluène, six heures par jour, pendant cinq jours. Par ailleurs, les animaux étaient traités à l'acivicine le lundi matin ainsi que le mercredi soir à raison de 5 mg/kg, *i.p.*. Après exposition au toluène, les rats étaient placés dans des cages à métabolisme pour recueillir les urines. Le dosage des gamma-glutamyltransférases ( $\gamma$ -GT) urinaires, témoins de l'efficacité de l'inhibition à l'Aci, était réalisé le lendemain matin. Le tableau 4 résume les résultats obtenus :

*Tableau 4 : Variation de l'activité urinaire des  $\gamma$ -GT (UI/g de créatinine) au cours de la semaine chez des rats traités à 5 mg/kg d'acivicine (Aci), lundi matin et mercredi soir. M : mardi, Me : mercredi, J : jeudi, V : vendredi. Exposition à 1750 ppm de toluène.*

	M	Me	J	V	Moyenne
Témoin (n=4)	1052 $\pm$ 225	1155 $\pm$ 86	1528 $\pm$ 482	1296 $\pm$ 204	<b>1257 <math>\pm</math> 249</b>
Aci (n=5)	5 $\pm$ 2	455 $\pm$ 169	2 $\pm$ 1	271 $\pm$ 47	<b>183 <math>\pm</math> 54</b>
TOL (n=7)	1582 $\pm$ 483	1694 $\pm$ 500	1833 $\pm$ 783	1425 $\pm$ 226	<b>1633 <math>\pm</math> 498</b>
TOL Aci (n=5)	1 $\pm$ 1	356 $\pm$ 42	4 $\pm$ 3	324 $\pm$ 104	<b>171 <math>\pm</math> 37</b>

Les rats (n=4) du groupe témoin présentent une activité des  $\gamma$ -GT de 1257  $\pm$  249 UI/g de créatinine en moyenne qui correspond à l'activité de base de la  $\gamma$ -GT chez le rat. Lorsque les rats (n=7) sont exposés à 1750 ppm de toluène, l'activité de la  $\gamma$ -GT augmente [ $F_{\text{groupe}}(3,76)=105,5$  ;  $p<0,001$ ] de 30% par rapport aux rats du groupe « Témoin », pour atteindre 1633  $\pm$  498 UI/g de créatinine.

Les rats (n=5 par groupe) des groupes « Aci » et « TOL Aci » ont une activité semblable de 183  $\pm$  54 et 171  $\pm$  37 UI/g de créatinine. L'efficacité du traitement à l'acivicine était donc suffisante pour réaliser l'expérimentation.

Enfin, l'activité de la  $\gamma$ -GT chez les rats des groupes « TOL » et « TOL Aci » est significativement différente [Post-hoc Bonferroni] : elle passe de 1633  $\pm$  498 à 171  $\pm$  37 UI/g de créatinine. Le traitement à l'acivicine qui repose sur deux injections hebdomadaires inhibe à 90% en moyenne l'activité de la  $\gamma$ -GT.

## II- Contrôle des poids des animaux

Comme pour les études A et B, le contrôle des poids a été effectué au cours de l'expérimentation (Figure 53). Ce contrôle était d'autant plus important que l'inhibition d'une voie métabolique peut perturber l'état de santé des animaux.

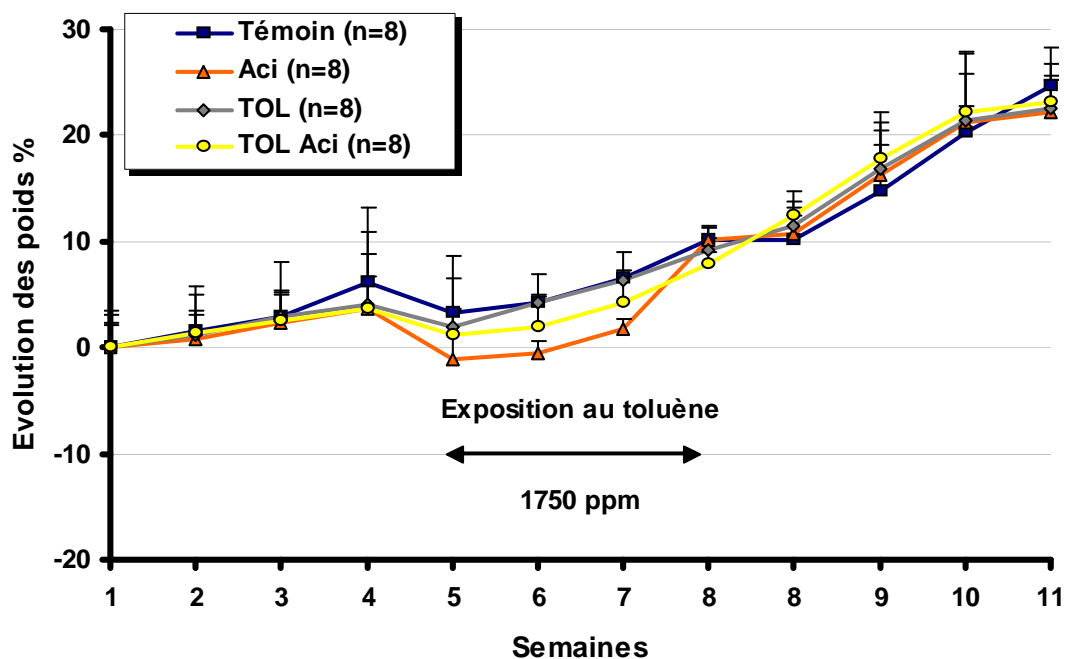


Figure 53 : Évolution des poids des rats au cours de l'étude C. Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Aci : acivicine 5 mg/kg, i.p.. Barre d'erreur : écart type.

L'évolution des poids des rats ne révèle pas de différence [ $F_{\text{groupe}}(3,47)=0,07$  ;  $p=0,976$ ] entre les différents groupes testés. Au cours de l'exposition au toluène entre la 5<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> semaine, la prise de poids des animaux a été interrompue. Cependant, la rupture de pente apparaît également pour les rats du groupe « Témoin », par conséquent ce phénomène est indépendant du traitement à l'acivicine et de l'exposition au toluène.

### III- Audiométrie

#### III-1. Seuils auditifs avant exposition

Comme pour les études A et B, un premier audiogramme basé sur le recueil de seuils des potentiels auditifs évoqués au niveau du colliculus inférieur, a été réalisé pour les fréquences allant de 2 à 32 kHz (Figure 54).

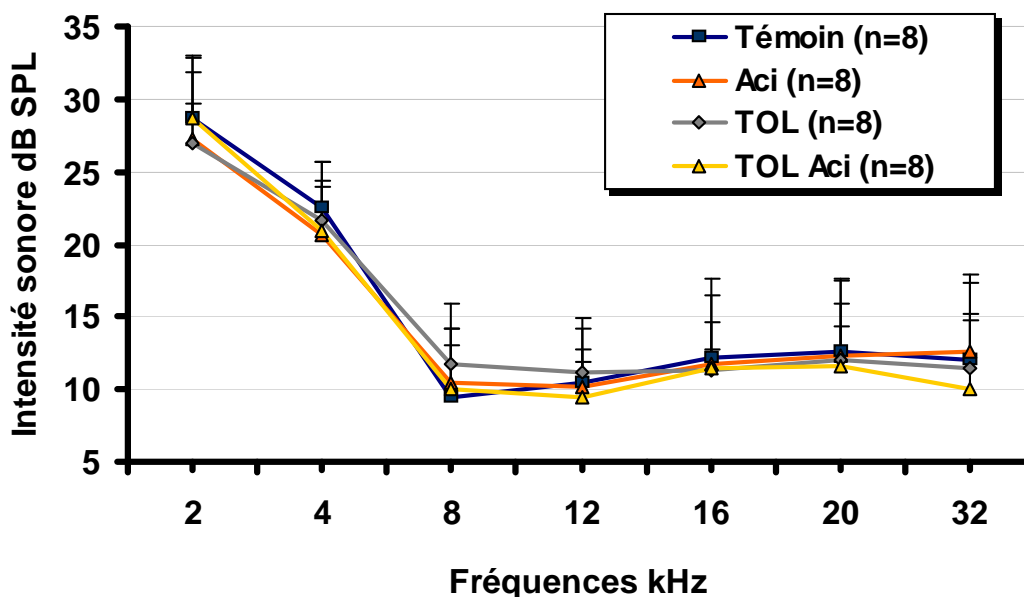


Figure 54 : Intensité sonore requise pour obtenir une amplitude de 15  $\mu$ V des potentiels auditifs évoqués, avant exposition au toluène, Aci : acivicine 5 mg/kg, ip. Barre d'erreur : écart type.

Avant exposition au toluène, il n'y avait pas de différence entre les différents groupes [ $F_{\text{groupe}}(3,196)=0,06$  ;  $p=0,982$ ], quelle que soit la fréquence testée [ $F_{\text{groupe} \times \text{fréquence}}(18,196)=0,24$  ;  $p=0,999$ ]. L'audiométrie des rats des différents groupes testés pouvait donc être considérée comme homogène avant l'expérimentation.



### III-2. Déplacement permanent de seuils auditifs

Au terme des quatre semaines d'exposition au toluène et des quatre semaines de récupération (Figure 13, p25), un deuxième audiogramme était réalisé sur chaque animal pour calculer les variations des déplacements permanents de seuils auditifs (Figure 55).

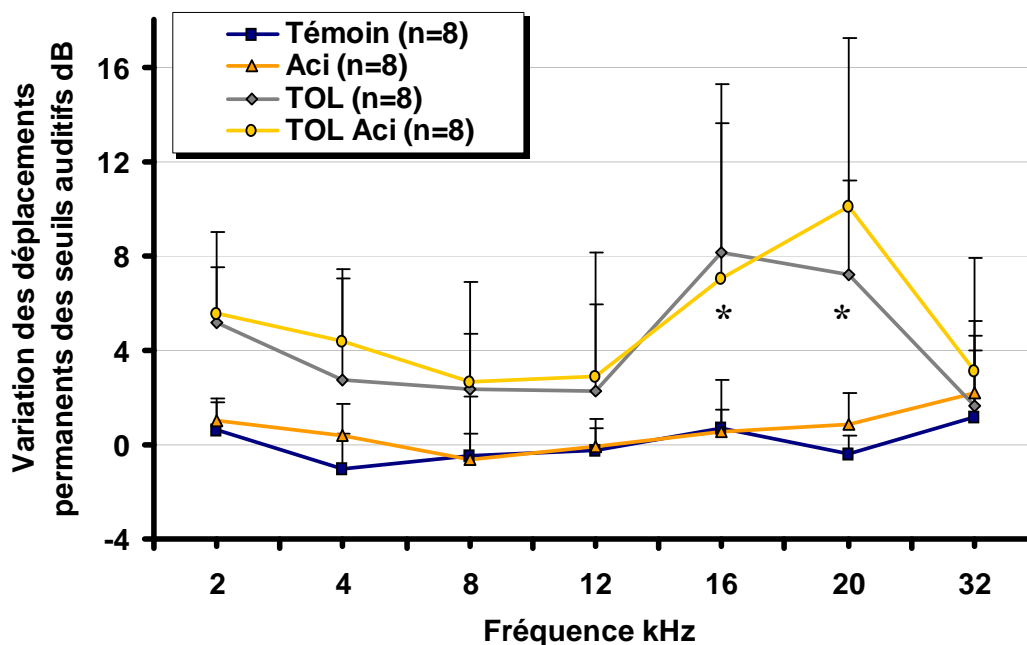


Figure 55 : Variations des déplacements permanents des seuils auditifs chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. Aci: acivicine 5 mg/kg, i.p.. Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs), test des étendues multiples par rapport au groupe Témoin.

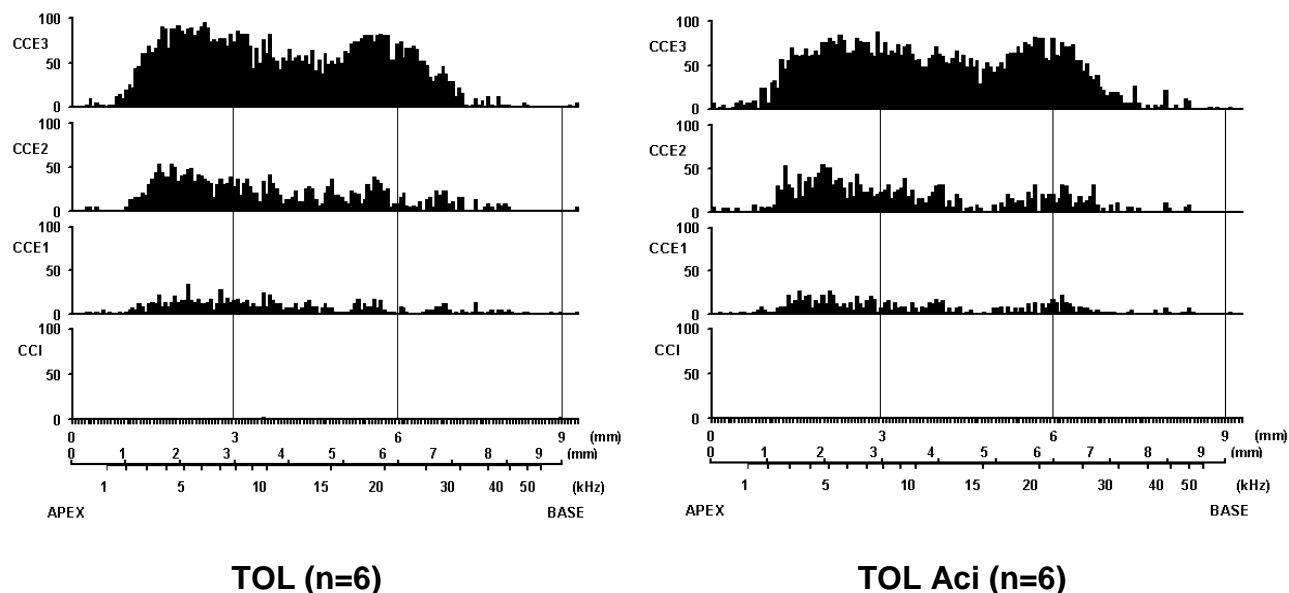
Les déplacements permanents des seuils auditifs ne sont pas significativement différents entre les rats des groupes « Témoin » et « Aci ».

En revanche, les déplacements permanents de seuils auditifs calculés pour les rats (n=8 par groupe) des groupes « TOL » et « TOL Aci » sont [ $F_{\text{groupe}}(3,196)=28,66$  ;  $p<0,001$ ] différents par rapport aux rats du groupe « Témoin », quelle que soit la fréquence testée [ $F_{\text{groupe} \times \text{fréquence}}(18,196)=1,67$  ;  $p=0,047$ ]. On remarque que l'amplitude des déplacements des seuils auditifs des rats appartenant au groupe « TOL Aci » est maximale à 20 kHz : elle est de 10 dB à 20 kHz.

Le traitement à l'acivicine n'a pas modifié les variations audiométriques engendrées par une exposition au toluène.

## IV- Histologie de la cochlée

Les cochléogrammes illustrent le pourcentage de pertes de cellules ciliées en fonction de la carte en fréquence, le long de l'organe de Corti (Figure 56).



**Figure 56** : Pertes de cellules ciliées chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. Aci : acivicine 5 mg/kg, i.p.. TOL (n=6), TOL Aci (n=6).

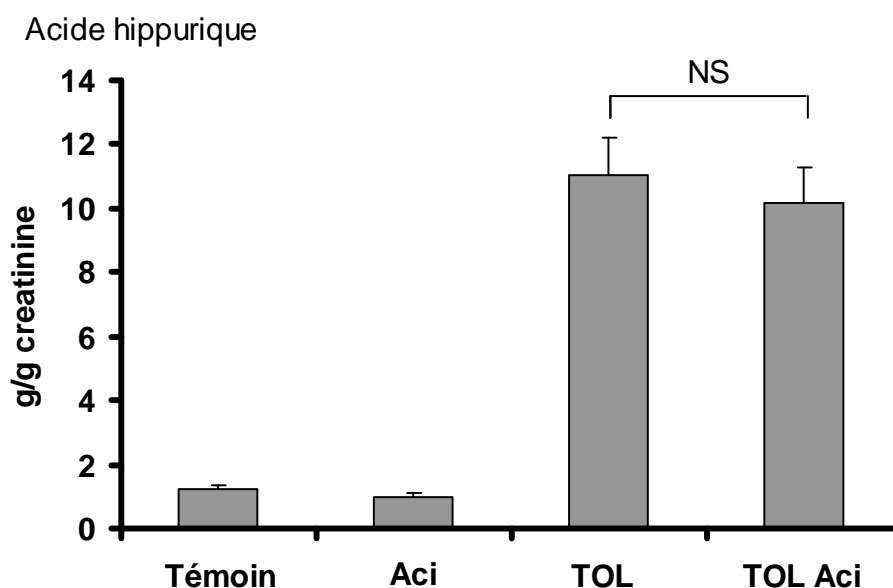
Les cochléogrammes obtenus pour les rats des groupes «Témoin» et «Aci» ne présentaient pas de pertes cellulaires, ils étaient semblables à la figure 43 et pour cette raison ne sont pas illustrés sur la figure 56. Les pertes cellulaires provoquées par l'exposition au toluène n'ont pas été modifiées par le traitement à l'Aci. En effet, les rats (n=6 par groupe) des groupes « TOL » et « TOL Aci » souffrent du même profil de pertes de CCE entre 2 et 30 kHz après une exposition à 1750 ppm de toluène. Le profil des pertes présente deux pics à 5 et 20 kHz : les pertes moyennes de CCE des rats des groupes « TOL » et « TOL Aci » sont, respectivement, de 12 et 8 % au niveau de la 1<sup>ère</sup> rangée, de 25 et 18 % au niveau de la 2<sup>ème</sup>, et enfin de 70 et 64 % au niveau de la 3<sup>ème</sup> rangée. Comme décrit lors de l'étude A, les pertes de cellules ciliées croissent de la première vers la troisième rangée de CCE. Les CCI n'ont pas été endommagées.

L'acivicine n'a pas modifié les pertes de cellules ciliées induites par le toluène.

## V- Mesures des métabolites urinaires et du toluène sanguin

### V-1. Acide hippurique

L'acide hippurique (AH) a été dosé après 2, 3, et 4 semaines d'exposition à 1750 ppm de toluène. Etant donné qu'aucune variation n'a été observée entre les différentes semaines, les concentrations des AH de la 4<sup>ème</sup> semaine ont été représentées (Figure 57).



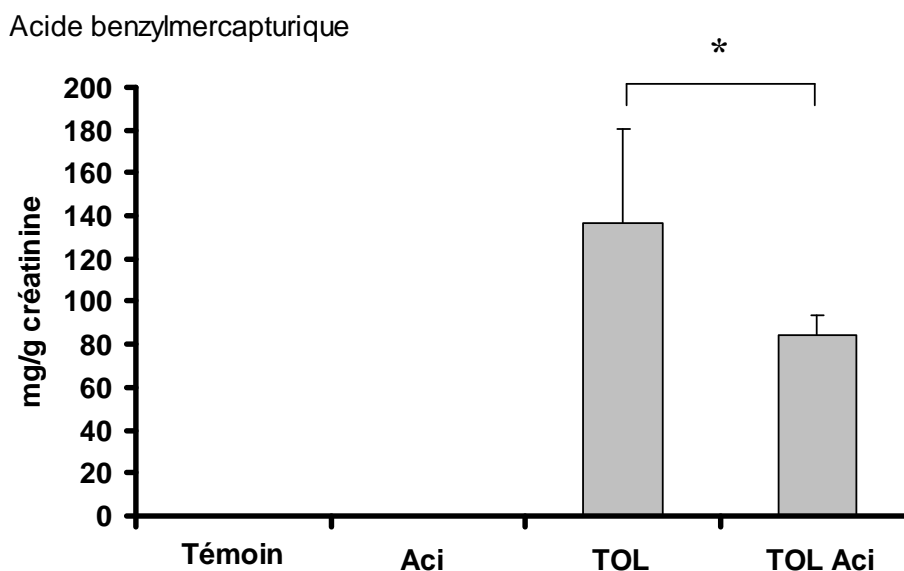
*Figure 57 : Concentrations urinaires d'acide hippurique chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Aci : acivicine 5 mg/kg, i.p.. Témoin (n=5), Aci (n=5), TOL (n=5), TOL Aci (n=5). Barre d'erreur : écart type. NS : différence non significative (Kruskal-Wallis).*

La concentration d'AH de  $1 \pm 0,1$  g/g de créatinine obtenue avec les rats (n= 5 par groupe) des groupes « Témoin » et « Aci », correspond à la concentration endogène d'AH. Les rats des groupes « TOL » et « TOL Aci » ont respectivement une concentration d'AH de  $11,1 \pm 1,1$  et  $10,1 \pm 1,1$  g/g de créatinine. Il n'y a pas de différence [K=0,33 ; p=0,567] entre les groupes « TOL » et « TOL Aci ».

Les rats traités à l'acivicine et exposés au toluène excrètent autant d'AH urinaire que les rats exposés seulement au toluène.

## V-2. Acide benzylmercapturique

Comme pour l'AH, la constance des concentrations d'acide benzylmercapturique (ABM) urinaire nous autorise à ne représenter que les concentrations obtenues après quatre semaines d'exposition au toluène (Figure 58).



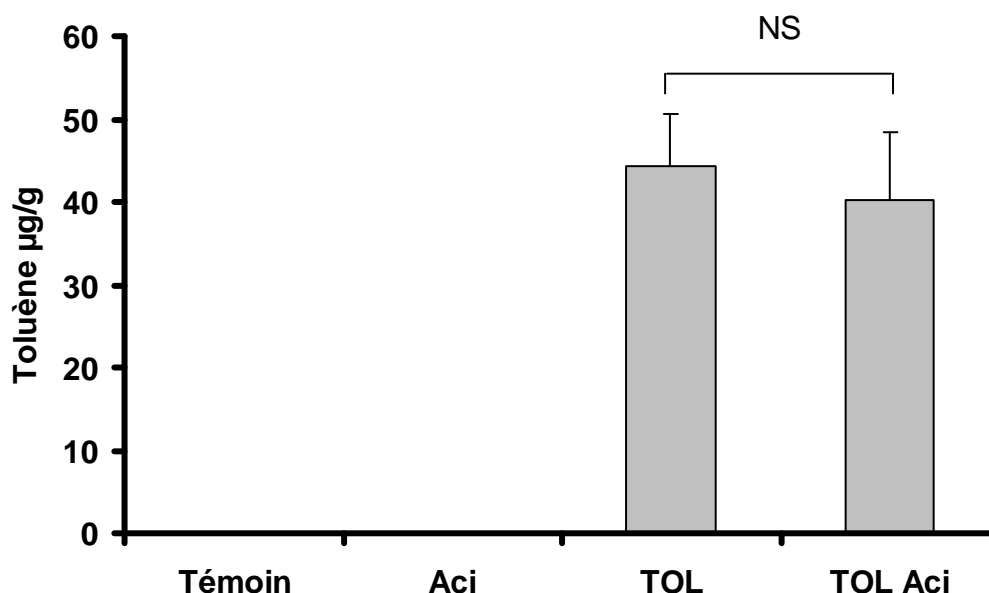
*Figure 58 : Concentrations urinaires d'acide benzylmercapturique chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Aci : acivicine 5 mg/kg, i.p.. Témoin (n=8), Aci (n=8), TOL (n=8), TOL Aci (n=8). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).*

Aucune trace d'ABM urinaire n'a été décelée chez les rats (n=8 par groupe) des groupes « Témoin » et « Aci ». Les rats exposés au toluène seul présentent une concentration de  $137,1 \pm 43,5$  mg/g de créatinine. Les animaux traités à l'acivicine et exposés au toluène, ont une concentration d'ABM urinaire moins élevée de  $84,1 \pm 9,4$  mg/g de créatinine. La différence de 53 mg/g de créatinine entre les rats des groupes « TOL » et « TOL Aci » est significative [K=3,85 ; p=0,049].

Les rats traités à l'acivicine excrètent 38% d'ABM urinaire en moins par rapport aux rats exposés au toluène seul.

### V-3. Toluène veineux

À la fin des quatre semaines (6h/j, 5j/sem) d'exposition à 1750 ppm de toluène, des prélèvements de sang veineux étaient effectués après section de l'extrémité de la queue du rat (Figure 59).



*Figure 59* : Concentrations sanguine de toluène chez le rat après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Aci : acivicine 5 mg/kg, i.p.. Témoin (n=8), Aci (n=8), TOL (n=8), TOL Aci (n=8). Barre d'erreur : écart type. NS : différence non significative (Kruskal-Wallis).

Comme attendu, aucune trace de toluène n'a été décelée chez les rats (n=8 par groupe) des groupes « Témoin » et « Aci ». Les rats des groupes « TOL » et « TOL Aci » présentent respectivement une concentration sanguine de toluène de  $44,3 \pm 6,3$  et  $40,2 \pm 8,2$  µg/g. Il n'y a pas de différence [K=0,75 ; p=0,039] de concentration sanguine de toluène entre ces deux groupes.

Le traitement à l'acivicine (5mg/kg i.p.) n'a pas influencé la concentration de toluène sanguin chez le rat.

## VI- Récapitulatif des résultats de l'étude C

Le tableau 5 présente le récapitulatif des résultats de l'étude C.

*Tableau 5 : Comparaison des résultats obtenus lors d'une inhibition par l'acivicine de la voie de conjugaison chez le rat. Les animaux atteints d'une surdité sont visualisés en orange.*

	Toxicocinétique	Audiométrie	Histologie	Biochimie		
	[Toluène] sanguin µg/g	Elévation des seuils dB	Perte CCE2 % à 5 kHz	[AH] g/g	[ABM] mg/g	γ-GT UI/g
<b>Témoin</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1257</b>
<b>Aci</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>183</b>
<b>TOL</b>	<b>44</b>	<b>8</b>	<b>25</b>	<b>11</b>	<b>137</b>	<b>1633</b>
<b>TOL Aci</b>	<b>40</b>	<b>8</b>	<b>18</b>	<b>10</b>	<b>84</b>	<b>171</b>

Bien que l'activité des  $\gamma$ -GT des rats du groupe « Aci » ait diminué de 86% par rapport aux animaux des groupes « Témoin » et « TOL », attestant de l'efficacité du traitement, les données audiométriques, histologiques et biochimiques obtenues pour les rats du groupe « Aci » ne révèlent aucune modification par rapport aux rats du groupe « Témoin ». Ces résultats démontrent l'inocuité du traitement à l'acivicine sur l'audition du rat.

L'exposition à 1750 ppm de toluène a engendré une élévation de 8 dB des seuils audiométriques et des pertes de 25 % des cellules ciliées obtenues à la 2<sup>ème</sup> rangée. On remarque également une augmentation des concentrations d'AH et d'ABM par rapport aux rats des groupes « Témoin ».

Les animaux appartenant au groupe « TOL Aci » présentent également une élévation de 8 dB des seuils audiométriques et des pertes de 18 % des cellules ciliées obtenus à la 2<sup>ème</sup> rangée. On note une augmentation de la concentration d'AH semblable à celle des rats du groupe « TOL », tandis que l'apparition des ABM est moins forte pour les rats du groupe « TOL Aci ».

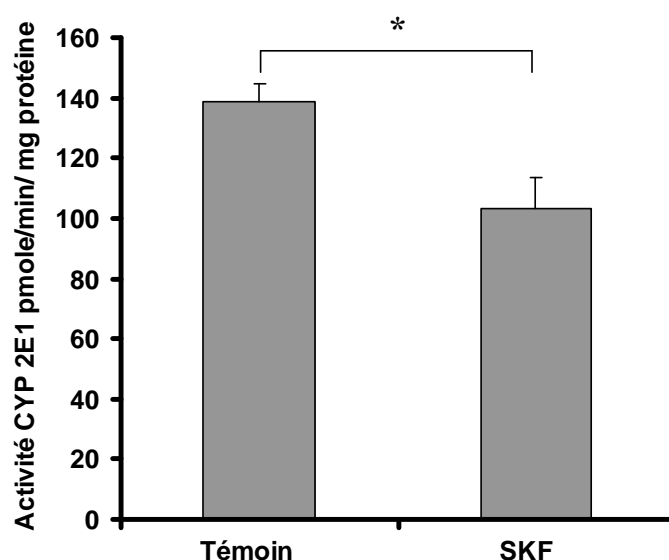
**L'acivicine n'a pas modifié l'ototoxicité induite par le toluène malgré une diminution des ABM urinaires.**

## Étude D : SKF-525A et régime hypoprotéiné à 7%. Inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène chez le rat

### I- Efficacité du traitement au SKF

#### I-1. Activité des CYP 2E1

Au cours d'une étude préliminaire, l'inhibition de la voie d'oxydation par le traitement au 2,2-diphénylpentanoate de 2-(diéthylamino)-éthyle (SKF) a été évaluée par les mesures de l'activité hépatique des CYP 2E1. Les rats ont été traités à 50 mg/kg, s.c. de SKF, puis, une heure après le traitement, le foie était prélevé pour préparer des microsomes et mesurer l'activité des CYP 2E1 (Figure 60).



*Figure 60 : Activité hépatique des CYP 2E1 (pmole/min/mg protéine) chez le rat. SKF : 50 mg/kg, s.c.. Témoin (n=4), SKF (n=4). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).*

Les rats (n=4) du groupe « Témoin » possèdent une activité hépatique basale des CYP 2E1 de  $138 \pm 5,9$  pmole/min/mg protéine.

Après une injection de 50 mg/kg, s.c. de SKF, l'activité des CYP 2E1 des rats (n=4) appartenant au groupe « SKF » diminue [ $K=5,83$  ;  $p=0,021$ ], jusqu'à atteindre  $104 \pm 10,2$  pmole/min/mg protéine.

Le SKF a donc permis de réduire l'activité hépatique des CYP2E1 de 24,6 % par rapport aux rats du groupe « Témoin », une heure après le traitement.

## I-2. Toluène artériel

Après avoir confirmé l'efficacité de l'inhibition du traitement au SKF sur l'activité des CYP 2E1 des microsomes hépatiques, l'impact du SKF sur la concentration de toluène circulant a été évalué. Les rats expérimentés ont été traités à 50 mg/kg s.c. de SKF, puis ont reçu, une heure après, une injection intrajugulaire d'un bolus de 300  $\mu$ L d'intralipide contenant 28  $\mu$ L de toluène. Des échantillons de sang ont été prélevés dans la carotide pour déterminer la concentration de toluène circulant entre 1 et 180 minutes (Figure 61).

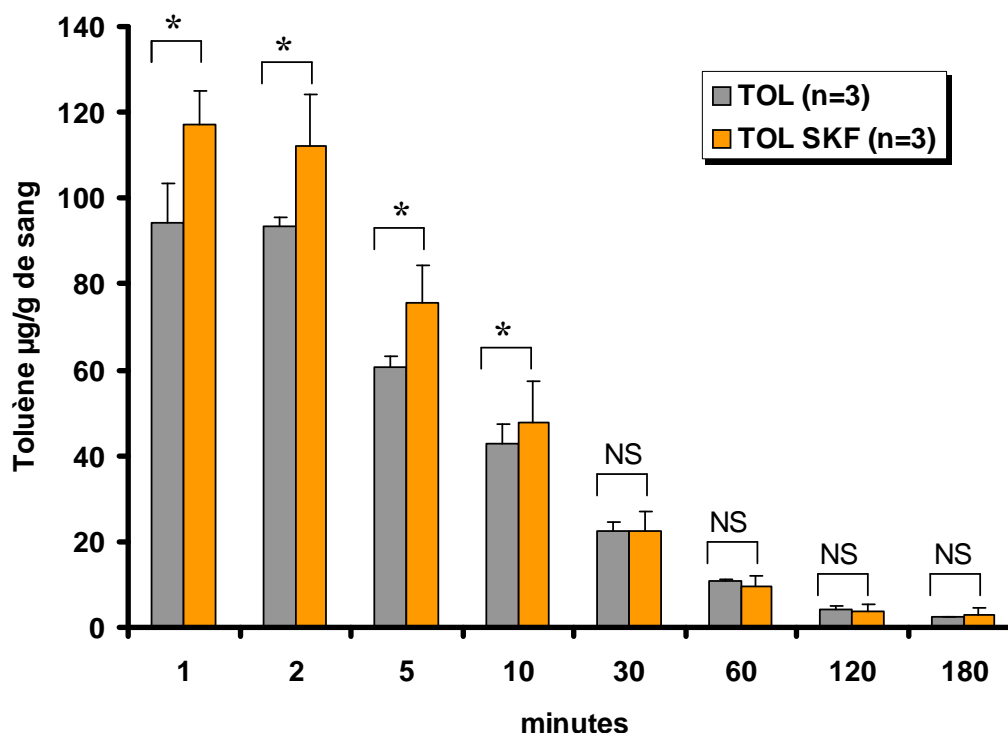


Figure 61 : Variations des concentrations artérielles du toluène ( $\mu$ g/g sang) chez le rat traité à 50 mg/kg, s.c. de SKF. Toluène : injection intrajugulaire d'un bolus de 300  $\mu$ L d'intralipide contenant 28  $\mu$ L de toluène. Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95%, NS : différence non significative (Anova à 2 facteurs).

Les animaux (n=3) du groupe « TOL » présentent une concentration moyenne de  $94 \pm 9,1$   $\mu$ g de toluène par gramme de sang à 1 et 2 minutes. Puis cette concentration diminue progressivement jusqu'à atteindre une valeur de  $2,3 \pm 0,3$   $\mu$ g/g, au bout de 180 minutes.

Les rats (n=3) du groupe « TOL SKF » ont une concentration sanguine de toluène plus élevées que celle des rats du groupe « TOL » [ $F_{\text{groupe}}(1,32)=19,92$  ;  $p<0,001$ ]. À une minute, elle est de  $117 \pm 8,1$   $\mu$ g/g (n=3) au lieu de  $94 \pm 9,1$   $\mu$ g de toluène par gramme de sang ; et au bout de 30 minutes, les concentrations sont identiques pour les deux groupes.

En présence d'un traitement par le SKF, la concentration de toluène est augmentée de 24,5 % pendant les cinq premières minutes et reste plus élevée pendant au moins dix minutes.



## II- Contrôle des poids des animaux

Le contrôle des poids a été effectué tout au long de l'expérimentation (Figure 62), car l'inhibition conjointe des voies d'oxydation et de conjugaison risquait d'altérer l'état de santé des animaux. De plus, au cours de cette étude, la modification du métabolisme a été accentuée par un régime appauvri en protéine. Il était donc essentiel de suivre la croissance des animaux pour écarter toute dénutrition potentielle au cours de l'expérimentation.

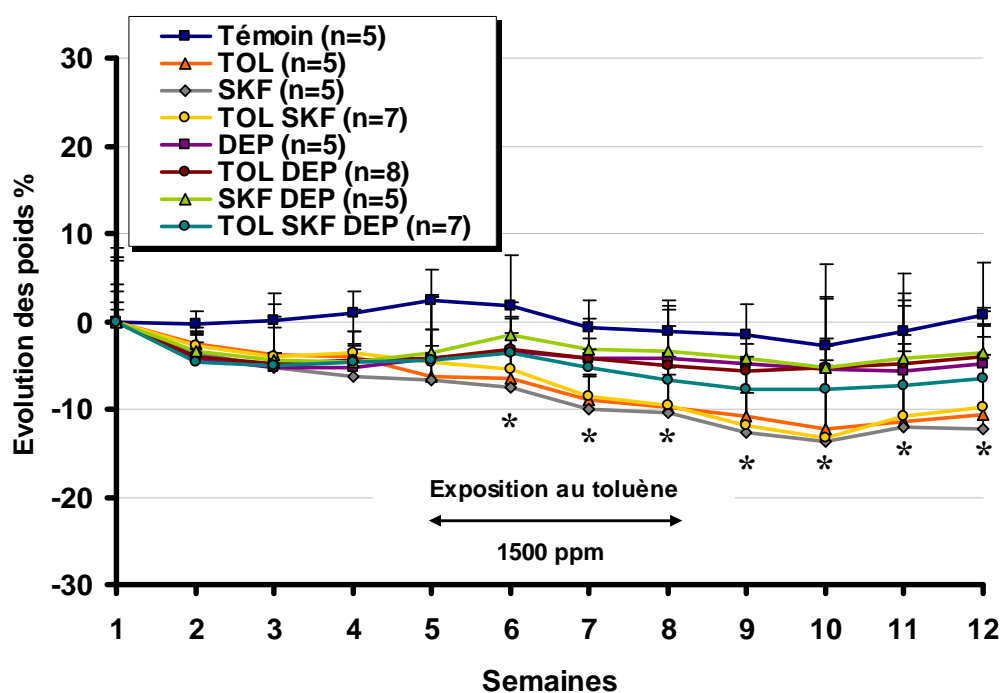


Figure 62 : Evolution des poids des rats au cours de l'étude D. Exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. SKF : 50 mg/kg, s.c.. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs), test des étendues multiples par rapport au groupe Témoin.

Les poids des rats des groupes « SKF », « TOL » et « TOL SKF » présentent des différences de poids [ $K=41,28$  ;  $p<0,001$ ] par rapport aux rats du groupe « Témoin ». Les poids diminuent en fonction du temps, jusqu'à atteindre une perte de 13 % au bout de la 10<sup>ème</sup> semaine d'expérimentation pour les rats du groupe « SKF ».

Le traitement au SKF semble réduire le poids des rats. On note que les rats des groupes « SKF DEP » et « TOL SKF DEP » sont moins affectés par cette diminution de poids bien que les rats aient été traités au SKF.

### III- Audiométrie

#### III-1. Seuils auditifs avant exposition

Comme dans les études A, B et C, un premier audiogramme, basé sur le recueil des potentiels auditifs évoqués au niveau du colliculus inférieur, a été réalisé avant l'exposition au toluène permettant de déterminer le seuil auditif de chaque animal (Figure 63).

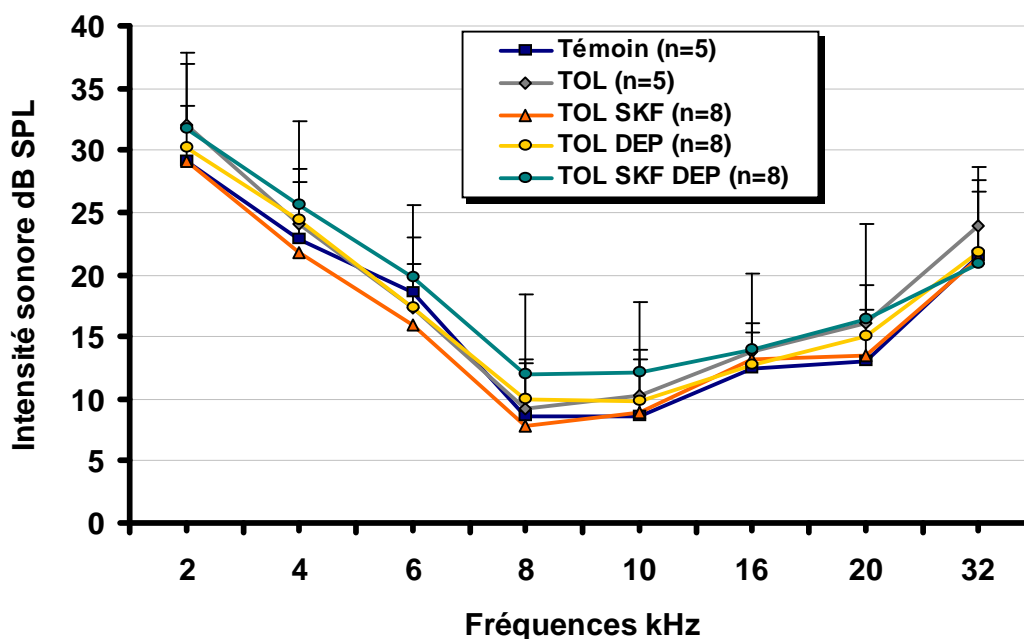


Figure 63 : Intensité sonore requise pour obtenir une amplitude de 15  $\mu$ V des potentiels auditifs évoqués, avant exposition au toluène. SKF : 50 mg/kg, sc. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Barre d'erreur : écart type.

Avant exposition au toluène, aucune différence [ $F_{\text{groupe}}(4,232)=2,36$  ;  $p=0,054$ ] des intensités sonores n'a été constatée entre les différents groupes, quelle que soit la fréquence testée [ $F_{\text{groupe} \times \text{fréquence}}(28,232)=0,19$  ;  $p=1$ ].

Les intensités sonores des rats (n=5 par groupe) des groupes « SKF », « DEP » et « SKF DEP » n'ont pas été illustrés sur la figure ci-dessus pour en faciliter la lecture ; ils ne présentent aucune différence de seuils auditifs [ $F_{\text{groupe}}(3,128)=0,65$  ;  $p=0,584$ ] par rapport aux animaux du groupe « Témoin », quelle que soit la fréquence testée [ $F_{\text{groupe} \times \text{fréquence}}(21,128)=0,10$  ;  $p=1$ ].

En dépit du traitement au SKF et du régime hypoprotéiné à 7 %, l'audiométrie des différents groupes testés pouvait être considérée comme homogène avant l'expérimentation.

### III-2. Déplacement permanent de seuils auditifs

Au terme des quatre semaines d'exposition au toluène et des quatre semaines de récupération, un second audiogramme a été effectué (Figure 16, p30), pour calculer les déplacements permanents de seuils auditifs de chaque groupes testés (Figure 64).

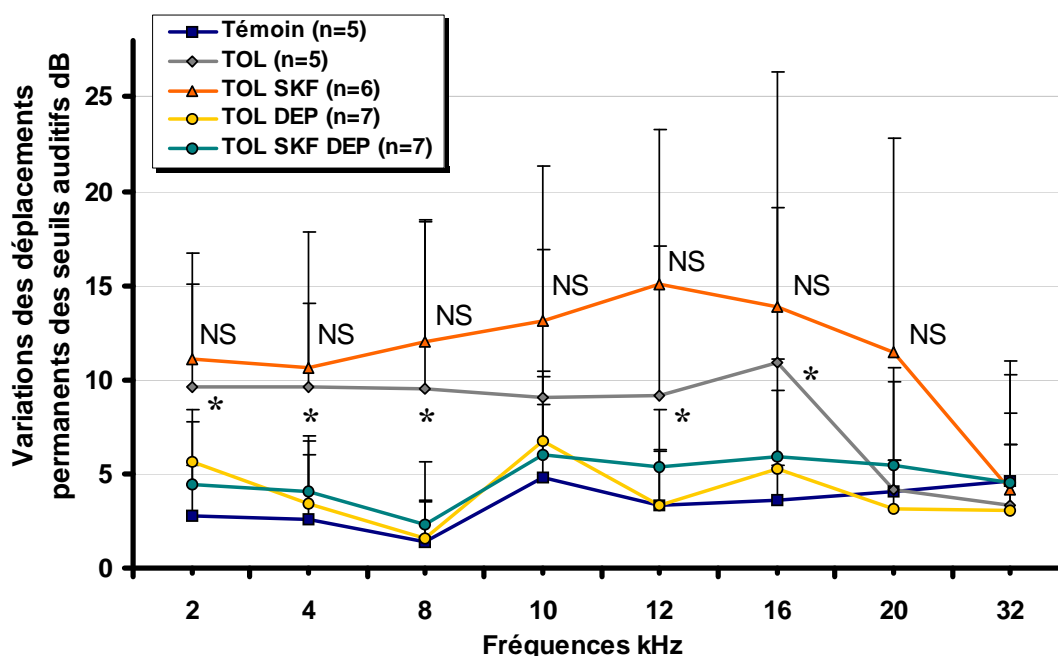


Figure 64 : Variation des déplacements permanents des seuils auditifs chez le rat après exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c., DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Barre d'erreur : écart type. différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs), test des étendues multiples par rapport au groupe Témoin (\*), NS : différence non significative, test des étendues multiples par rapport au groupe TOL (NS).

Les rats (n=5 par groupe) des groupes « SKF », « DEP », et « SKF DEP » révèlent des variations de déplacements de seuils auditifs comparables à celles des rats du groupe « Témoin » soit  $3,3 \pm 1,1$  dB en moyenne sur l'ensemble de la gamme de fréquences testées. Les résultats n'ont pas été illustrés sur le graphique ci-dessus pour en faciliter la lecture.

Les déplacements de seuils auditifs des rats des groupes « TOL » (n=5) et « TOL SKF » (n=6) sont différents [ $F_{\text{groupe}}(4,208)=9,32$  ;  $p<0,001$ ] des rats du groupe « Témoin » selon les fréquences testées [ $F_{\text{groupe} \times \text{fréquence}}(28,208)=0,67$  ;  $p=0,899$ ]. Les rats des groupes « TOL » et « TOL SKF », présentent respectivement un maximum de variations de déplacements de seuils auditifs de  $10,8 \pm 8,2$  dB à 16 kHz et de  $15,1 \pm 8,1$  dB à 12 kHz.

Enfin, les rats des groupes « TOL DEP » et « TOL SKF DEP » ne semblent pas souffrir de perte auditive, comparativement au groupe « Témoin » sur l'ensemble de la gamme de fréquence testée.

Bien qu'ayant augmenté les déplacements permanents de seuils auditifs, l'augmentation induite par le traitement au SKF n'était pas significative. En revanche, les rats qui ont suivi le régime hypoprotéiné ne présentent pas de pertes auditives attendues après une exposition au toluène.

## IV- Histologie de la cochlée

Les cochléogrammes ci-dessous illustrent le pourcentage de pertes de cellules ciliées en fonction de la carte en fréquence le long de l'organe de Corti (Figure 65).

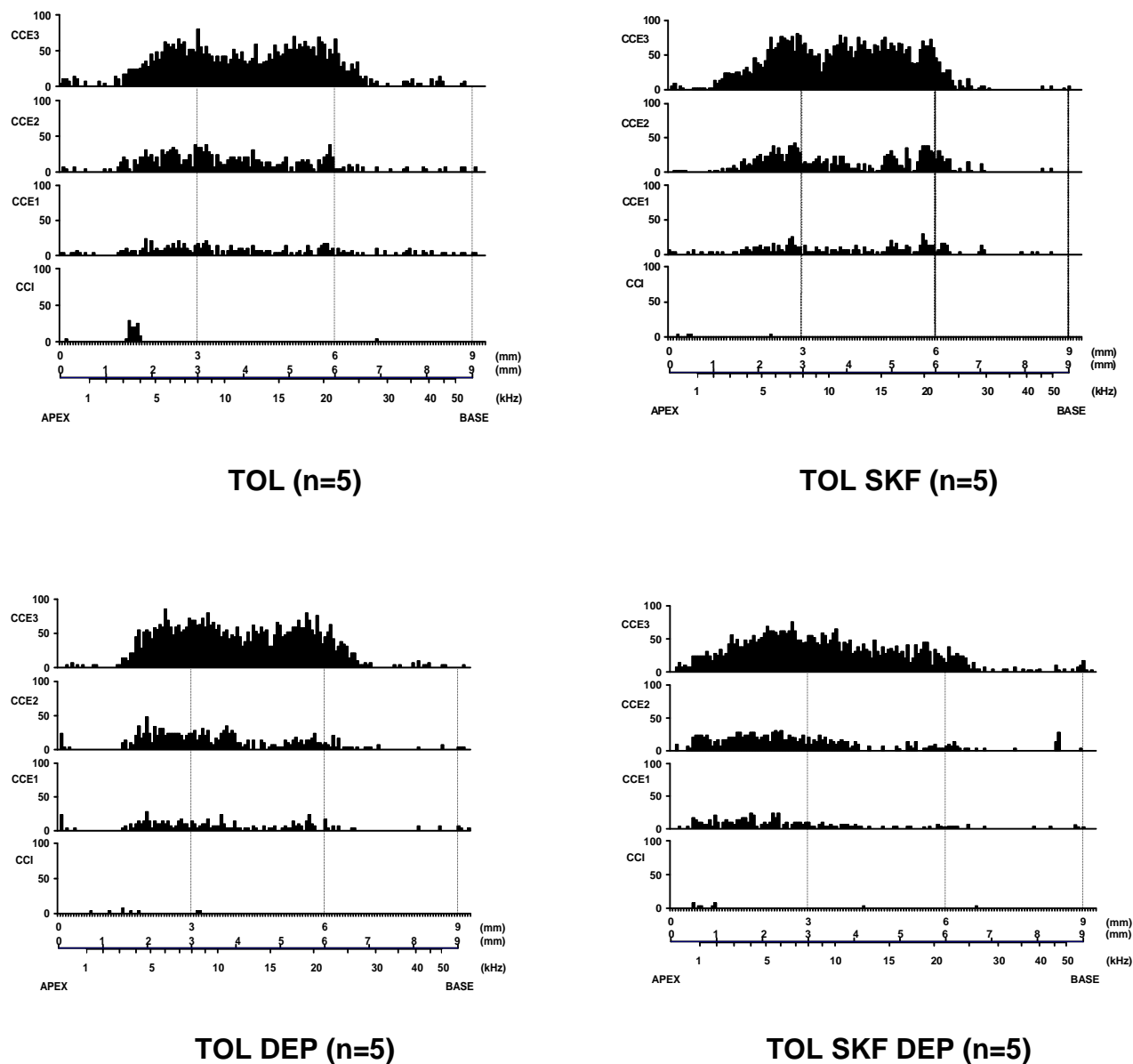


Figure 65 : Pertes de cellules ciliées chez le rat après exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c.. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. TOL (n=5), TOL SKF (n=5), TOL DEP (n=5), TOL SKF DEP (n=5).

Les rats des groupes « Témoin » (n=5), « SKF » (n=5), « DEP » (n=5) et « SKF DEP » ne présentaient aucune perte cellulaire, leur cochléogramme était identique aux rats du groupe « Témoin » illustré lors de l'étude A (Figure 43, p61). Ils n'ont donc pas été illustrés pour cette étude.

Les animaux (n=5) du groupe « TOL » souffrent de pertes des CCE entre 2 et 30 kHz, en épargnant les extrémités apicales et basales de l'organe de Corti. Comme décrit lors de l'étude A, les pertes de cellules ciliées croissent de la première vers la troisième rangée de CCE. Entre 8 et 20 kHz, les pertes moyennes de CCE du groupe « TOL » sont de 65 % au niveau de la 3<sup>ème</sup> rangée, de 31 % au niveau de la 2<sup>ème</sup>, et enfin de 17 % au niveau de la 1<sup>ère</sup> rangée.

Le cochléogramme obtenu pour les rats (n=5) du groupe « TOL SKF » montre, entre 8 et 20 kHz, une moyenne de 68 % de pertes de CCE à la troisième rangée, 35 % à la deuxième rangée et 21 % à la première rangée. Il n'y a pas de différence évidente entre les rats des groupes « TOL » et « TOL SKF », le traitement au SKF n'a pas modifié les pertes de cellules ciliées induites par le toluène.

Comme pour les animaux du groupe « TOL », ceux du groupe « TOL DEP » (n=5) présentent 70 % de pertes des CCE3 entre 8 et 20 kHz, tandis les pertes cellulaires de la deuxième et de la première rangée sont respectivement de 29 % et de 8 %.

Le régime hypoprotéiné n'a pas aggravé les pertes de cellules ciliées engendrées par l'exposition au toluène.

Enfin, les rats du groupe « TOL SKF DEP » (n=5) révèlent une perte de 53 % en moyenne des CCE3 entre 6 et 25 kHz. Le pourcentage de pertes cellulaires au niveau de la deuxième rangée est de 27 %, il est de 11 % à la première rangée. Au-delà de 30 kHz, les cellules ciliées semblent préservées. Dans ce groupe, les cellules apicales sont plus endommagées que dans les autres groupes testés.

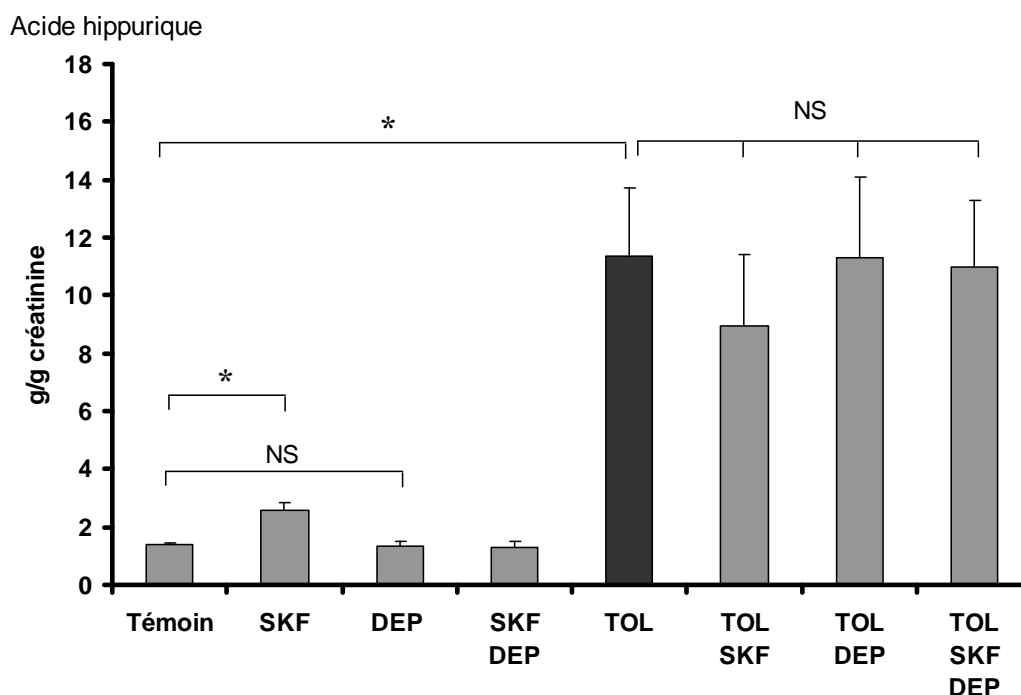
Le traitement au SKF associé au régime hypoprotéiné n'a pas augmenté les pertes cellulaires chez le rat, mais la répartition des pertes est différente : les pertes cellulaires sont plus nombreuses à l'apex par rapport aux rats des autres groupes testés.

Comme lors des études A, B et C, quel que soit le groupe étudié, les CCI semblent préservées des agressions ototoxiques engendrées par le toluène.

## V- Métabolisme

### V-1. Acide hippurique

Puisque les concentrations en AH urinaire étaient constantes au cours des quatre semaines d'exposition au toluène, seuls les résultats obtenus lors de la 4<sup>ème</sup> semaine ont été illustrés sur la figure 66.



*Figure 66* : Concentrations urinaires d'acide hippurique chez le rat après exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. SKF : 50 mg/kg, sc., DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=5), SKF (n=5), DEP (n=5), SKF DEP (n=5), TOL (n=5), TOL SKF (n=5), TOL DEP (n=5), TOL SKF DEP (n=5). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Kruskal-Wallis), NS : différence non significative.

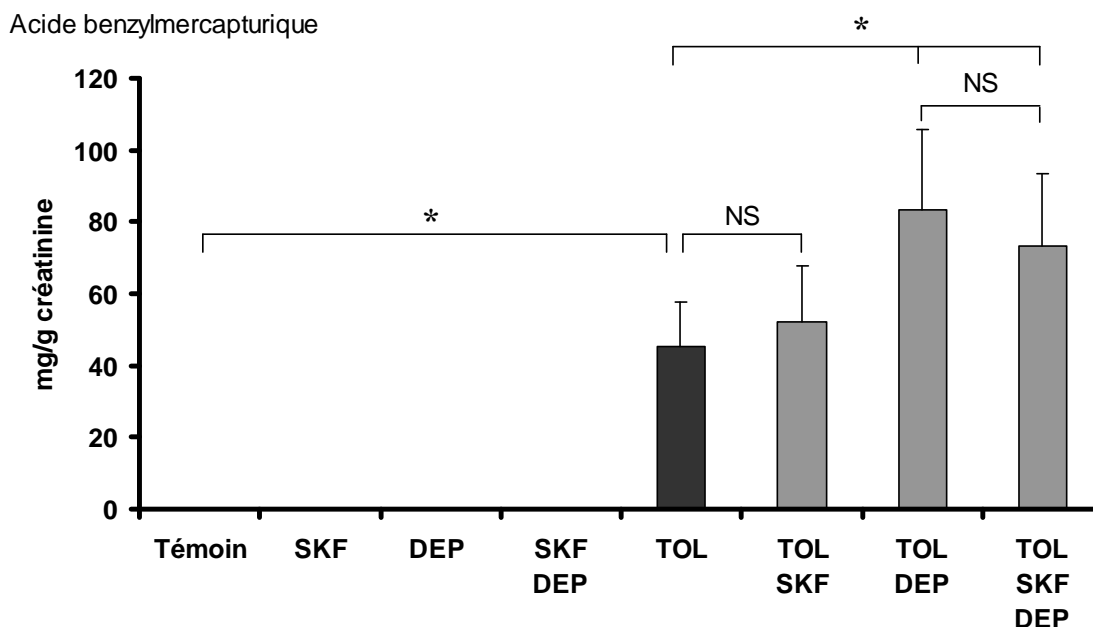
Une concentration moyenne d'AH de  $1,6 \pm 0,08$  g/g de créatinine a été obtenue pour les rats (n=5 par groupe) appartenant aux groupes « Témoin », « SKF », « DEP » et « SKF DEP ». Cette mesure de concentration est cohérente avec celle obtenue lors de l'étude A, B et C (Figures 45, 51 et 57). Cette concentration représente la concentration endogène d'AH.

La concentration d'AH des rats (n=5) du groupe « TOL » augmente [K=32,89 ; p<0,001] jusqu'à atteindre  $11,4 \pm 2,3$  g/g de créatinine par rapport aux rats du groupe « Témoin ». La concentration d'AH obtenue avec les rats exposés au toluène est inférieure à celle mesurée dans l'étude A, B et C. La différence de concentration mesurée entre les rats du groupe « TOL » s'explique par la différence des concentrations d'exposition : 1750 ppm vs. 1500 ppm. Enfin, les tests statistiques montrent que les animaux des groupes « TOL SKF », « TOL DEP » et « TOL SKF DEP » ne présentent pas de différence significative par rapport aux rats du groupe « TOL ».

Le régime hypoprotéiné et/ou le traitement au SKF n'a pas modifié l'excrétion des AH urinaires induite par une exposition au toluène.

## V-2. Acide benzylmercapturique

Comme pour l'AH, les concentrations en ABM urinaire étaient constantes au cours des quatre semaines d'exposition. Seule la concentration obtenue après la quatrième semaine d'exposition au toluène a été illustrée sur la Figure 67.



*Figure 67 : Concentrations urinaires d'acide benzylmercapturique chez le rat après exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. SKF : 50 mg/kg, s.c.. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=5), SKF (n=5), DEP (n=5), SKF DEP (n=5), TOL (n=5), TOL SKF (n=5), TOL DEP (n=5), TOL SKF DEP (n=5). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Kruskal-Wallis) ; NS : différence non significative.*

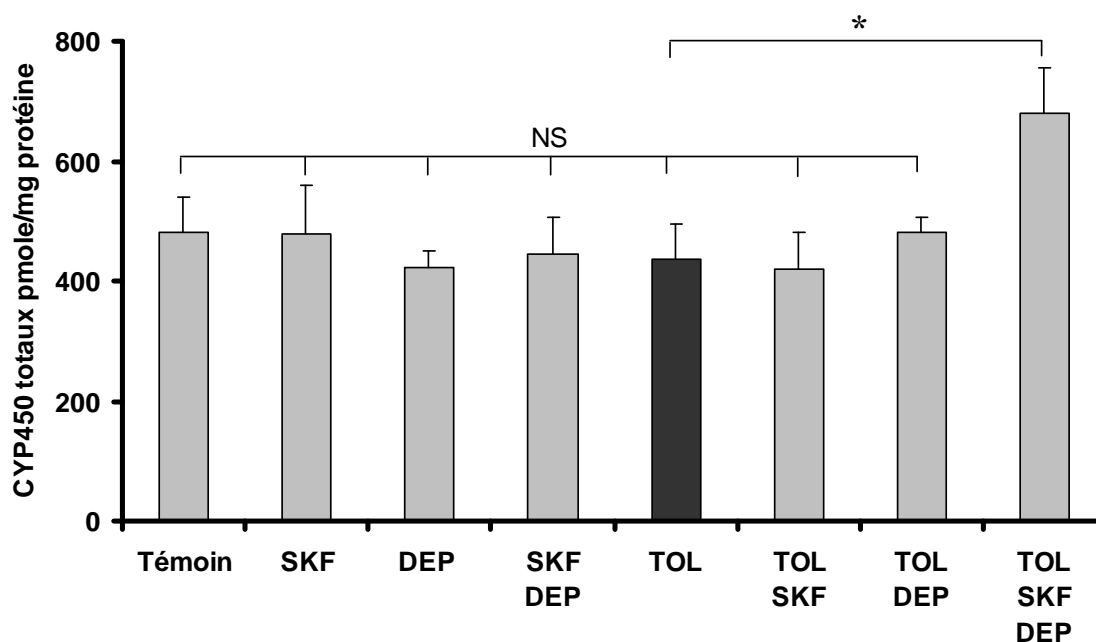
Les animaux (n=5 par groupe) des groupes « Témoin », « SKF », « DEP » et « SKF DEP » ne présentent aucune trace d'ABM urinaire. Par contre, les concentrations en ABM des rats des groupes « TOL » et « TOL SKF » augmentent [K=36,187, p<0,001] pour atteindre respectivement  $45,7 \pm 12,7$  et de  $52,2 \pm 15,7$  mg/g de créatinine par rapport aux animaux du groupe « Témoin ».

L'augmentation de la concentration des ABM se vérifie également pour les rats (n=5) des groupes « TOL DEP » et « TOL SKF DEP » qui excrètent respectivement  $83,4 \pm 22,4$  et  $73,1 \pm 20,2$  mg/g de créatinine ; soit 46 % de plus que les rats du groupe « TOL ».

Chez le rat exposé au toluène, le traitement au SKF n'influence pas l'excrétion des ABM urinaires, tandis que le régime hypoprotéiné augmente l'excrétion des ABM par rapport aux rats exposés au toluène seul.

### V-3. Cytochromes P450 totaux

Au terme des quatre semaines de récupération après exposition, les cytochromes hépatiques totaux ont été quantifiés pour mettre en évidence l'influence du traitement au SKF et celle du régime hypoprotéiné sur la synthèse des cytochromes. Ces données ne présument pas de la fonctionnalité des CYP450 (Figure 68).



*Figure 68 : Concentrations hépatiques des CYP450 (pmole/mg protéine) chez le rat après exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=4), SKF (n=5), DEP (n=5), SKF DEP (n=4), TOL (n=5), TOL SKF (n=7), TOL DEP (n=6), TOL SKF DEP (n=9). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Kruskal-Wallis), NS : différence non significative.*

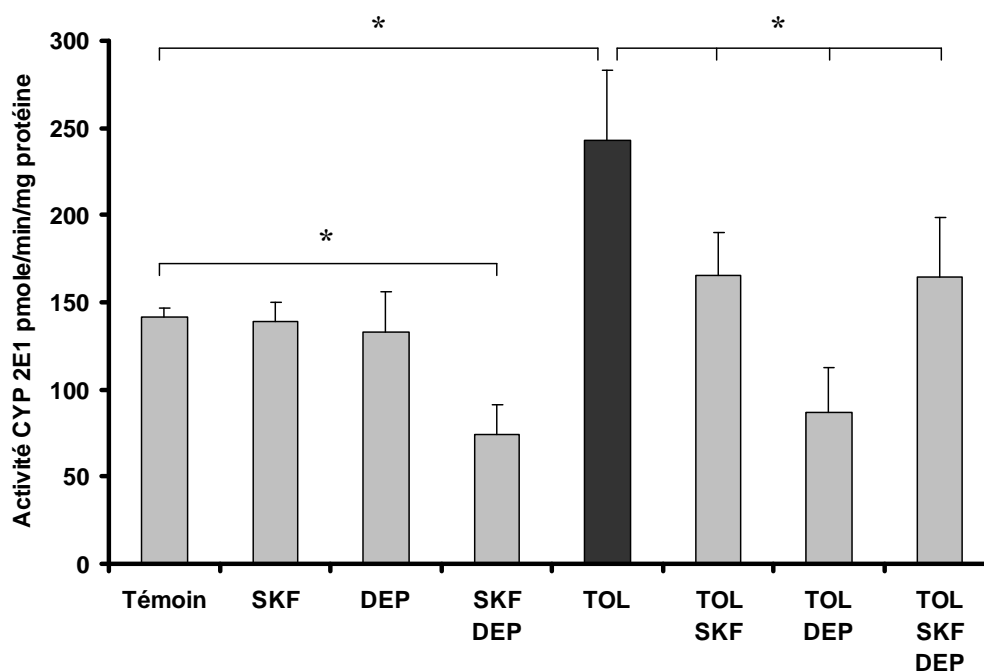
Les rats (n=4) du groupe « Témoin » possèdent une quantité de CYP450 totaux de  $481 \pm 50$  pmole/mg de protéine. Seuls les rats (n=9) du groupe « TOL SKF DEP » ont une quantité de CYP450 totaux supérieure [ $K=16,106$  ;  $p=0,024$ ] à celle des autres groupes expérimentés pour atteindre  $681 \pm 100$  pmole/mg de protéine, soit une augmentation de 41,6% par rapport aux rats du groupe « Témoin ».

L'exposition au toluène n'a pas modifié la quantité de CYP450 totaux hépatiques. Sous régime hypoprotéiné ou traités au SKF, les rats présentent le même taux de CYP450 ; en revanche, la combinaison du régime et du traitement augmente la quantité des CYP450 hépatiques.



#### V-4. Activité des CYP 2E1

Au terme des quatre semaines de récupération après exposition, l'étude de l'activité des CYP 2E1 était essentielle pour évaluer l'action des différents traitements : SKF, régime hypoprotéiné (Figure 69).



*Figure 69 : Activité hépatique des CYP 2E1 (pmole/min/mg protéine) chez le rat après exposition à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=4), SKF (n=5), DEP (n=5), TOL (n=5), TOL SKF (n=7), TOL DEP (n=6), SKF DEP (n=4), TOL SKF DEP (n=9). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).*

L'activité basale des CYP 2E1 obtenue avec les microsomes hépatiques des rats (n=4) du groupe « Témoin » est de  $141,7 \pm 4,8$  pmole/min/mg de protéine et n'est pas différente de celle des rats (n=4) des groupes « SKF », « TOL SKF », « DEP », « TOL SKF DEP ». En revanche, l'activité des CYP 2E1 des rats du groupe « SKF DEP » diminue jusqu'à  $74,3 \pm 17$  pmole/min/mg de protéine, soit une diminution moyenne de 38,7 % par rapport aux rats du groupe « Témoin ».

Quant à l'activité des CYP 2E1 des rats (n=5) du groupe « TOL », elle augmente jusqu'à  $242,5 \pm 40,3$  pmole/min/mg de protéine; soit une augmentation [K=29,38 ; p<0,001] de 71,6 % par rapport aux rats du groupe « Témoin ».

L'activité des CYP 2E1 des rats des groupes « TOL SKF » (n=7) et « TOL DEP » (n=6) diminue par rapport au groupe « TOL » jusqu'à atteindre respectivement  $165 \pm 24,8$  et  $87,2 \pm 24,8$  pmole/min/mg de protéine. Seule l'exposition au toluène augmente l'activité des CYP 2E1 hépatiques. Le traitement au SKF et le régime hypoprotéiné diminuent significativement cette activité lorsque les animaux sont exposés au toluène.

## V-5. Glutathion

Au terme des quatre semaines de récupération après exposition, l'étude de la concentration du glutathion hépatique (Figure 70) a permis d'évaluer l'influence du traitement au SKF, et/ou du régime hypoprotéiné, sur la voie de conjugaison.

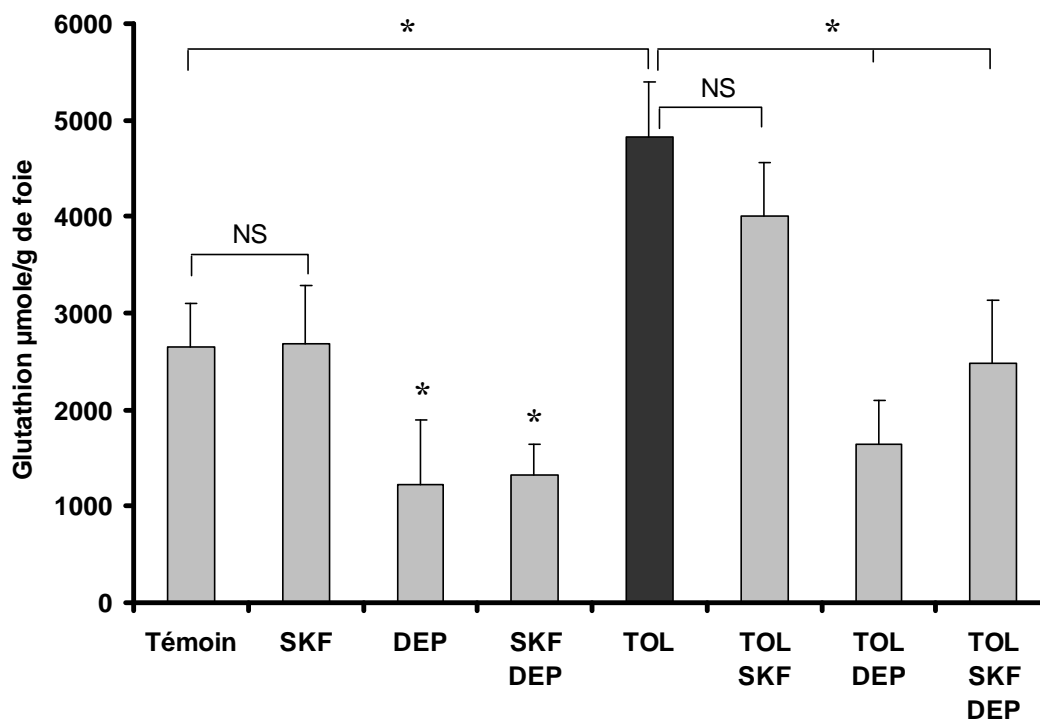


Figure 70 : Concentrations hépatiques du glutathion ( $\mu\text{mole/g}$  foie) chez le rat exposé à 1500 ppm de toluène pendant 4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c.. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin ( $n=5$ ), SKF ( $n=5$ ), DEP ( $n=5$ ), SKF DEP ( $n=4$ ), TOL ( $n=5$ ), TOL SKF ( $n=6$ ), TOL DEP ( $n=8$ ), TOL SKF DEP ( $n=8$ ). Barre d'erreur : écart type. différence significative à 95% (Anova à 1 facteur), NS : différence non significative.

Les rats ( $n=5$ ) du groupe « Témoin » ont une concentration de glutathion de  $2643 \pm 450$   $\mu\text{mole/g}$  de foie. Cette concentration n'est pas significativement différente de celle des rats du groupe « SKF ». Le traitement au SKF n'a pas influencé la concentration de glutathion au niveau du foie. Par contre, les rats ( $n=5$ ) du groupe « DEP » ont une concentration de glutathion de  $1222 \pm 664$   $\mu\text{mole/g}$  de foie, soit une diminution [ $F_{\text{groupe}}(7,45)=28,32$  ;  $p<0,001$ ] de 53 % par rapport aux rats du groupe « Témoin ». À ce propos, les rats des groupes ayant suivi le régime : « DEP » ( $n=5$ ), « TOL DEP » ( $n=8$ ), « SKF DEP » ( $n=4$ ) ont une concentration de glutathion inférieure à celle des rats appartenant au groupe « Témoin » ( $n=5$ ). La déplétion a donc eu un impact sur la concentration de glutathion hépatique. Par exemple, la concentration de glutathion de  $4013 \pm 544$   $\mu\text{mole/g}$  de foie des rats du groupe « TOL SKF » ( $n=6$ ) est 2,4 fois plus élevée que celle des rats du groupe « TOL DEP », qui est de  $1648 \pm 439$   $\mu\text{mole/g}$  de foie.

## VI- Récapitulatif des résultats de l'étude D

Le tableau 6 présente le récapitulatif des résultats de l'étude D.

*Tableau 6 : Comparaison des résultats obtenus lors d'une inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison par un traitement à 50 mg/kg s.c. de SKF et par un régime hypoprotéiné à 7% chez le rat. Les animaux atteints d'une surdité sont visualisés en orange.*

	<b>Toxicocinétique</b>	<b>Audiométrie</b>	<b>Histologie</b>
	[Toluène] sanguin µg/g	Elévation des seuils dB	Moyenne pertes CCE2 %
<b>Témoin</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>TOL</b>	<b>94</b>	<b>11</b>	<b>31</b>
<b>SKF</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>TOL SKF</b>	<b>117</b>	<b>15</b>	<b>35</b>
<b>DEP</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>TOL DEP</b>	-	<b>0</b>	<b>29</b>
<b>SKF DEP</b>	-	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>TOL SKF DEP</b>	-	<b>0</b>	<b>27</b>

	<b>Biochimie</b>				
	<b>[AH]</b>	<b>[ABM]</b>	<b>[CYP450]</b>	<b>Activité 2E1</b>	<b>[Glutathion]</b>
	g/g	mg/g	mmole/mg protéine	pmole/min/mg protéine	µmole/g de foie
<b>Témoin</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>481</b>	<b>141</b>	<b>2643</b>
<b>TOL</b>	<b>11</b>	<b>45</b>	<b>436</b>	<b>242</b>	<b>4831</b>
<b>SKF</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>479</b>	<b>139</b>	<b>2687</b>
<b>TOL SKF</b>	<b>9</b>	<b>52</b>	<b>419</b>	<b>165</b>	<b>4013</b>
<b>DEP</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>421</b>	<b>132</b>	<b>1222</b>
<b>TOL DEP</b>	<b>11</b>	<b>83</b>	<b>480</b>	<b>87</b>	<b>1648</b>
<b>SKF DEP</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>444</b>	<b>74</b>	<b>1331</b>
<b>TOL SKF DEP</b>	<b>11</b>	<b>73</b>	<b>681</b>	<b>164</b>	<b>2474</b>

Les données audiométriques, histologiques et métaboliques des rats du groupe « SKF » ne révèlent pas de modifications par rapport aux rats du groupe « Témoin ». En revanche, les données métaboliques des rats du groupe « DEP » montrent une diminution de 50 % de la concentration hépatique de glutathion par rapport à celle des animaux du groupe « Témoin ».

En dépit de la baisse du glutathion hépatique des animaux du groupe « DP », ces résultats prouvent l'inocuité du traitement au SKF et du régime hypoprotéiné à 7% sur l'audition du rat.

L'exposition à 1500 ppm de toluène a engendré des pertes auditives associées à des pertes cellulaires. L'augmentation de la concentration d'AH et d'ABM témoigne de la détoxification du toluène par les voies d'oxydation et de conjugaison. Au terme des quatre semaines de récupération après exposition, l'activité des CYP 2E1 des rats du groupe « TOL » est toujours élevée par rapport à celle des rats du groupe « Témoin ». Il en va de même pour la concentration de glutathion. Notons que la quantité de CYP450 totaux ne présume pas de l'activité des CYP 2E1 : l'activité des CYP 2E1 a doublé par rapport à celle des témoins en dépit d'une quantité constante des CYP450 (436 vs. 481 mmole/mg de protéine).

Les animaux du groupe « TOL SKF » souffrent de pertes auditives et révèlent des concentrations urinaires d'AH et d'ABM comparables à celles obtenues avec les animaux du groupe « TOL ». La concentration de CYP450 totaux et l'activité des CYP 2E1 des rats du groupe « TOL SKF » sont comparables à celles des animaux du groupe « Témoin ». Pour les rats du groupe « TOL SKF », seule la concentration de glutathion a augmenté. **Le traitement par le SKF n'a pas modifié l'ototoxicité du toluène mais on est en droit de se demander si l'efficacité de l'inhibition des CYP2E1 a été suffisamment longue.**

Les rats du groupe « TOL DEP » ne présentent que des pertes cellulaires, la concentration de CYP450 totaux est identique aux rats du groupe « Témoin ». Par rapport aux rats du groupe « TOL », la concentration de glutathion a diminué de plus de la moitié, tandis que la concentration d'ABM urinaire a doublé. En revanche, malgré une concentration constante d'AH, l'activité des CYP 2E1 a diminué de moitié : il semble donc qu'une baisse de moitié de l'activité des CYP 2E1 n'influence pas l'efficacité de la voie d'oxydation. **Le régime hypoprotéiné semble avoir limité l'ototoxicité du toluène.**

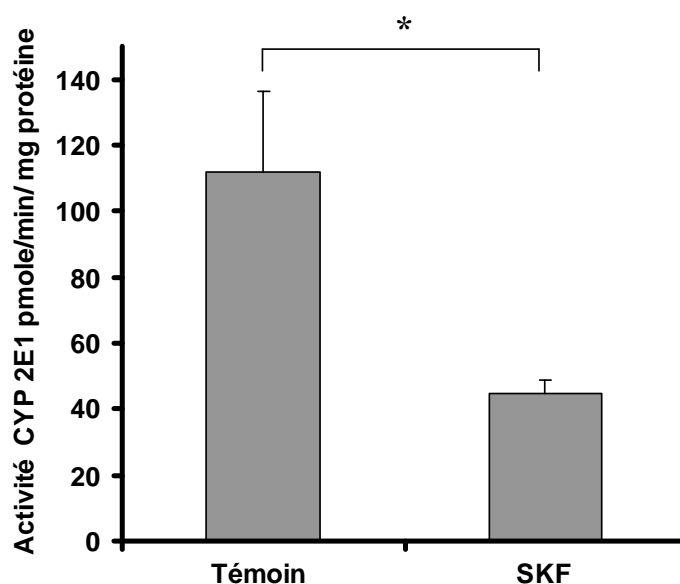
Les rats du groupe « TOL SKF DEP » souffrent de pertes cellulaires identiques à celles des rats du groupe « TOL DEP ». Cette fois encore, la concentration de glutathion a diminué de la moitié, tandis que la concentration d'ABM urinaire a augmenté de 62 %. Comme précédemment avec les rats du groupe « TOL DEP », la concentration d'AH n'a pas changé malgré une diminution de 32 % de l'activité des CYP 2E1 : cette baisse de 32 % de l'activité des CYP 2E1 n'a pas influencé l'efficacité de la voie d'oxydation. Bien que des pertes cellulaires soient identiques à celles des autres groupes exposés au toluène, les déplacements de seuil de potentiels auditifs ont été considérablement réduits par rapport au groupe « TOL », **on peut penser que le traitement associé au régime aurait permis d'atténuer la toxicité rétro-cochléaire du toluène.**

## Étude E : SKF-525A et régime hypoprotéiné à 7%. Inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison du toluène chez le cobaye

### I- Efficacité du traitement au SKF

#### I-1. Activité des CYP 2E1

Au cours d'une étude préliminaire, des cobayes ont été traités au 2,2-diphénylpentanoate de 2-(diéthylamino)-éthyle (SKF) à raison de 50 mg/kg en s.c, puis une heure après le traitement, le foie était prélevé pour déterminer l'activité des CYP 2E1 et en déduire l'efficacité du traitement au SKF (Figure 71).



*Figure 71 : Activité hépatique des CYP 2E1 (pmole/min/mg protéine) chez le cobaye. SKF : 50 mg/kg, s.c. Témoin (n=4), SKF (n=4). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).*

Les cobayes (n=4) du groupe « Témoin » révèlent une activité des CYP 2E1 de base de  $112 \pm 24$  pmole/min/mg de protéine. Après une injection de 50 mg/kg, s.c. de SKF, l'activité des CYP 2E1 des cobayes (n=4) du groupe « SKF » a diminué [ $K=5,33$  ;  $p=0,021$ ] jusqu'à  $44 \pm 4$  pmole/min/mg de protéine.

Le traitement au SKF a permis de réduire l'activité hépatique des CYP 2E1 de 60,7% par rapport aux cobayes du groupe « Témoin ».

## I-2. Toluène artériel

Dans le but d'augmenter les effets de l'inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison par le SKF, des animaux ont suivi un régime hypoprotéiné à 7% pendant quatre semaines. L'impact du régime hypoprotéiné, associé au traitement au SKF, sur la concentration de toluène circulant a été étudié par le biais d'une étude de toxicocinétique. Les cobayes au régime recevaient une injection de 50 mg/kg s.c de SKF. Une heure après le traitement, une injection intrajugulaire d'un bolus de 300  $\mu$ L d'intralipide contenant 28  $\mu$ L de toluène était pratiquée. Des prélèvements de sang étaient effectués au niveau de la carotide pour déterminer les variations de la concentration de toluène circulant entre 1 et 180 minutes (Figure 72).

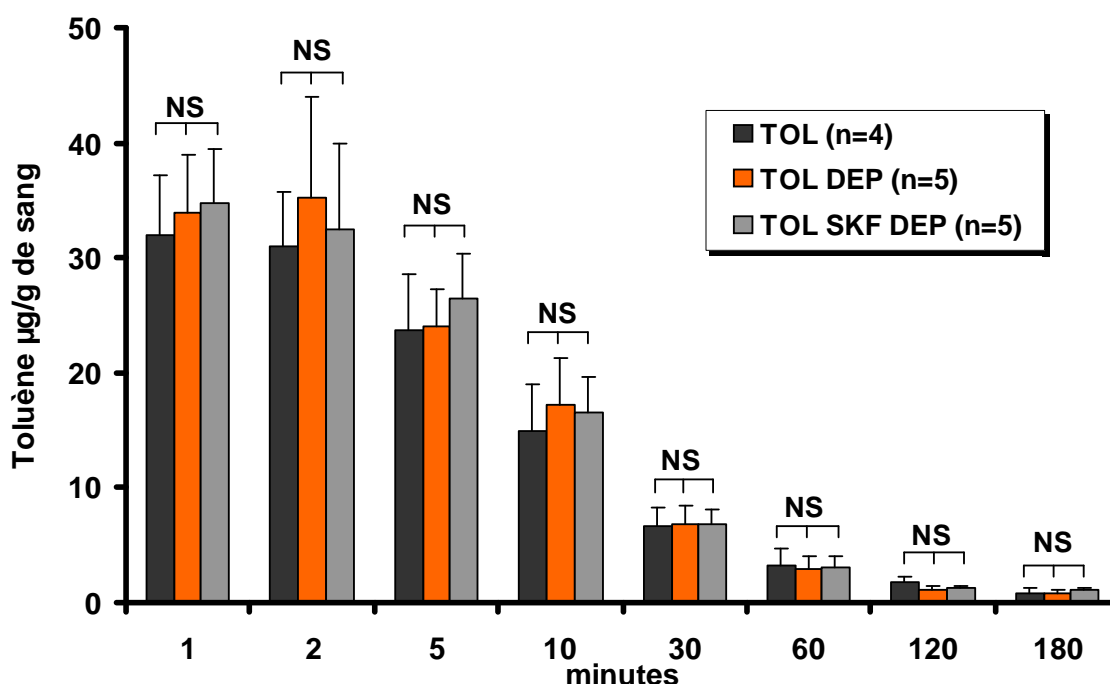


Figure 72 : Variations des concentrations artérielles du toluène ( $\mu$ g/g sang) chez le cobaye. DEP : régime hypoprotéiné à 7%, SKF : 50 mg/kg, s.c., TOL : Injection intrajugulaire d'un bolus de 300  $\mu$ L d'intralipide contenant 14  $\mu$ L de toluène. Barre d'erreur : écart type. NS : différence non significative (Anova à 2 facteurs).

Les cobayes des groupes « TOL » (n=4), « TOL DEP » (n=5) et « TOL SKF DEP » (n=5) ont des concentrations sanguines de toluène semblables de 1 à 180 minutes. La différence des concentrations sanguines de toluène entre les trois groupes n'est pas significative [ $F_{\text{groupe}}(1,48)=1,85$ ;  $p=0,180$ ] et ce indépendamment du temps [ $F_{\text{groupe} \times \text{temps}}(5,48)=1,56$ ;  $p=0,189$ ].

L'inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison, renforcée par un régime hypoprotéiné à 7%, n'a pas modifié la concentration sanguine de toluène chez le cobaye.

## II- Contrôle des poids des animaux

Le contrôle des poids a été effectué tout au long de l'expérimentation (Figure 73), il permet d'évaluer l'état de santé des animaux. Ce contrôle était d'autant plus important que dans l'étude E, les voies d'oxydation et de conjugaison étaient en partie inhibées.

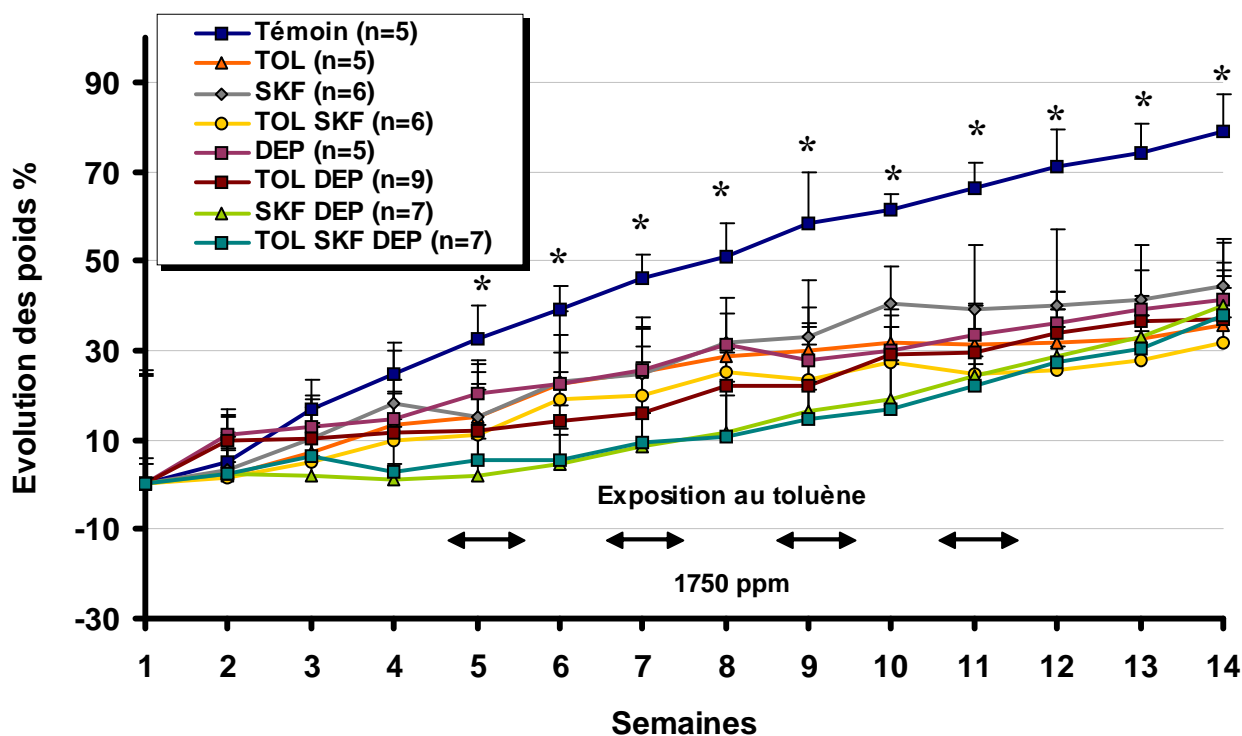


Figure 73 : Evolution des poids des cobayes au cours de l'étude E. Exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine. SKF : 50 mg/kg, s.c.. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Kruskal-Wallis), comparaison des boîtes à moustaches par rapport aux autres groupes testés.

À la fin de l'expérimentation, les cobayes du groupe « Témoin » présentent une augmentation de 79 % des poids par rapport aux poids initiaux. En revanche, le poids moyen des animaux appartenant aux autres groupes augmente de 37 % par rapport à leur poids initial. La différence entre la progression des poids des animaux témoins par rapport aux cobayes des autres groupes est significative [(K=20,74 ; p=0,004).

### III- Audiométrie

Au terme des quatre semaines de récupération après exposition, les animaux ont été équipés d'une électrode au niveau de la fenêtré ronde pour mesurer les potentiels auditifs évoqués à la fin de l'expérimentation (figure 74).

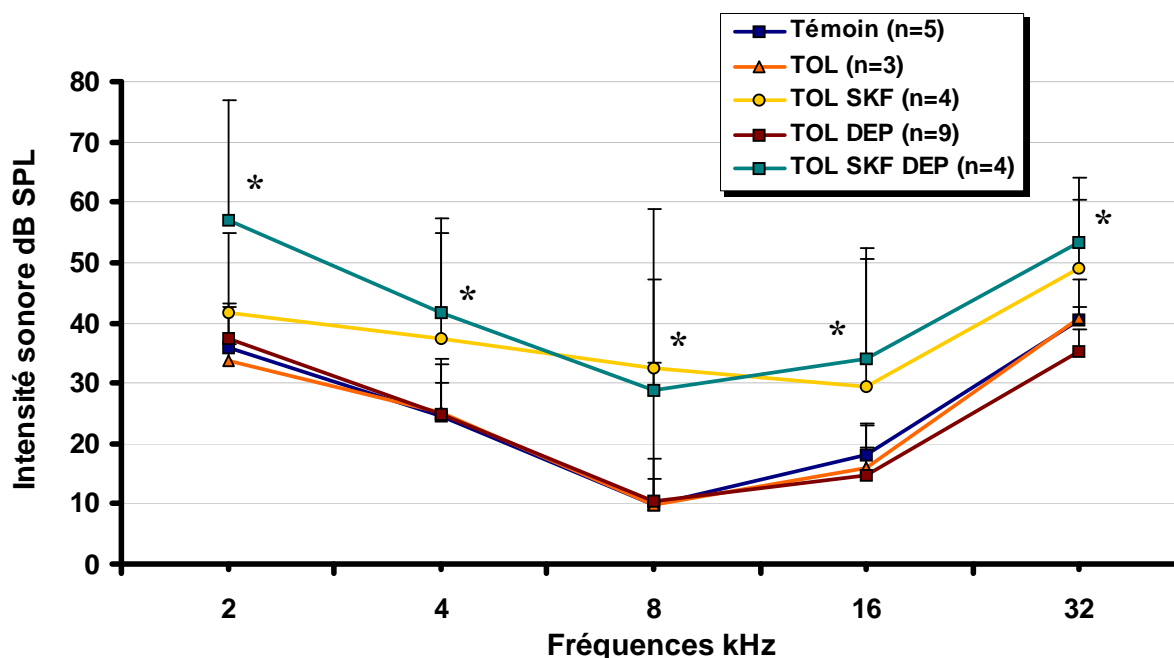


Figure 74 : Intensité sonore requise pour obtenir une amplitude de  $15\mu\text{V}$  des potentiels auditifs évoqués chez le cobaye, après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c., DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Anova à 2 facteurs), test des étendues multiples par rapport au groupe Témoin.

Les résultats audiométriques montrent une augmentation moyenne des intensités sonores de 12,2 et 17,4 dB SPL respectivement, pour les cobayes des groupes « TOL SKF » et « TOL SKF DEP ». Ces deux groupes présentent des différences [ $F_{\text{groupe}}(4,124)=14,16$  ;  $p<0,001$ ] par rapport au groupe « Témoin » et ce indépendamment de la fréquence testée [ $F_{\text{groupe} \times \text{fréquence}}(16,124)=0,39$  ;  $p=0,982$ ].

Les cobayes du groupe « TOL DEP » ne montrent pas d'augmentation des intensités sonores par rapport aux animaux du groupe « Témoin ».

Quant aux cobayes des groupes « SKF » (n=5), « DEP » (n=5) et « SKF DEP » (n=7), ils ne présentent aucune différence par rapport aux cobayes du groupe « Témoin » [ $F_{\text{groupe}}(3,109)=0,85$  ;  $p=0,471$ ], quelle que soit la fréquence [ $F_{\text{groupe} \times \text{fréquence}}(12,109)=0,89$  ;  $p=0,564$ ]. Les résultats audiométriques relatifs à ces groupes ne sont pas représentés sur la figure 74 par souci de clarté.

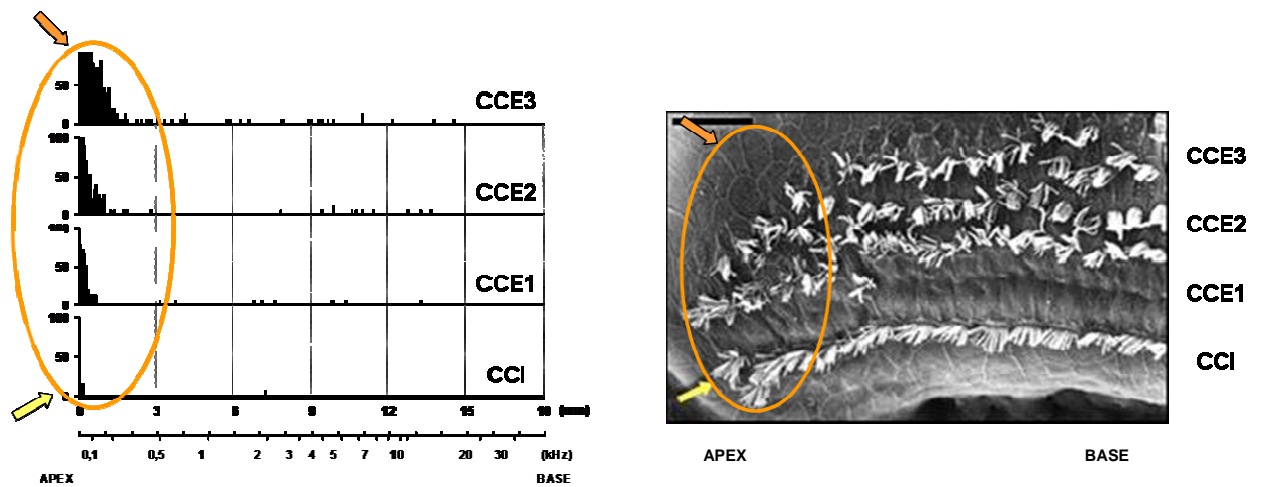
Le régime hypoprotéiné n'a pas modifié la sensibilité du cobaye au toluène tandis que le traitement au SKF a engendré une augmentation des intensités sonores chez le cobaye exposé au toluène.



## IV- Histologie

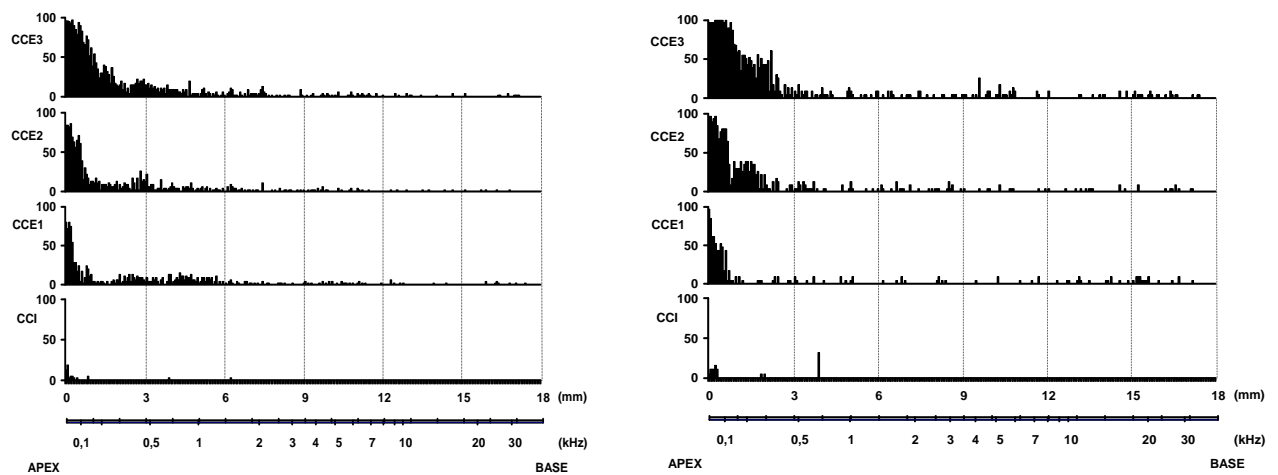
### IV-1. Cochlée

Les cobayes des groupes « SKF » (n=6), « DEP » (n=5) et « SKF DEP » (n=4) ne révèlent aucune perte cellulaire et présentent donc des cochléogrammes similaires à ceux obtenus avec les cobayes du groupe « Témoin ». En ce qui concerne les pertes cellulaires à l'apex, elles ne sont pas dues au solvant mais à un agencement désordonné des cellules ciliées, illustré par la Figure 75.



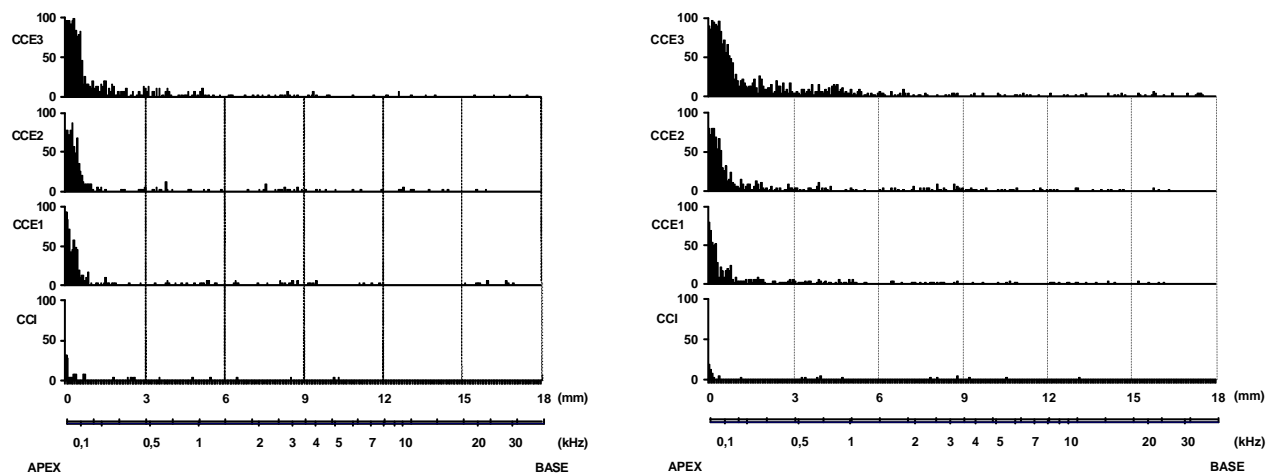
*Figure 75 : Cochléogramme moyen (n=4) du groupe « Témoin » obtenu chez le cobaye (gauche). Apex de l'organe de Corti de cobaye observé au microscope électronique (droite).*

En revanche, les cobayes des groupes « TOL », « TOL SKF », « TOL DEP », « TOL SKF DEP » présentent quelques pertes disparates de cellules ciliées principalement à l'apex (Figure 76). Seules les CCE semblent touchées par le solvant, de plus la gamme de fréquence endommagée s'échelonne de 0,1 à 2 kHz.



**TOL (n=4)**

**TOL SKF (n=4)**



**TOL DEP (n=4)**

**TOL SKF DEP (n=4)**

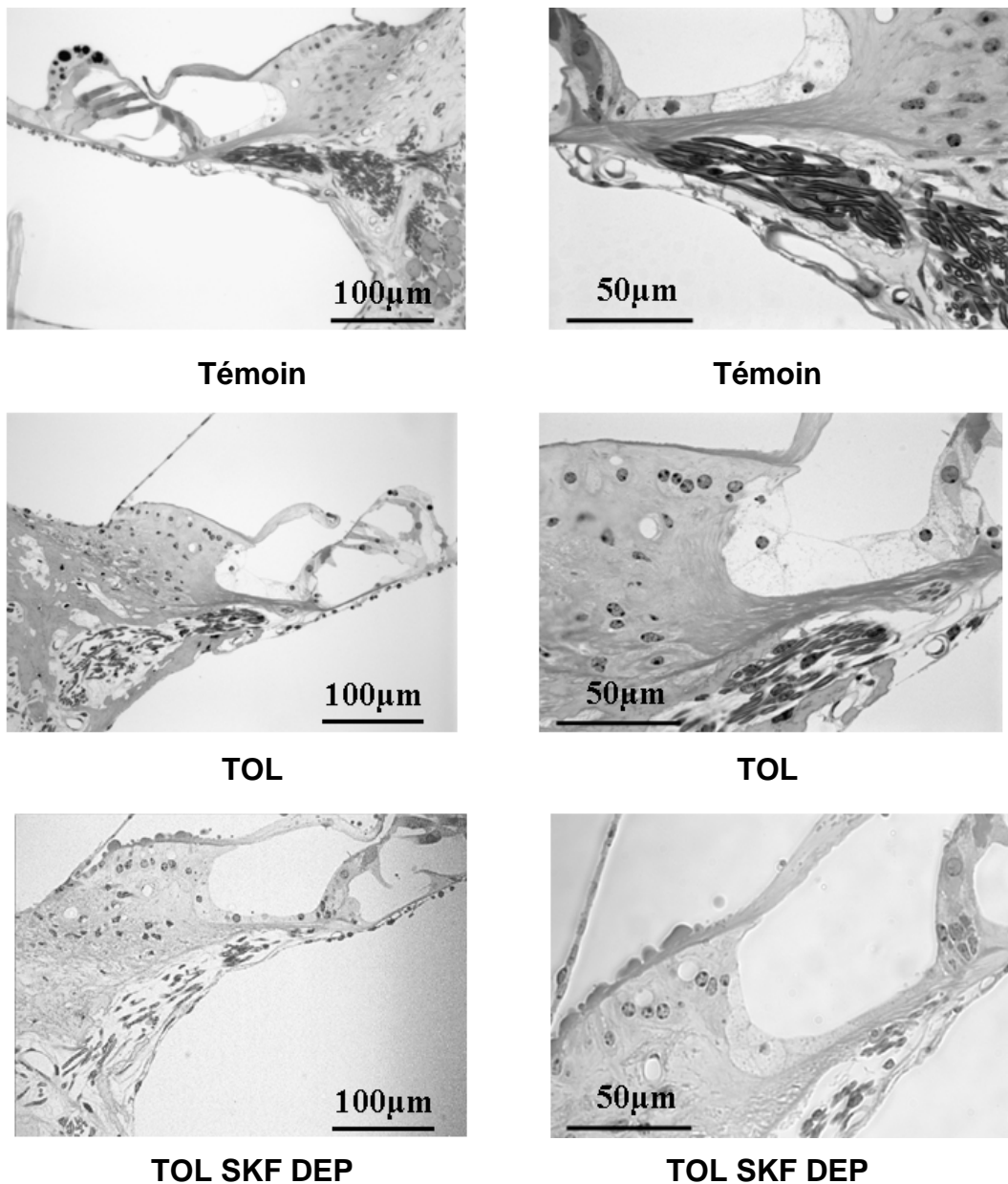
*Figure 76 : Pertes de cellules ciliées chez le cobaye après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg, s.c. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. TOL (n=4), TOL SKF (n=4), TOL DEP (n=4), TOL SKF DEP (n=4).*

L'analyse histologique (Figure 76) a révélé quelques pertes de CCE, néanmoins celles-ci ne peuvent expliquer à elles seules le déplacement de seuils audiométriques constaté sur la Figure 74.

Par conséquent, il était intéressant d'explorer l'organe de Corti et les structures périphériques telles que la strie vasculaire et le nerf auditif.

## IV-2. Fibres nerveuses

La figure 77 illustre les fibres nerveuses observées au microscope optique chez le cobaye.

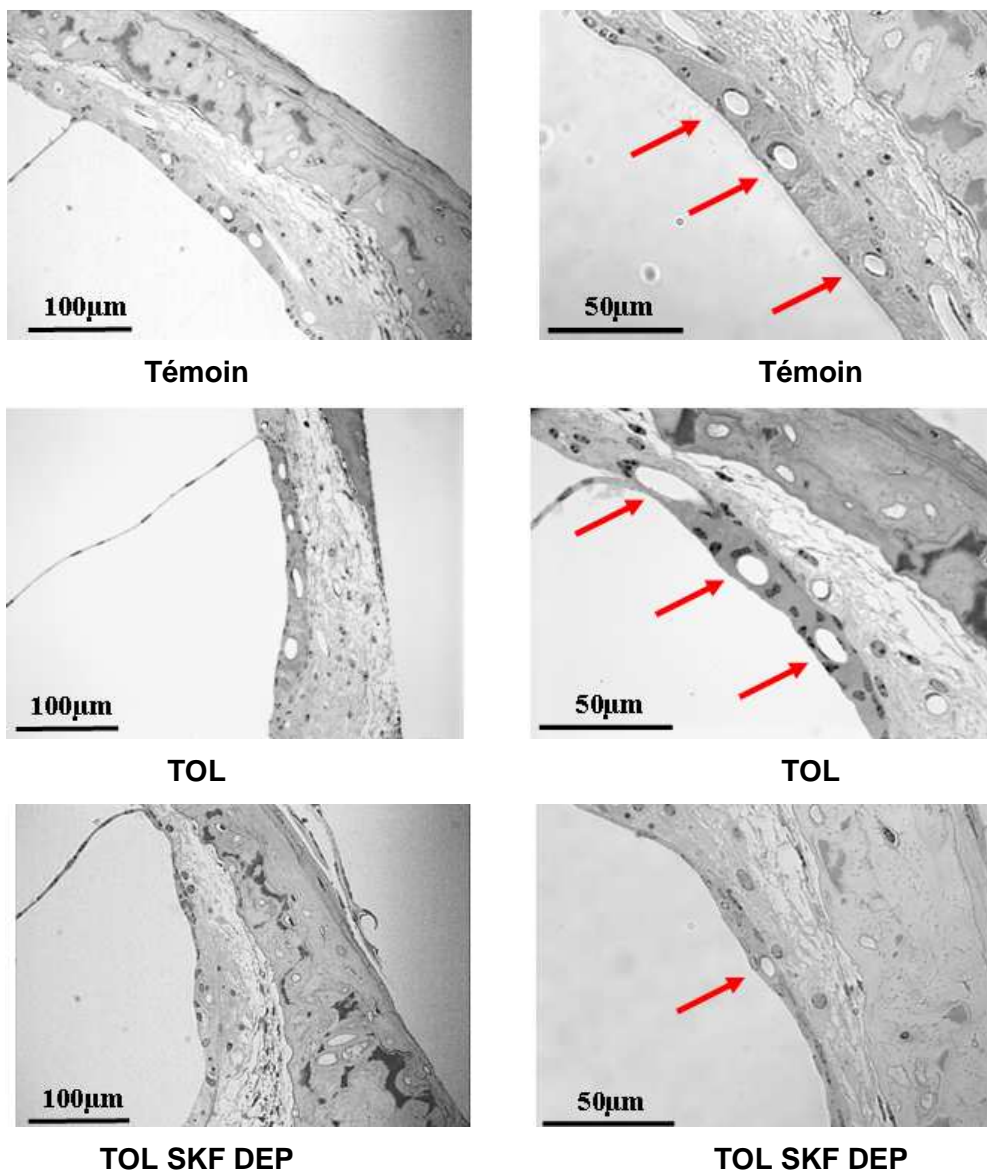


*Figure 77 : Fibres nerveuses observées au microscope optique chez le cobaye exposé à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF 50 mg/kg s.c, DEP : régime hypoprotéiné à 7%.*

Les cobayes du groupe « Témoin » montrent un nerf cochléaire très riche en fibres. Lorsque les cobayes sont exposés au toluène, on remarque une atteinte des fibres nerveuses. Cette altération des fibres nerveuses est encore plus évidente chez les cobayes du groupe « TOL SKF DEP » révéle un nerf cochléaire anormalement appauvri en fibres.

### IV-3. Strie vasculaire

La figure 78 montre la strie vasculaire observée au microscope optique chez le cobaye.

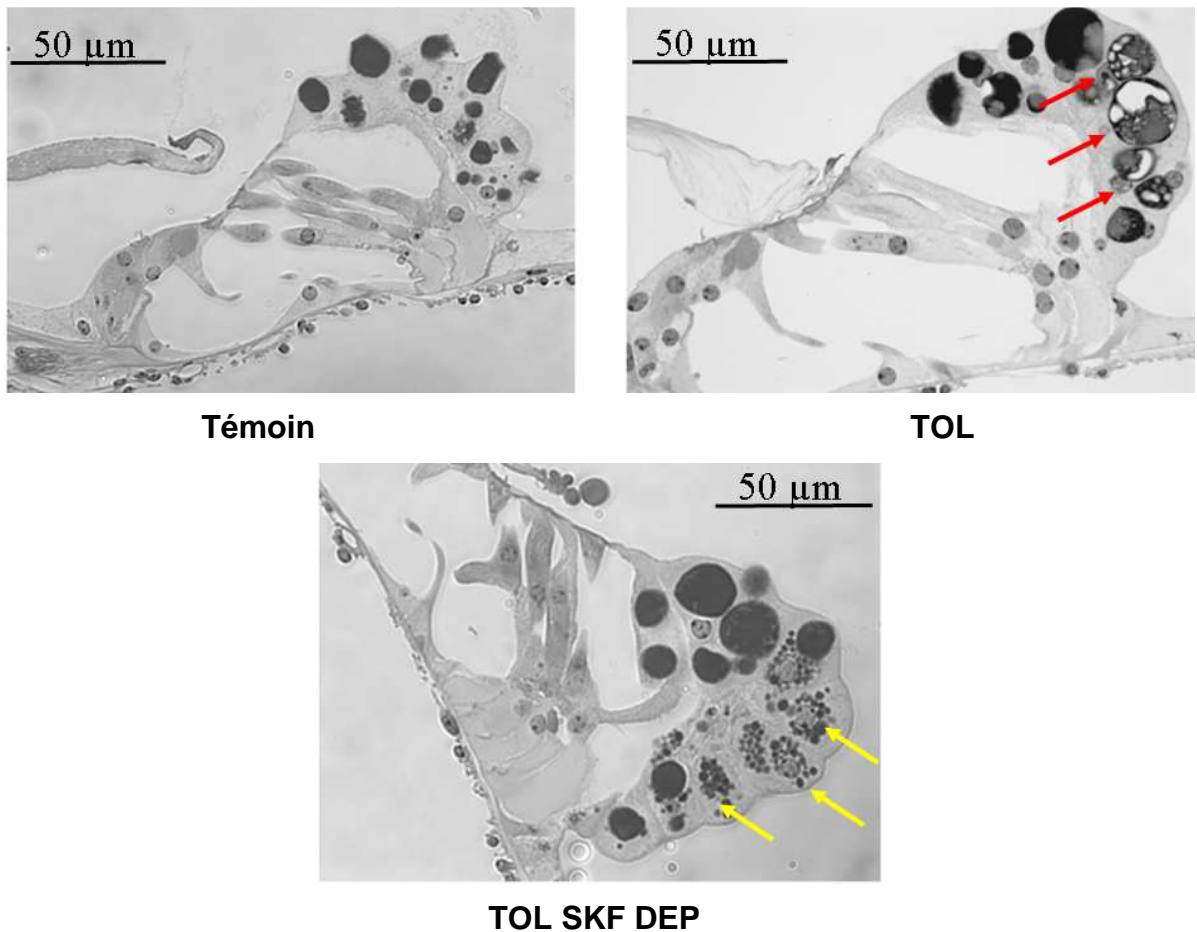


*Figure 78* : Strie vasculaire observée au microscope optique chez le cobaye exposé à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF 50 mg/kg s.c. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Flèches rouges : vaisseaux sanguins.

Les cobayes des groupes « Témoin », « TOL » et « TOL DEP » montrent une strie vasculaire composée des cellules basales, intermédiaires et marginales. Des vaisseaux sanguins (flèches rouges) sont présents dans la strie vasculaire au niveau des cellules intermédiaires, alimentant ainsi la strie en nutriments et en oxygène. En ce qui concerne les cobayes du groupe « TOL SKF DEP », la strie vasculaire apparaît beaucoup plus fine. Les noyaux des cellules basales et marginales sont encore visibles, ce qui laisse penser que seules les cellules intermédiaires ont disparu. Conjointement à la disparition des cellules intermédiaires, le nombre de vaisseaux sanguins a diminué. Le traitement au SKF associé au régime hypoprotéiné a modifié la structure de la strie vasculaire.

#### IV-4. Organe de Corti

La figure 79 présente des organes de Corti observés au microscope optique appartenant aux cobayes des groupes « Témoin », « TOL » et « TOL SKF DEP ».



*Figure 79: Coupe sagittale des organes de Corti observés au microscope optique chez le cobaye exposé à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg s.c.. DEP : régime hypoprotéiné à 7%.*

Les coupes sagittales de l'organe de Corti ne montrent pas de différence morphologique entre les cobayes des trois groupes.

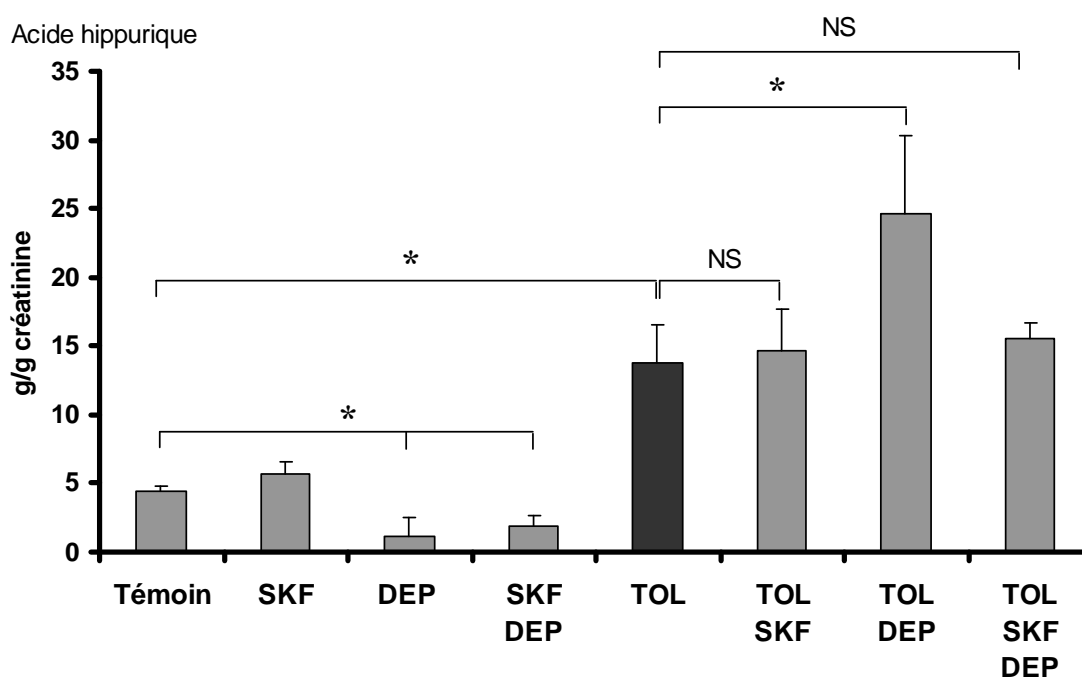
Des grains de mélanine sont présents au niveau des cellules de Hensen chez tous les cobayes des groupes testés. Cependant, chez les cobayes du groupe « TOL », des vacuoles (flèches rouges) sont visibles au niveau des grains de mélanine. Chez les cobayes du groupe « TOL SKF DEP », ces grains paraissent désagrégés (flèches jaunes), se fractionnant en une multitude de petits grains de mélanine.

Seuls les cobayes exposés au toluène présentent des grains de mélanines atypiques.

## V- Métabolisme

### V-1. Acide hippurique

Puisqu'aucune variation de la concentration d'AH urinaire n'a été constatée au cours des quatre semaines d'exposition au toluène, seuls les résultats obtenus au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine ont été illustrés (Figure 80).



*Figure 80* : Concentrations urinaires d'acide hippurique chez le cobaye après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine. SKF : 50 mg/kg, sc. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=4), SKF (n=5), DEP (n=6), SKF DEP (n=8), TOL (n=8), TOL SKF (n=6), TOL DEP (n=9), TOL SKF DEP (n=7). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95 % (Kruskal-Wallis).

La concentration moyenne de  $4,4 \pm 0,4$  g/g de créatinine des cobayes (n=4) du groupe « Témoin » est semblable à celle des cobayes (n=5) du groupe « SKF » de  $5,6 \pm 0,9$  g/g de créatinine; de ce fait, le traitement au SKF n'a pas modifié la concentration d'AH endogène.

La concentration d'AH des cobayes des groupes « DEP » (n=6) et « SKF DEP » (n=5) a diminué [ $K=48,49$  ;  $p<0,001$ ] de 66 % jusqu'à 1,5 g/g de créatinine par rapport aux cobayes du groupe « Témoin ». Les animaux des groupes « TOL » (n=8), « TOL SKF » (n=6) et « TOL SKF DEP » (n=7) ont une concentration moyenne d'AH de  $14,6 \pm 2,7$  g/g de créatinine qui est 3 fois plus élevée que celle des cobayes du groupe « Témoin ». Seule la concentration d'AH obtenue à partir des cobayes (n=9) du groupe « TOL DEP » a augmenté de 79 % par rapport à celle des animaux du groupe « TOL », passant d'une valeur de  $24,6 \pm 5,6$  g/g à  $13,7 \pm 2,7$  g/g de créatinine.

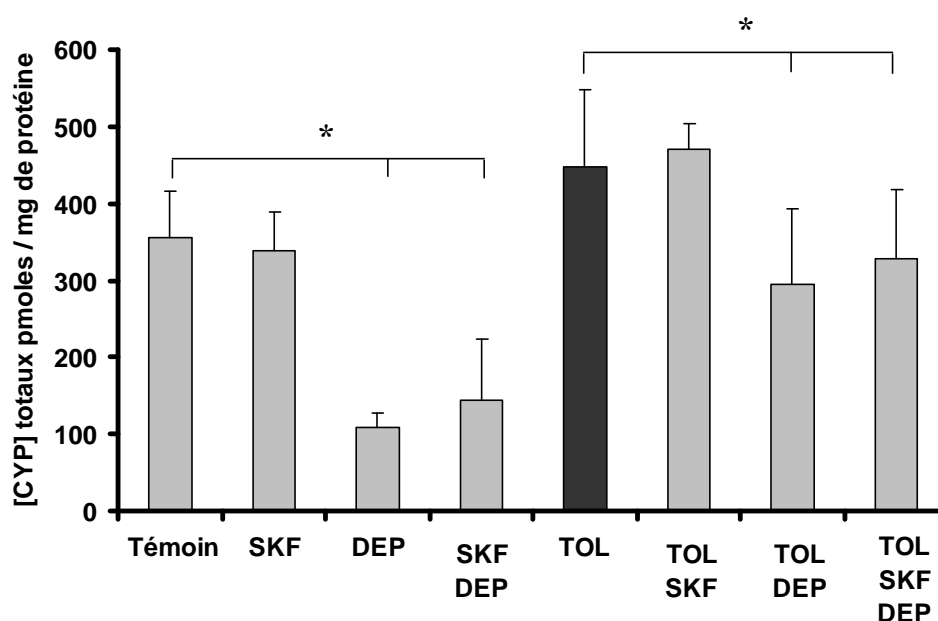
Le régime hypoprotéiné semble avoir augmenté la dégradation du toluène en AH.

## V-2. Acide benzylmercapturique

Les animaux de tous les groupes étudiés ont une concentration d'ABM urinaire inférieure au seuil de détection.

## V-3. Cytochromes P450 totaux

Au terme des quatre semaines de récupération après exposition au toluène, les quantités de cytochromes hépatiques totaux ont été déterminées pour mettre en évidence l'influence du traitement au SKF et du régime hypoprotéiné sur la synthèse des CYP450 (Figure 81) : l'information obtenue porte donc sur la quantité et non sur la fonctionnalité des CYP450.

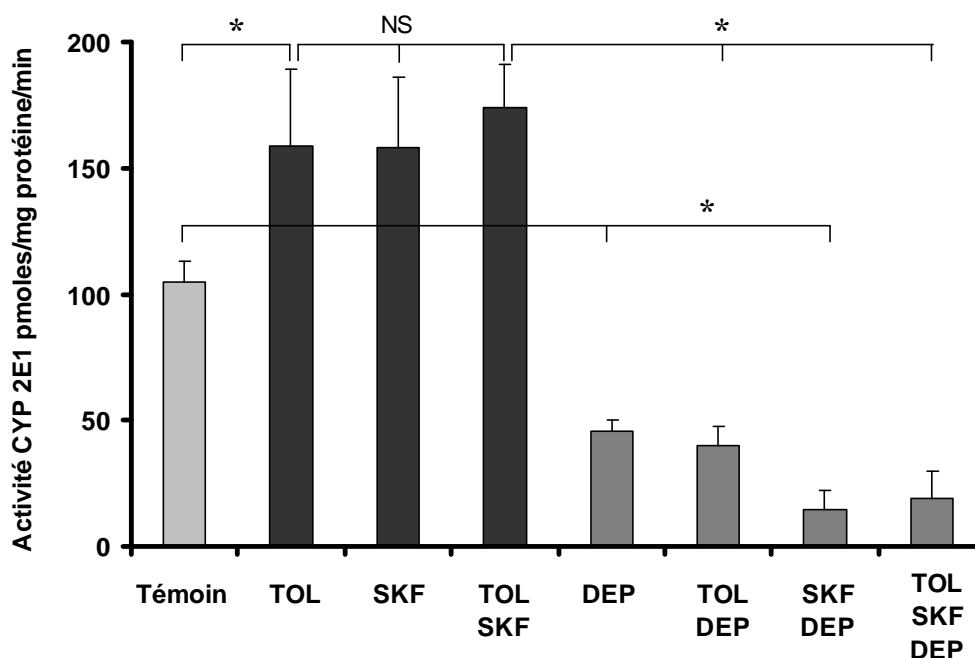


*Figure 81* : Concentrations hépatiques des CYP450 totaux (pmole/mg protéine) chez le cobaye après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg. DEP : régime hypoprotéiné à 7 %. Témoin (n=3), SKF (n=5), DEP (n=4), SKF DEP (n=8), TOL (n=7), TOL SKF (n=4), TOL DEP (n=8), TOL SKF DEP (n=6). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Kruskal-wallis).

Les cobayes (n=3) du groupe « Témoin » montrent une concentration basale de CYP450 totaux de 355 ± 60 pmoles/mg de protéine. Les cobayes des groupes « TOL » (n=7) « SKF » (n=5) « TOL SKF » (n=4) « TOL DEP » (n=8) « TOL SKF DEP » (n=6) ne présentent pas de différence significative avec le groupe « Témoin ». En revanche, les cobayes des groupes « DEP » (n=4) et « SKF DEP » (n=8) présentent une diminution [K=30,94 ; p<0,001] de la concentration des CYP450, soit respectivement 108 ± 20 et 144 ± 80 pmoles/mg de protéine. Contrairement au traitement au SKF, le régime hypoprotéiné diminue donc la concentration de CYP450 de 65 % en moyenne par rapport au groupe « Témoin ». L'exposition au toluène contrebalance la diminution des CYP450 induite par le régime.

#### V-4. Activité des CYP 2E1

Au terme des quatre semaines de récupération après exposition au toluène, la détermination de l'activité des CYP 2E1 (Figure 82) était essentielle pour mettre en évidence l'action du SKF et du régime hypoprotéiné sur l'activité des CYP 2E1.



**Figure 82 :** Activité hépatique des CYP 2E1 (pmole/min/mg protéine) chez le cobaye après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg de SKF. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=5), TOL (n=6), SKF (n=5), TOL SKF (n=4), DEP (n=4), TOL DEP (n=7), SKF DEP (n=6), TOL SKF DEP (n=6). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Kruskal-Wallis).

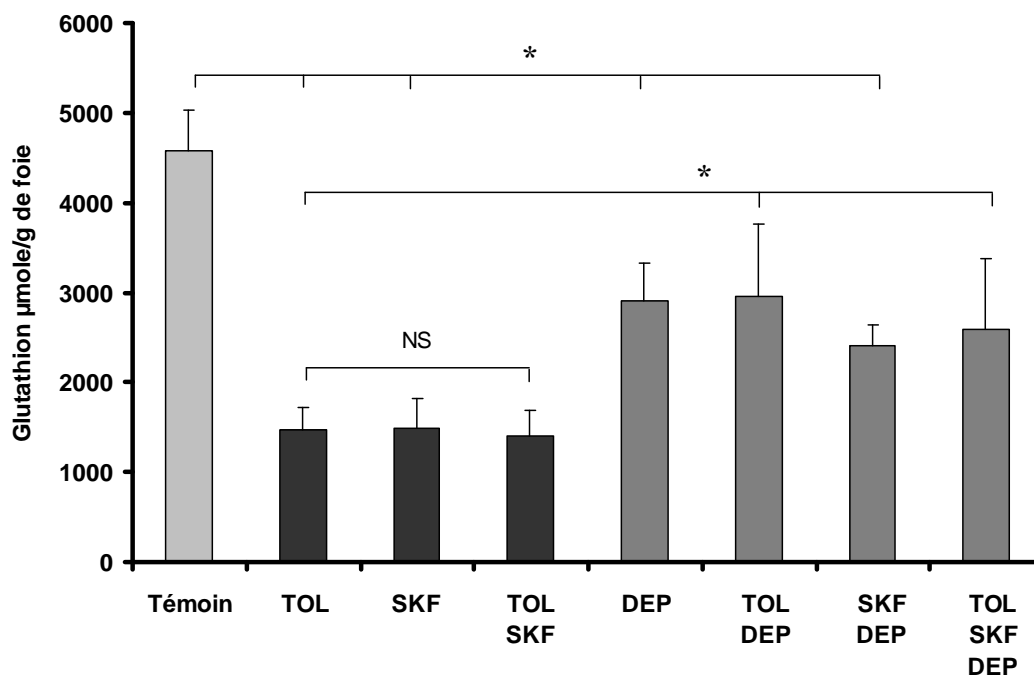
Les cobayes (n=5) du groupe « Témoin » présente l'activité basale des CYP 2E1, soit  $104,6 \pm 8,5$  pmoles/mg de protéine/min. Pour les animaux des groupes « TOL » (n=6), « SKF » (n=5) et « TOL SKF » (n=4), l'activité des CYP 2E1 a augmenté jusqu'à  $163,7 \pm 9,1$  pmoles/mg de protéine/min. Cette augmentation de 56,5 % est [ $K=47,02$  ;  $p<0,001$ ] par rapport aux cobayes du groupe « Témoin ».

L'activité des CYP 2E1 des cobayes des groupes « DEP » (n=4) et « TOL DEP » (n=7) a diminué jusqu'à  $42,9 \pm 4,1$  pmoles/mg de protéine/min, soit une diminution de 57,6 % par rapport aux cobayes du groupe « Témoin ». Quant aux cobayes des groupes « SKF DEP » (n=6) et « TOL SKF DEP » (n=6), la diminution jusqu'à  $16,8 \pm 3,5$  pmoles/mg de protéine/min correspondait à une diminution de 83 % par rapport au groupe « Témoin ». Après exposition au toluène, l'activité des CYP 2E1 a augmenté, sauf lorsque les cobayes suivaient le régime hypoprotéiné.



## V-5. Glutathion

Au terme des quatre semaines de récupération après exposition au toluène, la figure 83 illustre l'évaluation de la concentration du glutathion hépatique après le traitement au SKF et le régime hypoprotéiné à 7 %.



*Figure 83* : Concentrations hépatiques du glutathion ( $\mu\text{mole/g}$  foie) chez le cobaye après exposition à 1750 ppm de toluène pendant 4 semaines (une semaine sur deux), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et après 4 semaines de récupération. SKF : 50 mg/kg. DEP : régime hypoprotéiné à 7%. Témoin (n=5), TOL (n=6), SKF (n=5), TOL SKF (n=4), DEP (n=4), TOL DEP (n=6), SKF DEP (n=8), TOL SKF DEP (n=6). Barre d'erreur : écart type. \* différence significative à 95% (Kruskal-Wallis), NS : différence non significative.

La concentration moyenne du glutathion hépatique pour les cobayes du groupe « Témoin » est de  $4584 \pm 452$   $\mu\text{mole/g}$  de foie. La concentration du glutathion pour les animaux des groupes « TOL » (n=6), « SKF » (n=5) et « TOL SKF » (n=4) a chuté jusqu'à  $1452 \pm 41$   $\mu\text{mole/g}$  de foie, ce qui correspond à une diminution [K=34,26 ; p<0,001] de 68 % par rapport au groupe « Témoin ».

Quant à la concentration de glutathion des animaux des groupes « DEP », (n=5) « TOL DEP » (n=6), « SKF DEP » (n=8) et « TOL SKF DEP » (n=6), elle n'a chuté que de 40 % par rapport au groupe « Témoin ».

Quelles que soient les conditions expérimentales : exposition au toluène, traitement au SKF, régime hypoprotéiné, la concentration de glutathion a diminué. Cependant, le régime hypoprotéiné semble contrebalancer, tout au moins en partie, la diminution du glutathion induite par le toluène ou le traitement au SKF.

## VI- Récapitulatif des résultats de l'étude E

Le tableau 7 présente le récapitulatif des résultats de l'étude E.

*Tableau 7 : Comparaison des résultats obtenus lors d'une inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison après un traitement à 50 mg/kg s.c. de SKF et un régime hypoprotéiné à 7 % chez le cobaye. Les animaux atteints d'une surdité sont visualisés en orange.*

	Toxicocinétique	Audiométrie	Histologie
	[Toluène] sanguin µg/g	Elévation des seuils dB	Perte des cellules ciliées
Témoin	0	0	0
TOL	42	0	apex
SKF	-	0	0
TOL SKF	39	12,2	apex
DEP	-	0	0
TOL DEP	-	0	apex
SKF DEP	-	0	0
TOL SKF DEP	-	17,4	apex

	Biochimie				
	[AH] g/g	[ABM] mg/g	[CYP450] pmole/mg prot	Activité 2E1 pmole/mg/min	[Glutathion] µmole/g foie
Témoin	4	0	355	104	4584
TOL	13	0	448	158	1464
SKF	5	0	339	158	1488
TOL SKF	14	0	471	174	1405
DEP	1	0	108	45	2899
TOL DEP	24	0	294	40	2953
SKF DEP	1	0	144	14	2400
TOL SKF DEP	15	0	329	19	2586

Les résultats obtenus chez les cobayes du groupe « SKF » ne révèlent pas de modification par rapport au groupe « Témoin », ce qui prouve l'inocuité du SKF sur l'audition du cobaye.

Une exposition à 1750 ppm de toluène n'engendre pas de surdité décelable par analyse audiométrique et histologique. La concentration des AH des cobayes du groupe « TOL » a fortement augmenté par rapport aux animaux du groupe « Témoin ». **Contrairement au rat, l'audition du cobaye n'est pas vulnérable à une exposition au toluène.**

En dépit des similitudes métaboliques constatées entre les cobayes des groupes « TOL SKF » et « TOL » : augmentation de la concentration d'AH urinaire, de l'activité des CYP 2E1 et diminution de la concentration de glutathion, seuls les cobayes du groupe « TOL SKF » présentent des déplacements de seuils par rapport aux cobayes du groupe « TOL ». Puisque les données histologiques de la cochlée sont similaires dans les deux groupes, **le traitement au SKF aurait provoqué une surdité rétro-cochléaire chez les cobayes exposés au toluène.**

Les animaux du groupe « TOL DEP » présentent une diminution de l'activité des CYP 2E1 et de la concentration de glutathion par rapport au groupe « Témoin ». L'augmentation de la concentration d'AH chez les cobayes du groupe « TOL DEP » montre que **le régime a induit la voie oxydative chez le cobaye.**

Enfin, les cobayes du groupe « TOL SKF DEP » souffrent de pertes auditives associées à une destruction des fibres spirales. **Le cobaye peut donc souffrir d'une surdité rétro-cochléaire.**

## **DISCUSSION**

Des études épidémiologiques ont montré que l'exposition à des solvants aromatiques présents en milieu industriel, comme le toluène et le styrène, pouvait avoir des effets délétères sur l'audition des salariés (Morata *et al.*, 1994 ; Sliwinska-Kowalska *et al.*, 2001 ; 2007). Quant aux expérimentations animales, elles ont révélé que l'ototoxicité de ces solvants dépendait de l'espèce (Campo *et al.*, 1993 ; Fechter, 1993 ; Lataye *et al.*, 2002) : si l'audition des rats est vulnérable aux solvants aromatiques, il n'en est pas de même pour celle du cobaye. Ces différences de sensibilité entre les espèces pourraient s'expliquer par des particularités (1) morphologiques de l'épithélium sensoriel cochléaire et (2) métaboliques entre ces espèces. En effet, il existe des différences d'absorption pulmonaire, de coefficient de partage air/sang et de clairance des solvants aromatiques. Par exemple, dans des conditions d'exposition identiques, la concentration sanguine en toluène est deux fois plus élevée chez le rat que chez le cobaye (Campo *et al.*, 2006). Dans le même esprit, après une exposition à l'éthylbenzène, les concentrations sanguines en solvant sont plus élevées chez le rat que chez le cobaye (Cappaert *et al.*, 2002). D'une façon générale, la comparaison des paramètres toxicocinétiques entre rat et cobaye (Campo *et al.*, 2006 ; 2008) a montré que :

- l'absorption pulmonaire du toluène était plus efficace de 46% chez le rat,
- l'affinité du toluène pour le sang était plus élevée de 44% chez le rat,
- la demi-vie du toluène circulant était deux fois plus longue chez le rat que chez le cobaye.

Si la demi-vie du toluène circulant est plus longue chez le rat que chez le cobaye et que seule l'audition du rat est sensible à une exposition au toluène, il était raisonnable de penser que le métabolisme jouait un rôle majeur dans l'ototoxicité du toluène. Lorsque les voies d'oxydation et de conjugaison du toluène sont en compétition inhibitive avec celles de l'éthanol, les rats souffrent de pertes de cellules ciliées plus élevées que lorsque les rats sont uniquement exposés au toluène (Figure 50). À l'inverse, lorsque ces voies métaboliques sont induites de manière non spécifique par le phénobarbital, les pertes auditives (Figure 42) et cellulaires (Figure 43) des rats induits sont plus faibles que celles des rats exposés au toluène seul. Si l'inhibition et l'induction des voies d'oxydation et de conjugaison modifient ainsi les pertes auditives, alors le métabolisme hépatique a un impact évident sur l'ototoxicité du toluène chez le rat.

Les résultats obtenus chez le rat lors de l'induction des cytochromes P450 (CYP450) par le phénobarbital étaient attendus : augmentation du métabolisme et diminution de l'ototoxicité. En revanche, les résultats obtenus lors de l'inhibition aspécifique des CYP450 par le SKF525-A étaient plus déroutants. De toute évidence, une inhibition efficace des CYP450 est plus difficile à maintenir sur le long terme qu'une induction de ces mêmes cytochromes. Bien que le SKF engendre une diminution de l'activité des CYP 2E1 (Figure 60), cytochrome majeur impliqué dans le métabolisme du toluène (Gut *et al.*, 1993 ; Nakajima et Wang, 1994), et bien qu'il augmente la concentration du toluène circulant sur une courte période (Figure 61), l'inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison ne semble pas affecter la concentration sanguine en toluène au cours d'une exposition de 4 semaines. En effet, aucune diminution de la concentration des métabolites urinaires : acides hippurique (Figure 66) et mercapturique, (Figure 67) n'a pu être mise en évidence au cours de l'exposition au toluène. De ce fait, il semble que l'inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison par le traitement au SKF choisi ne parvienne pas à modifier de façon significative le toluène circulant.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer la stabilité de la concentration en toluène circulant malgré les conditions métaboliques sévères que nous avons imposées aux rats :

- l'inhibition des CYP 2E1 serait insuffisante,
- l'inhibition des CYP 2E1 serait compensée par des isoenzymes capables de catalyser l'oxydation du toluène en alcool benzylique.

L'inhibition des voies métaboliques hépatiques reste donc un challenge de taille car le métabolisme du rat semble capable de s'adapter à un déséquilibre métabolique provoqué par un xénobiotique. Cette adaptation pourrait être considérée comme l'un des systèmes de protection naturelle et essentielle à la survie de l'espèce.

L'adaptation du métabolisme hépatique en présence d'un xénobiotique se vérifie également lors de l'analyse des CYP450 totaux chez le rat et le cobaye. Quatre semaines après la fin de l'exposition au toluène, les rats au régime ou traités au SKF présentaient la même quantité de CYP450 totaux que les rats témoins (Figure 68). En conséquence, ni le régime hypoprotéiné, ni le traitement au SKF, n'a influencé la quantité des CYP450 totaux en dépit de l'exposition au toluène. Pourtant, l'exposition au toluène induit la synthèse des CYP450 (Nakajima et Wang, 1994), notamment la famille des CYP 2E1 (Gut *et al.*, 1993 ; González-Jasso *et al.*, 2003). Les effets de l'induction provoquée par notre exposition au toluène ne se sont donc pas maintenus quatre semaines après la fin de l'exposition. En fait, la quantité de CYP450 mesurée au terme de l'expérimentation était constante (Figure 68), même lorsque les rats suivaient le régime hypoprotéiné.

Nous avons espéré une diminution de la synthèse des CYP450 due à la réduction de l'apport en protéine, mais il n'en a rien été. En dépit du régime hypoprotéiné, le rat a donc maintenu la synthèse des CYP450 totaux qui jouent un rôle clef dans la métabolisation du toluène.

Contrairement au rat, les quantités de CYP450 des différents groupes de cobaye ont fluctué au terme des quatre semaines de récupération après la fin de l'exposition au toluène (Figure 81). Le SKF n'a évidemment pas diminué la quantité de CYP450 puisqu'il modifie l'activité des cytochromes sans en influencer leur synthèse. En revanche, le régime hypoprotéiné a considérablement diminué la quantité de CYP450, même si cette diminution a été parfois contrebalancée par l'induction provoquée par l'exposition au toluène. En résumé, contrairement au rat, le régime hypoprotéiné a permis chez le cobaye de diminuer la synthèse des CYP450. Cependant, cette diminution des CYP450 n'a pas provoqué de surdité chez le cobaye exposé au toluène. Il est possible que la quantité de CYP450 non-inhibé lui ait permis malgré tout de métaboliser le toluène circulant, ou que la voie d'oxydation ait été suppléée par la voie de conjugaison.

Quoi qu'il en soit, les particularités du métabolisme hépatique chez le rat et chez le cobaye pourraient expliquer, en partie tout au moins, la différence de sensibilité au toluène de leurs récepteurs auditifs. Par ailleurs, en plus des particularités du métabolisme hépatique, les réserves cochléaires en glutathion sont huit fois plus élevées chez le cobaye qu'elles ne le sont chez le rat (Lautermann *et al.*, 1997). Si les particularités métaboliques décrites dans la littérature peuvent expliquer la sensibilité relative de l'audition du rat par rapport à celle du cobaye lors d'une exposition au toluène (Lataye *et al.*, 2003 ; Campo *et al.*, 2006), elles ne permettent pas de présumer de la

nature de l'agent ototoxique : le toluène ou ses métabolites. Seules des modifications du métabolisme hépatique telles que :

- une compétition inhibitive entre toluène et éthanol par exemple,
- une inhibition des voies principales de détoxification à l'aide d'inhibiteurs spécifiques,
- ou encore une induction des enzymes impliquées dans les voies d'oxydation et de conjugaison,

permettraient d'évaluer l'implication de la molécule-mère ou de l'un de ses métabolites dans le processus ototoxique du toluène.

L'étude chez le rat de l'impact d'une compétition inhibitive entre toluène et éthanol sur l'ototoxicité du solvant avait été abordée par Campo et ses collaborateurs, en 1998. Cependant, ni les variations de la concentration sanguine en toluène, ni les variations des métabolites urinaires n'avaient été analysées. En complétant cette première investigation, nous avons confirmé qu'une compétition inhibitive entre éthanol et toluène pouvait engendrer une augmentation significative de la concentration sanguine en solvant (Figure 47), comme l'avait démontré certains auteurs (Cherry, 1993 ; Watanabe *et al.*, 1993). L'augmentation de la demi-vie du toluène sanguin explique la diminution de l'excrétion de l'acide hippurique (AH) illustrée par la Figure 51. En revanche, l'excrétion d'acide S-benzylmercapturique (ABM) a fortement augmenté (3,6 X) chez les rats préalablement gavés à l'éthanol (Figure 52). Mais cette fois, l'augmentation des ABM urinaires s'explique par une meilleure affinité de l'ADH et l'ALDH pour l'éthanol qui va ralentir la formation d'acide hippurique et augmenter la formation de l'alcool benzylique. Cette augmentation de l'alcool benzylique va induire la voie de conjugaison. De plus, l'éthanol induit l'activité de la  $\gamma$ -glutamyltransférase (Nishmura et Teschke, 1982) et la mobilisation du glutathion hépatique (Martin *et al.*, 1988). L'induction générale de la voie de conjugaison explique l'augmentation de l'excrétion des ABM urinaires. La compétition inhibitive de la voie d'oxydation du toluène par l'éthanol a été partiellement compensée par une augmentation de l'efficacité de la voie de conjugaison. Il en résulte une augmentation du toluène circulant chez les animaux gavés à l'éthanol et exposés au toluène (Figure 47).

En résumé, la cochléotoxicité du toluène pourrait résulter de l'augmentation du toluène circulant ou des métabolites issus de la voie de conjugaison. En effet, l'induction par l'éthanol de la voie de conjugaison aurait pu favoriser l'apparition de métabolites tels que l'alcool benzylique dont on ne peut écarter le rôle potentiellement ototoxique. De plus, cette expérience ne nous permet pas d'écarter définitivement la responsabilité des métabolites résultant de l'oxydation du cycle : crésols et acide toluylmercapturique. À ce stade de nos investigations, nous ne pouvons donc pas encore déterminer la part de responsabilité des métabolites de cette voie d'oxydation dans l'ototoxicité du solvant.

Après cette première étude, bon nombre de métabolites restent potentiellement responsables de l'ototoxicité du toluène, notamment la S-benzyl-cystéinyglycine et la S-benzyl-L-cystéine. Ces deux composés sont des dérivés cystéinés apparaissant après l'action des  $\gamma$ -glutamyltransférases ( $\gamma$ -GT) au niveau de la voie de conjugaison. D'après la littérature, les dérivés cystéinés sont parfois

néphrotoxiques (Nash *et al.*, 1984 ; Morel *et al.*, 1998) et par conséquent, ils pourraient également être ototoxiques (Rybak, 1993 ; Humes, 1999 ; Selimoglu, 2007).

Pour évaluer le pouvoir ototoxique des dérivés cystéinés, la voie de conjugaison a été spécifiquement inhibée au niveau de la  $\gamma$ -GT par l'acivicine (Aci) (Smith *et al.*, 1995). L'Aci inhibe la  $\gamma$ -GT. Elle va donc réduire la formation des dérivés cystéinés sans modifier la dégradation du S-benzylglutathion (Figure 12). Nous en voulons pour preuve que les rats traités à l'Aci et exposés au toluène ont excrété 38% en moins d'ABM urinaire par rapport aux rats exposés au toluène seul (Figure 58). En revanche, la concentration urinaire en AH pour les rats traités à l'Aci et exposés au toluène était identique à celle des rats exposés uniquement au toluène (Figure 57). Par conséquent, l'inhibition de la  $\gamma$ -GT n'a pas été compensée par une induction de la voie oxydative et la concentration en toluène circulant n'a pas été modifiée après le traitement à l'Aci (Figure 59).

Bien que les dérivés cystéinés aient été fortement inhibés au cours de l'étude (Tableau 4), les rats traités à l'Aci et exposés au toluène souffraient d'une augmentation (1) des seuils de potentiels auditifs : 8 dB à 16 kHz et 20 kHz (Figure 55) et (2) de pertes des cellules ciliées similaires à celles du groupe exposé uniquement au toluène : approximativement 70 % de pertes à la troisième rangée (Figure 56).

L'inhibition partielle de la synthèse des dérivés cystéinés n'a donc pas modifié l'amplitude des déplacements de potentiels auditifs évoqués, ni le pourcentage de pertes cellulaires provoquées par le toluène. Par conséquent, le traitement à l'Aci n'a pas diminué le pouvoir ototoxique du toluène. Il apparaît donc que les dérivés cystéinés ne jouent pas un rôle majeur dans l'ototoxicité du toluène. Cette étude permet d'éliminer la responsabilité des métabolites en aval de la  $\gamma$ -GT soit la S-benzyl cystéinyglycine et la S-benzyl-L-cystéine. Les molécules susceptibles de jouer un rôle dans l'ototoxicité du toluène restent le toluène lui-même, l'alcool benzylique, le benzyl sulfate, le S-benzyl glutathion, ainsi que les métabolites de la voie d'époxydation : les crésols et l'acide toluylmercapturique.

Dans la logique de nos investigations, l'inhibition des CYP450 chez le rat était une démarche expérimentale incontournable pour étudier l'impact de la molécule mère, le toluène, sur l'ototoxicité du solvant. L'inhibition aspécifique des CYP450 a été obtenue par un traitement au SKF 525-A conforté par un régime hypoprotéiné à 7%.

Lors de l'étude pilote, le traitement au SKF a permis de réduire de 25% l'activité hépatique des CYP 2E1 une heure après l'injection de l'inhibiteur (Figure 60). Cette diminution du quart de l'activité hépatique des CYP 2E1 a engendré une augmentation du toluène circulant (Figure 61). Cependant, lors de l'étude chronique, les concentrations urinaires en AH et en ABM n'ont pas diminué (Figures 66 ; 67), ce qui laisse supposer que l'activité des CYP450 n'a été que partiellement inhibée.

En dépit de ce constat, on ne peut ignorer l'augmentation des seuils de potentiels auditifs obtenue chez les rats traités au SKF et exposés au toluène (Figure 64), bien que l'histologie ne nous ait pas permis de confirmer cette tendance (Figure 65). Ces résultats montrent que le traitement au



SKF n'a pas été suffisamment efficace pour modifier le métabolisme hépatique du toluène et par conséquent, d'en modifier l'ototoxicité.

Les rats soumis au régime hypoprotéiné et exposés au toluène avaient des amplitudes de déplacements de seuils comparables à celles des témoins (Figure 64). De même, les rats soumis au régime hypoprotéiné, traités au SKF et exposés au toluène avaient des amplitudes de seuils comparables à celles des témoins. Contre toute attente, le régime hypoprotéiné a donc minimisé les pertes auditives induites par le toluène, même lorsque les rats étaient préalablement traités au SKF (Figure 64).

Cette « protection » de l'audition des rats seraient probablement due à l'induction de la voie de conjugaison. En effet, les rats, au régime, traités au SKF, et exposés au toluène, ont excrétés 46 % d'ABM urinaire en plus par rapport aux animaux exposés au toluène seul (Figure 67). Cette augmentation d'ABM témoigne d'une induction de la voie de conjugaison qui n'a cependant pas permis de réduire les effets ototoxiques au niveau des récepteurs auditifs (Figure 65). En induisant la voie de conjugaison, le régime aurait donc plutôt minimisé les effets toxiques du toluène au niveau central qu'au niveau périphérique.

En résumé, en dépit d'une baisse de l'activité des CYP 2E1, le SKF a augmenté la concentration en ABM urinaire (Figure 67) et a diminué parallèlement la quantité du glutathion (Figure 70). Par conséquent, les effets attendus du régime hypoprotéiné : une diminution de l'activité des CYP450 et une diminution du glutathion hépatique ont bien été obtenues. Mais les résultats électrophysiologiques obtenus étaient en revanche plutôt inattendus. En effet, les rats au régime et exposés au toluène avaient des seuils plus réduits que ceux des rats exposés au toluène seul. On est en droit de se demander si l'induction de la voie de conjugaison par le régime hypoprotéiné n'aurait pas permis de réduire les déplacements de seuils auditifs. Le fait que les pertes de cellules ciliées soient identiques entre les différents groupes nous laisse penser que le régime hypoprotéiné aurait favorisé une protection plutôt centrale que périphérique. Quoi qu'il en soit, cette étude ne nous informe pas sur la responsabilité du toluène, en tant que molécule mère, dans l'ototoxicité engendrée par le solvant.

Etant donné qu'il est difficile, sinon impossible, d'inhiber les deux voies du métabolisme du toluène chez le rat, l'induction a été préférée à l'inhibition des voies d'oxydation et de conjugaison pour tenter d'évaluer la responsabilité du toluène sur l'ototoxicité du solvant.

L'induction des voies d'oxydation et de conjugaison par le 5-éthyl-5-phényl-2,4,6 (1H, 3H, 5H)-pyrimidinetrione (phénobarbital ou PhB) (Waxman et Azaroff, 1992 ; Aniya *et al.*, 1993) a permis de réduire de 15 dB les seuils des potentiels auditifs obtenus suite à une exposition au toluène (Figure 42). Les résultats audiométriques ont été confirmés par les analyses morphologiques puisque les animaux induits au PhB et exposés au toluène souffraient d'une diminution significative des pertes cellulaires par rapport aux rats exposés au toluène seul (Figure 43). Cette diminution de l'effet ototoxique du toluène par le PhB peut s'expliquer par l'induction des enzymes du métabolisme

hépatique. En effet, le traitement au PhB a augmenté de 42% l'excrétion urinaire en AH (Figure 45) et de 35% celle en ABM (Figure 46), par rapport aux excréctions relatives des rats exposés seulement au toluène.

Sachant que le PhB induit les CYP450, l'ADH, l'ALDH, la GST et la  $\gamma$ -GT, l'induction par le PhB augmente la clairance de la molécule mère comme celle de ses métabolites. En conséquence, il est donc difficile d'attribuer à l'un ou à l'autre des métabolites formés, une responsabilité dans l'ototoxicité du toluène.

Cependant, les premières études ont permis de sélectionner les métabolites jouant un rôle potentiel dans la toxicité auditive : l'alcool benzylique, le benzylsulfate, le S-benzyl glutathion ainsi que les crésols et l'acide toluylmercapturique.

La responsabilité des crésols et celle de l'acide toluylmercapturique peuvent être éliminées d'emblée, car si ces métabolites avaient été responsables de la surdité induite par le toluène, le traitement au PhB aurait dû augmenter leur ototoxicité.

En ce qui concerne l'alcool benzylique, le benzylsulfate et le S-benzyl glutathion, leur clairance a également été accentuée par le traitement au PhB, mais le PhB induit également de manière non-spécifique l'activité des enzymes des deux voies métaboliques. De ce fait, on ne peut pas éliminer avec certitude une éventuelle responsabilité de ces métabolites dans l'ototoxicité du solvant, même si le toluène en tant que molécule mère semble être l'agent ototoxique le plus pertinent.

Cette série d'investigations a permis de progresser sensiblement dans la compréhension des mécanismes de l'ototoxicité du toluène. Après les expériences menées chez le rat, nous pouvons affirmer qu'une modification du métabolisme hépatique du toluène peut influencer son ototoxicité. D'une façon générale, les études menées chez le rat ont mis en évidence un équilibre entre les voies d'oxydation et de conjugaison. Nos investigations relèguent les dérivés cystéinés au rang de métabolites inoffensifs pour l'audition des rats. En revanche, la molécule de toluène jouerait un rôle prépondérant dans le processus d'ototoxicité, comme l'avait supposé Pryor, en 1991.

Au terme de toutes nos expérimentations, nous ne pouvons pas écarter le fait que le métabolisme cochléaire du toluène puisse également jouer un rôle prépondérant. En d'autres termes, les métabolites présents en faible quantité au niveau de l'oreille interne pourraient également avoir un rôle ototoxique qu'il est certes difficile d'étudier.

Après les études menées chez le rat, animal dont le récepteur auditif est vulnérable au toluène, l'étude chez le cobaye nous est apparue comme incontournable. En effet, l'audition du cobaye possède la particularité d'être résistante au toluène. Comprendre les mécanismes de résistance de l'audition du cobaye face à une exposition au toluène pourrait dénouer les liens entre métabolisme hépatique et ototoxicité.

Notre première étape fut de tenter d'augmenter la concentration en toluène circulant chez le cobaye et d'en étudier l'impact sur l'ototoxicité. Comme précédemment chez le rat, l'inhibition des CYP450 a été entreprise par un traitement au SKF 525-A et confortée par un régime hypoprotéiné. Cependant, le traitement au SKF que nous avons affiné chez le rat, s'est révélé nocif pour le métabolisme du cobaye. Pour maintenir le cobaye dans de bonnes conditions physiologiques (Figure 73), nous avons été contraints de réduire la dose hebdomadaire de SKF (Figure 20).

Le traitement au SKF ainsi ajusté a permis de diminuer de 61% l'activité des CYP 2E1 (Figure 71) : l'inhibition était donc beaucoup plus efficace chez le cobaye qu'elle ne l'était chez le rat. Néanmoins, en dépit du fort pourcentage d'inhibition obtenu chez le cobaye, la concentration en toluène circulant n'a pas été modifiée de façon significative (Figure 72). D'ailleurs, les cobayes traités au SKF et exposés au toluène ont excrété autant d'acide hippurique (AH) que les animaux exposés au toluène seul. On peut expliquer ce résultat en supposant d'une part, que 40 % de l'activité des CYP 2E1 a suffi aux cobayes pour métaboliser le toluène, ou d'autre part, que le traitement au SKF était inefficace en fin de semaine, lors du recueil des urines. Quoi qu'il en soit, l'inhibition partielle par le SKF a permis d'obtenir, pour la première fois chez le cobaye, une surdité provoquée par du toluène inhalé : 17,4 dB en moyenne sur toute la gamme de fréquences testées (Figure 74).

L'élévation des seuils électrophysiologiques ne peut pourtant pas s'expliquer par les pertes de cellules ciliées reportées dans le cochléogramme de la Figure 76. En effet, il faut garder à l'esprit que les cochléogrammes ne nous informent que de la présence des cellules ciliées, sans présumer de leur fonctionnalité. Il est donc possible que les cellules ciliées présentes ne soient pas fonctionnelles. Il se pourrait également qu'un mécanisme toxique rétro-cochléaire traduise la surdité mesurée par l'augmentation des seuils électrophysiologiques. À ce propos, le déplacement constant sur toute la gamme de fréquences nous laisse penser à une atteinte rétro-cochléaire plutôt qu'à une atteinte cochléaire, généralement limitée en fréquences.

Contrairement à nos attentes, ni le traitement au SKF, ni le régime hypoprotéiné n'a augmenté la charge de toluène sanguin (Figure 72). En effet, en dépit d'une baisse de l'activité des CYP 2E1 des cobayes au régime, par rapport à celle des témoins (Figure 82), une augmentation de la concentration urinaire en AH a été mise en évidence (Figure 80). Cela signifie que, chez le cobaye exposé au toluène, le régime a amélioré l'efficacité de la voie d'oxydation (Qin *et al.*, 2007).

Puisque le régime n'a pas modifié la concentration en toluène circulant (Figure 72), il se pourrait donc que, à l'inverse de la voie d'oxydation, la voie de conjugaison ait été particulièrement déprimée par le régime. Cependant, nous n'avons pas pu évaluer l'impact du régime sur la voie de conjugaison car, rappelons-le, le cobaye n'excrète pas d'ABM urinaire.

En résumé, le régime hypoprotéiné seul n'a pas permis d'augmenter la charge en toluène sanguine chez le cobaye et de surcroît, il n'a pas provoqué de surdité. Le régime n'a donc pas potentialisé les effets toxiques du toluène, comme il le fait lors d'une exposition au bruit (Ohinata *et al.*, 2000) ou pour certains xénobiotiques tels que la gentamicine (Hoffman *et al.*, 1987 ; Lautermann *et al.*, 1995a), le cisplatine (Lautermann *et al.*, 1995b). L'impact de la modification des voies métaboliques par le régime dépend donc de la nature du xénobiotique et de leur mécanisme d'ototoxicité relatif.

La surdité engendrée par le toluène chez des cobayes au régime et traités au SKF s'étend sur une large gamme de fréquences audiométriques et n'est pas corrélée à la perte de cellules ciliées externes ou internes. Les caractéristiques de cette surdité plaident plutôt en faveur d'une ototoxicité de type rétro-cochléaire. En effet, si le foie possède une certaine flexibilité métabolique, il n'en est peut-être pas de même pour des organes autres, tels que le système nerveux central. De ce fait, pour une même quantité de toluène sanguin, le système nerveux central pourrait ne plus être en mesure de métaboliser le solvant lorsque l'activité de ses CYP450 est diminuée ou que son stock de glutathion est réduit. Cette hypothèse pourrait expliquer l'altération des fibres nerveuses du nerf auditif des cobayes soumis au régime, traités au SKF et exposés au toluène (Figure 77). En effet, la perte des fibres spirales afférentes en présence des cellules ciliées internes témoignent d'une neurotoxicité centrale plutôt que périphérique. Elle serait due à une dégénérescence Wallérienne des dendrites plutôt qu'à une dé-afférentation des dendrites avec les cellules ciliées internes.

Si le toluène circulant semble être un paramètre déterminant dans l'ototoxicité du solvant, force est de constater que son impact histopathologique cochléaire est différent en fonction de l'espèce. Chez le rat, le toluène provoque des pertes de cellules ciliées externes, alors qu'elles sont minimales chez le cobaye. En revanche, chez le cobaye, le toluène provoque des pertes de fibres spirales qui n'ont jamais été observées chez le rat. Certains auteurs ont avancé l'hypothèse que le glutathion pourrait jouer un rôle déterminant dans la protection de la cochlée contre le bruit, les antibiotiques (Lautermann *et al.*, 1997), le cisplatine (Dickey *et al.*, 2004) et pour finir, contre les solvants aromatiques (Chen *et al.*, 2007).

Chez le cobaye, la concentration du glutathion le long de l'épithélium sensoriel apical est huit fois plus élevée que le long de l'épithélium basal (Lautermann *et al.*, 1997 ; Sha *et al.*, 2001). Cette distribution différentielle entre cochlée basale et apicale ne permet pas d'établir un lien direct entre la présence de glutathion dans la cochlée et la vulnérabilité des fibres à l'apex de la cochlée. Si le glutathion avait eu un rôle protecteur déterminant dans notre contexte expérimental, alors les fibres spirales apicales auraient dû être épargnées. En conséquence, la distribution du glutathion cochléaire ne permet pas d'expliquer nos données histopathologiques. Cependant, il est indéniable que le glutathion joue un rôle très important dans la métabolisation du toluène, au niveau des voies de conjugaison, mais aussi dans la lutte contre le stress oxydant (Rana *et al.*, 2002). Une étude récente a montré qu'une exposition au toluène pouvait induire une diminution de la concentration de glutathion au niveau du système nerveux central (El-Nabi Kamel et Shehata, 2008). On peut donc imaginer que

dans de telles conditions, le stress oxydant provoqué par l'exposition au toluène ait pu altérer les voies auditives centrales et engendrer une dégénérescence des fibres spirales.

Les pertes auditives obtenues chez le cobaye exposé au toluène auraient donc plutôt une origine rétro-cochléaire, bien que l'on ne puisse ignorer l'atteinte morphologique de la strie vasculaire des animaux au régime et traités au SKF. En plus d'une nette diminution du nombre de vaisseaux sanguins, les cellules intermédiaires de la strie vasculaire ont disparu pour la plupart, à l'apex de la cochlée. Or, la strie vasculaire du cobaye renferme des enzymes telles que la glutathion-S-transférase, la glutathion peroxydase (Fujimura *et al.*, 2008) et des molécules telles que la mélatonine, qui peuvent jouer un rôle contre le stress oxydant (Biesalski *et al.*, 1988 ; Sayan *et al.*, 2004). Chez les cobayes au régime et traités au SKF, ces enzymes et molécules antioxydantes pourraient avoir été dépassées par l'affluence du solvant qui aurait alors altéré la strie vasculaire.

Par ailleurs, la mélanine présente dans les cellules de Hensen pourrait également jouer un rôle contre le stress oxydant. En effet, une étude récente a révélé que les granules de mélanine présents dans l'organe de Corti renfermaient une quantité importante de glutathion-S-transférase jouant un rôle primordial dans la défense contre le stress oxydant (Bustamante *et al.*, 1993 ; Fujimura *et al.*, 2008). Ce rôle protecteur de la mélanine serait illustré par les images histologiques de l'organe de Corti. Chez les animaux exposés au toluène, les granules de mélanine renferment des vacuoles (Figure 79) ; chez les cobayes au régime et traités au SKF, certains granules apparaissent fractionnés en une multitude de petits grains de mélanines. Ces grains de mélanine pourraient avoir un rôle de réservoir (Zecca *et al.*, 2003) ou de barrière vis-à-vis du toluène.

## **CONCLUSION**

L'inhibition du métabolisme hépatique du toluène augmente son ototoxicité chez le rat comme chez le cobaye. Si nos investigations permettent d'éliminer les dérivés cystéinés des métabolites potentiellement ototoxiques, elles ne permettent pas d'incriminer avec certitude la molécule mère, le toluène, comme seul agent cochléotoxique. L'alcool benzylique, le benzyl sulfate, le S-benzyl glutathion pourraient également avoir un effet délétère sur la cochlée. En revanche, nos expérimentations permettent de mettre en évidence une relation étroite entre les voies d'oxydation et de conjugaison du métabolisme hépatique du toluène. Cette relation entre les deux voies métaboliques est cruciale pour la survie de l'animal. Nous en voulons pour preuve qu'il est difficile, sinon impossible, d'inhiber simultanément les deux voies métaboliques lorsque les animaux sont exposés au toluène. En conséquence, quelle que soit la stratégie d'inhibition adoptée, la relation entre les voies d'oxydation et de conjugaison traduit une certaine réactivité des processus de métabolisation lors d'une exposition au toluène. Les progrès apportés dans la compréhension des mécanismes de métabolisation du toluène chez les deux espèces ont permis de bousculer le dogme de l'invulnérabilité du récepteur auditif du cobaye exposé à ce solvant aromatique.

Pour la première fois, l'inhalation de toluène a provoqué une surdité chez le cobaye. Pour y parvenir, les cytochromes P450 des cobayes ont été inhibés de manière non-spécifique par le SKF. Cependant, les dommages cochléaires observés chez le cobaye étaient différents de ceux provoqués chez le rat. Par exemple, les cellules ciliées externes chez le rat, vulnérables à une intoxication au toluène, se sont révélées résistantes chez le cobaye. En revanche, les pertes de cellules intermédiaires et de fibres spirales constatées chez le cobaye n'ont jamais été observées chez le rat. Enfin, la surdité engendrée par le toluène chez le cobaye, contrairement à celle engendrée chez le rat, s'est étendue sur une large gamme de fréquences audiométriques. L'ensemble de ces résultats prouve que les mécanismes d'ototoxicité imputés au toluène sont fondamentalement différents entre les deux espèces : la surdité serait davantage cochléaire chez le rat alors qu'elle serait rétro-cochléaire chez le cobaye.

La résistance au toluène de l'organe de Corti du cobaye pourrait trouver son origine dans l'efficacité d'une part, de son métabolisme hépatique et d'autre part, de sa lutte contre le stress oxydant cochléaire en usant de molécules telles que la mélanine ou le glutathion. Le glutathion jouerait donc un rôle clef dans la protection contre l'ototoxicité du toluène chez le cobaye. Pour évaluer son rôle dans la protection du récepteur auditif, il serait intéressant d'analyser l'impact d'un apport en glutathion au niveau hépatique et cochléaire sur l'ototoxicité du toluène chez le rat. Pour cela, une étude réalisée chez le rat exposé au toluène et traité à la N-acétyl-L-cystéine (précurseur du glutathion) sera envisagée dans un futur proche. Si l'apport en glutathion cochléaire diminue l'ototoxicité du toluène chez le rat, alors le glutathion pourra être considéré comme la molécule capable de minimiser les effets ototoxiques d'une exposition au toluène.

Pour finir, la toxicité rétro-cochléaire constatée chez le cobaye pourrait trahir une vulnérabilité plus importante du système nerveux central lorsqu'il est déplété en glutathion et/ou en cytochromes P450. Que l'on considère la cochléotoxicité ou la neurotoxicité, le glutathion s'avère donc une molécule clef dans la prévention des surdités induites par des expositions aux solvants industriels aromatiques tels que le toluène.

# **PUBLICATIONS**



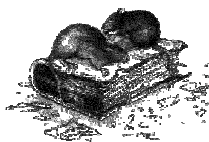
## Liste des publications



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



Campo P., **Waniusiow D.**, Lataye R., Cossec B., Rieger B., Cosnier F., Burgart M. Toluene-induced hearing loss in Phenobarbital-treated rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 2008 ; 30: 46-54.



**Waniusiow D.**, Campo P., Cossec B., Cosnier F., Grossman S., Ferrari L. Toluene-induced hearing loss in acivicin-treated rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 2008 ; 30: 154-160.



**Waniusiow D.**, Campo P., Venet T., Cossec B., Cosnier F., Beydon D., Burgart M., Ferrari L., Parietti C. Toluene-induced hearing loss in guinea-pig. *Toxicol. Sci.* En soumission.

# **BIBLIOGRAPHIE**

---

Airlie-Søborg P. Solvent neurotoxicity. Boca Raton, CRC Press. 1992 ; 129-153.

Altıparmak M., Pamuk O., Pamuk G. Ataman R., Serdengeçti K. Is isoniazid ototoxic in patients undergoing hemodialysis? *Nephron*. 2002 ; **92**: 478-480.

Anders M. Enhancement and inhibition of drug metabolism. *Ann. Rev. Pharmacol.* 1971 ; **11**: 37-56.

Anders M., Lash L., Dekant W., Elfarra A., Dohn D. Biosynthesis and biotransformation of glutathione-S- conjugates to toxic metabolites. *Crit. Rev. Toxicol.* 1988 ; **18**: 311-341.

Aniya Y., Shimoji M., Naito A. Increase in liver microsomal glutathione S-transferase activity by phenobarbital treatment of rats. Possible involvement of oxidative activation via cytochrome P450. *Biochem. Pharmacol.* 1993 ; **46**: 1741-1747.

Anzenbacherova E., Hudecek J., Murgida D., Hildebrandt P., Marchal S., Lange R., Anzenbacher P. Active sites of two orthologous cytochromes P450 2E1 : Differences revealed by spectroscopic methods. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005 ; **338**:477-482.

Bakke J. Biochemical and physiological dispositions of glutathione conjugates. *Drug Metabo. Rev.* 1990 ; **22**: 637-647.

Biesalski H.K., Welker H.A., Thalmann R., Vollrath L. Melatonin and other serotonin derivatives in the guinea pig membranous cochlea. *Neurosci. Lett.* 1988 ; **91**: 41-46.

Bu S., Kim Y., Kim S., Lee M. Effects of enzyme inducers and inhibitor on the pharmacokinetics of intravenous 2-(allylthio)pyrazine, a new chemoprotective agent, in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* 2000 ; **21**: 157-164.

Bustamante J., Bredeston L., Malanga G., Mordoh J. Role of melanin as a scavenger of active oxygen species. *Pigment Cell. Res.* 1993 ; **6**: 348-353.

Campo P., Lataye R., Bonnet P. No interaction between noise and toluene on cochlea in the guinea pig. *Acta. Acust.* 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**: 129-140.

Campo P., Lataye R., Cossec B., Villette V. Combined effects of simultaneous exposure to toluene and ethanol on auditory function in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 1998 ; **20**: 321-332.

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

Campo P., Pouyatos B., Lataye R., Morel G. Is the aged rat ear more susceptible to noise or styrene damage than the young ear ? *Noise and Health.* 2003 ; **5**: 1-18.

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

Campo P., Waniusiow D., Lataye R., Cossec B., Rieger B., Cosnier F., Burgart M. Toluene-induced hearing loss in Phenobarbital-treated rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 2008 ; **30**: 46-54.

Cappaert N.L., Klis S.F., Muijser H., Kulig B.M., Ravensberg L.C., Smoorenburg G.F. Differential susceptibility of rats and guinea pigs to the ototoxic effects of ethyl benzene. *Neurotox. Teratol.* 2002 ; **24**: 503-510.

Chen G., Chi L., Kostyniak P., Henderson D. Styrene induced alterations in biomarkers of exposure and effects in the cochlea : mechanisms of hearing loss. *Toxicol. Sci.* 2007 ; **98**: 167-177.

Chen W., McAlhany R., West Jr., West J. 4-Methylpyrazole, an alcohol deshydrogenase inhibitor, exacerbates alcohol-induced microencephaly during the brain growth spurt. *Alcohol.* 1995 ; **12**: 351-355.

Cherry A. Neurobehavioural effects of solvents : the role of alcohol. *Environ. Res.* 1993 ; **62**: 155-158.

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

Cummings B., Parker J., Lash L. Cytochrome p450-dependant metabolism of trichloroethylene in rat kidney. *Toxicol. Sci.* 2001 ; **60**: 11-19.

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

Deamer N., Genter M. Olfactory toxicity of diethyldithiocarbamate (DDTC) and disulfiram and the protective effect of DDTC against the olfactory toxicity of dichlobenil. *Chemico-Biological Interactions.* 1995 ; **95**: 215-226.

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

Dickey D., Muldoon L., Kraemer D., Neuwelt E. Protection against cisplatin-induced ototoxicity by N-acetylcysteine in a rat model. *Hear. Res.* 2004 ; **193**: 25-30.

Directive 2003/10/CE du parlement européen et du conseil de l'union européenne, L4238. JO 6 février 2003.

Ejiri N., Katayama K., Doi K. Induction of cytochrome P450 isozymes by phenobarbital in pregnant rat and fetal livers and placenta. *Exp. Mol. Pathology.* 2005 ; **78**: 150-155.

El-Nabi Kamel M.A., Shehata M. Effect of toluene exposure on the antioxidant status and apoptotic pathway in organs of the rat. *Br. J. Biomed. Sci.* 2008 ; **65**:75-79.:

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

Fiche toxicologique FT74, Toluène, 2008, [www.inrs.fr](http://www.inrs.fr)

Fromowicz P., Brondeau M., Bonnet P., De Ceaurriz J. Effect of SKF-525-A on the glutathion-conjugating enzyme system and on liver toxicity. *Toxicol. Lett.* 1987 ; **36**: 275-280.

Fujimura T., Suzuki H., Udaka T., Shiomori T., Mori T., Inaba T., Hiraki N., Kayashima K., Doi Y. Immunoreactivities for glutathione S-transferases and glutathione peroxidase in the lateral wall of pigmented and albino guinea pig cochlea. *Med. Mol. Morphol.* 2008 ; **41**: 139-144.

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

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

Gatley M., Kelly G., Turnbull I. A case of organic solvent exposure and temporal lobe demyelination. *J. Soc. Occup. Med.* 1991 ; **41**: 83-85.

González-Jasso E., López T., Lucas D., Berthou F., Manno M., Ortega A., Albores A. CYP2E1 regulation by benzene and other small organic chemicals in rat liver and peripheral lymphocytes. *Toxicol. Lett.* 2003 : **144**: 55-67.

Greenberg M. The central nervous system and exposure to toluene: a risk characterization. *Env. Res.* 1997 ; **72**: 1-7.

Greenwood D. A cochlear frequency-position function for several species-29 years. *J. Acoust. Soc. Am.* 1990 ; **87**: 2592-25605.

Gut I., Terelius Y., Frantík E., Linhart I., Soucek P., Filipcová B., Klucková H. Exposure to various benzene derivatives differently induces cytochromes P450 2B1 and P450 2E1 in rat liver. *Arch. Toxicol.* 1993 ; **67**: 237-243.

Hackney C., Furness D. Mechanotransduction in vertebrate hair cells : structure and function of the stereociliary bundle. *Am. J. Physiol.* 1995 ; **268**: 1-13.

Heran-Le Roy O., Sandret N. SUMER 94. Documents pour le médecin du travail. 1997 ; **69**: 63-70.

Hinchman C., Ballatori N. Glutathione-degrading capacities of liver and kidney in different species. *Biochem. Pharmacol.* 1990 ; **40**: 1131-1135.

Hjelm E., Sato A., Colmsj A. Dietary and ethanol induced alterations of the toxicokinetics of toluene in humans. *Occup. Environ. Med.* 1994 ; **51**: 487-491.

Hoffman D.W., Whitworth C.A., Jones K.L., Rybak L.P. Nutritional status, glutathione levels, and ototoxicity of loop diuretics and aminoglycoside antibiotics. *Hear. Res.* 1987 ; **31**: 217-222.

Humes H. Insights into ototoxicity. Analogies to nephrotoxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999 ; **28**: 15-18.

Jaffe M. Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. *Z. Physiol. Chem.* 1886 ; **10**: 391-400.

Johnson A., Canlon B. Progressive hair cell loss induced by toluene exposure. *Hear. Res.* 1994 ; **75**: 201-208.

Kim S., Kwak J., Lee J., Novak R., Park S., Kim N. Malotilate, a hepatoprotectant, suppresses CYP2E1 expression in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994 ; **200**: 1414-1420.

Lash L. Role of renal metabolism in risk to toxic chemicals. *Environ. Health Perspect.* 1994 ; **102**: 75-79.

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

Lataye R., Campo P., Barthelemy C., Loquet G., Bonnet P. Cochlear pathology induced by styrene. *Neurotoxicol. Teratol.* 2001 ; **23**: 71-79.

Lataye R., Campo P., Pouyatos B., Cossec B., Blachère V., Morel G. Solvent ototoxicity in rat and guinea pig. *Neurotox.Teratol.* 2002 ; **531**: 1-12.

Lataye R., Campo P., Pouyatos B., Cossec B., Blachère V., Morel G. Solvent ototoxicity in the rat and guinea pig. *Neurotox. Teratol.* 2003 ; **25**: 39-50.

Lautermann J., McLaren J., Schacht J. Glutathione protection against gentamicin ototoxicity depends on nutritional status. *Hear. Res.* 1995a ; **86**: 15-24.

Lautermann J., Song B., McLaren J., Schacht J. Diet is a risk factor in cisplatin ototoxicity. *Hear. Res.* 1995b ; **88**: 47-53.

Lautermann J., Crann S., McLaren J., Schacht J. Glutathione-dependent antioxidant systems in the mammalian inner ear: effects of aging, ototoxic drugs and noise. *Hear. Res.* 1997 ; **114**: 75-82.

Lejus C., Fautrel A., Mallédant Y., Guillouzo A. Inhibition of cytochrome P450 2E1 by propofol in human and porcine liver microsomes. *Bioch. Pharmacol.* 2002 ; **64**: 1151-1156.

Loquet G., Campo P., Lataye R. Comparison of toluene-induced and styrene-induced hearing losses. *Neurotox. Teratol.* 1999 ; **21**: 89-697.

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

Manzo L., Locatelli C., Candura S., costa L. Nutrition and alcohol neurotoxicology. *Neurotoxicology.* 1994 ; **15**: 555-566.

Martin M.I., Gonzalez J., Muñoz M.E., Alonso L., Esteller A., Feroso J. Changes in hepatic and serum gamma-glutamyltransferase activities following chronic ethanol intake in rats. *Drug Alcohol Depend.* 1988 ; **21**:19-23.

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

Meek M., Chan P. Toluene : evaluation of risks to human health from environmental exposure in Canada. *Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 1994 ; **12**: 507-515.

Mitchell D., Petersen D. Inhibition of rat hepatic mitochondrial aldehyde deshydrogenase mediated acetaldehyde oxidation by trans-4-hydroxy-2nonenal. *Hepatology.* 1991 ; **13**: 728-734.

Morata T., Dunn D., Kretschmer L., Lemasters G., Keith R. Effects of occupational exposure to organic solvents and noise on hearing. *Scand. J. Work Environ. Health.* 1993 ; **19**: 245-254.

Morata T., Dunn D., Sieber W. Occupational exposure to noise and ototoxic organic solvents. *Arch. Environ. Health.* 1994 ; **49**:359-365.

Morata T., Nylén P., Johnson A., Dunn D. Auditory and vestibular functions after single or combined exposure to toluene. *Arch. Toxicol.* 1995 ; **69**: 431-443.

Morata T., Johnson A., Nylén P., Svensson E., Cheng J., Krieg E., Lindblad A., Ernstgard L., Franks J. Audiometric findings in workers exposed to low levels of styrene and noise. *J. Occup. Environ. Med.* 2002 ; **44**: 806-814.

Morel G., Bonnet P., Cossec B., Morel S., Cour C., Lambert A., Roure M., Brondeau M. The role of glutathion and cysteine conjugates in the nephrotoxicity of o-xylene in rats. *Arch. Toxicol.* 1998 ; **72**: 553-558.

Müller M. Frequency representation in the rat cochlea. *Hear Res.* 1991 ; **51**: 247-254.

Nash J., King L., Lock E., Green T. The metabolism and disposition of hexachloro-1,3-butadiene in the rat and its relevance to nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984 ; **73**: 124-137.

Nakajima T., Wang R. Induction of cytochromes P450 by toluene. *Int. J. Biochem.* 1994 ; **26**: 1333-1340.

Nishiyama T. Changes in the auditory evoked potentials index by induction doses of four different intravenous anesthetics. *Acta. Anaesthesiol. Scand.* 2005 ; **49**: 1326-1329.

Nishmura M, Teschke R. Effect of chronic alcohol consumption on the activities of liver plasma membrane enzymes: gamma-glutamyltransferase, alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase. *Biochem. Pharmacol.* 1982 ; **31**:377-381.

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

Okey A. Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmac. Ther.* 1990 ; **45**: 241-298.

Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 1964 ; **239**: 2370-2378.



Parkinson A. An overview of current cytochromes P450 technology for assessing the safety and efficacy of new material. *Toxicol. Pathol.* 1996 ; **45**: 241-298.

Persijn J., Van Der Slik W. A new method for the determination of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in serum. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1976 ; **14**: 421-427.

Poloyac S., Tortorici M., Przychodzin D., Reynolds R., Xie W., Frye R., Zemaitis M. The effect of isoniazid on CYP2E1- and CYP4A-mediated hydroxylation of arachidonic acid in the rat liver and kidney. *Drug Metab. Dispos.* 2004 ; **32**: 727-733.

Poster D., Bruno S., Penta J., Neil G., McGovren J. Acivicin an antitumor antibiotic. *Cancer Clin. Trials.* 1981 ; **4**: 327-330.

Pryor G., Dickinson J., Howd R., Rebert C. Transient cognitive deficits and high-frequency hearing loss in weanling rats exposed to toluene. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 1983 ; **5**: 53-57.

Pryor G., Rebert C., Kassay K., Kuiper H., Gordon R. The hearing loss associated with exposure to toluene is not caused by a metabolite. *Brain Res. Bull.* 1991 ; **27**: 109-113.

Qin L.Q., Wang Y., Xu J.Y., Kaneko T., Sato A., Wang P.Y. One-day dietary restriction changes hepatic metabolism and potentiates the hepatotoxicity of carbon tetrachloride and chloroform in rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 2007 ; **212**: 379-387.

Rana S., Allen T., Singh R. Inevitable glutathione, then and now. *Indian J. Exp. Biol.* 2002 ; **40**: 706-716.

Raphael Y., Altschuler R. Scar formation after drug-induced cochlear insult. *Hear. Res.* 1991 ; **51**: 173-184.

Rebert C., Sorensen S., Howd R., Pryor G. Toluene-induced hearing loss in rats evidenced by the brainstem auditory-evoked response. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 1983 ; **5**: 59-62.

Römer K., Federsel R., Freundt K. Rise of inhaled toluene, ethyl benzene, xylene, or mesitylene in rat blood after treatment with ethanol. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1986 ; **37**: 382-386.

Rosenberg N., Kleinschmidt-DeMasters B., Davis K., Dreisbach J., Hormes J., Filley C. Toluene abuse causes diffuse central nervous system white matter changes. *Ann. Neurol.* 1988 ; **23**: 611-614.

Rybak L. Ototoxicity of loop diuretics. *Otolaryngol. Clin. North. Am.* 1993 ; **26**: 829-844.

Saadeddin A., Torres-Molina F., Carcel-Trullols J., Araico A., Peris J. Effect of cytochrome P450 inhibitors (diethyl dithiocarbamate, ketoconazole and grapefruit juice) on the pharmacokinetics of all-trans-retinoic acid. *Farmaco*. 2004 ; **59**: 697-702.

Sano K., Ikegami Y., Uesugi T. Initial intraorgan formation of mercapturic acid. *Bio. Pharm. Bull.* 2001 ; **24**: 1324-1328.

Sato A., Nakajima T., Koyama Y. Effect of chronic ethanol consumption on hepatic metabolism in rat liver of some aromatic and chlorinated hydrocarbons in rats. 1980 ; **37**: 382-386.

Sato A., Nakajima T., Koyama Y. Dose-related effects of a single dose of ethanol on the metabolism in rat liver of some aromatic and. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1981 ; **60**: 8-15.

Sayan H., Ozacmak V.H., Ozen O.A., Coskun O., Arslan S.O., Sezen S.C., Aktas R.G. Beneficial effects of melatonin on reperfusion injury in rat sciatic nerve. : *J. Pineal Res.* 2004 ; **37**: 143-148.

Selimoglu E. Aminoglycoside-induced ototoxicity. *Curr. Pharm. Des.* 2007 ; **13**: 119-126.

Sha S.H., Taylor R., Forge A., Schacht J. Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. *Hear. Res.* 2001 ; **155**: 1-8.

Shimada T., Mimura M., Inoue K., Nakamura S., Oda H., Ohmori S., Yamazaki H. Cytochromes P450-dependent drug oxidation activities in liver microsomes of various animal species including rats, guinea pig, dogs, monkeys, and human. *Arch. Toxicol.* 1997 ; **71**: 401-408.

Sliwiska-Kowalska M., Zamyslowska-Szmytke E., Szymczak W., Kotylo P., Fiszler M. Hearing loss among workers exposed to moderate concentrations of solvents. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 2001 ; **27**: 15-24.

Sliwiska-Kowalska M., Zamyslowska-Szmytke E., Szymczak W., Kotylo P., Fiszler M., Wesolowski W., Pawlaczyk-luszczynka M. Ototoxic effects of occupational exposure to styrene and co-exposure to styrene and noise. *J. Occup. Environ. Med.* 2003 ; **45**: 15-24.

Sliwiska-Kowalska M. Exposure to organic solvent mixture and hearing loss: literature overview. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 2007 ; **20**: 309-314.

Smith T., Ikeda Y., Fujii J., Tanigushi N., Meister A. Different sites of acivicin binding and inactivation of gamma-glutamyl transpeptidase. 1995 ; **21**: 15-24.

Song B., Veech R., Park S. Induction of rat hepatic n-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilisation. *J. Biol. Chem.* 1989 ; **264**: 3568-3572.

Spicer S., Schulte B. Evidence for a medial K<sup>+</sup> recycling pathway from inner hair cell. *Hear. Res.* 1998 ; **118**: 1-12.

Stole E., Smith T., Manning J., Meister A. Interaction of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase with Acivicin. *J. Biol. Chem.* 1994 ; **269**: 21435-21439.

Sullivan M., Rarey K., Conolly R. Ototoxicity of toluene in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 1988 ; **10**: 525-530.

Suresh S., Meister T., Meister A. Serine-borate complex as a transition-state inhibitor of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. *Biochem.* 1978 ; **75**: 4806-4809.

Takase S., Matsuda Y., Yasuhara M., Takada A. Effects of malotilate treatment on alcoholic liver disease. *Alcohol.* 1989 ; **6**: 219-222.

Tassaneeyakul W., Birkett D., Edwards J., Veronese M., Turkey R., Minners J. Human cytochromes P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and o-,m-,p-xylene. *J.Pharmacol. Exp. Therapeutics.* 1996 ; **276**: 101-108.

Tsutsumi M., Lasker J., Takahashi T., Lieber. C. In vivo induction of hepatic P450 2E1 by ethanol: Role of increased enzyme synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993 ; **304**: 209-218.

Van Doorn R., Leijdekkers C.M., Bos R.P., Brouns R.M.E, Henderson P.T. Alcohol and sulfate intermediates in the metabolism of toluene and xylenes to mercapturic acids. *Toxicol.* 1981 ; **1**: 236-242.

Vincent R. Inventaire des agents chimiques CMR utilisés en France en 2005. *Cah.Notes Doc.* 2006 ; **205**: 83-95.

Waldron H., Cherry N., Johnson J. The effects of ethanol on blood toluene concentrations. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1983 ; **51**: 365-369.

Wallen M., Nslund P., Nordqvist M. The effect of ethanol on the kinetics of toluene in man. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984 ; **76**: 414-419.

Watanabe H., Yoshida Y., Tanioka Y., Orita Y. The effects of chronic ethanol ingestion on toluene metabolism. *Res. Commun. Subst. Abuse.* 1993 ; **14**: 151-158.

Waxman D., Azaroff L. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem. J.* 1992 ; **281**: 577-592.

Winters D., Cederbaum A. Time course characterization of the induction of cytochrome p-450 2E1 by pyrazole and 4-methylpyrazole. *Biochem. Biophysica Acta.* 1992 ; **1117**: 15-24.

Wrighton S., Stevens J. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* 1992 ; **22**: 1-21.

Yamamoto T., Egashira T., Yoshida T., Kuroiwa Y. Effect of adrenalectomy, pretreatment with SKF 525-A, phenobarbital and diethyl maleate on the acute toxicity of fenitrothion in male rats. *Arch. Toxicol.* 1983 ; **52**: 233-242.

## Résumé :

L'audition du rat, contrairement à celle du cobaye, est vulnérable à une exposition au toluène par inhalation. Le premier objectif de cette thèse était d'étudier l'impact du métabolisme hépatique sur l'ototoxicité du toluène inhalé. Le second objectif était d'améliorer la compréhension des mécanismes de protection développés par le cobaye pour lutter contre une intoxication au toluène. Les voies d'oxydation et de conjugaison impliquées dans le métabolisme du toluène ont été induites par le 5-éthyl-5-phényl-2,4,6 (1H, 3H, 5H)-pyrimidinetrione (phénobarbital) (50 mg/kg : 5 j/sem., 4 sem.), ou déprimées par des inhibiteurs tels que l'acide  $\alpha$ -Amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacétique (acivicine) (5 mg/kg : 2 j/sem., 4 sem.) pour la  $\gamma$ -glutamyltransférase ou le 2,2-diphénylpentanoate de 2-(diéthylamino)-éthyle (SKF 525A) (50 mg/kg : 2 j/sem., 4 sem.) pour les cytochromes P450 (CYP450). Les modifications du métabolisme hépatique ont clairement montré que la concentration sanguine de toluène était le paramètre responsable de l'ototoxicité du solvant, reléguant les dérivés cystéinés au rang de composés inoffensifs pour l'audition. Par ailleurs, le programme d'inhibition des CYP450 a montré qu'il est très difficile d'inhiber simultanément les deux voies de détoxification ; le métabolisme trouve toujours une compensation à l'inhibition de la voie majeure, en l'occurrence la voie d'oxydation. Pour la première fois, une surdité induite par le toluène a pu être provoquée chez le cobaye dont les CYP450 avaient été préalablement déprimés. Les cobayes souffraient d'une perte des fibres spirales plutôt que d'une perte de cellules ciliées. Ces données histologiques témoignent de l'aspect neurotoxique de l'exposition au solvant. Au niveau de l'organe de Corti, la présence de mélanine pourrait également faire écran à l'intoxication au toluène. Enfin chez le cobaye, le glutathion, molécule qui protège contre le stress oxydant, pourrait être un atout majeur contre l'intoxication au solvant.

**Mots clés :** Toluène, induction, inhibition, cochlée, rat, cobaye.

## Abstract :

The hearing of rats, contrary to that of guinea pigs, is vulnerable to toluene exposure by inhalation. The first aim of this thesis was to evaluate the hepatic metabolism impact on toluene-induced ototoxicity. The second aim was to improve the understanding of the protective mechanisms developed by guinea pig to resist toluene intoxication. The oxidative and conjugate pathways involved in toluene metabolism were induced by 5-ethyl-5-phenyl-2,4,6 (1H, 3H, 5H)-pyrimidinetrione (Phenobarbital) (50 mg/kg: 5 d/w., 4 w.), or depressed by inhibitors such as ( $\alpha$  S,5S)- $\alpha$ -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid (acivicin) (5 mg/kg: 2 d/w, 4w.) for the  $\gamma$ -glutamyltransferase and 2-diethylaminoethyl 2,2-diphenylvalerate: (SKF 525A) (50 mg/kg: 2 d/w., 4 w.) for the cytochromes P450 (CYP450). The modifications of the hepatic metabolism clearly showed that the blood concentration of toluene was responsible for the solvent ototoxicity, pushing the cysteine S-conjugates into the background. On the other hand, the inhibition program of the CYP450 showed that the inhibition of both detoxification pathways is very difficult. The metabolism is capable of compensating the inhibition of the major pathway in our experimental context. For the first time, toluene-induced hearing loss was assessed in the guinea pig having depressed CYP450. The guinea pigs suffered from spiral fibre rather than hair cell losses. These histological findings pleaded in favour of neurotoxic effects induced by solvent exposures. Within the organ of Corti, the presence of melanin could also constitute a barrier against toluene intoxication. At last, an antioxidant molecule such as glutathion, which is largely present in cochlea, could play a major role against solvent intoxication.

**Keywords:** Toluene, induction, inhibition, cochlea, rat, guinea pig.