



HAL
open science

Évaluation de l'efficacité des réflexes de protection de l'oreille par la mesure des produits de distorsion acoustiques chez le rat : développement d'un nouvel outil clinique pour l'homme

Cécile Rumeau

► **To cite this version:**

Cécile Rumeau. Évaluation de l'efficacité des réflexes de protection de l'oreille par la mesure des produits de distorsion acoustiques chez le rat : développement d'un nouvel outil clinique pour l'homme. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0091 . tel-01749866

HAL Id: tel-01749866

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749866>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par **Cécile RUMEAU**

*Evaluation de l'efficacité des réflexes
de protection de l'oreille par la mesure des
produits de distorsion acoustiques chez le rat :
développement d'un nouvel outil clinique pour l'homme*

Le 19 avril 2013

Membres du jury :

Rapporteurs :

Thierry MOM
Professeur, INSERM U-1107, Université de Clermont-Ferrand

Jean-Luc PUEL
Professeur, INSERM U-1051, Université Montpellier 2

Examineurs :

Paul AVAN
Professeur, INSERM U-1107, Université de Clermont-Ferrand

Pierre CAMPO
Dr. (HDR) Institut National de Recherche et de Sécurité,
Vandoeuvre-lès-Nancy (Directeur de thèse)

Joël DUCOURNEAU
Maître de Conférence (HDR), Laboratoire d'Energétique et de Mécanique
théorique et appliquée, Université de Lorraine

Cécile PARIETTI-WINKLER
Professeur, EA DevAH, Université de Lorraine (Co-directrice de thèse)

EA DevAH - Développement, Adaptation et Handicap – Université de Lorraine
Adresse de correspondance : Pr Parietti-Winkler,
Service d'ORL et Chirurgie cervico-faciale, CHU-Hôpital central, Nancy

INRS, Département Polluants et Santé
Rue du Morvan, CS 60027, 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex - www.inrs.fr

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier sincèrement les Prs. Jean-Luc PUEL et Thierry MOM, rapporteurs, le Pr. Paul AVAN et le Dr. Joël DUCOURNEAU, examinateurs, qui me font l'honneur de juger cette thèse.

Je tiens ensuite à exprimer ma profonde reconnaissance au Dr. Pierre CAMPO, pour son encadrement dynamique et la confiance qu'il a su m'accorder pendant ces années de Master puis de thèse ; mais aussi pour m'avoir permis de connaître un peu sa « face cachée ».

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude et mon amitié au Pr Cécile PARIETTI-WINKLER, pour son soutien indéfectible et ses « dead-line » salvatrices....

Je remercie les Drs Marie-Thérèse BRONDEAU puis Alain SIMMONARD pour m'avoir ouvert les portes du Département Polluants et Santé, ainsi que la Direction de l'Institut National de Recherche et de Sécurité pour avoir soutenu matériellement et scientifiquement ces recherches.

Un grand merci également à tous ceux qui ont participé à ce travail : Chantal COUR, Aurélie THOMAS, Benoît RIEGER pour tous les moments studieux mais heureux partagés ; Aurélie REMY et Pascal WILD pour leur collaboration statistiquement significative ; et une dédicace toute particulière à Thomas VENET : l'efficacité de l'ingénieur, la pertinence du chercheur et la patience du pédagogue quand il s'agit de rendre accessible certaines notions d'acoustique...

Merci également à Marie-Jo DECRET et tout le personnel de l'animalerie de l'INRS, pour leur professionnalisme et leur bienveillance.

Mes pensées vont bien sûr à ma famille, pour son soutien dans les moments difficiles qui n'ont pas manqué d'émailler mon parcours. Merci tout particulièrement à Eric pour sa compréhension, son efficacité et son amour.

à ma Princesse Noémie avec tout mon amour,

Sommaire

Liste des abréviations.....	7
Liste des unités.....	8
Liste des figures	9
Liste des tableaux.....	13
Introduction générale.....	15
I. Rappels physiologiques.....	19
I.1. Rôle de l'oreille externe et moyenne : fonctions de transfert	19
I.2. Epithélium neuro-sensoriel auditif : l'organe de Corti.....	20
I.3. Physiologie cochléaire.....	22
II. Les réflexes acoustiques	24
II.1. Réflexe d'oreille moyenne	24
II.2. Réflexe d'oreille interne	27
III. Produits de distorsion acoustiques	29
<u><i>Première Partie</i></u>	
<i>Expérimentation animale chez le rat</i>	<i>34</i>
Introduction	35
Matériels et Méthodes	36
I. Animaux.....	36
II. Anesthésie.....	37
III. Mesures des réflexes.....	37
III.1. Enregistrement des produits de distorsion acoustique (PDAs)	37
III.2. Déclenchement du réflexe d'oreille moyenne	39
III.2.1. Stimulation controlatérale	39
III.2.2. Stimulation ipsilatérale.....	40
III.3. Déclenchement du réflexe d'oreille interne.....	40
IV. Chirurgie.....	40
IV.1. Section des muscles de l'oreille moyenne.....	40

IV.2. Implantation du cathéter et injection de solvant.....	41
V. Histologie	42
V.1. Cochléées.....	42
V.2. Etude de traçage de la voie d'intoxication.....	43
VI. Enregistrement des données	44
VII. Statistiques	47
Résultats :	
Réflexe de l'oreille moyenne	48
I. Effets du toluène sur la contraction des muscles de l'oreille moyenne	48
I.1. Stimulation acoustique controlatérale	48
I.2. Stimulation acoustique ipsilatérale.....	51
II. Histologie	54
II. 1. Cochléées	54
II.2. Cerveaux	56
Discussion	
Réflexe de l'oreille moyenne	57
Résultats	
Réflexe de l'oreille interne	65
I. Mesure de l'amplitude du réflexe olivo-cochléaire	65
II. Stimulation CONTRA, injection d'intralipide et muscles IPSI sectionnés	66
III. Stimulation CONTRA, injection de toluène IPSI et muscles IPSI sectionnés ..	67
IV. Stimulation CONTRA, injection de toluène CONTRA et muscles IPSI sectionnés	67
V. Stimulation CONTRA, injection de toluène CONTRA et muscles sectionnés IPSI et CONTRA	67
Discussion	
Réflexe de l'oreille interne	69
Conclusions de la 1^{ère} partie	73

Deuxième Partie

Expérimentation clinique chez l'homme

1^{ère} étude : Développement et validation d'un nouvel outil de mesure adapté à l'homme : l'EchoScan.....	74
Introduction	75
Matériels et Méthodes	79
I. Participants.....	79
II. Mesures EchoScan.....	80
II.1. Enregistrement des produits de distorsion acoustique (PDAs).....	81
II.1.1. Courbes « entrée / sortie » du PDA	81
II.1.2. DPgramme	82
II.2. Enregistrement entrée / sortie du réflexe stapédien	82
III. Analyse statistique.....	83
Résultats	84
I. Mesure des PDAs.....	84
I.1. Entrée / sortie des PDAs vs. âge et sexe	84
I.2. Seuils de PDAs en fonction de la fréquence : le DPgramme	87
I.3. Comparaison du DPgramme avec l'audiométrie tonale liminaire	89
II. Mesure du déclenchement du réflexe stapédien en fonction de l'âge.....	91
III. Seuils du réflexe stapédien mesurés par l'EchoScan vs. impédancemétrie	92
Discussion	94
Conclusion	97
2^{ème} étude : « EchoScan en entreprises » : Comparaison des résultats obtenus chez des sujets témoins et chez des sujets exposés au bruit.....	99
Introduction	100
Matériels et Méthodes	103
I. Protocole d'inclusion des participants.....	103
I.1. Pré-inclusion.....	103
I.2. Inclusion.....	104
I.3. Exclusion.....	105
II. Mesures en entreprises.....	105
II.1. Mesures par EchoScan.....	105

II.2. Quantification de l'exposition au bruit	107
III. Analyse statistique.....	108
Résultats	109
I. Participants.....	109
II. Quantification de l'exposition au bruit.....	111
II.1. Audiométrie tonale.....	111
II.2. Mesures EchoScan	112
II.2.1. Entrée/sortie des PDAs	112
II.2.2. DPgramme	113
II.2.3. Seuils du ROM	114
Discussion	1185
Conclusion générale et perspectives.....	118
Bibliographie.....	121
Annexes.....	129

Liste des abréviations

BS	Bruit stimulant utilisé pour déclencher le ROM
BSi	Bruit stimulant utilisé pour déclencher le ROI
CCE	Cellules ciliées externes
CCI	Cellules ciliées internes
CONTRA	Contra-latérale
DP	Début de poste
FP	Fin de poste
FOCC	Faisceau olivo-cochléaire croisé
FOCD	Faisceau olivo-cochléaire direct
I	<i>Inputs</i> , définissant les signaux des voies afférentes
<i>i.p.</i>	intrapéritonéale
IPSI	ipsi-latérale
Leq dB(A)	niveau de bruit continu équivalent mesuré en dB(A)
Leq _(-1h) dB(A)	niveau de bruit continu équivalent mesuré la dernière heure
L _{EX,d} dB(A)	Leq calculé sur 8 heures
Lex,8h	niveau d'un bruit continu de 8 heures équivalent à une exposition sonore quotidienne
O	<i>Outputs</i> , définissant les signaux des voies efférentes
OC	Olivo-cochléaire
Pc	Pression acoustique de crête
PA	Potentiels d'actions
PDA	Produit de distorsion acoustique
PTA	Audiométrie tonale liminaire (<i>Pure-tone audiometry</i>)
R1S	1 ^{er} seuil de ROM significatif
RCS	valeur de seuil de ROM à partir duquel tous les déclenchements sont significatifs (courbe « entrée / sortie » du ROM)
ROI	Réflexe de l'oreille interne
ROM	Réflexe de l'oreille moyenne
VLEP	Valeur limite d'exposition professionnelle
<i>vs.</i>	versus

Liste des unités

kg	kilogramme
g	gramme
mg	milligramme
mm	millimètre
mL	millilitre
µL	microlitre
M	molaire
mM	millimolaire
µmol	micromole
ppm	partie par million
s	seconde
ms	milliseconde
°C	degré Celsius
Hz	Hertz
kHz	kilohertz
dB	décibel
dB(A)	décibel pondéré A
dB(C)	décibel pondéré C
dB SPL	décibel Sound Pressure Level

Liste des figures

- Figure 1-**----- p 21
Représentation en coupe de cochlée, position de l'organe de Corti entre les rampes cochléaires.
D'après Campo, 1992.
- Figure 2-**----- p 21
Organe de Corti. SV : *Rampe vestibulaire*, ST : *Rampe tympanique*, RM : *Membrane de Reissner*, SM : *Rampe médiane*, TM : *Membrane tectoriale*, St.V : *Strie vasculaire*, Sp.L : *Ligament spiral*, SP : *Proéminence spirale*, BM : *Membrane basilaire*, C : *Cellules de Claudius*, H : *Cellules de Hensen*, D : *Cellules de Deiters*, OP et IP : *Piliers de Corti*, OHC : *CCE*, IHC : *CCI*.
D'après Slepecky, dans « The Cochlea », 1996, p 46.
- Figure 3-**----- p 23
Amplificateur cochléaire : sélectivité en fréquence de l'organe de Corti.
Schéma réalisé par P. Campo (INRS)
- Figure 4-**----- p 25
Voies du réflexe stapédien
Voies afférentes, lignes rouge et voies efférentes, lignes bleues
NC_V et NC_D, noyau cochléaire ventral et dorsal respectivement
SOC, Complexe olivaire supérieur
VII, noyau du nerf facial
Schéma réalisé par A. THOMAS (INRS)
- Figure 5-**----- p 27
Schéma illustrant le principe de fonctionnement d'un impédancemètre.
HP : Haut-parleur
D'après EMC [20-175-A-10]
- Figure 6-**----- p 29
Voies du réflexe olivo-cochléaire. Voies afférentes, lignes rouge et voies efférentes, lignes bleues. NC_V et NC_D, noyau cochléaire ventral et dorsal respectivement. SOC, complexe olivaire supérieur. VII, noyau du nerf facial. FOCC, fibres olivo-cochléaire croisées. FOCD, fibres olivo-cochléaires directes. Schéma réalisé par A. THOMAS (INRS)
- Figure 7-**----- p 33
Schéma résumant les sources et mécanismes de génération du PDA cubique.
D'après Brown et al. (1996).

Figure 8------ p 39

Schéma de l'étude. Les tests auditifs étaient réalisés en mesurant le PDA cubique $2f_1-f_2$. Primaires $f_1 = 8000$ Hz à 65 dB SPL et $f_2 = 9600$ Hz à 60 dB SPL ; $f_1/f_2 = 1,2$. La stimulation controlatérale était un bruit de bande de 800 Hz centré sur 4 kHz, la stimulation ipsilatérale était un son pur de 3,5 kHz.

Figure 9------ p 42

Photographie du cathéter utilisé pour l'injection intracarotidienne du bolus contenant le véhicule (inralipide) +/- le toluène (58 ou 116 mM). Les deux extrémités sont insérées dans le même abord carotidien, rendant le cathéter « circulaire ». L'injection est réalisée par la seringue en dérivation sans interrompre le flux sanguin.

Figure 10------ p 46

Diminution de l'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ provoquée par les réflexes de protection. Trait bleu épais : ROI. Trait noir fin : ROM.

Chaque bruit supprimeur durait 2,5 s.

Axe primaire des ordonnées (axe gauche) : amplitude du PDA en dB SPL.

Axe secondaire (axe droit) : amplitude de la variation du PDA induite par la stimulation.

Cercles blancs : PDA mesuré sur 500 ms sans bruit supprimeur. Cercles noirs : Moyenne de 18 PDAs mesurés sans bruit supprimeur.

Triangles blancs : PDA mesuré sur 500 ms pendant l'émission d'un bruit supprimeur stimulant le ROM. Triangles noirs : moyenne de quatre mesures de PDA réalisées pendant l'émission d'un bruit supprimeur.

Croix : Mesures de PDAs exclues du calcul.

Les carrés gris correspondent à l'amplitude du réflexe pour chaque série de mesure: différence entre la moyenne des valeurs des deux cercles noirs (pré et post BS) et du triangle noir.

Figure 11------ p 50

Variations de l'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ et efficacité du réflexe de l'oreille moyenne avant, pendant et après une injection de (A) 0 mM, (B) 58 mM, (C) 116 mM de toluène. Un bolus de 266 μ L de véhicule contenant le toluène à la concentration appropriée était injecté pendant 80 s (triangles gris). Les primaires étaient délivrés dans l'oreille ipsilatérale : $f_1 = 8000$ Hz et $f_2 = 9600$ Hz à $L_1 = 65$ dB SPL et $L_2 = 60$ dB SPL respectivement. $f_1/f_2 = 1,2$. Le bruit supprimeur controlatéral était un bruit de bande de 800 Hz centré sur 4 kHz et émis à 100 dB SPL. Composante N : diminution de l'énergie acoustique pénétrant la cochlée. Composante P : augmentation de l'énergie acoustique pénétrant la cochlée. Chaque courbe correspondant à un animal représentatif du groupe (n = 5).

Figure 12- ----- p 52

Variations de l'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ et efficacité du réflexe de l'oreille moyenne avant, pendant et après une injection de (A) 0 mM, (B) 58 mM, (C) 116 mM de toluène. Un bolus de 266 μ L de véhicule contenant le toluène à la concentration appropriée était injecté pendant 80 s (triangles gris). Les primaires étaient délivrés dans l'oreille ipsilatérale : $f_1 = 8000$ Hz et $f_2 = 9600$ Hz à $L_1 = 65$ dB SPL et $L_2 = 60$ dB SPL respectivement. $f_1/f_2 = 1,2$. Le bruit supprimeur controlatéral était un son pur à 3,5 kHz et émis à 75 dB SPL. Composante P : augmentation de l'énergie acoustique pénétrant la cochlée. Composante N : diminution de l'énergie acoustique pénétrant la cochlée. Courbe correspondant à un animal représentatif du groupe (n = 5).

Figure 13- ----- p 55

Photographies de microscopie optique à faible grossissement ($G \times 35$, A et B) et à fort grossissement ($G \times 300$, C-H) montrant des cochlées gauche après injection d'un bolus de 266 μ L d'intralipide seul (contrôles = CTRL, vues A et C-E) ou contenant du toluène à 116 mM (TOL, vues B et F-H). Les CCEs sont colorées au NBT monosodique pour évaluer l'activité SDH.

Figure 14- ----- p 56

Photographies de vues macroscopiques et de microscopie optique montrant le chemin emprunté par un traceur (OSO_4) injecté via le tronc commun carotidien. (A) vue ventrale montrant l'artère basilaire, les artères pontiques et le cercle de Willis. (B) Vue dorsale montrant la distribution relative du traceur entre côté IPSI et CONTRA du cerveau. (C, D) Sections transversales du tronc cérébral de deux rats différents montrant le tissu atteint par l'agent toxique injecté via l'artère carotide IPSI. VII, nerf facial.

Figure 15- ----- p 60

Schéma général du parcours des fibres afférentes (en rouge) et efférentes (en bleu) impliquées dans le réflexe stapédien chez le rat. VII, noyau moteur du nerf facial.

(A) Stimulation acoustique contralatérale.

(B) Stimulation acoustique ipsilatérale.

I [Inputs], signaux afférents, arbitrairement côtés de 2 (bruit de fond) à 12 (stimulation acoustique controlatérale émise à 100 dB SPL).

O [Outputs], signaux des voies efférentes déclenchant la contraction des muscles de l'oreille moyenne en condition physiologique.

Figure 16- ----- p 64

Architecture fonctionnelle des circuits neuronaux impliqués dans le réflexe de l'oreille moyenne déduite des données toxicologiques obtenues. I [inputs] signaux afférents, arbitrairement côtés de 2, pour le bruit de fond, à 12, pour la stimulation acoustique controlatérale émise à 100 dB SPL. O [outputs], signal efférent déclenchant la contraction des muscles de l'oreille moyenne. Les nuages bleus masquent les régions contaminées par le toluène.

Figure 17- ----- p 68

Variations de l'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ et efficacité du réflexe de l'oreille interne avant, pendant et après une injection d'un bolus de 266 μ L de véhicule contenant (A) 0 mM (B, C, D) 116 mM de toluène pendant 80 s (triangles gris). Les primaires étaient délivrés dans l'oreille ipsilatérale (IPSI) : $f_1 = 8000$ Hz et $f_2 = 9600$ Hz à $L_1 = 65$ dB SPL et $L_2 = 60$ dB SPL respectivement. $f_1/f_2 = 1,2$. Le bruit supprimeur (BSi) était un bruit de bande de 800 Hz centrée sur 4 kHz et émis à 100 dB SPL du côté controlatéral (CONTRA). Dans tous les cas les muscles *tensor tympani* et stapédien étaient sectionnés côté IPSI. Chaque courbe correspondant à un animal représentatif du groupe. (A) $n = 4$; (B) $n = 4$; (C) $n = 4$; (D) $n = 3$.

Figure 18- ----- p 71

Schéma général du parcours des fibres afférentes (en rouge) et efférentes (en bleu) impliquées dans le réflexe de l'oreille moyenne et le réflexe olivo-cochléaire chez le rat. VII, noyau moteur du nerf facial. NC_D et NC_V , noyaux cochléaires dorsal et ventral. SOC, Complexe olivaire supérieur. FOCC, Faisceau olivo-cochléaire croisé. FOCD, Faisceau olivo-cochléaire direct.

Figure 19- ----- p 77

Présentation du dispositif EchoScan

Figure 20- ----- p 85

Amplitude des PDAs en fonction de l'intensité de la primaire f_1 chez le sujet n°7.

A : l'aire grisée correspond à la zone de croissance linéaire

B : une diminution de l'intensité de f_1 entraîne une diminution de l'amplitude des PDAs

Les fréquences présentées en légende correspondent à f_2

Figure 21- ----- p 93

Comparaison des seuils de déclenchement du réflexe stapédien mesurés par EchoScan et par impédancemétrie.

La diagonale rouge représente les valeurs pour lesquelles la sensibilité de détection des deux tests serait identique.

Figure 22- ----- p 111

Différence FP-DP des seuils moyens mesurés en audiométrie tonale pour chaque fréquence testée.

Les barres représentent l'erreur standard.

Les différences inter-groupes sont significatives à 4000 Hz ($p < 0,01$).

Figure 23- ----- p 113

Différence (FP-DP) d'amplitude du PDA cubique en fonction de la fréquence f_2 .

Les barres représentent l'erreur standard.

Les différences inter-groupes étaient significatives pour $f_2 = 1008, 3600$ et 6528 Hz ($p < 0,05$).

Liste des tableaux

Tableau 1- -----	p 53
Effet de la concentration de toluène sur l'amplitude des composantes N/P obtenues avec une stimulation controlatérale	
Tableau 2- -----	p 53
Effet de la concentration de toluène sur l'amplitude des composantes N/P obtenues avec une stimulation ipsilatérale	
Tableau 3- -----	p 66
Amplitude de variations du PDA $2f_1-f_2$ en fonction de l'intensité du bruit supprimeur délivré dans l'oreille controlatérale. Bruit de bande centrée sur 4 kHz ; durée des bouffées de bruit ou « bursts » : 2,5 s.	
Tableau 4- -----	p 79
Distribution de la population étudiée en classes d'âge et de sexe	
Tableau 5- -----	p 86
Analyse statistique de la mesure des PDAs en fonction de l'âge et du sexe. « Intercept » correspond à la valeur prédictive pour un homme âgé de 20 ans calculée par le modèle mixte à effet aléatoire. « * » résultat significatif $p < 0,05$ « ** » résultat significatif $p < 0,01$ « *** » résultat significatif $p < 0,001$	
Tableau 6- -----	p 88
Analyse statistique de l'amplitude du DPgramme en fonction de l'âge et du sexe. L'« intercept » correspond à la valeur prédictive calculée par le modèle mixte à effet aléatoire pour un homme âgé de 20 ans. « * » résultat significatif $p < 0,05$ « ** » résultat significatif $p < 0,01$ « *** » résultat significatif $p < 0,001$	
Tableau 7- -----	p 90
Valeurs d'audiométrie tonale (PTA) et de DPgramme en fonction de la fréquence. Les données grisées représentent les réglages différents utilisés pour l'audiométrie tonale liminaire et pour la mesure des DPgrammes, obtenus avec l'EchoScan.	
Tableau 8- -----	p 90
Coefficients de corrélation entre les valeurs de l'audiométrie tonale (PTA) et les valeurs du DPgramme. En grisé : corrélation significative ($R = \text{coefficient de corrélation} \geq 0,14$)	

Tableau 9- ----- p 91
Seuils de déclenchement du réflexe stapédien par EchoScan en fonction de l'âge.

Tableau 10- ----- p 110
Participants exposés au bruit.
Leq dB(A) : niveau de bruit continu équivalent mesuré en utilisant la pondération A
L_{EX,d} dB(A) : Leq calculé sur 8 heures
Leq (-1h) dB(A) : niveau de bruit continu équivalent mesuré la dernière heure

Tableau 11- ----- p 112
Différences (FP-DP) des PDAs, en dB, entre exposés et témoins par niveaux de primaires (L1) pour chaque couple de primaires testés en procédure « entrée / sortie ».
NS = Non Significatif
* p < 0,05

Tableau 12- ----- p 114
Différences de seuils du ROM entre fin de poste et début de poste en fonction de l'exposition, par fréquence de bruit stimulant.
NS = Non significatif
N = nombre de valeurs = nombre de sujets
** p < 0,01
*** p < 0,001

Introduction générale

S'il est bien connu que le bruit est un facteur néfaste pour l'audition, la prise en compte de facteurs additifs ou synergiques, qu'ils soient endogènes (facteurs génétiques, état de santé, vieillissement) ou exogènes (multi-expositions) est une préoccupation récente (Lataye et al., 2000 ; Prasher et al. 2002 ; Fechter et al., 2002 ; Campo et al. 2011). Le bruit est reconnu comme responsable de maladies professionnelles depuis 1973, selon les critères décrits dans le tableau n°42 du régime général de la Caisse Nationale d'Assurance Maladie (CNAM). Cependant, en milieu professionnel, il peut s'associer à des agents chimiques ototoxiques et/ou neurotoxiques, comme certains solvants aromatiques.

Le toluène, le styrène, les xylènes, ou encore l'éthylbenzène sont en effet très répandus en milieu industriel, que ce soit comme matières premières dans la fabrication de produits pétroliers et de résines, ou dans les activités utilisant les colles, peintures ou dégraissants (Vincent, 2006). Le risque lié aux expositions de solvants aromatiques a été pris en compte par le législateur qui a fixé des valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP) aux agents chimiques celles-ci étant calculées par rapport à la durée d'un poste de travail de huit heures. Chaque pays fixe ses propres VLEP pour chaque agent chimique, en s'appuyant sur des rapports d'expertise synthétisant les données toxicologiques ou épidémiologiques puisées dans la littérature. Par exemple, en France, le ministère chargé du Travail, de l'Emploi et de la Santé a fixé, en 2007 (Décret 2007-1539), les VLEPs du toluène et du styrène à 50 ppm (partie par million), alors que les USA ont retenu une VLEP de 20 ppm. Cependant, la réglementation ne tient pas compte des effets des solvants aromatiques sur l'appareil auditif, les effets pharmacologiques et l'atteinte auditive n'étant pas mentionnés dans le tableau n°84 du régime général de la CNAM. Seule la directive s'appliquant au bruit (Directive « Bruit »

2003/10/CE du Parlement européen) rappelle que lors de l'évaluation des risques, l'employeur doit, « dans la mesure où cela est réalisable sur le plan technique, relever toute incidence sur la santé et la sécurité des travailleurs résultant d'interactions entre le bruit et des substances ototoxiques d'origine professionnelle, et entre le bruit et les vibrations ».

Ces solvants organiques aromatiques sont des composés volatils qui pénètrent dans l'organisme principalement par voie pulmonaire et, dans une moindre mesure, par voie transcutanée. Les effets ototoxiques des solvants aromatiques sont à présent bien documentés, aussi bien par des études expérimentales chez le rat (Pryor et al., 1987 ; Yano et al., 1992 ; Rebert et al., 1993 ; Crofton et al., 1994 ; Mäkitie et al. 2002 ; Morata et Campo 2002), que par des enquêtes épidémiologiques chez l'homme au travail (pour revue, voir Johnson et Nylén, 1995).

De par leur caractère lipophile, les solvants aromatiques s'accumulent dans les tissus riches en lipides, dont le tissu nerveux et exercent par là-même des effets neurotoxiques. Cette toxicité a été documentée dès 1983 par l'observation de l'effet de doses fortes, lors de leur usage détourné par les toxicomanes (Ehyai et Freemon, 1983 ; Fornazzari et al., 1983 ; Lazar et Ho, 1983). De nombreuses études ont par la suite confirmé ces effets neurotoxiques à la fois sur le système nerveux central (SNC) et sur le système nerveux périphérique (voir Arlien-Søborg et al. 1992 pour revue). C'est par le biais de l'expérimentation animale que les mécanismes pharmacologiques des solvants aromatiques sont explorés. La grande majorité des études ont d'ailleurs été réalisées chez le rat qui, contrairement au cobaye (Fechter 1993 ; Campo et al. 2005 ; Waniusiow et al. 2009) et au chinchilla (Davis et al. 2002), possède un métabolisme des solvants aromatiques proche de celui de l'homme (Kishi et al., 1988 ; Nakajima et al., 1993 ; Nakajima et Wang, 1994).

Enfin, les solvants aromatiques et le bruit ont un effet synergique sur l'audition (Morioka et al. 2000 ; Morata et Little 2002 ; Prasher et al. 2002 ; Sliwińska-Kowalska et al. 2003). Cette synergie pourrait s'expliquer en partie par l'action neuropharmacologique des solvants aromatiques sur les centres impliqués dans les réflexes de protection acoustiques (Campo et al., 2007 ; Maguin et al., 2009 ; Rumeau et al., 2011). En effet, il existe au niveau des centres nerveux deux boucles réflexes de protection acoustique : le réflexe de l'oreille moyenne (ROM), assimilé chez l'homme au réflexe stapédien, et le réflexe de l'oreille interne (ROI), également appelé réflexe olivo-cochléaire. Des expérimentations menées chez le rat ont établi que le toluène pouvait agir comme un antagoniste des récepteurs à l'acétylcholine (Lataye et al., 2007) et plus spécifiquement comme un bloqueur des canaux calciques voltage-dépendant (Maguin et al., 2009). De part ces effets, le toluène pourrait en particulier perturber les voies impliquées dans le réflexe de l'oreille moyenne et indirectement influencer les effets du bruit sur la cochlée.

Outre l'intérêt fondamental de démontrer l'implication des voies centrales dans la synergie des effets du bruit et des solvants sur l'audition, ces travaux ont mis en lumière la pertinence du ROM pour appréhender les effets pharmacologiques de substances chimiques. En effet, l'état de fonctionnement de l'arc réflexe renseigne sur l'état de fonctionnement du capteur auditif périphérique (oreille interne), des voies afférentes et efférentes et de l'effecteur musculaire. Cependant, la méthode utilisée précédemment au laboratoire était basée sur des techniques électrophysiologiques faisant appel à la mesure du potentiel microphonique cochléaire (PMC) (Lataye et al., 2007). Ces techniques invasives sont non utilisables pour des études longitudinales chez l'animal et sont difficiles à mettre en œuvre chez l'homme. C'est cette impasse technique qui a été à l'origine des travaux présentés dans ce mémoire.

Cette thèse présente un travail transversal s'articulant sur deux phases expérimentales. La première phase avait pour objectif principal de valider, chez le rat, par des mesures non invasives, les résultats précédemment obtenus au laboratoire avec le PMC (Lataye et al., 2007). Pour cela, les produits de distorsions acoustiques (PDAs) ont été utilisés comme outil audiométrique, car plus à même d'être adaptés chez l'homme. Au-delà de la confirmation des résultats obtenus sur le ROM, les effets du toluène sur le ROI ont été étudiés pour développer, à partir des résultats expérimentaux, un modèle de fonctionnement des voies réflexe elles-mêmes (Campo et al., 2007 ; Rumeau et al., 2011 ; Venet et al., 2011). L'aboutissement de cette première partie a été la mise au point d'un dispositif de mesure utilisable chez l'homme, basé sur l'enregistrement combiné des PDAs et du ROM, baptisé EchoScan.

La deuxième phase expérimentale rapporte l'adaptation et l'utilisation du dispositif EchoScan chez l'homme, pour la mesure combinée du fonctionnement cochléaire (PDAs) et du réflexe stapédien (ROM). Une première étude clinique a permis d'optimiser les paramètres d'utilisation du prototype et d'en éprouver l'innocuité (Venet et al., 2012). Une deuxième investigation, menée en entreprises sur des salariés volontaires, a permis de tester les performances du prototype EchoScan pour objectiver les effets d'une exposition au bruit au cours d'une journée de travail. Des mesures en entreprises se poursuivent au-delà de ce travail pour étudier les effets d'une exposition à des solvants aromatiques et d'expositions combinées au bruit et à des solvants.

Quelques rappels sur l'anatomie et la physiologie cochléaire ainsi que sur les produits de distorsion acoustiques viendront en introduction éclairer notre propos.

I.Rappels physiologiques

I.1.Rôle de l'oreille externe et moyenne : fonctions de transfert

Le terme d'appareil auditif désigne l'ensemble des structures impliquées dans le traitement du message auditif, du pavillon auriculaire aux aires auditives corticales. Les variations de pression des couches d'air qui constituent le signal sonore sont captées par l'oreille externe et conduites via le canal auditif externe jusqu'à la membrane tympanique, qui les transforme en vibrations mécaniques. Ces vibrations traversent alors l'oreille moyenne par l'intermédiaire de la chaîne ossiculaire, qui joue le rôle d'adaptateur d'impédance entre le milieu aérien et les liquides contenus dans l'oreille interne, encore appelés fluides endolabyrinthiques.

Le contenu de la stimulation acoustique est modifié par l'oreille externe et par l'oreille moyenne, qui filtrent et amplifient certaines fréquences. Le concept de « fonction de transfert » permet d'établir une relation intensité/fréquence entre le signal acoustique émis en champ libre et celui qu'il devient à la suite des transformations exercées d'une part, par l'oreille externe, et d'autre part, par l'oreille moyenne. C'est la somme des fonctions de transfert de l'oreille externe et de l'oreille moyenne qui détermine la sensibilité en fréquence de l'oreille interne, et donc sa susceptibilité au bruit. Chez l'homme, les fréquences autour de 4000 Hz sont les plus amplifiées par les oreilles externe et moyenne. Ceci explique la fameuse « encoche » à 4000 Hz, appelée scotome auditif, typique d'une surexposition au bruit.

I.2.Epithélium neuro-sensoriel auditif : l'organe de Corti

L'organe de Corti repose sur la membrane basilaire qui s'enroule autour du modiolus de la cochlée (Figure 1). Il est constitué de plusieurs types cellulaires se partageant entre les cellules de soutien (cellules de Hensen, cellules de Deiters, piliers de Corti...) et les cellules sensorielles (Figure 2). Il existe deux populations de cellules sensorielles :

- les cellules ciliées internes (CCI) sont les véritables transducteurs neurosensoriels. Elles sont connectées aux fibres de type I (système afférent radial) qui représentent 95 % des fibres afférentes du nerf auditif et dont le neurotransmetteur est le glutamate. Ces fibres myélinisées véhiculent le message auditif jusqu'aux noyaux cochléaires.
- les cellules ciliées externes (CCE), disposées sur trois rangées (CCE1, CCE2, CCE3), participent au conditionnement de l'énergie vibratoire transmise aux CCI. Elles reçoivent surtout une innervation efférente par le système médian, dont le neurotransmetteur est l'acétylcholine.

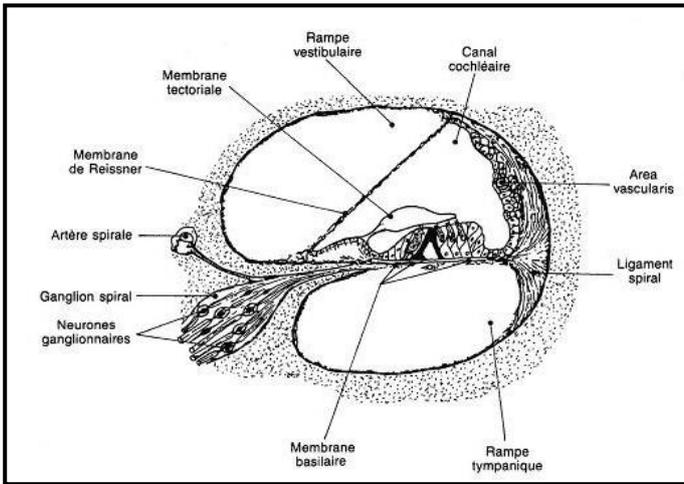


Figure 1-
Représentation en coupe de
cochlée, position de
l'organe de Corti entre les
rampes cochléaires.
D'après Campo, 1992.

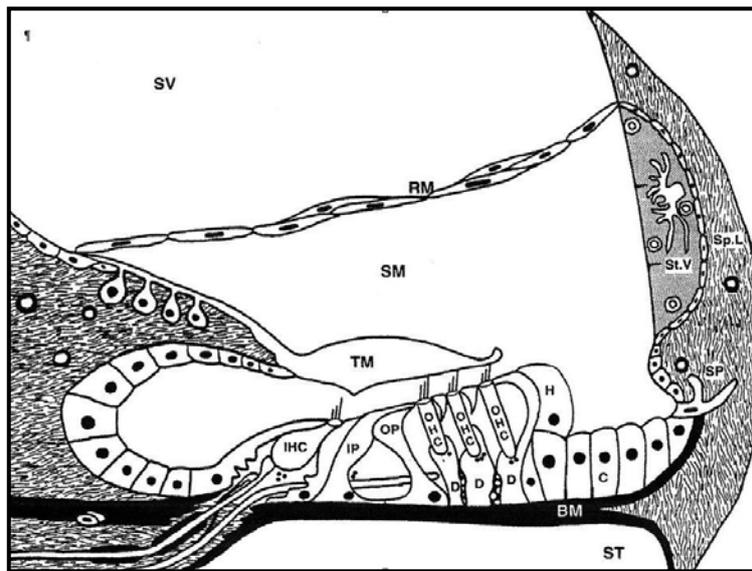


Figure 2-

Organe de Corti. SV : Rampe vestibulaire, ST : Rampe tympanique, RM : Membrane de Reissner, SM : Rampe médiane, TM : Membrane tectoria, St.V : Strie vasculaire, Sp.L : Ligament spiral, SP : Proéminence spirale, BM : Membrane basilaire, C : Cellules de Claudius, H : Cellules de Hensen, D : Cellules de Deiters, OP et IP : Piliers de Corti, OHC : CCE, IHC : CCI.

D'après Slepecky, dans « The Cochlea », 1996, p 46.

I.3. Physiologie cochléaire

L'énergie vibratoire transmise à la rampe vestibulaire par la platine du *stapes* provoque une pression différentielle entre les liquides des deux rampes et met en mouvement la membrane basilaire. L'onde passive ainsi générée se disperse alors de la base vers l'apex de la cochlée. L'emplacement du pic d'amplitude maximale de cette onde propagée dépend de la fréquence caractéristique (FC) de la stimulation acoustique : par exemple, les hautes fréquences, dont l'énergie est rapidement absorbée, génèrent une onde dont l'amplitude est maximale à la base de la cochlée. Ainsi, l'emplacement du pic d'amplitude de l'onde de Bekesy (Bekesy, 1960), permet une discrimination spatiale en fréquence le long de la membrane basilaire, qui supporte l'organe de Corti. Cependant cette mécanique cochléaire passive est insuffisante pour expliquer la discrimination fine, en fréquence, réalisée par l'organe de Corti. D'autres mécanismes interviennent dans lesquels les CCE jouent un rôle majeur.

Les CCE sont solidaires des mouvements de la membrane basilaire par l'intermédiaire de leurs cellules de soutien, les cellules de Deiters. Or les CCE sont également fixées à une membrane inerte (la membrane tectoriale), par leurs stéréocils les plus longs. Elles assurent ainsi le couplage micro-mécanique entre membrane basilaire et membrane tectoriale. Le mouvement relatif de l'ensemble [membrane basilaire - cellules de soutien - CCE] par rapport à la membrane tectoriale inerte crée des mouvements de cisaillement au niveau des stéréocils des CCE. L'inclinaison des stéréocils déclenche l'ouverture de canaux potassiques, et donc un afflux massif de potassium, présent à forte concentration dans l'endolymphe, vers le milieu intracellulaire, en raison du gradient de concentration ionique, et du gradient électrique existant entre la rampe cochléaire (+80 mV) et le milieu intracellulaire des cellules neurosensorielles (-60mV). L'entrée de potassium dans les CCE entraîne une modification du potentiel membranaire le long de la membrane plasmique étroitement liée au réticulum

endoplasmique. Cette dépolarisation membranaire est à l'origine de l'activation de protéines contractiles (prestine) par un effet piézo-électrique, conduisant à une succession de contractions rapides des CCE qui amplifient les phénomènes vibratoires locaux (pour revue: Guinan et al., 2012).

L'électromotilité des CCE permet une amplification sélective du mouvement vibratoire de la membrane basilaire (Figure 3), surtout pour les fréquences proches de la fréquence caractéristique (fréquence de stimulation acoustique pour laquelle la réponse d'une fibre afférente est maximale). Cette augmentation locale de l'amplitude des mouvements vibratoires permet l'inclinaison suffisante des stéréocils de la CCI correspondante. A son tour, la CCI se dépolarise sous l'effet d'un afflux de potassium, ce qui provoque la libération de Ca^{2+} intracellulaire, initiant alors l'étape de transduction neuro-sensorielle.

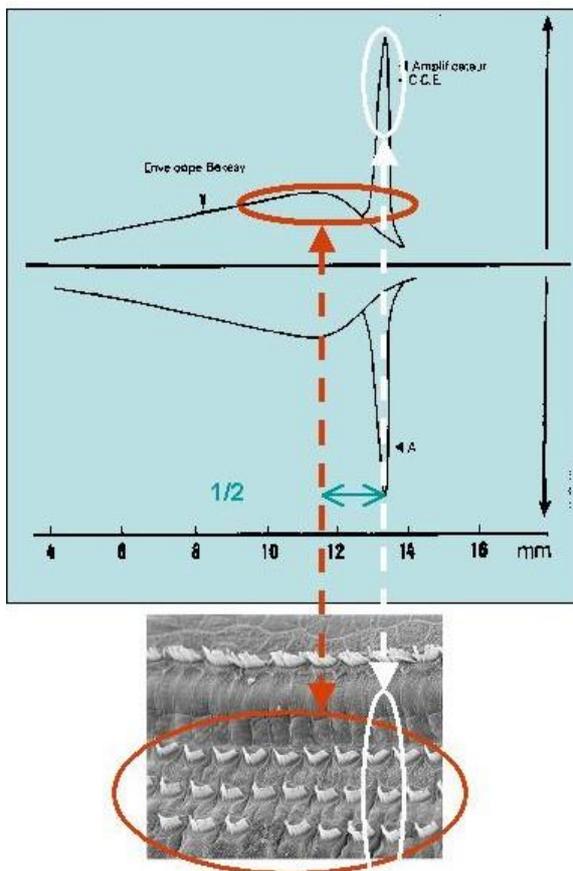


Figure 3-
Amplificateur cochléaire :
sélectivité en fréquence de
l'organe de Corti.
Schéma réalisé par P. Campo
(INRS)

La libération de Ca^{2+} au sein des CCI provoque l'exocytose de vésicules contenant du glutamate dans la fente synaptique. La libération de ce neurotransmetteur exciteur rapide déclenche sur le versant post-synaptique des trains de potentiels d'actions constituant l'influx nerveux afférent. Celui-ci transite alors par le neurone auditif afférent de la huitième paire crânienne jusqu'aux structures auditives centrales.

II. Les réflexes acoustiques

Il existe deux voies de rétrocontrôle efférent agissant sur le système auditif périphérique : le réflexe d'oreille moyenne, et le réflexe d'oreille interne (ou réflexe olivo-cochléaire). Ces deux réflexes sont déclenchés par une stimulation acoustique ipsi et/ou controlatérale. Ils ont des effets de protection cochléaire et améliorent le traitement du signal acoustique en permettant en particulier de lutter contre le masquage sonore dans les ambiances bruyantes (Lee et al., 2006).

II.1. Réflexe d'oreille moyenne

L'oreille moyenne contient deux muscles : le muscle *tensor tympani*, qui s'insère à la partie antérieure et supérieure du manche du *malleus*, et le muscle stapédien, inséré en arrière du col du *stapes*. Chez l'homme, le ROM est habituellement assimilé au réflexe stapédien dont la physiologie et les implications cliniques sont bien connues. La contraction du muscle stapédien s'oppose au mouvement de piston du *stapes*. Il rigidifie ainsi la chaîne tympano-ossiculaire, limitant l'enfoncement de la platine dans la fenêtre ovale, et donc l'énergie vibratoire transmise à la cochlée. Le degré d'atténuation dépend de la fréquence. Chez l'homme, le ROM est plus efficace dans les basses fréquences ; l'atténuation étant maximale

autour de 1 kHz (Lieberman et Guinan, 1998). Il agit donc pour optimiser le décodage du signal dans le bruit de fond (démasquage).

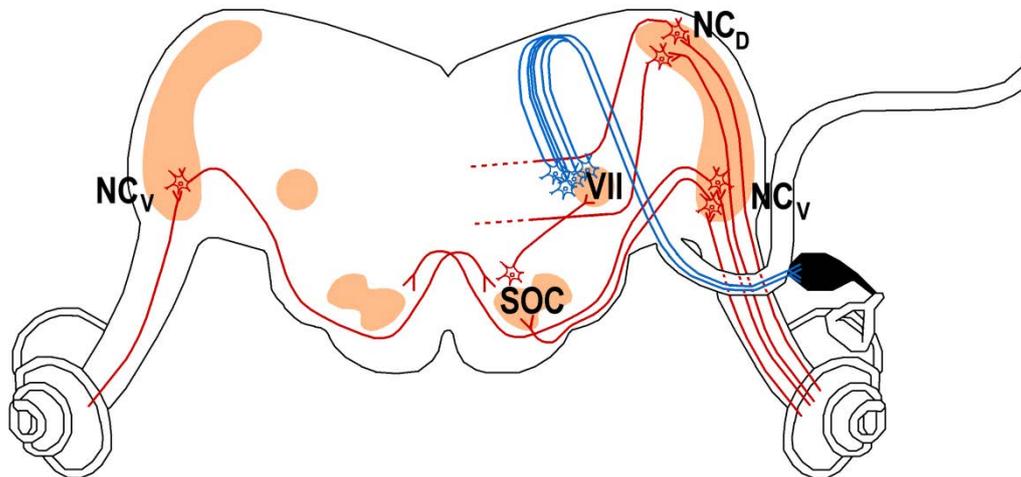


Figure 4-

Voies du réflexe stapédien

Voies afférentes, lignes rouge et voies efférentes, lignes bleues

NC_v et NC_d, noyau cochléaire ventral et dorsal respectivement

SOC, Complexe olivaire supérieur

VII, noyau du nerf facial

Schéma réalisé par A. THOMAS (INRS)

La voie afférente du ROM emprunte les neurones auditifs primaires puis les noyaux cochléaires. La voie efférente emprunte les motoneurones innervant le muscle stapédien, qui prennent leur origine autour du noyau moteur du nerf facial ipsilatéral (VII^{ème} paire crânienne). Les connexions entre voies afférente et efférente du ROM s'effectuent de manière directe mais également croisée, via des inter-neurones connectant le complexe olivaire supérieur (Lee et al. 2006) (Figure 4). Le ROM se déclenche donc de manière bilatérale, en réponse à une stimulation acoustique ipsi et/ou controlatérale. Il est probable qu'il existe

également des connexions descendantes sur cet arc réflexe, certaines personnes étant capables de le déclencher volontairement (Burns et al., 1993).

La mesure du seuil du réflexe stapédien chez l'homme est réalisée en routine par le test de Metz, avec un impédancemètre (Figure 5). La sonde d'impédancemétrie comprend trois canaux. Le premier canal est relié à un haut-parleur qui émet en continu un son-test de fréquence fixe, généralement de 220 Hz, dénommé « tonale de la sonde » dont le niveau mesuré en temps réel renseigne sur l'impédance tympano-ossiculaire. Le deuxième canal est relié à un microphone qui mesure le niveau sonore total dans le méat acoustique externe. Le troisième canal est relié à une pompe permettant de faire varier la pression statique de l'air dans le méat acoustique externe entre -400 et +400 mm d'eau. Les modifications d'impédance tympano-ossiculaire induites par le déclenchement du ROM peuvent être mesurées bilatéralement. En cas d'utilisation d'un stimulus acoustique controlatéral, un écouteur standard d'audiométrie est utilisé pour le son supprimeur. Le seuil du réflexe stapédien est défini comme l'intensité sonore la plus basse donnant lieu à un changement mesurable d'impédance, dont l'évolution temporelle est parallèle à celle du son supprimeur. L'analyse des valeurs de seuil est actuellement automatisée mais reste sujette à correction subjective de l'investigateur en fonction de l'aspect visuel des courbes. Par défaut, le pas d'incrémentation du son supprimeur est de 5 dB. Les seuils moyens controlatéraux obtenus avec cet appareil chez un sujet adulte normo entendant dépendent fortement du contenu spectral du stimulus. Pour des sons purs de fréquences [de 500 à 2 000 Hz], les seuils sont compris entre 85 et 100 dB HL. Pour un bruit de large bande, il est estimé à 75 dB SPL (Gelfand, 1984). Cependant l'impédancemètre ne détecte pas les contractions légères des muscles de l'oreille et surestime probablement le seuil du ROM (Feeney et Keefe, 2001 ; Guinan et al., 2003).

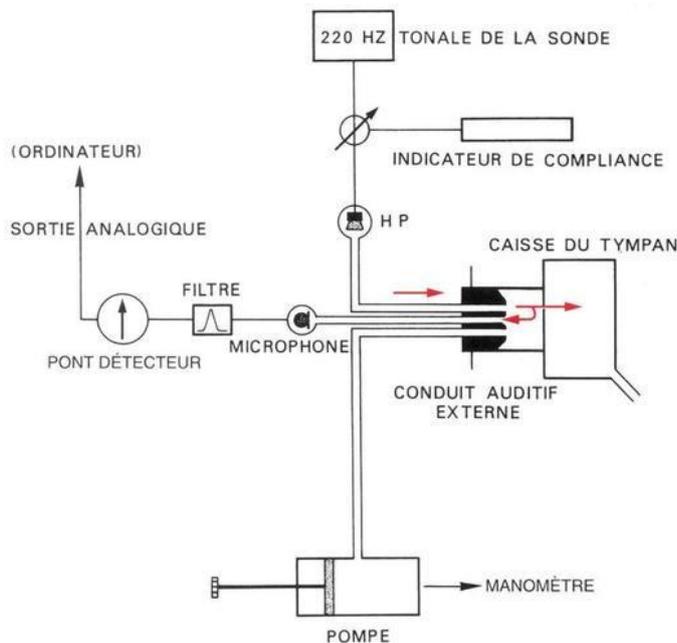


Figure 5-
Schéma illustrant le principe
de fonctionnement d'un
impédancemètre.
HP : Haut-parleur

D'après EMC [20-175-A-10]

II.2. Réflexe d'oreille interne

La découverte du système olivo-cochléaire (OC) et sa description anatomique sont en grande partie le fruit des travaux de Grant Rasmussen (1946 ; 1953). Chez tous les mammifères, le système olivo-cochléaire est composé de deux populations de neurones (médial et latéral) dont la distribution varie légèrement en fonction des espèces (Warr et al., 1986). Chez le rat, les neurones du système OC latéral proviennent de l'olive supérieure latérale et se projettent exclusivement sur la cochlée ipsilatérale. Les neurones du système OC médian proviennent majoritairement du noyau ventral du corps trapézoïde et ont une projection bilatérale, bien que majoritairement controlatérale (Figure 6). Le ratio projections croisées : directes du système OC médian est de 2 : 1 (White et Warr, 1983).

A l'étage du tronc cérébral, les fibres OC forment un faisceau compact en position ventrale, à proximité du genou du nerf facial. Elles cheminent ensuite avec le contingent vestibulaire du nerf cochléo-vestibulaire (VIII^{ème} paire crânienne) et pénètrent dans la cochlée par

l'anastomose vestibulo-cochléaire (faisceau de Oort) à la partie moyenne du tour basal de la cochlée. Les fibres du système OC médian contactent directement les CCE à leur pôle basal. Quant aux fibres du système OC latéral, elles contactent les fibres afférentes de type I sous les CCI. Le système OC latéral est mal connu et agit sur un versant post-synaptique côté CCI, sans interférer avec la micromécanique cochléaire. Nos évaluations étant réalisées par mesure de PDAs, les effets du système OC latéral n'ont pas été discriminants. En conséquence, seuls les effets du système OC médial ont été traités sous l'appellation réflexe d'oreille interne (ROI).

Comme pour le ROM, les effets du ROI sont déclenchés par des sons ipsi et/ou controlatéraux. La stimulation binaurale est la plus efficace, suivie de la stimulation IPSI et enfin de la stimulation CONTRA. L'activation du ROI provoque des modifications de la compliance de l'organe de Corti à la base de la cochlée (fréquences élevées) de telle sorte que le gain de l'amplificateur cochléaire soit réduit. De ce fait, le niveau sonore nécessaire pour stimuler la CCI, et donc la fibre afférente de type I, est augmenté. Cette action joue un rôle dans la protection auditive, en atténuant les réponses de l'oreille interne. Elle permet également d'optimiser le traitement du bruit de fond pour les sons de hautes fréquences (démasquage), complétant ainsi l'effet du ROM (Lieberman et Guinan, 1998).

Les effets du système OC médian sont fonction du niveau du bruit supprimeur, probablement parce que l'activité efférente est liée à l'intensité du son stimulant (White et Warr, 1983 ; Guinan 2006). Dans tous les cas, le seuil d'activation du ROI est inférieur au seuil d'activation du ROM (Guinan et McCue, 1987 ; Liberman et Guinan, 1998).

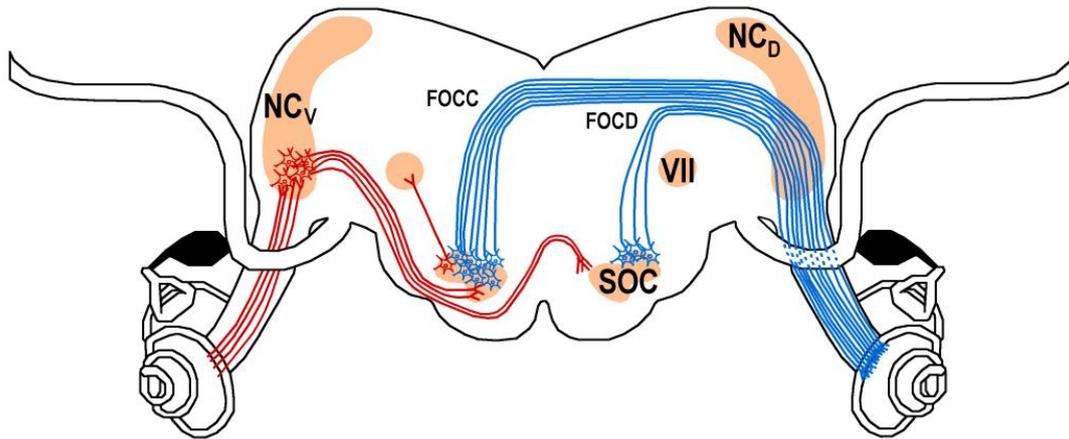


Figure 6

Voies du réflexe olivo-cochléaire. Voies afférentes, lignes rouge et voies efférentes, lignes bleues. NC_v et NC_d, noyau cochléaire ventral et dorsal respectivement. SOC, complexe olivaire supérieur. VII, noyau du nerf facial. FOCC, fibres olivo-cochléaire croisées. FOCD, fibres olivo-cochléaires directes. Schéma réalisé par A. THOMAS (INRS)

III. Produits de distorsion acoustiques

Les produits de distorsion acoustiques (PDAs) appartiennent à la famille des otoémissions acoustiques provoquées. Ils peuvent être obtenus avec deux sons purs stimulants de fréquence f_1 et f_2 , appelés primaires, présentés de façon continue et simultanée dans le conduit auditif externe. Le signal acoustique recueilli dans le conduit est le résultat des distorsions exercées par le système [oreille externe - oreille moyenne - oreille interne] lors de l'application des deux primaires. On décrit ainsi plusieurs PDAs, définis par leur fréquence spécifique. Parmi ces PDAs, les plus utilisés en clinique, comme en recherche, sont le produit cubique ($2f_1-f_2$) et le quadratique (f_2-f_1). Ce sont en effet les plus robustes, c'est-à-dire qu'ils persistent pour des intensités de primaires relativement faibles, quelles que soient les fréquences des primaires.

En pratique, les PDAs sont mesurés par incrémentation : l'analyse du signal sortant est basée sur une compilation de nombreuses acquisitions, permettant ainsi d'extraire le PDA du

bruit de fond, qui est par définition aléatoire. Le nombre d'acquisitions nécessaires est donc d'autant plus important que le PDA est faible, ce qui est le cas chez l'homme : les PDAs recueillis chez l'homme sont inférieurs d'au moins 25 dB à ceux que l'on peut recueillir chez le rat (Fechter, 1993).

La mesure des PDAs peut être effectuée selon deux méthodes :

- La plus informative est la procédure « entrée-sortie » (ou input/output), qui consiste à enregistrer l'intensité des PDAs produits pour chaque couple de fréquences f_1/f_2 en faisant varier l'intensité des primaires, mais en gardant leurs rapports de fréquences (f_1/f_2) et d'intensités (L_1/L_2) constants.
- La seconde méthode consiste, pour une intensité de stimulation donnée, à faire varier les fréquences de stimulation (avec f_1/f_2 constant), traçant ainsi un « Dpgramme » à l'intensité choisie. Cette méthode est particulièrement utilisée en clinique car elle est plus rapide.

Les PDAs sont spécifiques du fonctionnement et des dysfonctions des CCEs, qu'elles soient structurelles (Schrott et al., 1991 ; Trautwein et al., 1996) ou fonctionnelles (Schmiedt, 1986 ; Mills et al., 1993 ; Mills et Rubel, 1994).

Sources et mécanismes cochléaires à l'origine des produits de distorsions acoustiques

La cochlée a les caractéristiques d'un système non linéaire compressif :

- non linéaire.

Bien que périodique, la réponse à un signal sinusoïdal n'est pas sinusoïdale car elle intègre les harmoniques de la fréquence de stimulation. En cas de stimulations acoustiques combinées, la réponse intègre les signaux suivant : les fondamentales, les harmoniques et

leurs produits d'intermodulation. De même, l'amplitude de la réponse d'un système non-linéaire n'est pas proportionnelle à l'amplitude du son stimulant.

- compressif : la réponse du système est inférieure à celle du stimulus. On estime par exemple qu'une augmentation du niveau sonore de 10 dB mesurée à proximité de la membrane tympanique induit une augmentation de 2,5 dB sur la vibration de la membrane basilaire (Chatterjee et Zwislocki, 1998).

Brown et al. (1996), distinguent deux mécanismes différents de génération des PDAs : la distorsion non linéaire et la réflexion.

~ ***La distorsion non linéaire***

La distorsion non linéaire provient de l'interaction entre l'onde de Békésy et les phénomènes actifs locaux provoqués par l'amplificateur cochléaire. Ceci lui a valu le nom de phénomène « onde-dépendant » (« wave-fixed phenomenon »).

~ ***Le mécanisme de réflexion***

La réflexion de l'énergie acoustique absorbée par la cochlée dépend de l'architecture de l'épithélium neuro-sensoriel fait d'inhomogénéités structurelles et anatomiques. L'épithélium crée donc des inégalités de réflexion de l'énergie acoustique, qui sont distribuées de façon aléatoire, mais constante, le long de la membrane basale. Il s'agit d'un phénomène « place-dépendant » (« place-fixed phenomenon »).

Les PDAs seraient le résultat de la combinaison de ces deux phénomènes, dont la participation respective varie en fonction des conditions de stimulation acoustique et des inhomogénéités locales.

Pour le PDA cubique, on décrit deux sources cochléaires distinctes (Figure 7) :

- ~ une première source située dans la région de recouvrement des ondes correspondant aux sons purs stimulants,
- ~ une seconde source localisée au site correspondant à la fréquence caractéristique du PDA ($CF_{dp} = 2f_1 - f_2$).

Pour chacune de ces sources, les deux mécanismes de génération s'expriment avec un degré d'efficacité variable. Ainsi, la réflexion est négligeable au niveau de la région de recouvrement, alors qu'elle est prédominante pour la source CF_{dp} . Les produits de ces deux sources s'additionnent pour créer une onde composite, mesurable dans le conduit auditif externe. Le signal composite peut être assimilé à la somme : [mécanisme de distorsion non linéaire de la zone de recouvrement] plus [mécanisme de réflexion de la zone CF_{dp}].

Par conséquent, lorsque l'énergie de réflexion est faible, la source du signal enregistré correspond à la région de recouvrement, celle-ci pouvant être assimilée à la région de f_2 . Dans le cas contraire, le PDA mesuré provient de CF_{dp} et reflète donc l'activité des régions f_1 et f_2 . Les études récentes (Shaffer et al., 2003 ; Mauermann et Kollmeier, 2004) ont isolé dans le signal mesuré la part provenant de chacune de ces deux sources, afin de pouvoir supprimer CF_{dp} , rendant ainsi la mesure plus spécifique d'une seule région cochléaire (f_2) et limitant la variabilité inter-individuelle.

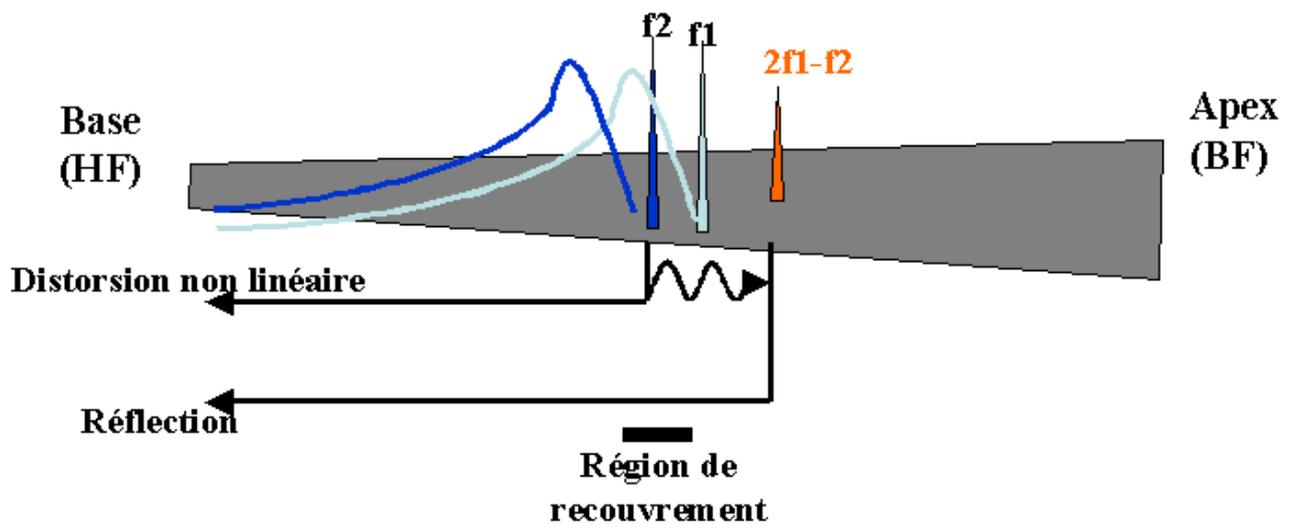


Figure 7-
Schéma résumant les sources et mécanismes de génération du PDA cubique.
D'après Brown et al. (1996).

Première partie

Expérimentation

animale chez le rat

Introduction

L'implication des voies centrales dans la synergie des effets auditifs du bruit et des solvants aromatiques a été démontrée au laboratoire en utilisant le PMC (Lataye et al., 2007 ; Maguin et al., 2009). Ces travaux ont mis en lumière la pertinence de l'étude des réflexes acoustiques pour appréhender les effets pharmacologiques de substances chimiques. En effet, l'état de fonctionnement de l'arc réflexe renseigne indirectement sur le capteur auditif périphérique (oreille interne), les voies afférentes et efférentes et l'effecteur (musculaire pour le ROM). Cependant, l'explication des résultats obtenus restait soumise à des hypothèses, en particulier pour le ROI, où une propagation du bruit contralatéral d'une oreille à l'autre (crosstalk acoustique) était suspectée. Dans le but de pouvoir mener ces investigations de manière longitudinale chez le rat et de les transposer chez l'homme, il était indispensable de mettre au point un instrument non invasif. Pour cela, les produits de distorsions acoustiques (PDAs) ont été utilisés comme outil d'investigation. Le protocole expérimental était calqué sur celui utilisé par Lataye et al. (Lataye et al., 2007). Les PDAs cubiques étaient enregistrés en continu et une stimulation contralatérale (CONTRA) ou ipsilatérale (IPSI) était utilisée pour déclencher les réflexes : ROM ou ROI. Les mesures étaient réalisées simultanément à une injection intra-carotidienne d'un véhicule contenant du toluène.

Au-delà de la confirmation des résultats obtenus sur les réflexes acoustiques, les résultats toxicologiques expérimentaux obtenus ont tous été intégrés aux données connues de la physiologie des voies afférentes et efférentes afin de proposer un modèle de fonctionnement des voies réflexe elles-mêmes (Campo et al., 2007 ; Rumeau et al., 2011 ; Venet et al., 2011). L'aboutissement de cette première partie a été la mise au point d'un dispositif de mesure utilisable chez l'homme, basé sur l'enregistrement combiné des PDAs et du ROM, baptisé EchoScan.

Matériels et Méthodes

I. Animaux

Les expérimentations ont été réalisées sur des rats Long-Evans adultes de plus de 350 g (n = 16 pour le ROM, n = 22 pour le ROI) provenant des *Laboratoires Charles River* (Saint Aubin-les-Elbeuf, France). Les rats pigmentés, comme le rat Long-Evans, sont souvent choisis pour leur pigmentation au niveau de la strie vasculaire. En effet, il semble que les animaux albinos soient particulièrement sensibles au bruit et aux ototoxiques et qu'ils ne présentent pas d'homogénéité de leurs performances audiologiques (Bock et Steel, 1984).

Trois animaux ont fait l'objet uniquement d'une étude complémentaire histologique afin de tracer la voie de diffusion des bolus injectés via la carotide commune. Pendant toute la durée précédant l'expérimentation, les animaux étaient maintenus en cages (350 x 180 x 184 mm) individuelles en polycarbonate garnies de rafles de maïs régulièrement renouvelées, avec alimentation standardisée (Special Diets Service, France. ref : Gold cob 891180) et eau à volonté. L'animalerie était éclairée de 7h00 à 19h00 et maintenue à une température de 22 ± 2 °C et une humidité de $55\% \pm 10\%$. L'animalerie est accréditée en tant que lieu d'expérimentations animales (NC54-547-10) et les expériences ont été menées dans le respect du guide pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire, promulgué par le Conseil d'Etat par le décret n°87-848, publié au Journal Officiel le 20 Octobre 1987.

II. Anesthésie

Une anesthésie générale était nécessaire pour mesurer des PDAs chez les rats. Une prémédication de lévomépromazine (12,5 mg/kg), réalisée par injection intrapéritonéale (*i.p.*), était réalisée 15 minutes avant l'induction de l'anesthésie pour minimiser le stress des animaux. L'anesthésie profonde était induite par injection *i.p.* d'un mélange de kétamine (50 mg/kg) et xylazine (6 mg/kg). Des doses complémentaires du mélange, correspondant à un cinquième du bolus initial, étaient administrées quand le rat réagissait à un pincement de patte. Une couverture chauffante était utilisée pour maintenir la température rectale des animaux anesthésiés autour de 36°C. Un examen otoscopique était systématiquement réalisé avant les mesures pour s'assurer de l'absence d'infection ou d'obstruction du conduit auditif externe, d'épanchement rétrotympanique et/ou de perforation.

En cas de prélèvement du cerveau ($n = 3$), les animaux étaient anesthésiés avec une dose élevée de kétamine (75 mg/kg).

III. Mesures des réflexes

III.1. Enregistrement des produits de distorsion acoustique (PDAs)

Toutes les mesures étaient réalisées dans une cabine insonorisée. La sonde de mesure de PDAs, mise au point au laboratoire, associe deux transducteurs générant les primaires $f_1 = 8000$ Hz et $f_2 = 9600$ Hz et un microphone (Knowles FG 23329-C05) mesurant la pression acoustique dans le conduit auditif externe. Ces trois transducteurs sont réunis dans la sonde, dont l'extrémité était positionnée à l'entrée du conduit auditif externe de l'animal.

Les primaires f_1 et f_2 étaient émis à 65 et 60 dB SPL respectivement, et délivrés dans l'oreille IPSI (gauche). L'intensité maximale de 65 dB SPL a été choisie pour ne pas stimuler le réflexe de l'oreille moyenne. Une procédure de calibration permettait de s'assurer que les primaires étaient toujours émis aux intensités souhaitées. Cette calibration était réalisée avec un microphone de 1/8 pouces (B&K type 4138) placé dans une cavité spécifique, de volume équivalent au conduit auditif externe du rat.

Le ratio f_1/f_2 était de 1,2, ce qui est habituellement choisi chez le rat comme chez l'homme (Henley et al. 1990 ; Gaskill et Brown 1990). Les signaux des primaires étaient produits par un synthétiseur de fréquence (Pulse, B&K 3110) et émis par deux microphones miniaturisés (B&K type 4191). Ces signaux correspondaient à la stimulation acoustique IPSI dans le protocole décrit Figure 8.

La réponse acoustique mesurée dans le conduit auditif externe était analysée par un analyseur FFT (B&K PULSE 3110). L'amplitude des PDAs était déterminée par moyennage linéaire ($N = 149$) de spectres de 500 ms, en sachant que chaque analyse FFT durait 10 ms (recouvrement de 66,7%). Le moyennage de spectre était enregistré toutes les 500 ms pour suivre l'évolution de l'amplitude des PDAs en fonction de l'activité des réflexes acoustiques.

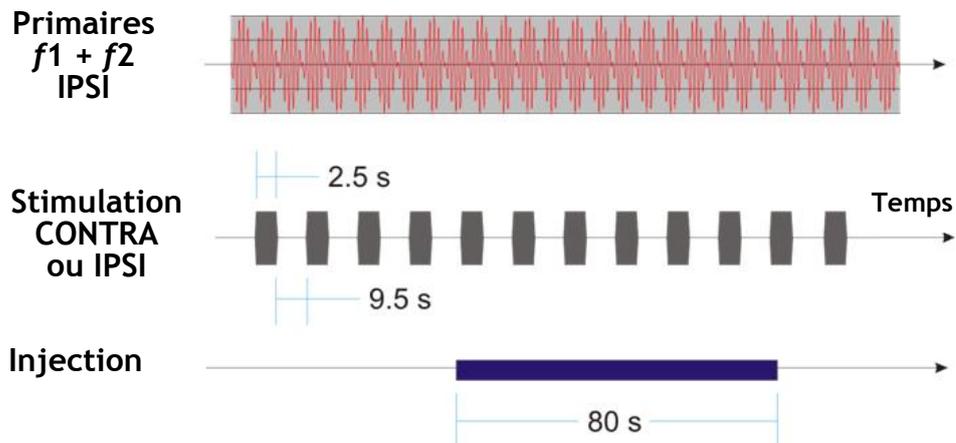


Figure 8-

Schéma de l'étude. Les tests auditifs étaient réalisés en mesurant le PDA cubique $2f_1-f_2$. Primaires $f_1 = 8000$ Hz à 65 dB SPL et $f_2 = 9600$ Hz à 60 dB SPL ; $f_1/f_2 = 1,2$. La stimulation controlatérale était un bruit de bande de 800 Hz centré sur 4 kHz, la stimulation ipsilatérale était un son pur de 3,5 kHz.

III.2. Déclenchement du réflexe d'oreille moyenne

III.2.1. Stimulation controlatérale

Le bruit controlatéral, dit bruit supprimeur (BS dans les formules et les figures) était un bruit de bande de 800 Hz centrée sur 4 kHz. Chaque « tone burst », ou bouffée de bruit, durait 2,5 s. Il était suivi par 9,5 s de silence puis d'un nouveau tone burst. L'intensité du bruit supprimeur controlatéral était de 100 dB SPL. Le signal était produit par un synthétiseur (B&K, Pulse 3109) et émis par un écouteur Ethymotic Research ER4 B. Les PDAs étaient mesurés avant et pendant l'émission du bruit supprimeur.

III.2.2. Stimulation ipsilatérale

En ipsilatéral, le bruit supprimeur était un son pur de 3,54 kHz. Son intensité était plus faible (75 dB SPL) que celle utilisée en condition controlatérale, afin de ne pas perturber la mesure du PDA cubique $2 f_1$ - f_2 dans la même oreille. Chaque stimulation durait 2,5 s et était suivie par 9,5 s de silence avant une nouvelle stimulation. Le signal était synthétisé par un B&K Pulse 3110 et émis par un des transducteurs inclus dans la sonde de mesure des PDAs. Dans le cas particulier de la stimulation ipsilatérale, f_1 et f_2 étaient émis par le même transducteur. Les PDAs étaient mesurés avant et pendant l'émission du bruit supprimeur.

III.3. Déclenchement du réflexe d'oreille interne

De la même façon que pour le ROM, le bruit controlatéral, dit bruit supprimeur (BS dans les illustrations) était un bruit de bande de 800 Hz centré sur 4 kHz. Chaque tone burst durait 2,5 s et était suivi par 9,5 s de silence puis d'un nouveau tone burst. Par contre, son intensité variait de 90 à 120 dB SPL. Le signal était produit par un synthétiseur (B&K, Pulse 3110) et émis par un écouteur Ethymotic Research ER4 B. Les PDAs étaient mesurés avant et pendant l'émission du bruit supprimeur.

IV. Chirurgie

IV.1. Section des muscles de l'oreille moyenne

Cette procédure chirurgicale concernait les animaux utilisés dans l'évaluation du ROI ($n = 22$). En fonction du schéma expérimental, il était nécessaire de sectionner les muscles de

l'oreille moyenne de manière unilatérale (IPSI, n = 19) ou bilatérale (n = 3). La bulle tympanique était alors exposée par une incision ventro-latérale et ouverte avec l'extrémité d'un bistouri chirurgical. Le tendon du muscle *tensor tympani* était sectionné à l'aide de micro ciseaux à son point d'attache sur le *malleus*. Le muscle stapédien était détruit par électrocoagulation en utilisant une électrode de platine isolée dénudée à son extrémité. Pour s'assurer que les données obtenues sur le ROI n'étaient pas des artéfacts, les cochlées controlatérales ont été détruites sur trois animaux supplémentaires lors d'une pré-étude.

IV.2. Implantation du cathéter et injection de solvant

La carotide commune gauche était exposée par une incision cervicale ventro-latérale. La carotide externe était ligaturée pour diriger le bolus vers le cerveau. Un cathéter circulaire mis au point et produit au laboratoire (« T » en polypropylène d.i. = 1,6 mm raccordé à des cathéters en silicone d.i. = 0,635 mm) rempli d'une solution de NaCl 0,9% et d'héparine (50 UI/mL) était introduit dans la carotide commune. Ce type de cathéter permet de maintenir un flux sanguin normal dans le vaisseau cathétérisé, tout en injectant le véhicule contenant le solvant. Une illustration de ce cathéter est représentée en Figure 9.

Une fois inséré, le cathéter circulaire était rempli du véhicule, constitué d'une émulsion à 10% d'huile de soja purifiée et d'acides gras essentiels (Intralipid Ref : 830513161 ; Fresenius Kabi Company). Toutes les injections étaient réalisées à l'aide d'un pousse-seringue électrique calibrée pour délivrer un bolus de 266 μ L sur 80 s (Figure 8). Deux concentrations de toluène (Prolabo, 20675294) ont été testées pour le ROM : 58,4 mM (n = 4), et 116,2 mM (n = 5). La concentration 0 mM (ROM : n = 4, ROI : n = 4) correspondait à une injection du véhicule seul. Pour le ROI, seule la concentration 116,2 mM a été testée.

Il est important de garder à l'esprit que toutes les concentrations sont données en tant que concentration dans la seringue et non en tant que concentration efficace atteignant le cerveau et/ou la cochlée. Chacun des animaux n'a été testé qu'avec une seule concentration.

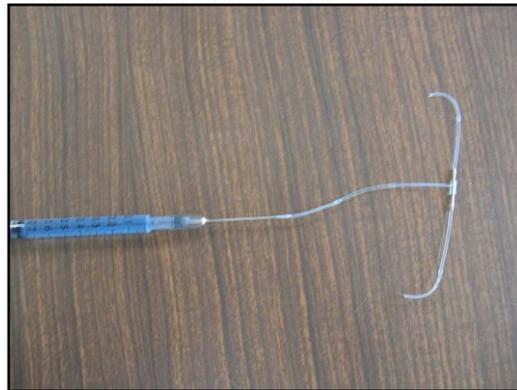


Figure 9-

Photographie du cathéter utilisé pour l'injection intracarotidienne du bolus contenant le véhicule (intralipide) +/- le toluène (58 ou 116 mM). Les deux extrémités sont insérées dans le même abord carotidien, rendant le cathéter « circulaire ». L'injection est réalisée par la seringue en dérivation sans interrompre le flux sanguin.

V.Histologie

V.1. Cochlées

La technique de coloration histochimique utilisée est basée sur le marquage colorimétrique de l'activité de la succinate déshydrogénase (SDH) des cellules ciliées de l'organe de Corti. La SDH est une enzyme mitochondriale intervenant dans le cycle de production de l'adénosine triphosphate (ATP) dont le niveau joue un rôle important dans la régulation de la mort cellulaire, et en particulier dans l'orientation vers l'apoptose ou la nécrose (Leist et al., 1997 ;

Tadros et al., 2008). Des études ont montré que l'activité SDH des cellules ciliées de l'organe de Corti se modifiait sensiblement en cas de traumatisme acoustique (Miyoshi et al., 2008) ou d'agression chimique (Fredelius et al., 2001). Fredelius et al. ont ainsi démontré que l'utilisation précoce d'un marquage histochimique de l'activité SDH au niveau de l'organe de Corti pouvait prédire les dommages cellulaires des cellules ciliées. Le marquage SDH des cellules ciliées était évalué sur la cochlée gauche (côté injecté, IPSI) en utilisant le sel monosodique nitrobleu tetrazolium (NBT). Des solutions de stock (0,1% NBT, 0,2 M succinate de sodium et 0,2 M tampon phosphate à pH 7,4) étaient préparées et conservées à 4°C. Les solutions utilisées pour la coloration étaient ensuite préparées à la demande, en mélangeant les solutions stockées NBT, succinate de sodium et tampon phosphate en proportions 2:1:1. A la fin des mesures auditives, les animaux étaient anesthésiés profondément par une injection massive de kétamine, puis sacrifiés. Les cochlées étaient rapidement prélevées et perfusées via la fenêtre ronde par la solution de SDH. L'excès de solution de coloration perfusée était évacué par la fenêtre ovale. Les cochlées étaient ensuite incubées pendant une heure à 37 °C.

Après la coloration SDH, les cochlées étaient perfusées avec une solution de trialdéhyde (glutaraldéhyde 3% + formaldéhyde 2% + acroléine 1% + DMSO 2,5%) dans une solution de cacodylate de sodium 0,08M à pH 7,4 et incubées toute une nuit. Après fixation, les cochlées étaient fraisées, puis disséquées. La lame spirale osseuse et le ligament spiral étaient retirés et l'organe de Corti segmenté en trois morceaux avant d'être observé au microscope optique.

V.2. Etude de traçage de la voie d'intoxication

Pour déterminer la cible tissulaire atteinte par le bolus d'intralipide contenant le solvant, un traceur, l'acide osmique (OsO₄), a été injecté lentement dans la carotide avec une micro

seringue sur des animaux euthanasiés. Avant d'injecter le traceur, les animaux étaient perfusés avec un mélange d'héparine et de solution saline. Après injection du traceur, le cerveau était prélevé et congelé à - 60 °C. Les cerveaux congelés étaient débités en coupes de 20 µm d'épaisseur dans un plan frontal passant par le segment cérébral situé à - 10,04 mm du bregma (Figures 14 B, C et D).

VI. Enregistrement des données

Les variations d'amplitude du PDA, mesurées avec et sans bruit supprimeur (BS et sansBS pour le ROM / BSi et sansBSi pour le ROI), sont illustrées Figure 10. En conditions physiologiques, les réflexes acoustiques déclenchent une diminution de l'amplitude du PDA et peuvent être modélisés comme suit :

$$\text{ROM} = \text{PDA}_{(\text{sansBS})} - \text{PDA}_{(\text{BS})}$$

$$\text{ROI} = \text{PDA}_{(\text{sansBSi})} - \text{PDA}_{(\text{BSi})}$$

La Figure 10 illustre également le principe du calcul de l'amplitude du ROM. La valeur de base des PDAs [$\text{PDA}_{(\text{sansBS})}$] était calculée par la moyenne de 18 mesures de PDAs avant et après émission du bruit supprimeur (cercles noirs). Afin de supprimer les effets de bord, pendant la stimulation, seuls les quatre points de mesure de PDAs les plus centraux étaient pris en compte pour le calcul d'amplitude du réflexe (triangles blancs). La moyenne des valeurs de ces quatre points détermine la valeur du PDA pendant l'action stable du ROM [$\text{PDA}_{(\text{BS})}$]. Les valeurs des points « de transition » (croix) étaient exclues du calcul. Les carrées gris représentent l'amplitude du ROM pour chaque émission du bruit supprimeur : [$\text{PDA}_{(\text{sansBS})}$] - [$\text{PDA}_{(\text{BS})}$] (écart entre cercles noirs et triangles blancs).

Le calcul de l'amplitude du ROI n'est pas illustré en Figure 10, mais suit le même principe.

Avant injection, quatre déclenchements de réflexe étaient enregistrés ; ils sont représentés en début de tracé Figures 11 et 12 pour le ROM. A partir de ces quatre mesures faites avant injection, une valeur moyenne du réflexe (moyROM ou moyROI) a été calculée pour tous les animaux, en réalisant la moyenne des valeurs correspondant aux quatre carrés gris tels que déterminés dans la Figure 10.

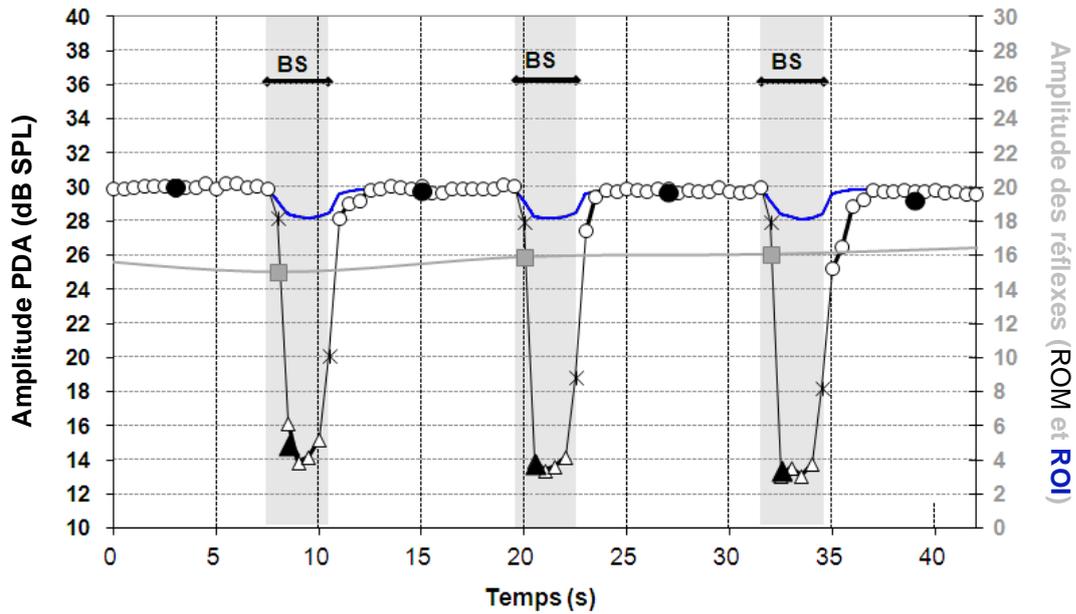


Figure 10-

Diminution de l'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ provoquée par les réflexes de protection. Trait bleu épais : ROI. Trait noir fin : ROM.

Chaque bruit supprimeur durait 2,5 s.

Axe primaire des ordonnées (axe gauche) : amplitude du PDA en dB SPL. Axe secondaire (axe droit) : amplitude de la variation du PDA induite par la stimulation.

Cercles blancs : PDA mesuré sur 500 ms sans bruit supprimeur. Cercles noirs : Moyenne de 18 PDA mesurés sans bruit supprimeur.

Triangles blancs : PDA mesuré sur 500 ms pendant l'émission d'un bruit supprimeur stimulant le ROM. Triangles noirs : moyenne de quatre mesures de PDAs réalisées pendant l'émission d'un bruit supprimeur.

Croix : Mesures de PDAs exclues du calcul.

Les carrés gris correspondent à l'amplitude du réflexe pour chaque série de mesure: différence entre la moyenne des valeurs des deux cercles noirs (pré et post BS) et du triangle noir.

VII.Statistiques

L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion XV. Les variations de $2f_1-f_2$ en fonction des conditions expérimentales ont été analysées avec une analyse de variance (ANOVA) à un facteur. Le résultat statistique est exprimé comme suit : [$F(df_b, df_i) = F\text{-ratio} ; p = p \text{ value}$] dans lequel, df_b est le nombre de degrés de liberté inter-groupes et df_i le nombre de degrés de liberté intra-groupe. $F\text{-ratio}$ est la moyenne du carré des valeurs entre groupes divisée par la moyenne du carré des valeurs intra groupe. L'analyse *Post hoc* était réalisée en utilisant la méthode de Bonferroni. Les comparaisons entre groupes utilisaient le test de Mann-Whitney (MW). Le seuil de significativité était fixé à 5% ($p < 0,05$).

Pour plus de clarté les résultats obtenus sur le ROM et sur le ROI seront exposés et discutés séparément.

Résultats :

Réflexe de l'oreille moyenne

Pendant l'injection du solvant, une augmentation d'amplitude du ROM était définie comme la composante N ou composante « négative ». Elle correspond à une diminution de l'énergie acoustique pénétrant la cochlée, conséquence de l'augmentation d'amplitude du ROM. A l'inverse, une diminution du ROM est définie comme la composante P, ou « positive », du fait de l'augmentation d'énergie acoustique pénétrant dans la cochlée. Ces deux composantes sont obtenues par la différence calculée entre les valeurs du ROM obtenues pendant l'injection et la moyROM obtenue avant l'injection.

I.Effets du toluène sur la contraction des muscles de l'oreille moyenne

I.1.Stimulation acoustique controlatérale

La Figure 11 montre que l'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ était proche de 30 dB SPL dans nos conditions expérimentales. Cette amplitude est restée stable tout au long des mesures, malgré les phases d'injection et quelle que soit la concentration du bolus concerné. Avant injection, les valeurs moyennes de ROM (moyROM) étaient de 12 dB \pm SD (30-18) pour les animaux recevant 58 mM de toluène (Figure 11B) et de 16 dB \pm SD (30-14) pour les animaux recevant 116 mM de toluène (Figure 11D).

L'injection de toluène à 58 mM n'a provoqué qu'une composante N, dont l'amplitude était de 8 dB (Figure 11B). La composante N correspond à une phase de contraction du ROM de plus

grande amplitude. L'amplitude de la composante N a rapidement augmenté pendant les 30 premières secondes de l'injection puis elle est restée constante jusqu'à la fin de l'injection.

L'injection de toluène à 116 mM a provoqué successivement deux composantes : d'abord une composante N (3 dB) puis une composante P, qui correspond à une phase de contraction du ROM de plus faible amplitude (11 dB) (Figure 11D). Cependant, alors que la composante N a duré 30 secondes, la composante P a interagi dès la 20^{ème} secondes, tendant à masquer la composante N. Le pic d'amplitude de la composante P était obtenu en fin d'injection.

Les variations d'amplitude de la composante N en fonction de la concentration en toluène sont reportées dans le Tableau 1. La différence entre les amplitudes obtenues avec 0 et 58 mM de toluène est statistiquement significative [$F(3,14) = 3,4 ; p = 0,048$]. A concentration plus élevée (116 mM), la composante N était masquée par la présence de la composante P. Pour la composante P, il existait une différence significative entre les effets d'une injection de toluène à 116 mM et ceux obtenus avec les concentrations plus faibles [$F(3,14) = 6,4 ; p = 0,006$] (Tableau 2).

En résumé, l'évolution de l'amplitude du ROM en fonction de la concentration de toluène administrée semble répondre à un principe dose-réponse.

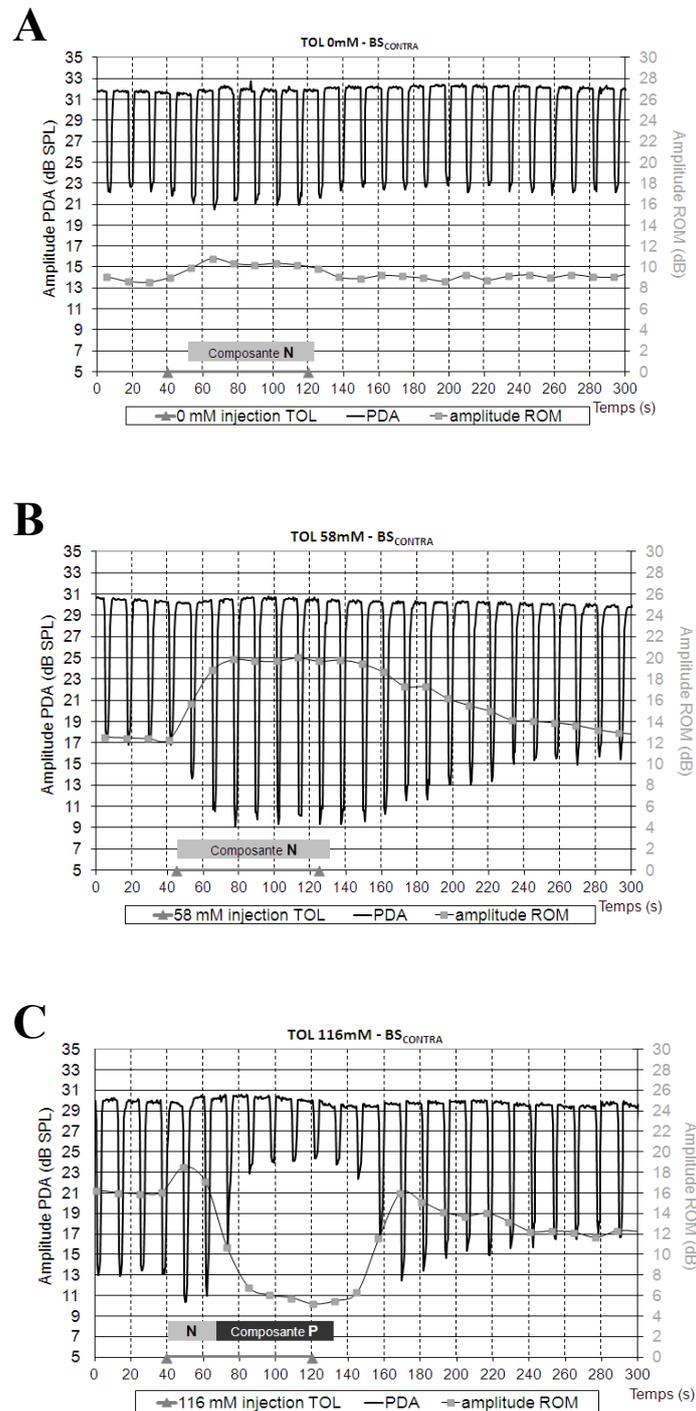


Figure 11-

Variations de l'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ et efficacité du réflexe de l'oreille moyenne avant, pendant et après une injection de (A) 0 mM, (B) 58 mM, (C) 116 mM de toluène. Un bolus de 266 μ L de véhicule contenant le toluène à la concentration appropriée était injecté pendant 80 s (triangles gris). Les primaires étaient délivrés dans l'oreille ipsilatérale : $f_1 = 8000$ Hz et $f_2 = 9600$ Hz à $L_1 = 65$ dB SPL et $L_2 = 60$ dB SPL respectivement. $f_1/f_2 = 1,2$. Le bruit supprimeur controlatéral était un bruit de bande de 800 Hz centré sur 4 kHz et émis à 100 dB SPL. Composante N : diminution de l'énergie acoustique pénétrant la cochlée. Composante P : augmentation de l'énergie acoustique pénétrant la cochlée. Chaque courbe correspondant à un animal représentatif du groupe (n = 5).

I.2. Stimulation acoustique ipsilatérale

Dans l'oreille IPSI, l'injection de 58 mM de toluène n'a provoqué qu'une composante P (Figure 12B). La différence d'amplitude du ROM entre les animaux ne recevant aucun solvant (0 mM) et ceux traités avec 58 mM de toluène a été significative après analyse *Post hoc* ; l'amplitude de la composante N était quant à elle de $2,0 \text{ dB} \pm \text{SD}$ (Tableau 2). Compte tenu de l'intensité choisie pour le bruit supprimeur IPSI (75 dB ipsi vs. 100 dB contra.), les amplitudes de ROM mesurées étaient plus faibles que celles obtenues avec une stimulation CONTRA. Cette réduction significative de l'intensité du bruit supprimeur était en effet nécessaire pour ne pas perturber les mesures du PDA réalisées dans la même oreille.

L'injection de 116 mM de toluène a provoqué deux composantes successives (Figure 12C) avec une séquence inverse de celle obtenue en condition CONTRA (Figure 11D) : d'abord une composante P, puis une composante N. Ainsi, en fonction du côté auquel a été appliqué le bruit supprimeur, les injections de toluène ont provoqué des effets opposés. L'amplitude de la composante P, obtenue en condition IPSI, était supérieure à 1 dB [$F(2,14) = 4,98$; $p = 0,03$] (Figure 12A). L'amplitude de la composante N obtenue avec 116 mM de toluène était supérieure à 2,5 dB [$F(2,14) = 20,57$; $p < 0,001$]. L'analyse *post hoc* a montré une différence significative entre 116 mM d'une part et 0 et 58 mM d'autre part (Tableau 2).

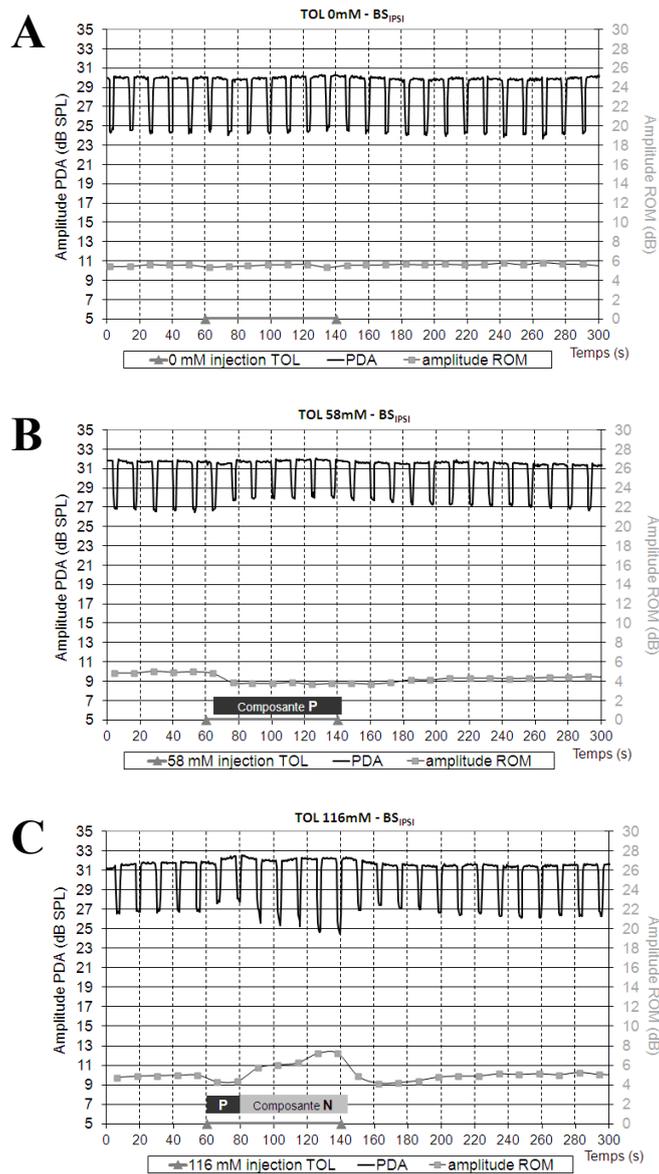


Figure 12-

Variations de l'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ et efficacité du réflexe de l'oreille moyenne avant, pendant et après une injection de (A) 0 mM, (B) 58 mM, (C) 116 mM de toluène. Un bolus de 266 μ L de véhicule contenant le toluène à la concentration appropriée était injecté pendant 80 s (triangles gris). Les primaires étaient délivrés dans l'oreille ipsilatérale : $f_1 = 8000$ Hz et $f_2 = 9600$ Hz à $L_1 = 65$ dB SPL et $L_2 = 60$ dB SPL respectivement. $f_1/f_2 = 1,2$. Le bruit supprimeur controlatéral était un son pur à 3,5 kHz et émis à 75 dB SPL. Composante P : augmentation de l'énergie acoustique pénétrant la cochlée. Composante N : diminution de l'énergie acoustique pénétrant la cochlée. Courbe correspondant à un animal représentatif du groupe (n = 5).

Tableau 1-

Effet de la concentration de toluène sur l'amplitude des composantes N/P obtenues avec une stimulation controlatérale

Composante	[Tol] mM	N	Moyenne (dB)	SD	Coefficient de variance %	Bonferroni Groupes homogènes	
N	0	4	2,6	0,9	34	X	
N	58	4	5,5	1,6	30	x	x
N	116	5	3,7	0,7	20		X
P	0	4	0	0		X	
P	58	4	0	0		X	
P	116	6	7,5	4,9	65		X

Tableau 2-

Effet de la concentration de toluène sur l'amplitude des composantes N/P obtenues avec une stimulation ipsilatérale

Composante	[Tol] mM	N	Moyenne (dB)	SD	Coefficient de variance %	Bonferroni Groupes homogènes	
N	0	5	0,1	0,1	81	X	
N	58	5	0,1	0,1	220	X	
N	116	5	2,0	0,8	45		X
P	0	4	0,3	0,2	77	X	
P	58	4	1,0	0,3	43		X
P	116	6	0,7	0,4	55	X	X

En résumé, il existe bien des modifications d'amplitude du ROM mesurables pendant l'injection d'un bolus de toluène. Ces modifications dépendent de la concentration de solvant utilisée et du côté d'émission du bruit supprimeur. Parallèlement, le niveau de base des PDAs

est resté stable malgré les injections, témoignant de l'absence de toxicité immédiate significative du toluène ou du véhicule sur les CCE.

II.Histologie

II. 1. Cochlées

Les cochlées provenant d'un animal témoin non injecté et d'un animal ayant reçu un bolus de 266 μ L d'intralipide contenant 116 mM de toluène ont été colorées à la SDH. Alors que les modifications d'amplitude du ROM étaient évidentes lors des mesures du PDA $2f_1$ - f_2 , l'analyse histologique des organes de Corti ne révélait pas d'effet identifiable du solvant (Figures 13A et 13B). Cette absence de lésions cochléaires a été confirmée à fort grossissement, quel que soit le tour de spire examiné : apical (Figures 13C et 13F), médian (Figures 13D et 13G) ou basal (Figures 13E et 13H).

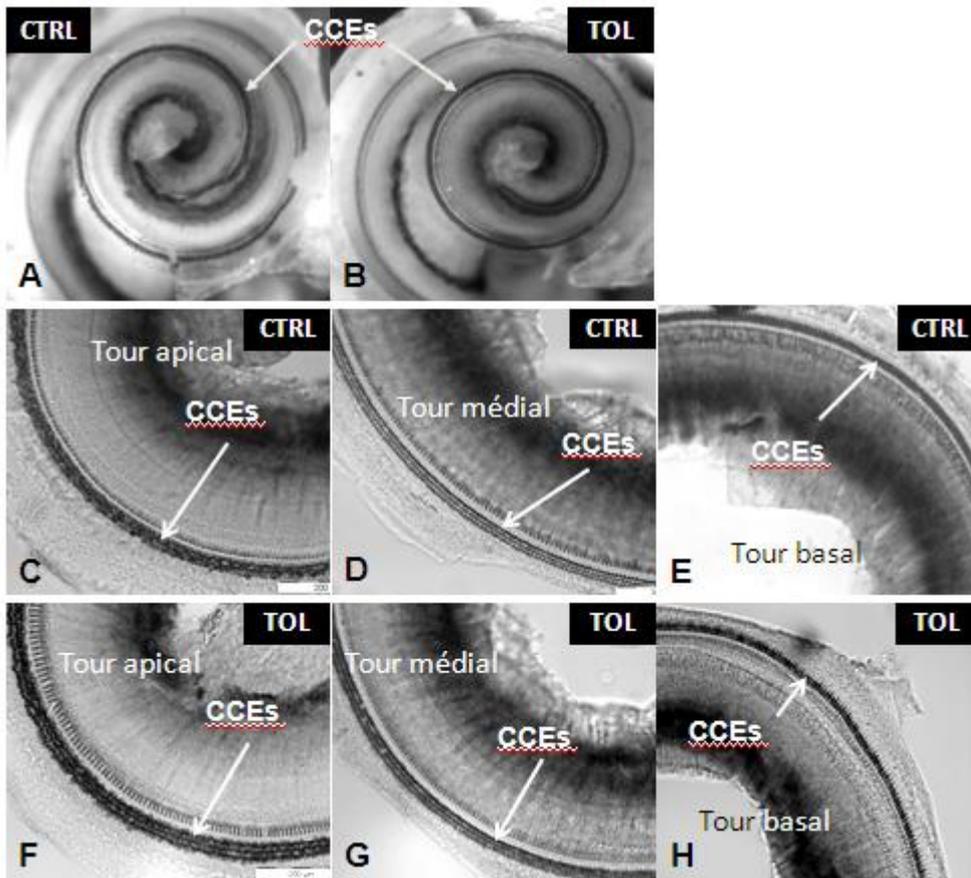


Figure 13-

Photographies de microscopie optique à faible grossissement ($G \times 35$, A et B) et à fort grossissement ($G \times 300$, C-H) montrant des cochlées gauche après injection d'un bolus de 266 μL d'intralipide seul (contrôles = CTRL, vues A et C-E) ou contenant du toluène à 116 mM (TOL, vues B et F-H). Les CCEs sont colorées au NBT monosodique pour évaluer l'activité SDH.

II.2. Cerveaux

Le traceur (OsO_4), injecté via l'artère carotide interne, a coloré intensément l'artère basilaire au niveau du tronc cérébral (Figure 14A). La quantité de traceur atteignant le cerveau était plus importante côté IPSI que côté CONTRA (Figure 14B). L'analyse des coupes congelées a montré que la partie basale du tronc cérébral, incluant le SOC, était atteinte par le traceur (Figures 14C et 14D). En conséquence, si le SOC a été atteint par le traceur, il est raisonnable de penser que le solvant véhiculé par le bolus d'intralipide et injecté selon les mêmes modalités a lui aussi contaminé cette zone du cerveau.

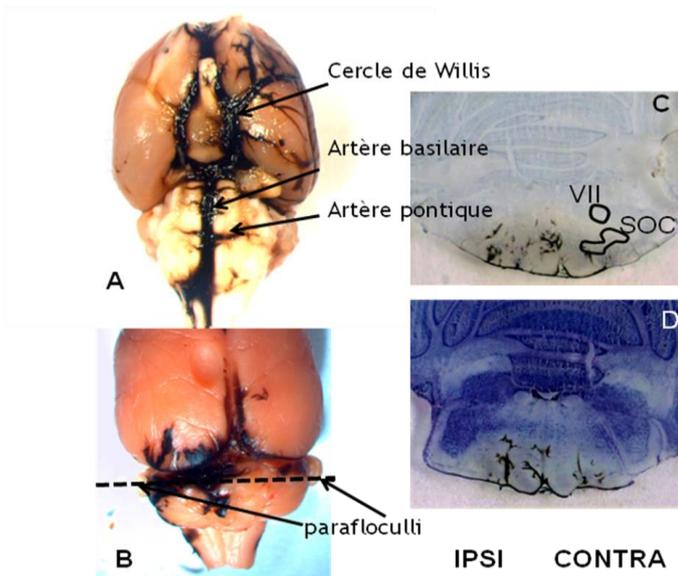


Figure 14-

Photographies de vues macroscopiques et de microscopie optique montrant le chemin emprunté par un traceur (OsO_4) injecté via le tronc commun carotidien. (A) vue ventrale montrant l'artère basilaire, les artères pontiques et le cercle de Willis. (B) Vue dorsale montrant la distribution relative du traceur entre côté IPSI et CONTRA du cerveau. (C, D) Sections transversales du tronc cérébral de deux rats différents montrant le tissu atteint par l'agent toxique injecté via l'artère carotide IPSI. VII, nerf facial.

En résumé, l'analyse histologique démontre que le protocole d'injection utilisé n'a pas entraîné de toxicité du solvant sur la cochlée mais a permis une contamination de la partie basale du tronc cérébral, et donc du SOC, par le bolus contenant le solvant.

Discussion

Réflexe de l'oreille moyenne

Comme montré préalablement par Campo et al. et Lataye et al., en 2007, un bolus de 116 mM de toluène injecté via le tronc carotidien gauche provoque un effet biphasique (composantes N et P), quel que soit le côté par lequel le bruit stimulant le ROM est émis. Ces auteurs avaient montré que la composante P correspondait à l'inhibition de la contraction musculaire du ROM. La signification exacte de l'onde N restait par contre imprécise. Avec cette nouvelle approche expérimentale, nous savons à présent que la composante N observée pendant l'injection de solvant correspond bien à une augmentation de l'efficacité du ROM.

Lors d'une injection de faible concentration de toluène (58 mM) en condition de bruit supprimeur CONTRA, nous n'avons mesuré qu'une onde N. Une concentration faible de toluène peut donc augmenter la contraction des muscles de l'oreille moyenne comparativement à une injection de véhicule (0 mM) (Figure 11B). L'effet biphasique, obtenu à 116 mM, pourrait en conséquence être dû aux variations progressives de concentrations locales en toluène dans le tissu-cible. Les variations d'amplitude du ROM en fonction du temps, avant et après la composante P, suggèrent d'ailleurs une transition progressive entre effets de faibles et fortes concentrations (Figure 11D).

La détermination du tissu-cible atteint par le toluène, dans ce schéma expérimental, restait à démontrer. La probabilité d'une atteinte du système nerveux central avait déjà été évoquée à la suite de précédentes expérimentations, sans pouvoir totalement exclure un impact éventuel sur la cochlée (Maguin et al., 2009). Nos résultats convergent pour exclure la possibilité d'une

atteinte cochléaire. D'une part, l'absence de variation d'amplitude des PDA_s 2f1-f2 pendant ou après injection (PDA_(sans BS)) prouve que le fonctionnement cochléaire n'est pas perturbé par le toluène. D'autre part, grâce aux analyses histologiques réalisées par marquage fonctionnel (SDH), cette étude montre que le solvant injecté n'affecte pas significativement la cochlée. En effet, aucune différence de marquage SDH n'a été observée entre les cochlées des rats exposés au toluène et celles des rats témoins (Figure 13). En conséquence, les variations d'amplitude du ROM mesurées simultanément à l'injection de toluène sont la conséquence d'une perturbation centrale.

En marquant avec un traceur coloré (OsO₄) le parcours du solvant depuis la carotide interne jusqu'au parenchyme cérébral, nous avons obtenu une coloration importante des artères basilaire et pontiques et de la partie basale du tronc cérébral, en particulier ipsilatéral (Figure 14A et 14B). Les Figures 14C et 14D illustrent la localisation des noyaux péri-faciaux et olivaire médian au niveau du tronc cérébral. Le bolus injecté dans notre protocole expérimental a donc pu atteindre ces structures, qui jouent un rôle majeur dans les réflexes de protection auditive.

Ainsi, dans nos conditions expérimentales, le toluène aurait agi sur les centres nerveux auditifs en augmentant ou en diminuant l'efficacité du ROM en fonction de sa concentration. Pour autant, il ne faudrait pas conclure que le toluène puisse avoir un effet pharmacologique excitateur ou inhibiteur sur une même cible tissulaire qui soit uniquement déterminé par sa concentration. D'ailleurs, des concentrations équivalentes de toluène (116 mM) ont provoqué des effets opposés sur le ROM, en fonction du côté par lequel le bruit supprimeur était délivré (IPSI vs. CONTRA) (Figures 11C et 12C). Puisqu'une même concentration de toluène ne peut pas provoquer des effets opposés sur une même cible tissulaire, la concentration du toluène seule ne peut pas expliquer les données obtenues. Il est clair que le côté où est

appliqué le bruit supprimeur est un paramètre déterminant dans la chronologie d'apparition des composantes : N puis P (Figure 11C) ou P puis N (Figure 12C).

Il existe donc une interaction complexe entre le solvant et les centres nerveux pilotant le ROM. Nous nous proposons d'éclairer ces interactions en s'appuyant sur l'étude de l'architecture fonctionnelle des circuits neuronaux impliqués. Comme illustré en Figure 15, le ROM est sous la dépendance d'une boucle de rétrocontrôle impliquant les neurones auditifs afférents et efférents. La plupart des motoneurones sont localisés dans la région des noyaux péri-facial (Lee et al., 2006). Bien que le rôle joué par les motoneurones soit bien décrit, le rôle physiologique des neurones afférents et des inter-neurones connectés aux noyaux auditifs reste débattu. Les données toxicologiques obtenues par cette étude éclairent, au moins en partie, le rôle clé des inter-neurones connectés aux noyaux du tronc cérébral. Les noyaux cochléaires dorsal et ventral (NC_D ; NC_V) et le complexe olivaire supérieur (SOC) sont impliqués dans le ROM (Borg, 1973; Rouiller et al., 1989; Lee et al., 2006). Les inter-neurones et les neurones des noyaux auditifs pourraient être capables d'interpréter et d'intégrer les différentes informations afférentes (Figures 15A et 15B), provenant des deux oreilles, avant de déclencher le ROM (Figures 15A et 15B). En fait, les inter-neurones permettraient aux noyaux auditifs d'ajuster le ROM en fonction des informations afférentes émanant des deux oreilles.

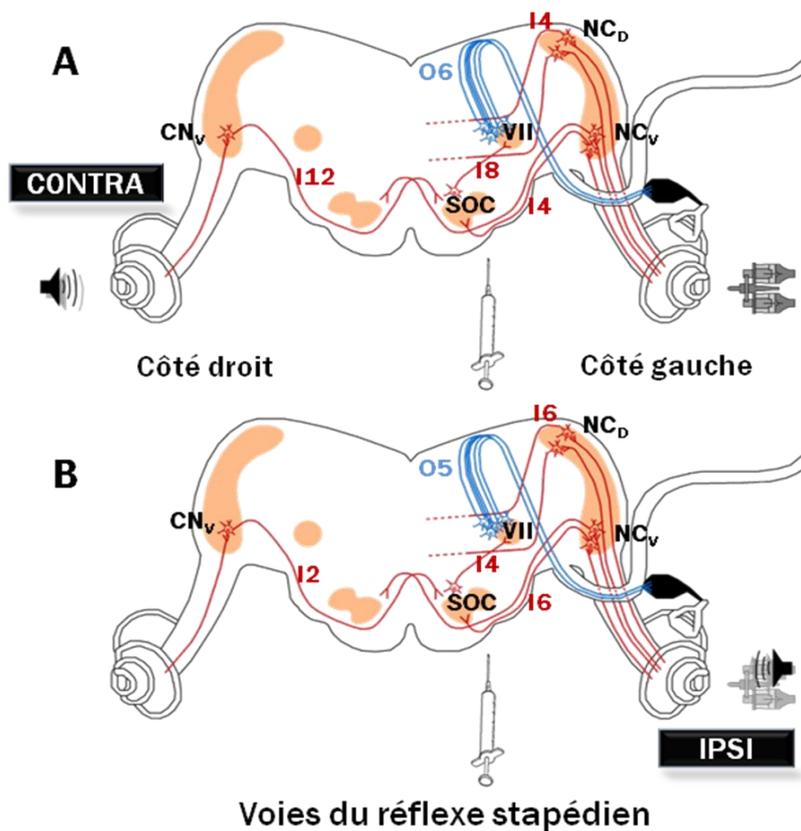


Figure 15-

Schéma général du parcours des fibres afférentes (en rouge) et efférentes (en bleu) impliquées dans le réflexe stapédien chez le rat. VII, noyau moteur du nerf facial.

(A) Stimulation acoustique contralatérale.

(B) Stimulation acoustique ipsilatérale.

I [Inputs], signaux afférents, arbitrairement côtés de 2 (bruit de fond) à 12 (stimulation acoustique contralatérale émise à 100 dB SPL).

O [Outputs], signaux des voies efférentes déclenchant la contraction des muscles de l'oreille moyenne en condition physiologique.

Cette hypothèse physiologique est illustrée Figure 16 où une stimulation acoustique déclenche une réponse des noyaux centraux soit directement via le noyau cochléaire dorsal (NC_D), soit indirectement via le SOC. Les messages auditifs sont codés par des potentiels d'action (PA ou *Input* [I] dans les illustrations) cheminant le long de fibres afférentes directes et croisées provenant des noyaux cochléaires dorsal et ventral (NC_D ; NC_V). Le message afférent, intégré par les noyaux centraux, est acheminé au noyau facial, qui déclenche le message efférent (*Output* [O] dans les illustrations) conduisant à la contraction du muscle stapédien. D'après ce modèle, les noyaux centraux analyseraient au moins trois sortes d'informations avant de déclencher le ROM.

Confrontation des résultats obtenus avec le modèle proposé.

La démonstration qui suit est illustrée en Figure 16. Les signaux afférents sont définis comme *inputs* [I], arbitrairement côtés de 2, pour le bruit de fond, à 12 pour la stimulation acoustique controlatérale émise à 100 dB SPL. Les signaux des voies efférentes déclenchant la contraction des muscles de l'oreille moyenne sont définis comme *outputs* [O].

La stimulation acoustique CONTRA, émise à 100 dB SPL, génère plus de PA [I12] que ceux générés par les primaires f_1 et f_2 dont l'intensité est de 65 dB SPL [I4]. Le SOC intègre les PAs provenant des voies ventrales directes [I4] et croisées [I12] pour produire une réponse pondérée qui pourrait avoir cette forme : $[(I12 + I4)/2 \Rightarrow I8]$. Le noyau facial, connecté au SOC par des inter-neurones, traite à son tour les informations provenant du SOC [I8] avec celles provenant du NC_D (IPSI), soit [I4]. Au final, le signal *output*, véhiculé par les motoneurones ($I8 + I4 \Rightarrow [O6]$), aura pris en compte la totalité des PAs émanant des voies afférentes, qu'elles soient issues des oreilles ISPI ou CONTRA, pour déclencher la contraction des muscles de l'oreille moyenne.

Si l'on considère **[O6]** comme un signal *output* d'intégration déclenchant le ROM, les données toxicologiques obtenues dans cette expérimentation montrent que le toluène peut perturber un ou deux niveaux d'intégration en fonction de sa concentration.

Ainsi, un bolus contenant 58 mM de toluène perturbe seulement le premier niveau d'intégration centrale : les PAs provenant du $NC_{V(IPS)}$. En conséquence, la région péri-olivaire ne reçoit que les PAs provenant du $NC_{V(CONTRA)}$ **[I12]**, et le noyau facial reçoit **[I12]** ainsi que les PAs provenant du NC_D **[I4]**. En injectant un bolus de 58 mM de toluène, on aboutit donc à un signal *output* **[O8]**, soit un signal *output* supérieur à celui obtenu dans la situation physiologique décrite précédemment (0 mM toluène ; **[O8]** > **[O6]**). Cette valeur élevée explique pourquoi une faible concentration de toluène augmente l'amplitude du ROM comparativement à celle obtenue en l'absence de toluène avec les mêmes paramètres (Figure 11B).

Inversement, un bolus contenant 116 mM de toluène perturbe le SOC dans son ensemble, aboutissant à un signal *output* **[O4]** (**[O4]** < **[O6]**). Ceci explique pourquoi l'amplitude de contraction du ROM était plus faible à cette concentration (Figure 11C).

Comme l'illustre la Figure 15B, les stimulations acoustiques émises côté IPSI déclenchent également des réponses des centres auditifs. Cependant, dans ces conditions, la totalité des PAs provoqués empruntent les afférences directes provenant du NC_D et du NC_V . En parallèle, l'oreille CONTRA est uniquement stimulée par le bruit de fond. Par conséquent, les PAs afférents peuvent être classés en deux catégories (Figure 16, colonne de droite): **[I2]** provenant du côté silencieux CONTRA et **[I6]** provenant du côté du bruit supprimeur, donc bruyant, IPSI. En condition physiologique, les PAs provenant des voies croisées sont alors rares puisqu'il n'y a pas de stimulation acoustique du côté IPSI. En revanche, les PAs provenant du $NC_{V(IPS)}$ $NC_{D(IPS)}$ sont nombreux : **[I6]**. Comme dans l'exemple précédent, les

centres auditifs traitent le message à deux niveaux : d'abord au voisinage du SOC, aboutissant à un *input* [I4], puis au noyau facial, générant un signal *output* [O5].

Comme précédemment, un bolus contenant 58 mM de toluène perturbe seulement le premier niveau d'intégration centrale : les PAs provenant du $NC_{V(IPS)}$. En conséquent, la région péri-olivaire transfère [I2] PAs au noyau facial, qui produit un signal *output* [O4]. Etant donné que $O4 < O5$, le toluène à 58 mM diminue l'amplitude de contraction du ROM lorsque le bruit supprimeur est émis en IPSI (Figure 12B). Par contre, un bolus de 116 mM de toluène perturbe le SOC dans son ensemble, aboutissant à un signal *output* [O6], qui dépend alors seulement des PAs [I6] provenant du $NC_{D(IPS)}$ après intégration via le noyau facial. Etant donné que $O6 > O5$, le toluène à 116 mM augmente l'amplitude de contraction du ROM lorsque le bruit supprimeur est émis en IPSI (Figure 12C).

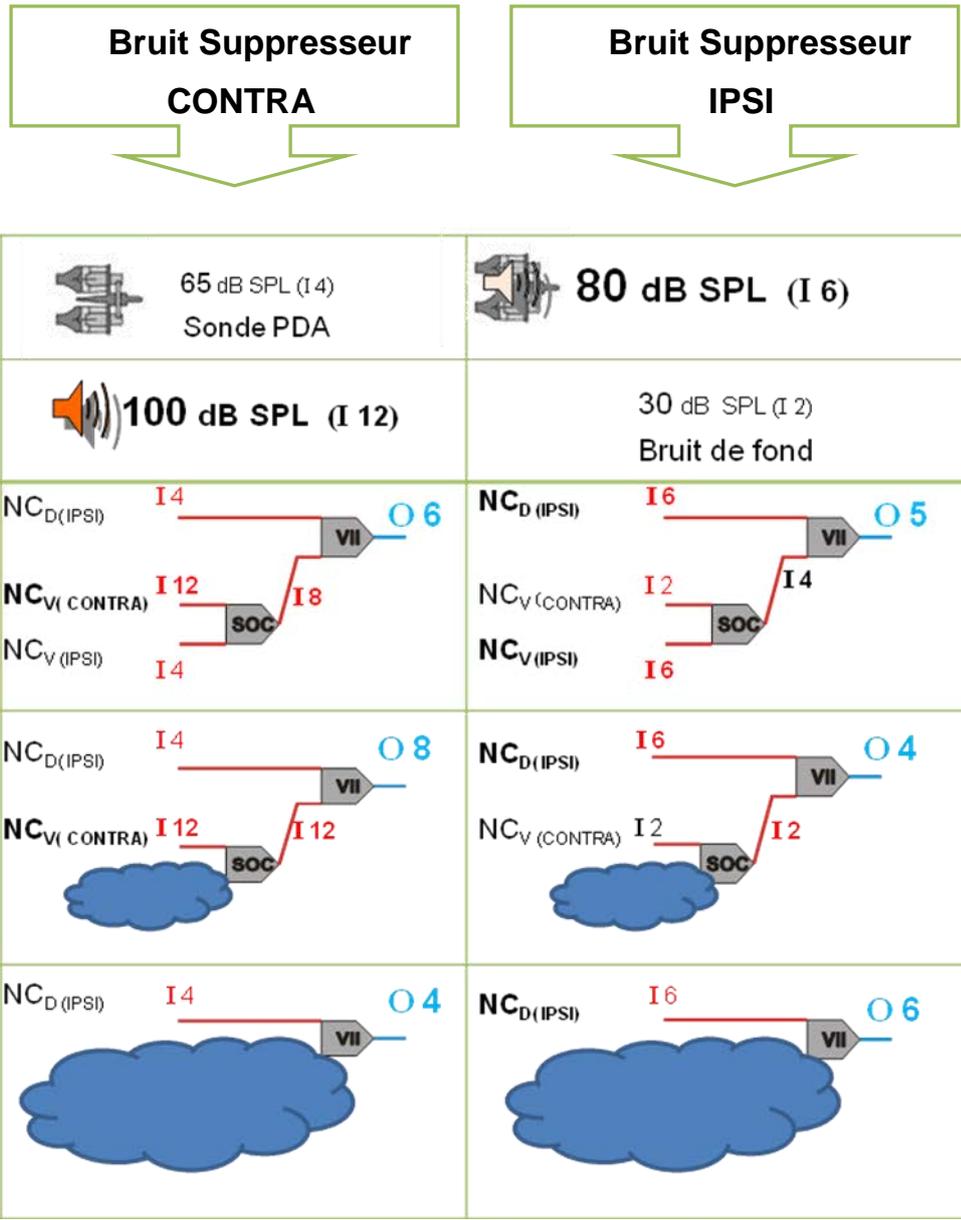


Figure 16-

Architecture fonctionnelle des circuits neuronaux impliqués dans le réflexe de l'oreille moyenne déduite des données toxicologiques obtenues. I [inputs] signaux afférents, arbitrairement côtés de 2, pour le bruit de fond, à 12, pour la stimulation acoustique controlatérale émise à 100 dB SPL. O [outputs], signal efférent déclenchant la contraction des muscles de l'oreille moyenne. Les nuages bleus masquent les régions contaminées par le toluène.

Résultats

Réflexe de l'oreille interne

I. Mesure de l'amplitude du réflexe olivo-cochléaire

Le *tensor tympani* et le muscle stapédien ont été sectionnés dans l'oreille testée (IPSI) de tous les animaux. Malgré cette intervention chirurgicale, l'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ a été mesurée en IPSI approximativement à 28 dB SPL. La présentation d'un bruit supprimeur controlatéral a provoqué une diminution significative ($MW = 0$; $p = 0,002$) de l'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ (Figure 17) correspondant au ROI. Les valeurs moyennes du ROI (moyROI) obtenues sur quatre animaux représentatifs étaient approximativement de 1,8 dB (voir Figure 17 pour illustration). Le calcul de l'amplitude du ROI a été réalisé selon la même méthode que celle décrite précédemment pour le ROM (voir p37).

Afin de s'assurer que les modifications d'amplitudes de PDAs observées étaient bien liées à un déclenchement du ROI et non à un artéfact lié à la transmission du bruit supprimeur d'une oreille à l'autre, une pré-étude a été réalisée sur trois animaux (données non fournies).

Chez ces trois animaux, en plus d'une section des muscles de l'oreille moyenne IPSI, l'oreille moyenne CONTRA a été détruite pour annuler le transfert trans-crânien. En d'autres termes, la conduction sonore à travers la base du crâne ne peut pas expliquer les résultats obtenus.

La relation entre l'intensité du bruit supprimeur et les variations d'amplitude des PDAs est reportée dans le Tableau 3. L'amplitude maximale du ROI mesurable avec cette technique était approximativement de 2 dB. Les variations d'amplitude obtenues avec un bruit supprimeur CONTRA délivré à 90, 100 ou 120 dB ont été suffisamment grandes pour être statistiquement significatives ($F(2,9) = 21,9$; $p < 0,05$). L'analyse *post hoc* de Bonferroni montre que le groupe 120 dB était différent des groupes 90 et 100 dB SPL.

Tableau 3-

Amplitude de variations du PDA $2f_1-f_2$ en fonction de l'intensité du bruit supprimeur délivré dans l'oreille controlatérale. Bruit de bande centrée sur 4 kHz ; durée des bouffées de bruit ou « bursts » : 2,5 s.

	Bruit Supprimeur, en dB ; muscles sectionnés		
	90	100	120
Rat n°1	0	0,5	2
Rat n°2	0	0,3	1,2
Rat n°3	0,5	0,7	1,2
Rat n°4	0,1	0,7	2
Moyenne ($n = 4$)	0,15	0,55	1,6
SD	0,15	0,15	0,15
Coefficient variation	158	35	29

II. Stimulation CONTRA, injection d'intralipide et muscles IPSI sectionnés

Une injection de toluène à 0 mM (intralipide seul) n'a pas provoqué de variation d'amplitude du PDA, quel que soit le côté de l'injection. Les données obtenues avec un rat représentatif des animaux de ce groupe ($n = 4$) sont illustrées en Figure 17A. Ces résultats ont permis de vérifier la neutralité du véhicule (intralipide) sur les résultats observés par la suite.

III. Stimulation CONTRA, injection de toluène IPSI et muscles IPSI sectionnés

La stimulation CONTRA combinée à une injection IPSI et une section IPSI des muscles de l'oreille moyenne a permis d'obtenir une moyROI de 1,7 dB environ. Les données obtenues avec un rat représentatif du groupe (n = 4) sont illustrées en Figure 17B. Le toluène était injecté dans le tronc carotidien IPSI, c'est-à-dire du côté de la mesure des PDAs. L'injection de 116 mM de toluène n'a pas modifié significativement l'amplitude moyenne du ROI (Test Bonferroni avant vs. pendant injection : $0,014 \pm 0,218$).

IV. Stimulation CONTRA, injection de toluène CONTRA et muscles IPSI sectionnés

En plus de la section des muscles de l'oreille moyenne du côté IPSI, une stimulation CONTRA et une injection de 116 mM de toluène CONTRA ont provoqué une augmentation inattendue de l'amplitude du ROI (Figure 17C). L'augmentation de 2 à 3 dB SPL (n = 4) était significative [$F(4,25) = 10,8$, $p < 0,001$; Test Bonferroni : différence significative de $0,586 \pm 0,218$].

V. Stimulation CONTRA, injection de toluène CONTRA et muscles sectionnés IPSI et CONTRA

Chez les rats dont les muscles des deux oreilles moyennes ont été sectionnés, une stimulation CONTRA a permis d'obtenir une amplitude de PDAs d'environ 27 dB SPL et une amplitude du ROI de 1,2 dB (Figure 17D). Seuls trois rats ont été testés dans ces conditions expérimentales (n = 3). L'injection de toluène CONTRA (116 mM) n'a pas modifié

significativement l'amplitude du ROI (Test Bonferroni avant vs. pendant injection : $0,054 \pm 0,239$).

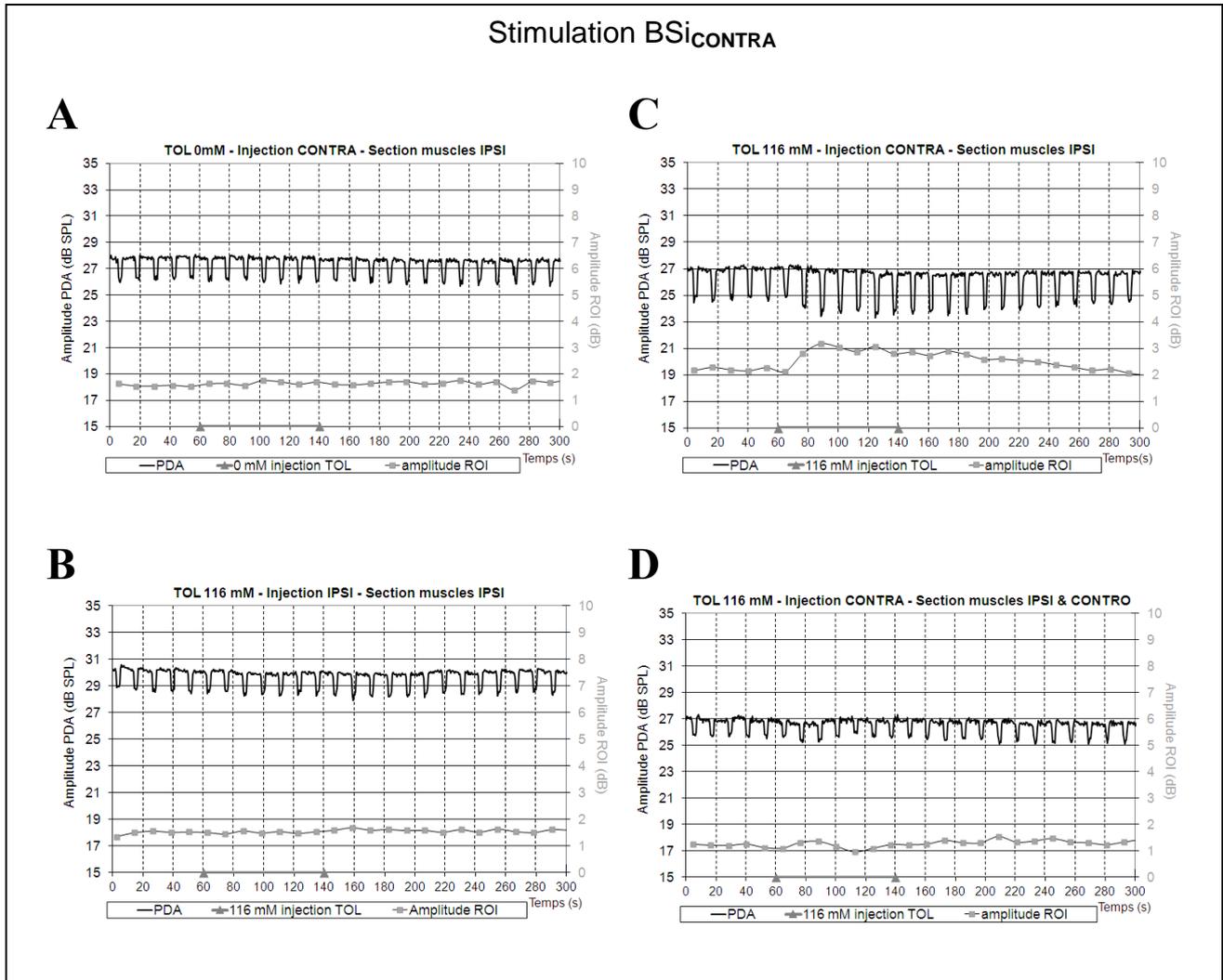


Figure 17-

Variations de l'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ et efficacité du réflexe de l'oreille interne avant, pendant et après une injection d'un bolus de 266 μ L de véhicule contenant (A) 0 mM (B, C, D) 116 mM de toluène pendant 80 s (triangles gris). Les primaires étaient délivrés dans l'oreille ipsilatérale (IPSI) : $f_1 = 8000$ Hz et $f_2 = 9600$ Hz à $L_1 = 65$ dB SPL et $L_2 = 60$ dB SPL respectivement. $f_1/f_2 = 1,2$. Le bruit suppresser (BSi) était un bruit de bande de 800 Hz centrée sur 4 kHz et émis à 100 dB SPL du côté controlatéral (CONTRA). Dans tous les cas les muscles *tensor tympani* et stapédien étaient sectionnés côté IPSI. Chaque courbe correspondant à un animal représentatif du groupe. (A) $n = 4$; (B) $n = 4$; (C) $n = 4$; (D) $n = 3$.

Discussion

Réflexe de l'oreille interne

Différentes approches ont été utilisées pour tester les effets des neurones OC efférents, incluant les potentiels auditifs évoqués (Puel et al., 1988 ; Puria et al., 1996) ou les otoémissions évoquées (Liberman et al., 1996). Dans notre approche expérimentale, les PDAs $2f_1-f_2$ ont été utilisés pour tester la protection cochléaire apportée par le système OC. Avec un bruit supprimeur CONTRA, et en sectionnant préalablement les muscles de l'oreille moyenne du côté testé (IPSI), une diminution faible, mais significative, de l'amplitude du PDA a été mesurée. La réponse était intensité-dépendante et s'échelonnait de 0,1 à 2 dB (Tableau 3).

Le déclenchement du ROI provoque une diminution de l'amplitude du PDA d'environ 2 dB, soit une variation très faible en comparaison de la diminution de 12 dB mesurée lors du déclenchement du ROM (Venet et al. 2011). Ceci illustre la différence importante qui existe entre ces deux réflexes en terme d'efficacité de protection auditive, conséquence du rôle respectif de chaque réflexe : le ROM modifie la compliance de la chaîne tympano-ossiculaire et par là-même diminue l'énergie acoustique qui pénètre dans la cochlée, alors que le ROI module, à l'échelle micro-mécanique, l'absorption de l'énergie acoustique par la membrane basilaire. Etant donné les effecteurs ciblés par chacun de ces réflexes, l'amplitude de leurs effets est différente.

Les données toxicologiques obtenues au cours de cette étude ont montré que le ROI était plus résistant que le ROM au toluène injecté via la carotide interne. Un bolus de 116 mM de toluène injecté via le tronc carotidien IPSI n'a pas modifié l'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ (Figure 17B). Ces données indiquent que l'injection de toluène dans le tronc carotidien n'altère aucun

des éléments constituant le réflexe OC : le récepteur auditif, la cochlée, ou le noyau OC médian.

A l'inverse, la même quantité de toluène injectée dans le tronc carotidien CONTRA a augmenté significativement l'efficacité du réflexe OC (Figure 17C). Pour mémoire, la valeur moyROI était de 2 dB avant injection et elle a augmenté de 3 dB pendant les 20 premières secondes de l'injection. A la lumière des résultats obtenus précédemment sur le ROM, nous avons suspecté un effet sur les noyaux centraux impliqués dans le ROM controlatéral : noyaux péri-facial et OC médian (Venet et al. 2011). Ceci a été confirmé en sectionnant de manière bilatérale les muscles de l'oreille moyenne (Figure 17 D), précaution qui a annulé l'effet d'augmentation décrit précédemment (Figure 17C). Ainsi, les résultats illustrés par la Figure 17C peuvent être expliqués par une inhibition de la protection offerte par le ROM controlatéral, permettant la pénétration d'un niveau plus élevé d'énergie acoustique dans la cochlée CONTRA.

Le réflexe OC est bilatéral et ses effets sur le PDA dépendent de l'intensité de la stimulation. Aussi, l'augmentation d'amplitude mesurée dans l'oreille IPSI était-elle due seulement à une augmentation du bruit pénétrant la cochlée CONTRA par inhibition du ROM.

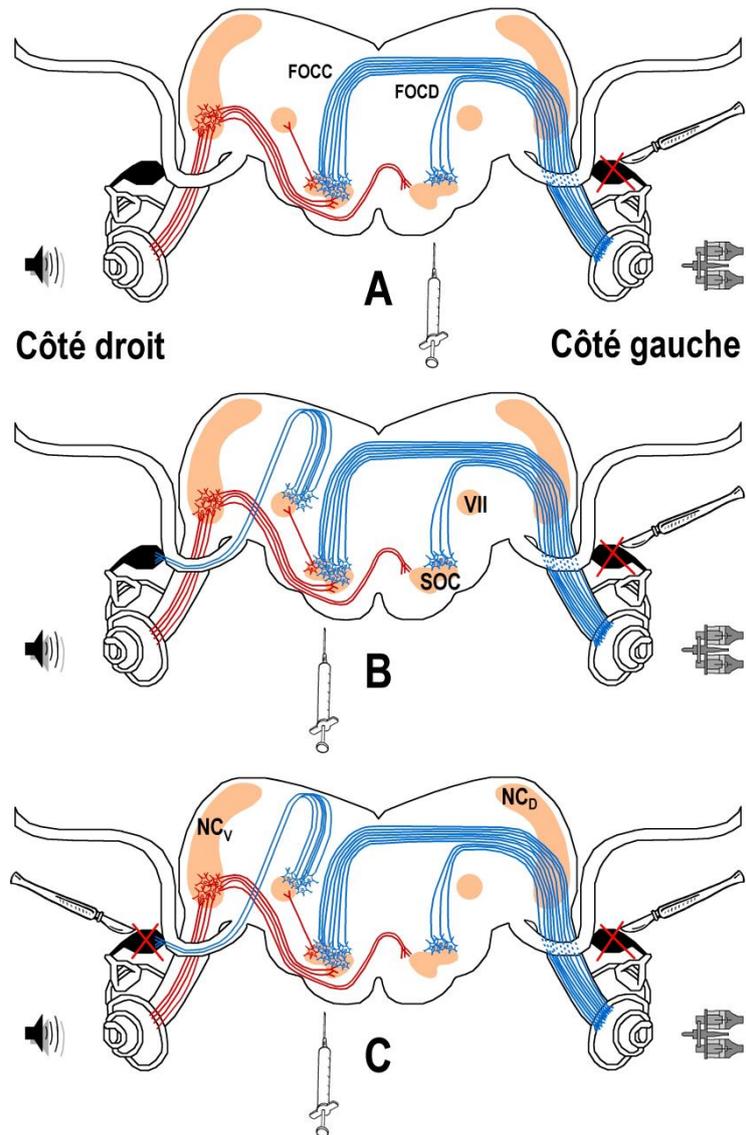


Figure 18-

Schéma général du parcours des fibres afférentes (en rouge) et efférentes (en bleu) impliquées dans le réflexe de l'oreille moyenne et le réflexe olivo-cochléaire chez le rat. VII, noyau moteur du nerf facial. NC_D et NC_V, noyaux cochléaires dorsal et ventral. SOC, Complexe olivaire supérieur. FOCC, Faisceau olivo-cochléaire croisé. FOCD, Faisceau olivo-cochléaire direct.

L'activité des neurones OC peut également protéger le récepteur périphérique, la base de la cochlée essentiellement, des dommages causés par les sons de forte intensité. Ceci passe principalement par une modification des micro-mécanismes cochléaires au niveau des cellules ciliées externes (Lim, 1986 ; Pujol, 1994 ; Cooper et Guinan, 2006).

Sachant que le ROI et le ROM partagent par leur architecture fonctionnelle le noyau olivaire médian au sein du SOC (Figures 15 et 18), la résistance du ROI au toluène ne peut s'expliquer que par un câblage différent des neurones efférents. Les neurones olivo-cochléaires (OC) médian forment la voie efférente du ROI (voir § physio). Le système OC médian est constitué de fibres croisées (FOCC) et directes (FOCD) (Warr et al., 1986). Les FOCC répondraient mieux à une stimulation acoustique ipsilatérale alors que les FOCD seraient plus sensibles à une stimulation acoustique controlatérale (Lieberman et Brown, 1986).

Les données toxicologiques présentées dans cette étude montrent que, chez le rat anesthésié, les FOCC et les FOCD du complexe olivaire médian affectent le ROI de façon équivalente. La présence de l'une des deux branches de fibres semble donc suffisante pour activer un fonctionnement « normal » du ROI. Dans les schémas expérimentaux utilisés, soit les FOCC, soit les FOCD étaient préservées et suffisantes pour déclencher un ROI approprié. En d'autres termes, la voie d'intoxication utilisée dans cette étude n'a pas suffi à neutraliser les circuits neuronaux impliqués dans le ROI. Pour inhiber simultanément les FOCC et les FOCD, il aurait fallu réaliser une injection de toluène synchrone dans les deux carotides ; mais un tel protocole expérimental aurait été létal avant toute mesure des réflexes acoustiques. En conséquence, il est nécessaire de développer et de tester une nouvelle voie d'administration qui pourrait permettre l'intoxication simultanée des deux noyaux centraux ou des deux contingents de fibres (FOCC et FOCD). Cette méthode pourrait alors être utilisée pour démontrer les effets du toluène sur le ROI.

Conclusions de la 1^{ère} partie

L'amplitude du ROI, à l'instar du ROM, dépend de l'intensité du bruit supprimeur. En revanche, ces deux réflexes se distinguent par leur sensibilité différente au solvant. La résistance du ROI au solvant s'appuie essentiellement sur une organisation séparée des FOCC et des FOCD. En effet, un faisceau unique OC intact apparaît suffisant pour maintenir l'efficacité du ROI. Etant donné l'absence d'effets mesurables du toluène sur le ROI dans nos conditions expérimentales, il est probable que les effets synergiques d'une co-exposition au bruit et au toluène soient principalement liés à l'effet déprimeur du solvant sur les noyaux centraux dirigeant le ROM.

Le protocole de mesure utilisé dans ces expérimentations est ainsi capable de fournir une mesure précise de l'état de fonctionnement des arcs réflexes du ROM et du ROI. Etant donné la puissance de l'outil dans l'évaluation des effets du toluène sur le ROM, l'adaptation pour l'homme de ce nouveau paradigme de mesure sera particulièrement pertinente pour étudier les effets pharmacologiques des solvants aromatiques ou d'autres substances chimiques, seules ou en association avec le bruit. Un prototype, baptisé EchoScan, a été mis au point à cet effet au laboratoire. L'évaluation de ses performances chez l'homme fait l'objet de la deuxième partie de ce mémoire. Si le champ d'investigation apparaît d'emblée immense en médecine du travail, d'autres applications seront également explorées, comme par exemple l'étude des effets pharmacologiques des anesthésiques sur le ROM. (voir en *perspectives*)

Deuxième partie

Expérimentation clinique chez l'homme

*1^{ère} étude : Développement et
validation d'un nouvel outil de
mesure adapté à l'homme :*

l'EchoScan

Introduction

L'atteinte auditive indemnisable au titre de maladie professionnelle est une surdité de perception bilatérale, avec une élévation moyenne des seuils auditifs, déterminés par audiométrie tonale liminaire, supérieure ou égale à 35 décibels [dB(HL)] sur la meilleure oreille. Cette moyenne est calculée sur les valeurs des seuils auditifs aux fréquences 500, 1000, 2000 et 4000 Hz. Il s'agit d'une atteinte auditive irréversible, en rapport avec des lésions cochléaires irréparables. La prise en charge ne peut donc être que palliative, avec adaptation d'un appareillage de correction auditive.

La prévention contre les traumatismes acoustiques est donc primordiale, c'est pourquoi les réglementations successives se sont intéressées à protéger le salarié des effets du bruit. La plus récente de ces réglementations est la directive « Bruit » 2003/10/CE du Parlement européen, transposée en droit français par le décret 2006-892 du 19 juillet 2006.

A l'heure actuelle, la surveillance des salariés exposés à des ambiances bruyantes est basée sur la réalisation d'une audiométrie tonale liminaire, qui doit être effectuée dans une cabine insonorisée, avec un audiomètre calibré. C'est l'article R241-49 du Code du Travail qui réglemente le nombre minimum de contrôles audiométriques à réaliser au cours de la vie professionnelle des salariés exposés au bruit. Tout salarié exposé à un $L_{EX,8h}$ supérieur ou égal à 85 dB(A), ou à une pression acoustique de crête (P_c) supérieure ou égale à 135 dB(C), doit ainsi faire l'objet d'un plan de surveillance médicale renforcée. Une audiométrie tonale liminaire est alors réalisée à l'embauche, une fois dans l'année suivant l'affectation, puis à une fréquence allant de une fois tous les trois ans à une fois par an en fonction des mesures d'ambiance sonore ($L_{ex,8h}$ et P_c).

Cet examen présente malgré tout deux limites. La première est son caractère subjectif, nécessitant la coopération du patient et la bonne compréhension de la consigne. La seconde est son faible apport en termes de prévention, puisque l'augmentation des seuils audiométriques peut traduire une élévation de la sensibilité auditive liée à des lésions histologiques définitives. Ceci en fait un outil peu satisfaisant pour une utilisation de dépistage. Il n'y a aujourd'hui aucun test précoce d'atteinte auditive qui soit utilisé en médecine du travail, et a fortiori aucun test objectif capable de déterminer les effets pharmacologiques des expositions chimiques.

A la lumière des résultats obtenus précédemment (Venet et al. 2011), en cas d'exposition aux solvants aromatiques, en particulier en cas d'exposition combinée avec le bruit, la mesure du réflexe stapédien, principal acteur du ROM chez l'homme, pourrait être adaptée pour évaluer et quantifier les effets de l'exposition. La mesure de l'amplitude du réflexe stapédien est en routine réalisée par le test de Metz. L'instrument de mesure utilisé pour ce test est l'impédancemètre, dont la précision (classiquement $\pm 5\text{dB}$) et la sensibilité pourraient être insuffisantes dans cette application (Feeney et Keefe, 2001 ; Guinan et al., 2003).

En adaptant pour l'homme le protocole de mesure utilisé chez le rat, nous proposons d'obtenir en une seule mesure objective des informations sur le fonctionnement cochléaire (PDA) et sur le réflexe stapédien. Cette mesure ne nécessite aucune participation du patient et peut être réalisée sans cabine insonorisée, sous réserve d'une ambiance calme.

Le dispositif de mesure mis au point au laboratoire a été baptisé EchoScan.

Il s'agit d'un dispositif contenant deux sondes reliées à un ordinateur :

- une sonde comprend trois transducteurs pour la mesure des PDAs. Deux transducteurs émetteurs, avec une bande passante allant de 200 Hz à 12 kHz, qui génèrent les deux

primaires (sons purs) f_1 et f_2 . Un transducteur récepteur mesure la pression acoustique dans le conduit auditif externe.

- une sonde controlatérale délivre une stimulation acoustique afin de déclencher le ROM (Figure 19).

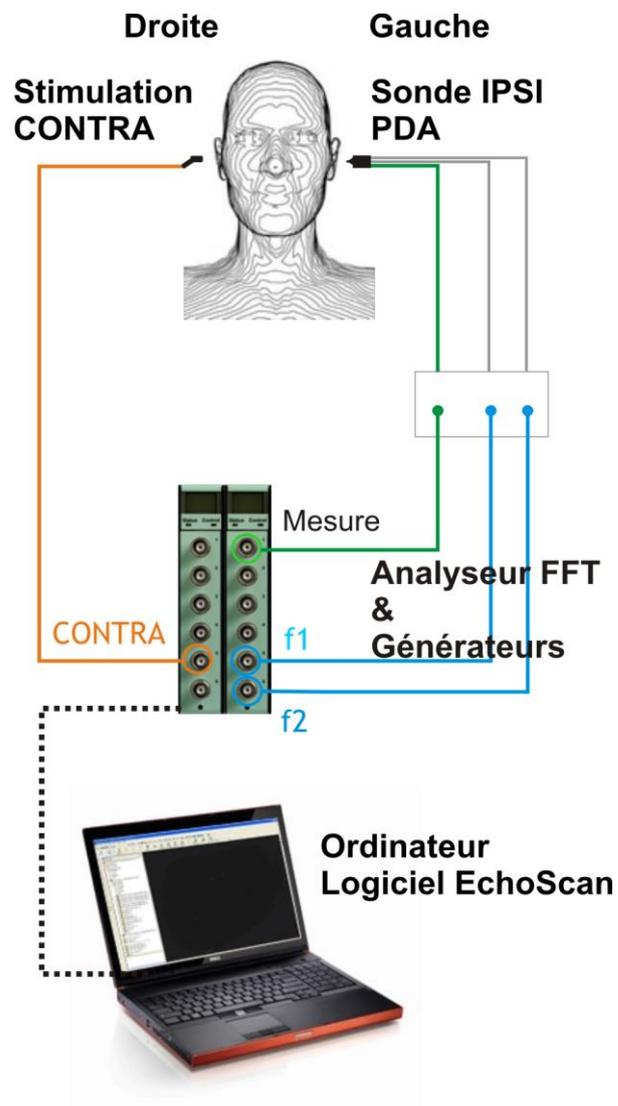


Figure 19-
Présentation du dispositif EchoScan

L'équipement permet de recueillir les PDA tout en exerçant une stimulation sonore controlatérale déclenchant le ROM. Une collaboration entre le service d'ORL et chirurgie cervico-faciale du Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, et l'INRS, a permis d'élaborer

un protocole de recherche dont l'objectif était d'évaluer, chez l'homme, l'innocuité, les performances, et la reproductibilité des mesures en clinique. L'analyse portait également sur la comparaison des données obtenues avec l'EchoScan et les outils cliniques existant : audiométrie tonale liminaire et impédancemétrie. Le protocole a été validé par l'AFSSAPS (UEC /AnnR/DA/2010-212, CPP n°10.07.02, IDRCB n°2010-A00551-38, Investigateur principal : Pr Parietti-Winkler).

Matériels et Méthodes

I.Participants

La population regroupait 50 sujets dont 24 femmes et 26 hommes, normo-entendants (Tableau 4).

Tableau 4-
Distribution de la population étudiée en classes d'âge et de sexe

Sexe	Classe d'âge (années)					Total
	20-29	30-39	40-49	50-59	60+	
Femme	7	6	2	8	1	24
	29,17%	25,00%	8,33%	33,33%	4,17%	100 %
Homme	8	12	4	1	1	26
	30,77%	46,15%	15,38%	3,85%	3,85%	100 %
Total	15	18	6	9	2	50
	30%	36%	12%	18%	4%	100 %

Pour être inclus au sein du protocole, les participants volontaires devaient être âgés de 18 à 65 ans, avoir un examen otoscopique et un bilan audiométrique normaux pour l'âge, avoir donné leur consentement écrit, être affilié à la sécurité sociale et ne pas être déjà engagé dans un autre protocole de recherche biomédicale.

Les critères d'exclusion regroupaient : la présence d'antécédents otologiques dans les 5 dernières années, une pathologie de l'oreille externe ou moyenne mise en évidence à l'otoscopie, un traitement médicamenteux par diurétique, myorelaxant et/ou morphinique, un antécédent récent d'hospitalisation pour motif chirurgical otologique ou rhinologique, une anomalie au bilan audiométrique et/ou impédancemétrique et un seuil de déclenchement du réflexe acoustique supérieur à 90 dB.

L'audiométrie tonale liminaire a été réalisée pour des fréquences de 500 à 8000 Hz (*Interacoustics AC 40*). Les sujets souffrant d'un déficit auditif supérieur à 30 dB sur les fréquences inférieures à 4000 Hz ont été exclus. L'impédancemétrie a été réalisée à l'aide d'un appareil clinique (*GSI Tymptstar, 2000-97XX*) dont la sonde délivre un son de 226 Hz avec une pression statique variant de -200 à 200 daPa/s dans le conduit auditif externe. Un tympanogramme normal, avec pic de compliance centré sur le zéro atmosphérique, était requis (Type A), ainsi que la mise en évidence d'un réflexe stapédien.

Les sujets ont été suivis pendant 2 jours, ils bénéficiaient d'une première série de mesures avec l'EchoScan à J0, puis de deux séries de mesure à J1, à une heure d'intervalle. Pour limiter l'impact d'un possible effet de l'heure de mesure sur nos résultats, les tests à J0 et J1 ont été effectués à des horaires identiques (Cacace et al., 1996).

II. Mesures EchoScan

Trois types de mesures ont été pratiqués avec l'EchoScan dans cette étude.

II.1. Enregistrement des produits de distorsion acoustique (PDAs)

II.1.1. Courbes « entrée / sortie » du PDA

La sonde de mesure des PDAs (Etymotic Research ER10C) était placée dans l'oreille IPSI. La bande passante des transducteurs était de 200 Hz à 12 kHz à ± 10 dB. L'émission des primaires était assurée par deux synthétiseurs (Pulse, B et K 3610) connectés à la sonde.

Le ratio f_2/f_1 était de 1,2 afin d'obtenir le maximum d'amplitude du PDA $2f_1-f_2$. Quatre couples de fréquences (f_1, f_2) ont été testés (1000, 1200), (2000, 2400), (3000, 3600), (4000, 4800) Hz. Pour chaque couple de fréquences, l'amplitude des PDAs était enregistrée en fonction de l'intensité de f_1 (L_1), qui s'échelonnait de 49 à 70 dB HL par pas de 3 dB selon une procédure de type « entrée/sortie ». Le niveau des primaires répondait à la formule $L_2 = L_1 - 6$ dB HL (Gaskill et Brown, 1990 ; Whitehead et al. 1995 ; Neely et al. 2009). L'intensité maximale était fixée à 70 dB pour ne pas risquer de stimuler le ROM en IPSI.

La calibration des primaires a été réalisée selon les standards ISO 389-2 et IEC 60318-4. L'amplitude des PDAs était déterminée par analyse FFT (résolution 8 Hz) : un moyennage temporel de 250 ms ($N = 4$) est réalisé. Ce spectre moyen de 250 ms est alors contrôlé pour vérifier l'émergence du PDA à la fréquence $2f_2-f_1$, vis-à-vis du bruit de fond mesuré sur les 6 raies spectrales adjacentes. Si l'émergence est supérieure à 6 dB, ce spectre est retenu pour le calcul du niveau de PDA. Cette mesure est renouvelée 20 fois soit une durée totale d'analyse de 5 s. Le niveau de PDA retenu est la moyenne des valeurs respectant le critère d'émergence du bruit de fond. Si au moins 7 des 20 valeurs sont correctes (33%) alors le niveau de PDA est jugé valable, sinon la valeur est jugée non représentative.

II.1.2.DPgramme

Les PDAs ont été également mesurés sous forme de DPgramme. Il s'agit de mesurer les PDAs à une intensité de primaires constante ($L1 = 62$ dB HL, $L2 = 56$ dB HL) mais en augmentant la fréquence $f2$, de 1008 à 8064 Hz. Les intensités des primaires utilisées pour générer les PDAs étaient exprimées en dB HL pour être compatibles avec la convention adoptée en audiométrie tonale. En revanche, l'amplitude des PDAs mesurée avec l'EchoScan était mesurée en dB SPL.

II.2.Enregistrement entrée / sortie du réflexe stapédien

L'écouteur CONTRA utilisé pour déclencher le réflexe stapédien, était un Etymotic Research ER4B, de bande passante 20 Hz à 16 kHz à ± 4 dB, connecté à un synthétiseur B et K Pulse 3610. L'intensité d'émission variait de 65 à 95 dB HL. La limite supérieure a été fixée à 95 dB pour éviter tout effet secondaire potentiel sur l'appareil auditif des participants, en particulier traumato-sonore. Cet émetteur était calibré selon la même procédure que la sonde IPSI. Le bruit CONTRA était un bruit de bande de 800 Hz centrée sur une fréquence variant de 500 à 4000 Hz (500, 1000, 2000 et 4000Hz). Chaque bouffée de bruit ou « burst » durait 2 s.

Le PDAs $2f1-f2$ était mesuré avant et pendant la stimulation controlatérale afin de détecter une diminution d'amplitude induite par l'activation du réflexe stapédien.

III. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant des modèles mixtes linéaires à effets aléatoires pour évaluer les effets de l'âge et du sexe. La significativité du seuil du ROM a été déterminée pour chaque mesure par un test de Student. La significativité a été fixée avec un risque alpha de 5 % ($p < 0,05$). Les associations entre les seuils obtenus en audiométrie tonale et le DPgramme d'une part, et entre les résultats du ROM provoqué par l'impédancemétrie et par l'EchoScan d'autre part, ont été testées par calcul de corrélation (coefficient de corrélation de Pearson). Le niveau de significativité est indiquée dans les figures et les tableaux par : $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ et $***p < 0,001$.

Résultats

I. Mesure des PDAs

L'augmentation de l'amplitude des PDAs en fonction de l'intensité de f_1 en dB HL est présentée dans la Figure 20A pour quatre couples de primaires définis par la fréquence f_2 (1200 Hz, 2400 Hz, 3600 Hz et 4800 Hz). Les courbes « entrée/sortie » sont illustrées par les données obtenues chez un sujet. Elles sont représentatives de la majorité des résultats.

La croissance de l'amplitude des PDAs était linéaire jusqu'à 65 dB HL aux fréquences $f_2=3600$ Hz et 4800 Hz (Figure 20A). Au dessus de 65 dB HL, l'amplitude des PDAs sature, et, du coup, l'effet du ROM sur l'amplitude des PDAs devient difficilement détectable, d'où un risque de sous-estimer le ROM (Figure 20B).

Compte tenu de cette zone de saturation, le choix des intensités des primaires utilisées dans la mesure « entrée / sortie » du ROM était dicté par les résultats de cette première mesure.

I.1. Entrée / sortie des PDAs vs. âge et sexe

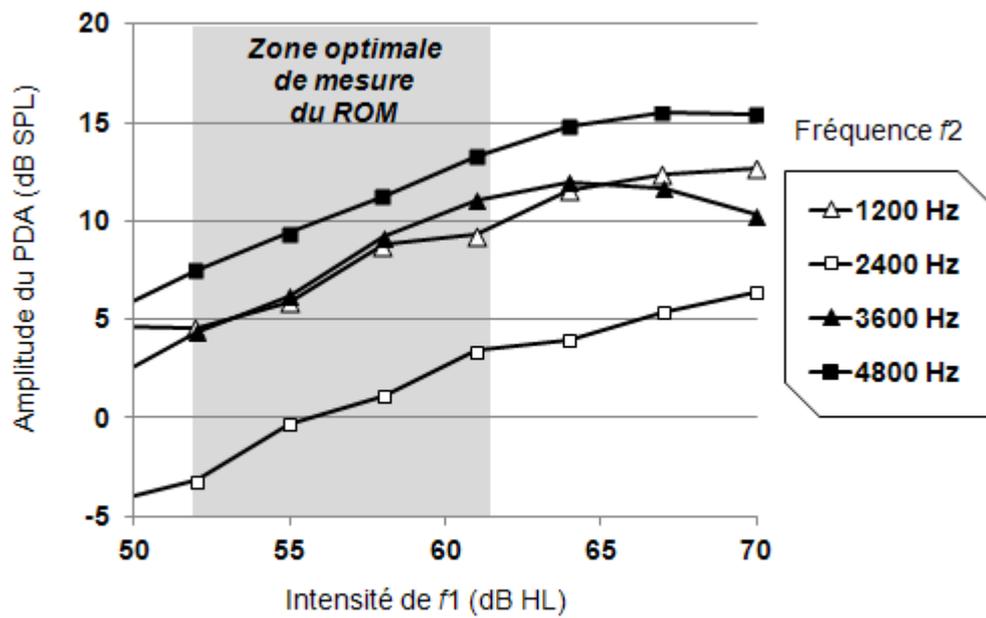
Le Tableau 5 montre l'analyse statistique des PDAs en fonction de l'âge et du sexe.

Un effet-âge et un effet-sexe ont été observés à 4800 Hz ($p < 0,05$).

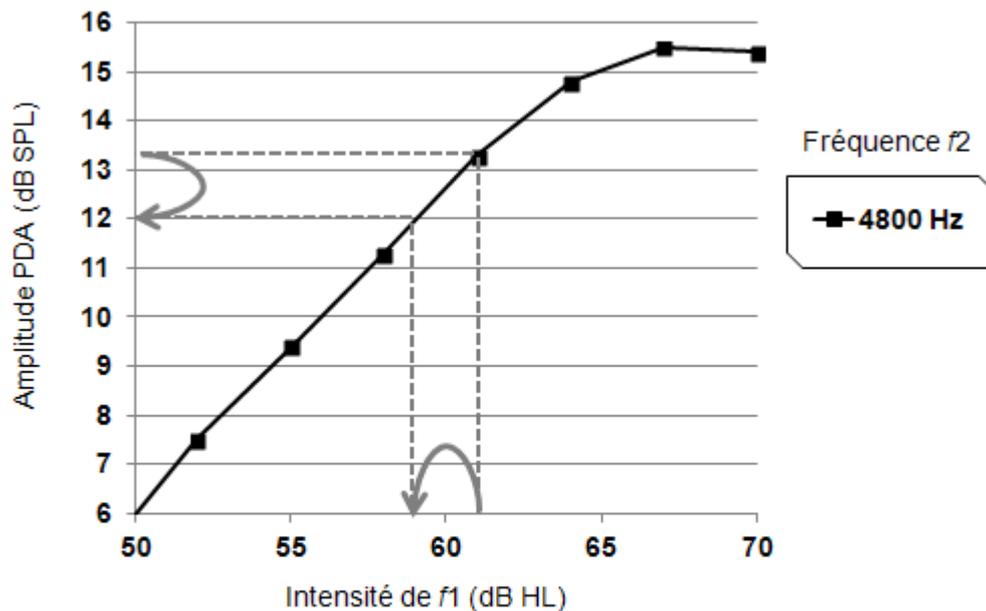
Une différence significative de 3,7 dB entre hommes et femmes a été observée à 4800 Hz ($p < 0,05$) et une différence de 1,8 dB a été notée à 3600 Hz.

Les résultats des mesures de PDAs étaient reproductibles dans le temps (J0 – J1) pour chaque sujet et pour toutes les fréquences testées. De même, les variations entre les sujets étaient inférieures à 5 dB, ce qui est comparable aux variations observées lors des mesures en audiométrie tonale liminaire (Tableau 7).

A



B



Réduction d'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ sous l'effet du ROM

Figure 20-

Amplitude des PDAs en fonction de l'intensité de la primaire f_1 chez le sujet n°7.

A : l'aire grisée correspond à la zone de croissance linéaire

B : une diminution de l'intensité de f_1 entraîne une diminution de l'amplitude des PDA

Les fréquences présentées en légende correspondent à f_2

Tableau 5-

Analyse statistique de la mesure des PDAs en fonction de l'âge et du sexe.

« Intercept » correspond à la valeur prédictive pour un homme âgé de 20 ans calculée par le modèle mixte à effet aléatoire.

« * » résultat significatif $p < 0,05$

« ** » résultat significatif $p < 0,01$

« *** » résultat significatif $p < 0,001$

<i>Amplitude maximale des PDAs (dB SPL)</i>	$f_2 = 1200$ Hz	$f_2 = 2400$ Hz	$f_2 = 3600$ Hz	$f_2 = 4800$ Hz
Effet âge (dB/an)	-0.08	-0.05	-0.07	-0.14*
Erreur standard	0,06	0,05	0,06	0,06
Effet sexe (dB)	0,52	0,25	1,83	3,73*
Déviatiion standard	1,33	1,25	1,29	1,46
Intercept	13,90 ***	8,791 ***	9,073 ***	14,07 ***
Erreur standard	2,15	1,98	2,13	2,36
Déviatiion standard entre les sujets	4,19	3,99	4,36	4,96
Déviatiion standard au sein des sujets	0,91	1,03	0,71	0,77
Nombre de mesures <i>n</i>	112	121	137	143

I.2. Seuils de PDA en fonction de la fréquence : le DPgramme

Un effet significatif de l'âge et du sexe a été confirmé à 4800 Hz et pour des fréquences plus élevées (6528 Hz et 8064 Hz) (Tableau 6).

L'effet-âge était plus visible avec le DPgramme qu'avec les mesures « entrée / sortie » du fait de la fréquence élevée des primaires (jusqu'à 8 kHz) testées. Nous avons pu mesurer une diminution significative de l'amplitude des PDAs de 0,19 dB par année pour les fréquences allant de 4800 à 8064 Hz ($p < 0,05$).

De même l'effet-sexe était plus significatif dans les hautes fréquences. Les femmes obtenaient des amplitudes de PDAs statistiquement supérieures à celles des hommes (différence de 4,34 dB pour $f_2 = 2800$ Hz, $p < 0,05$).

Tableau 6-

Analyse statistique de l'amplitude du DPgramme en fonction de l'âge et du sexe.

L'« intercept » correspond à la valeur prédictive calculée par le modèle mixte à effet aléatoire pour un homme âgé de 20 ans.

« * » résultat significatif $p < 0,05$

« ** » résultat significatif $p < 0,01$

« *** » résultat significatif $p < 0,001$

<i>DPgramme</i> <i>L1 = 62 dB HL</i>	Fréquence f_2 (Hz)								
	1008	1200	2016	2400	3264	4032	4800	6528	8064
Effet âge (dB/an)	-0,06	-0,02	-0,03	-0,02	-0,10	-0,10	-0,18*	-0,20*	-0,19*
Erreur standard	0,05	0,07	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07
Effet sexe dB	-0,92	-1,47	-1,64	-1,85	2,04	3,89	4,34*	3,66*	1,98
Déviaton standard	1,16	1,56	1,45	1,37	1,38	1,78	1,76	1,65	1,55
Intercept	10,945 ***	10,81 ***	6,819 ***	5,37 ***	3,67 ***	5,33 ***	9,24 ***	10,30 ***	7,87 ***
Erreur standard	0,99	1,42	1,32	1,30	1,26	1,60	1,61	1,54	1,43
Déviaton standard entre les sujets	3,24	4,73	4,82	4,48	4,67	5,93	5,98	5,48	4,94
Déviaton standard au sein des sujets	1,28	1,12	1,04	0,99	0,10	0,92	0,74	1,63	2,90
n mesures	96	110	123	128	140	138	142	137	128

I.3.Comparaison du DPgramme avec l'audiogramme

Le Tableau 7 compare les données obtenues en audiométrie tonale liminaire et celles obtenues par le DPgramme, en fonction de la fréquence (déterminée par f_2 pour les PDAs). La variabilité inter-mesures des PDAs étaient corrélées aux variations des seuils obtenus par l'audiométrie tonale, soit environ 4 à 5 dB. Le Tableau 8 représente les corrélations entre les seuils obtenus en audiométrie tonale liminaire et les mesures du DPgramme. La diagonale grisée surligne les fréquences où une corrélation significative était retrouvée entre les résultats obtenus avec les deux instruments (coefficient de corrélation R supérieur à 0,14).

Tableau 7-

Valeurs d'audiométrie tonale (PTA) et de DPgramme en fonction de la fréquence. Les données grisées représentent les réglages différents utilisés pour l'audiométrie tonale liminaire et pour la mesure des DPgrammes, obtenus avec l'EchoScan.

DPgramme Hz		1008	1200	2016	2400	3264	4032	8064
Seuil dB		9.34	10.13	5.83	4.29	3.15	5.56	5.95
Déviati standard		3.2	4.53	4.72	4.35	4.63	5.96	5.68
PTA Hz	500	1000		2000		3000	4000	8000
Seuil dB HL	-11.78	-11.98		-10.72		-9.26	-10.19	-11.2
Déviati standard	3.80	4.82		4.52		5.57	5.36	7.89

Tableau 8-

Coefficients de corrélation entre les valeurs de l'audiométrie tonale (PTA) et les valeurs du DPgramme.

En grisé : corrélation significative ($R = \text{coefficient de corrélation} \geq 0,14$)

<i>DPgramme</i> <i>PTA</i>	1008 Hz	1200 Hz	2016 Hz	2400 Hz	3264 Hz	4032 Hz	4800 Hz	6528 Hz	8064 Hz
	0,26	0,22	0,00	0,10	-0,01	0,11	0,03	-0,03	0,14
1000 Hz	0,21	0,21	0,02	0,08	0,05	0,16	0,08	0,07	0,17
2000 Hz	-0,10	-0,03	0,32	0,41	0,49	0,37	0,38	0,25	0,42
3000 Hz	0,07	0,02	0,08	-0,07	0,18	0,07	0,14	0,18	0,37
4000 Hz	0,03	-0,04	0,01	-0,11	0,20	0,15	0,27	0,30	0,27
8000 Hz	0,15	0,05	-0,04	0,06	0,22	0,23	0,27	0,27	0,38

II. Mesure du déclenchement du réflexe stapédien en fonction de l'âge

L'effet de l'âge sur le déclenchement du réflexe stapédien est significatif à 4000 Hz ($p < 0,05$), malgré une grande variabilité inter-individuelle (Tableau 9). En revanche, il n'y a pas de différence significative liée au sexe.

Tableau 9-

Seuils de déclenchement du réflexe stapédien par EchoScan en fonction de l'âge.

Fréquences Hz	Classes d'âge années	Mesures n	Seuil dB HL	Déviations standard
500	20	13	77,11	7,06
	30	16	77,03	4,93
	40	17	79,41	4,96
1000	20	13	81,73	7,46
	30	16	78,91	4,91
	40	16	80,31	7,18
2000	20	13	79,81	5,44
	30	16	80,78	4,97
	40	15	82,00	5,91
4000*	20	13	76,92	7,23
	30	16	79,53	5,64
	40	16	82,50	6,77

III. Seuils du réflexe stapédien mesurés par l'EchoScan vs. impédancemétrie

Pour des intensités inférieures ou égales à 95 dB HL, les performances de l'EchoScan ont été meilleures que celles de l'impédancemètre dans la détection du ROM.

Ainsi, chez 25 % des sujets, ce réflexe n'a pas pu être mesuré par impédancemétrie, quelle que soit la fréquence testée, contre seulement 8% des sujets testés par l'EchoScan. La comparaison des seuils de déclenchement du réflexe stapédien par EchoScan et par impédancemétrie est illustrée Figure 21. La diagonale rouge est la ligne d'iso-sensibilité entre les deux instruments pour la mesure du seuil de déclenchement du réflexe. Pour les quatre fréquences testées, l'EchoScan apparaît plus sensible que l'impédancemètre.

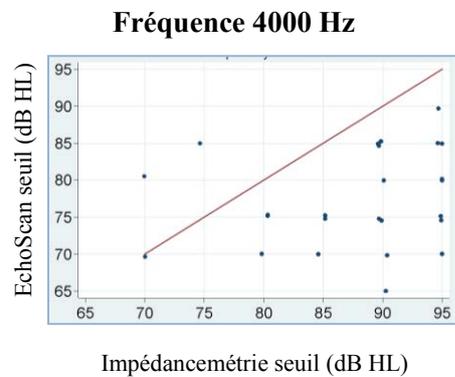
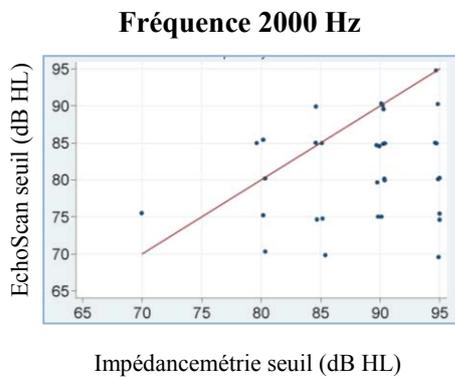
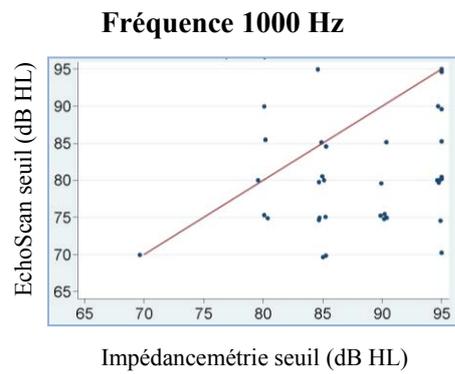
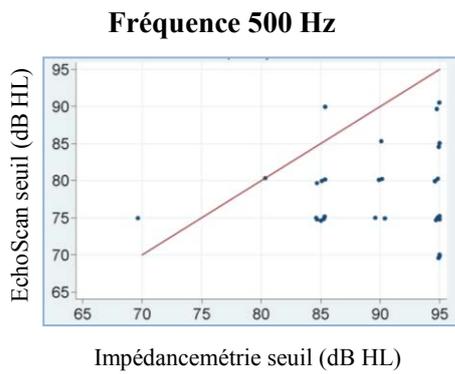


Figure 21-

Comparaison des seuils de déclenchement du réflexe stapédien mesurés par EchoScan et par impédancemétrie.

La diagonale rouge représente les valeurs pour lesquelles la sensibilité de détection des deux tests serait identique.

Discussion

Les résultats obtenus dans cette étude clinique montrent une étroite relation, fréquence par fréquence, entre les PDAs et les seuils auditifs mesurés en audiométrie tonale liminaire. L'avantage des PDAs est qu'ils fournissent une évaluation objective du traitement de l'information auditive à l'échelle de la biomécanique cochléaire (Lonsbury-Martin et al., 1990 ; Avan et Bonfils, 1993). Les courbes « entrée / sortie » des PDAs enregistrées avec l'EchoScan, chez des sujets ayant des seuils auditifs normaux pour leur âge, sont caractérisées par deux segments distincts : un segment à pente linéaire jusqu'à 65 dB et un plateau de saturation au delà (Figure 19). Les résultats étaient reproductibles pour un même sujet (Tableau 5) et les variations entre les sujets étaient au moins aussi bonnes que celles obtenues en audiométrie tonale liminaire (Tableau 7).

En fait, les différences observées (en moyenne 4 dB) tiennent, d'une part aux différences de norme d'étalonnage entre les deux appareils, et d'autre part, au fait que les unités de mesure sont différentes (dB HL pour l'audiométrie tonale et dB SPL pour les PDAs). De plus, l'intensité des primaires utilisée pour la mesure des PDAs n'était pas liminaire contrairement à celle de l'audiométrie tonale, qui s'accorde à rechercher un *seuil* auditif. Enfin, l'audiométrie tonale évalue une perception auditive reflétant le fonctionnement du système auditif dans son ensemble, alors que les PDAs sont spécifiques du fonctionnement cochléaire, et en particulier des CCEs. Il n'est donc pas forcément cohérent de chercher à comparer les performances de ces deux instruments sur un critère de précision en dB. En conséquence, la mesure des PDAs permet un dépistage objectif de la performance cochléaire sur une large bande de fréquence. C'est d'ailleurs cette qualité qui a permis pour certains d'envisager la mesure des PDAs comme outil objectif dans le dépistage auditif des nouveaux-nés et des jeunes enfants (Norton et al., 2000). En dehors de cette application, les PDAs restent par

contre assez peu utilisés dans les investigations cliniques chez l'adulte et totalement ignorés en médecine du travail.

Avant d'étudier les effets du bruit ou de certains toxiques chimiques sur l'audition, il est essentiel de prendre en compte le déclin des performances auditives lié à l'âge. Beaucoup d'études se sont intéressées aux effets de l'âge sur les PDAs et sur les seuils obtenus en audiométrie tonale (Gates et al., 1990 ; Rosenhall et al., 1990 ; Lonsbury-Martin et al., 1991 ; Oeken et al., 2000 ; Campo et al., 2011).

Les résultats obtenus dans notre étude montrent que le dispositif EchoScan peut être utilisé pour détecter les effets de l'âge. En effet, une diminution significative de l'amplitude des PDAs en fonction de l'âge a été trouvée pour les hautes fréquences. Cet effet de l'âge est probablement sous-estimé car lorsque les mesures n'étaient plus possibles, les données n'ont pas été enregistrées, et donc non prises en compte dans l'analyse statistique. La majorité des données manquantes concernaient des sujets de plus de 45 ans. Sur la base des résultats obtenus, l'EchoScan s'avère donc être un dispositif adapté pour détecter et suivre la cinétique de la presbyacousie cochléaire (Tableaux 5, 6 et 9).

L'influence du sexe sur l'amplitude des PDAs a également été mise en évidence. L'amplitude des PDAs chez les femmes était dans notre étude supérieure à celle des hommes pour $f_2 = 4800$ Hz. De nombreux travaux ont souligné cette différence d'amplitude des otoémissions en fonction du sexe, proposant des hypothèses variées pour l'expliquer : taux plus important d'otoémissions spontanées chez la femme (Moulin et al., 1993), influence possible de la taille des individus ou de caractéristiques physiques de l'oreille moyenne (Dreisbach et al., 2007). Plus récemment, McFadden (en 2011) a même proposé l'hypothèse d'un lien entre orientation sexuelle et « masculinisation » du système auditif, qui seraient déterminés par l'exposition aux androgènes pendant la période prénatale...

Un point-clé de cette étude concerne la détection du réflexe stapédien. C'est en effet dans le but de tester la sensibilité du ROM aux agents chimiques et au bruit que le prototype a été conçu. Le paradigme de mesure associé à l'EchoScan réalise un enregistrement continu des PDAs avant, pendant et après une stimulation acoustique controlatérale adaptée ; il informe donc à la fois sur l'état fonctionnel de la cochlée et sur l'amplitude du réflexe stapédien. L'amplitude des PDAs $2f_1-f_2$ renseigne sur l'état du capteur périphérique, et plus précisément sur le fonctionnement des CCEs de l'organe de Corti. Les variations d'amplitude des PDAs, sous l'effet du bruit supprimeur controlatéral, sont un reflet de l'amplitude du ROM et renseignent donc sur l'état de fonctionnement global du système récepteur – voies afférentes et efférentes – effecteur musculaire. Il est alors possible d'obtenir des courbes « entrée / sortie » pour le réflexe lui-même en variant l'intensité du bruit supprimeur. Le seuil de déclenchement du ROM peut être défini précisément, sous réserve de choisir l'intensité des primaires dans la portion linéaire de la courbe entrée / sortie du PDA (Figure 19).

Nous avons démontré, avec nos résultats, que l'EchoScan est plus sensible que l'impédancemétrie dans la détection du réflexe stapédien (Figure 20). Le réflexe stapédien était plus souvent détecté avec l'EchoScan, et avec des seuils plus bas. L'EchoScan est de plus le premier équipement qui soit capable de combiner, en une seule mesure, une évaluation du fonctionnement de l'oreille interne et moyenne. La tolérance de la mesure est excellente : nous n'avons observé aucun effet secondaire suite aux mesures réalisées avec ce nouveau dispositif. L'acquisition des données est plus rapide que la réalisation d'une audiométrie tonale liminaire associée à une impédancemétrie. Ce gain de temps pourrait être particulièrement intéressant pour les ORL et les médecins du travail dans le cadre du dépistage et de la prévention des atteintes auditives liées aux expositions professionnelles.

Conclusion

L'audiométrie tonale liminaire est l'outil de référence pour évaluer le fonctionnement auditif mais il donne des mesures subjectives des élévations de seuils, témoignant de dégâts installés et bien souvent irréversibles. Par conséquent, son utilisation n'est pas très adaptée aux programmes de prévention auditive. La mesure des PDAs, reflet du fonctionnement cochléaire, permet d'apprécier au mieux les altérations de l'oreille interne causées par le bruit ou certains solvants ototoxiques, avant qu'une baisse permanente de l'audition ne soit mesurée en audiométrie tonale. En plus de renseigner sur le niveau des PDAs, le paradigme de mesure associé à l'EchoScan teste le fonctionnement du réflexe stapédien, qui peut être perturbé par l'action pharmacologique de certaines substances chimiques, en particulier les solvants aromatiques, utilisées en entreprises. Là où l'impédancemétrie classique ne mesure que la variation de compliance de l'oreille moyenne en lien avec la contraction du muscle stapédien, l'EchoScan renseigne sur l'état de fonctionnement de tous les acteurs de l'arc réflexe depuis le récepteur périphérique jusqu'à l'effecteur musculaire. L'EchoScan permet de fournir des mesures reproductibles, sensibles, objectives et fiables chez les sujets ayant une audition normale, en prenant en compte l'âge et le sexe et en fournissant en une seule mesure des informations sur les oreilles moyenne et interne. Il s'agit d'un outil prometteur pour évaluer l'impact des agents ototoxiques et traumatiques sur la cochlée mais également l'impact neuropharmacologique de produits chimiques sur le réflexe stapédien. Par conséquent, l'EchoScan pourrait être un instrument de choix en médecine du travail pour mener une politique de prévention auditive. Il a d'ailleurs pu être testé en entreprise sur deux groupes de salariés volontaires, non exposés et exposés au bruit, au cours d'une journée de travail. Les résultats de ces mesures sont présentés dans l'étude qui suit. Des mesures se poursuivent, aujourd'hui encore, dans d'autres entreprises pour étudier les effets d'une

exposition à des solvants aromatiques et les effets d'expositions combinées au bruit et à des solvants.

2^{ème} étude :

« EchoScan en entreprises » :
Comparaison des résultats
obtenus chez des sujets
témoins et chez des sujets
exposés au bruit

Introduction

Les résultats obtenus précédemment ont permis de valider l'utilisation de l'EchoScan en tant que nouvel outil d'investigation du récepteur auditif périphérique (Venet et al., 2012). L'EchoScan teste en une seule mesure objective, non invasive et reproductible, à la fois le fonctionnement de la cochlée (PDAs), et le fonctionnement du réflexe stapédien.

Les effets d'une exposition au bruit sur l'audition ont été démontrés dans de nombreuses publications utilisant divers outils audiométriques, le plus souvent l'audiométrie tonale liminaire (Bapat et Tolley, 2007) mais également les otoémissions acoustiques, dont les PDAs (Olszewski et al., 2007 ; Müller et Janssen, 2008). Au cours d'expositions prolongées à des intensités modérées de bruit, une élévation des seuils audiométriques, ou une diminution des amplitudes des PDAs, a été mesurée. Lorsque l'élévation de seuils ou la diminution des amplitudes de PDAs est transitoire, c'est-à-dire lorsque les performances auditives initiales sont restituées après une période de repos sonore accordée aux sujets, elle est appelée fatigue auditive. Cette fatigue auditive est liée à la fois à un blocage post-synaptique des fibres afférentes de type I, connectées aux CCI (excitotoxicité glutamatergique), mais également à des altérations micro-mécaniques cochléaires, en particulier à des modifications de raideur des stéréocils (Saunders et al., 1986 ; Jacob et al., 2012). La mesure des otoémissions acoustiques pourrait d'ailleurs s'avérer plus sensible que l'audiométrie tonale pour détecter la fatigue auditive (Pawlaczyk-Luszczynska et al., 2004). Cette différence de sensibilité entre les deux approches est probablement expliquée par le concept de plasticité cérébrale, selon lequel le système nerveux central serait capable de pallier les défauts de fonctionnement du récepteur périphérique (Syka, 2002 ; Kaltenbach et Zhang, 2007 ; Finlayson et Kaltenbach, 2009). Puisque les otoémissions acoustiques sont spécifiques des CCE, elles permettent de démasquer les altérations fonctionnelles du récepteur périphérique.

Dans la littérature, peu d'études se sont intéressées à l'évolution du réflexe stapédien après exposition au bruit (Prasher et al., 2005). Dans ces études, les mesures de seuils de déclenchement ou de fatigabilité du réflexe (decay test) ont toujours utilisé l'impédancemétrie. Si les résultats n'ont pas toujours été concluants, ils tendent à mettre en évidence une fatigabilité du réflexe après exposition au bruit.

Outre le bruit, le ROM peut-être perturbé par les effets pharmacologiques de substances chimiques présentes en milieu industriel. Les effets des solvants aromatiques sur le ROM, en particulier le toluène, sont à présent bien documentés chez le rat (Campo et al., 2007 ; Venet et al., 2011). Les effets pharmacologiques des solvants chez l'homme commencent également à être explorés et sont suspectés d'être responsables d'atteintes auditives centrales (Fuente et al., 2006). Puisque l'EchoScan mesure à la fois l'amplitude des PDAs, et l'efficacité du réflexe stapédien (seuil de déclenchement et amplitude), il devrait être sensible à la fatigue auditive due au bruit mais aussi aux effets pharmacologiques de substances chimiques. Il pourrait donc être efficace dans la recherche d'indicateurs précoces de souffrance cochléaire, et de contaminations nerveuses, au cours d'expositions au bruit et/ou à des solvants aromatiques.

Afin de tester les performances de l'EchoScan en entreprises, nous avons mené un second protocole de recherche clinique (Afssaps n°UEC/Ann/DA/2010-212, CPP n°11.09.05, IDRCB n°2011-A00823-38), en vue de réaliser une détection précoce (sur une journée) des effets du bruit et/ou de solvants aromatiques.

L'objectif principal de cette étude était d'identifier des indicateurs précoces de fatigue auditive à l'aide de l'EchoScan. Pour cela, des mesures ont été réalisées en entreprises, en début et en fin de poste de travail, chez des salariés volontaires normo-entendants répartis en quatre groupes : témoin (non exposés), exposé au bruit, exposé à des solvants aromatiques et

exposé au bruit et à des solvants aromatiques. À ce jour, les inclusions sont terminées pour les groupes « témoin » et « exposé au bruit » ; les résultats obtenus pour ces deux groupes sont présentés ci-dessous. Les mesures se poursuivent pour les salariés exposés aux solvants d'une part et au bruit et aux solvants d'autre part.

L'objectif secondaire de l'étude était d'optimiser les programmes de fonctionnement de l'EchoScan en vue d'une utilisation par les médecins du travail. Ce travail passera par une sélection des paramètres les plus pertinents pour offrir un test rapide et facile d'utilisation.

Matériels et Méthodes

I. Protocole d'inclusion des participants

I.1. Pré-inclusion

Pour être inclus dans le protocole, les participants volontaires devaient être âgés de 18 à 65 ans (inclus), avoir donné leur consentement écrit, avoir subi un examen otoscopique et un bilan audiométrique, être affilié à la sécurité sociale et ne pas être déjà engagé dans un autre protocole de recherche biomédicale.

Les critères de non-inclusion regroupaient : la présence d'antécédents otologiques dans les 5 dernières années, une pathologie de l'oreille externe ou moyenne mise en évidence à l'otoscopie, un traitement médicamenteux par diurétique, myorelaxant et/ou aspirine, une anomalie au bilan audiométrique et/ou tympanométrique.

Pour chaque mesure, les participants ont été reçus individuellement dans un véhicule de l'INRS spécialement aménagé à cet effet, et ayant une autorisation de lieu pour des recherches médicales (SGAR n°2008-389, obtenue le 30 octobre 2008). L'audiométrie tonale liminaire a été réalisée de manière bilatérale pour des fréquences s'étalant de 250 à 8000 Hz (*Interacoustics AS608*). Les sujets souffrant d'un déficit auditif supérieur à 30 dB sur les fréquences inférieures à 4000 Hz ont été exclus. La tympanométrie a été réalisée avec le même appareil clinique que précédemment (*GSI Tymptstar, 2000-97XX*). Un tympanogramme normal (Type A), avec pic de compliance centré sur le zéro atmosphérique, était requis. Au terme de ces tests, l'oreille dédiée à la mesure des PDAs (côté IPSI) était choisie en fonction des performances ; l'oreille IPSI était l'oreille qui avait les seuils les plus bas en audiométrie

tonale (ou choisie au hasard si équivalence des deux oreilles), l'oreille CONTRA était l'oreille par laquelle on déclenchait le réflexe stapédien.

I.2.Inclusion

Les sujets qui remplissaient l'ensemble des critères précédents étaient pré-inclus dans l'étude et soumis à deux types de mesure avec l'EchoScan, dites mesures d'inclusion :

(1) courbes « entrée/sortie » des PDAs $2f_1-f_2$ à $f_2 = 4800$ Hz et $f_2 = 6528$ Hz.

La sonde de mesure des PDAs (Etymotic Research ER10C) était placée dans l'oreille IPSI.

Le ratio f_2/f_1 était de 1,2 afin d'obtenir le maximum d'amplitude du PDA $2f_1-f_2$. Deux couples de fréquences (f_1, f_2) ont été testés (4000, 4800), (5440, 6528) Hz. Pour chaque couple de fréquences, l'amplitude des PDAs était enregistrée pour chaque intensité de f_1 (L1), qui s'échelonnait de 49 à 67 dB HL par pas de 3 dB. Ce type d'approche est communément appelée procédure « entrée/sortie ». Le niveau des primaires répondait à la formule $L_2 = L_1 - 6$ dB HL (Gaskill et Brown, 1990 ; Whitehead et al. 1995 ; Neely et al. 2009). L'intensité maximale était plafonnée à 67 dB pour ne pas risquer de stimuler le ROM en IPSI. La calibration des primaires a été réalisée selon les standards ISO 389-2 et IEC 60318-4. L'amplitude des PDAs est déterminée par analyse FFT (résolution 8 Hz) comme décrit précédemment. Un moyennage temporel de 250 ms (N = 4) est réalisé.

(2) mesure du seuil de déclenchement du ROM pour un bruit déclencheur CONTRA de 1000 Hz.

Le bruit CONTRA était un bruit de bande de 800 Hz centrée sur la fréquence 1000 Hz. Chaque bouffée de bruit ou « burst » durait 2 s. L'intensité d'émission maximale était choisie à 95 dB HL.

I.3.Exclusion

Si l'amplitude des PDAs était trop faible sur les deux fréquences testées et/ou si le seuil de déclenchement du ROM était supérieur à 95 dB HL, les sujets étaient alors exclus de l'étude.

II.Mesures en entreprises

II.1.Mesures par EchoScan

Les sujets inclus faisaient l'objet d'une première série de mesures en début de poste (DP). Ils étaient ensuite équipés d'un exposimètre (0.1dB®, type Wed), dont le micro était porté à l'épaule ; chaque sujet était suivi pendant une journée de travail pour contrôler, par bluetooth et en temps réel, l'exposition sonore à laquelle les sujets étaient soumis. Une seconde série de mesures comparatives était effectuée, soit en fin de poste pour les sujets témoins (au bout de 8 heures), soit en cours de poste de travail lorsque leur dose de bruit mesurée par l'exposimètre se rapprochait de la valeur d'exposition supérieure déclenchant l'action ($L_{EX,8h} = 85$ dB(A), Directive « Bruit » 2003/10/CE), dès que l'encadrant du salarié autorisait une interruption de ses activités. Dans tous les cas, pour les salariés exposés au bruit, la mesure « fin de poste » était réalisée immédiatement après extraction de l'ambiance sonore. Pour plus de simplicité, la deuxième mesure sera par convention appelée « mesure fin de poste », notée FP. Au cas où les sujets devaient reprendre le travail après les mesures de FP, il leur était fortement recommandé de porter des bouchons d'oreilles.

La série de mesures, réalisée 15 minutes avant le début de poste et renouvelée en fin de poste, incluait une audiométrie tonale liminaire de l'oreille testée et trois types de mesures avec l'EchoScan :

1. Enregistrement « entrée/sortie » des PDAs

Les PDAs issus de trois couples de fréquences (f_1 , f_2), (3000, 3600), (4000, 4800), (5440, 6528) Hz, ont été mesurés selon la procédure, décrite précédemment.

2. DPgramme

Il s'agit d'une mesure du PDA $2f_1-f_2$ à une intensité de primaires constante ($L_1 = 61$ dB HL, $L_2 = 55$ dB HL) mais en augmentant la fréquence f_2 , de 1008 à 8064 Hz. Les intensités des primaires, utilisées pour générer les PDAs, étaient exprimées en dB HL pour être compatibles avec la convention adoptée en audiométrie tonale. En revanche, l'amplitude des PDAs mesurée avec l'EchoScan était mesurée en dB SPL.

3. Enregistrement « entrée / sortie » du réflexe stapédien

L'écouteur utilisé pour déclencher le réflexe stapédien était inséré dans l'oreille CONTRA. L'intensité d'émission variait de 65 à 95 dB HL. La limite supérieure a été fixée à 95 dB HL pour éviter tout effet traumato-sonore potentiel sur l'appareil auditif des participants volontaires. Cet émetteur était calibré selon la même procédure que la sonde IPSI. Le bruit CONTRA était un bruit de bande de 800 Hz centrée sur une fréquence variant de 1000 à 4000 Hz (1000, 2000 et 4000 Hz). Chaque bouffée de bruit ou « burst » durait 2 s.

Le PDA $2f_1-f_2$ était mesuré avant et pendant la stimulation controlatérale afin de détecter une diminution d'amplitude induite par l'activation du réflexe stapédien. Cette mesure était réalisée pour la plupart des patients avec un PDA déterminé par $f_2 = 4800$ Hz. La fréquence de f_2 a dû être fixée à 6528 Hz pour 5 patients chez lesquels la courbe « entrée/sortie » des PDAs à $f_2 = 4800$ Hz ne permettait pas de mesurer une amplitude suffisante de réflexe (pour mémoire, voir Figure 10).

II.2. Quantification de l'exposition au bruit

Comme indiqué précédemment, chaque participant était équipé d'un exposimètre (0.1dB®, type Wed), porté à l'épaule. Les données d'exposition étaient suivies et enregistrées en temps réel par les investigateurs grâce à un boîtier bluetooth.

Ce type de dispositif de mesures enregistre toutes les secondes le niveau moyen de l'exposition au bruit en dB(A) ($L_{Aeq(1s)}$), le niveau moyen et le niveau crête en dB(C), et calcule la moyenne globale de l'exposition en cours (L_{eq} en dB(A)).

Un logiciel de traitement informatique (dBTrait, Editeur 0.1 dB) permet *a posteriori* de recalculer des valeurs moyennes d'exposition sur des périodes d'intérêt. Pour chaque participant, la valeur moyenne d'exposition sur la dernière heure avant la mesure FP a ainsi été déterminée.

III. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant des modèles de régressions linéaires multiples sans effet aléatoire. Ils permettent de tester les effets fixes et l'interaction des modèles [exposition ' poste], [âge ' poste] et [exposition ' âge ' poste] pour les variables choisies, c'est-à-dire les différences entre les valeurs de fin de poste et celles de début de poste (FP-DP).

La significativité du seuil du ROM était déterminée pour chaque mesure par un test de Student. La significativité était fixée avec un risque alpha de 5% ($p < 0,05$). La première valeur significative était notée R1S (1^{er} seuil du ROM). Cette première valeur significative pouvait être suivie de stimulation(s) ne déclenchant pas de variation de PDAs significatives au test de Student. C'est pourquoi une deuxième valeur a été retenue pour définir le seuil à partir duquel on obtient un déclenchement systématiquement significatif du ROM, notée RCS. RCS ne peut être que supérieur ou égal à R1S. Chez certains sujets, une valeur de ROM significative était obtenue pour une intensité de bruit CONTRA, sans être confirmée par les intensités plus élevées. Dans ce cas, il n'y avait pas de RCS.

Le niveau de significativité est indiqué dans les tableaux et figures par : $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ et $***p < 0,001$.

Résultats

I.Participants

Le recrutement des volontaires a été effectué dans 7 entreprises. Lors de la phase de pré-inclusion, 75 sujets ont été testés pour n'en inclure que 46. Les critères de non-inclusion ont été un motif médical (3 sujets), des anomalies à l'audiométrie tonale (3), des PDAs trop faibles (11), un seuil de ROM supérieur à 92 dB HL (9) ou une difficulté liée à l'organisation des mesures DP et FP (3). Le groupe « bruit » était composé de 26 sujets (2 femmes et 24 hommes), âgés de 23 à 50 ans [$M = 36$; $SD = 8,3$] ; le groupe « témoin » regroupait 20 sujets (5 femmes et 15 hommes), âgés de 18 à 54 ans [$M = 38,5$; $SD = 11$].

Les postes de travail et les niveaux d'exposition pour chaque individu du groupe « bruit » sont détaillés dans le Tableau 10. Les sujets témoins travaillaient tous dans une ambiance sonore de $L_{EX,d}$ inférieur à 75 dB.

Tableau 10-

Participants exposés au bruit.

Leq dB(A) : niveau de bruit continu équivalent mesuré en utilisant la pondération A

L_{EX,d} dB(A) : Leq calculé sur 8 heures

Leq (-1h) dB(A) : niveau de bruit continu équivalent mesuré la dernière heure

Participants	Âge	Sexe	Leq dB(A)	L _{EX,d} dB(A)	Leq (-1hr) dB(A)	Durée d'exposition	Nombre de crêtes > 135dB(C)	Secteur d'activité
16	41	♀	84,5	84,5	84,5	7:30	0	Production
23	45	♂	87,2	87,1	92,6	7:21	0	Services
24	33	♂	86,5	86,4	91,3	7:22	0	Services
26	50	♂	87,0	83,5	86,1	3:32	2	Services
31	31	♂	86,1	85,6	86,3	7:12	0	Construction
32	34	♂	91,1	90,8	88,2	7:30	30	Construction
33	25	♂	93,6	91,3	94,5	4:40	50	Construction
34	23	♂	88,7	88,1	90,5	7:00	1	Construction
36	28	♂	85,6	84,9	86,8	6:45	1	Construction
38	40	♂	84,8	84,1	85,5	6:45	0	Construction
39	24	♂	85,4	84,8	86,7	7:00	0	Construction
40	34	♂	89,6	89,2	91,4	7:20	10	Construction
41	28	♀	80,3	80,2	80,5	7:50	0	Production
43	39	♂	86,7	85,6	87,1	6:15	0	Production
44	43	♂	88,7	88,0	87,2	6:45	0	Production
48	47	♂	83,3	83,3	84,0	7:57	0	Production
54	54	♂	84,6	84,5	85,1	7:50	0	Production
55	41	♂	85,2	84,0	87,4	6:00	0	Production
56	26	♂	82,6	82,5	82,2	7:47	0	Production
57	31	♂	85,7	84,5	83,5	6:00	0	Production
62	38	♂	83,8	83,8	83,7	8:00	0	Production
64	33	♂	84,2	83,7	87,1	7:10	0	Production
66	41	♂	84,7	84,6	81,1	7:50	0	Production
67	45	♂	79,0	79,1	81,6	8:15	0	Services
72	32	♂	81,3	80,5	81,6	6:40	0	Production
73	31	♂	83,4	83,4	82,7	8:05	0	Production

II. Quantification de l'exposition au bruit

II.1. Audiométrie tonale

Une différence significative entre exposés et témoins a été obtenue à 4000 Hz pour (FP-DP). Cette différence exprime la fatigue auditive liée au bruit. Elle était de 4,9 dB ($p < 0,01$) (Figure 22).

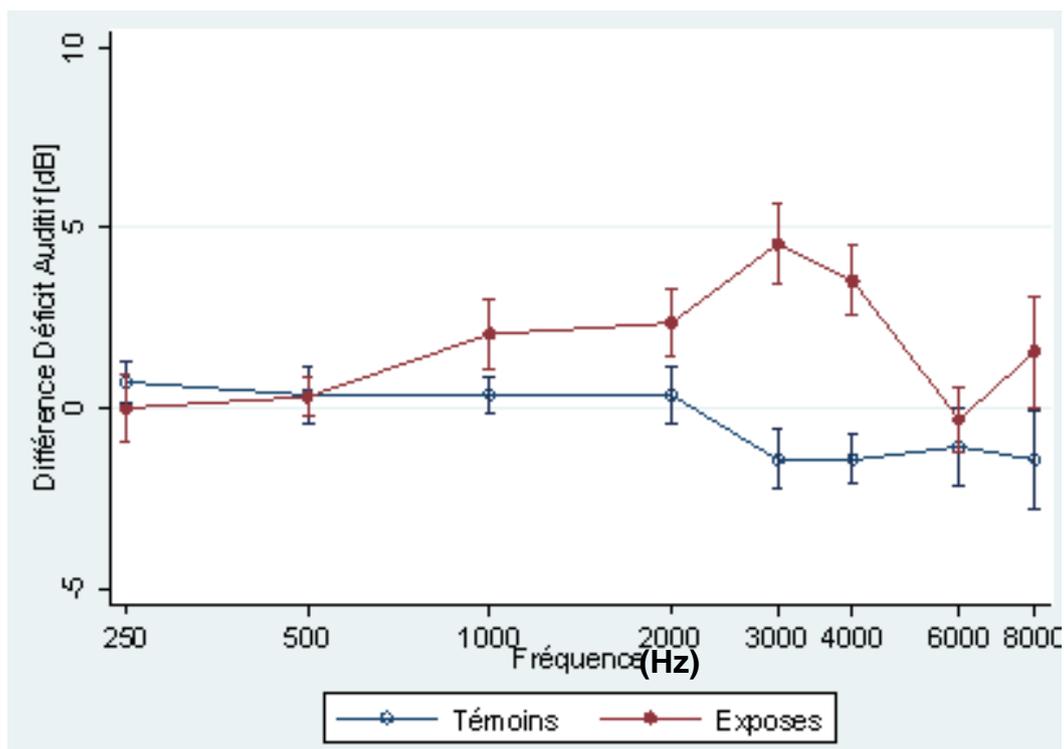


Figure 22-

Différence FP-DP des seuils moyens mesurés en audiométrie tonale pour chaque fréquence testée.

Les barres représentent l'erreur standard.

Les différences inter-groupes sont significatives à 4000 Hz ($p < 0,01$).

II.2.Mesures EchoScan

II.2.1.Entrée/sortie des PDAs

Des différences significatives de (FP-DP) entre exposés et témoins ont été obtenues d'après les courbes « entrée / sortie » des PDAs. Les écarts retrouvés entre les deux groupes, pour chaque intensité de primaires et chaque couple de fréquences testées, sont reportés dans le Tableau 11. Dans notre protocole, le couple de primaires le plus sensible pour détecter une fatigue auditive dans notre protocole était [$f_1 = 5440$ Hz ; $f_2 = 6528$ Hz]. Pour $f_2 = 6528$ Hz, quatre niveaux de primaires ont en effet mesuré un effet significatif de l'exposition sur les PDAs (FP-DP).

Tableau 11-

Différences (FP-DP) des PDAs, en dB, entre exposés et témoins par niveaux de primaires (L1) pour chaque couple de primaires testés en procédure « entrée / sortie ».

NS = Non Significatif

* $p < 0,05$

		Intensité de L1 (dB HL)					
		52	55	58	61	64	67
Fréquence f_2	3600 Hz	NS	NS	NS	-0,92*	3,48*	NS
	4800 Hz	NS	-3,78*	NS	NS	NS	NS
	6528 Hz	-1,18*	-1,27*	-1,23*	-1,25*	NS	NS

II.2.2.DPgramme

Le DPgramme a été mesuré à une intensité fixe $L1 = 61$ dB HL pour 7 couples de fréquences définis par $f2$. Les résultats du DPgramme ont confirmé les mesures obtenues dans les procédures « entrée / sortie ». La différence (FP-DP) de PDAs entre exposés et témoins était significative pour $f2 = 1008, 3600$ et 6528 Hz ($p < 0,05$) (Figure 23).

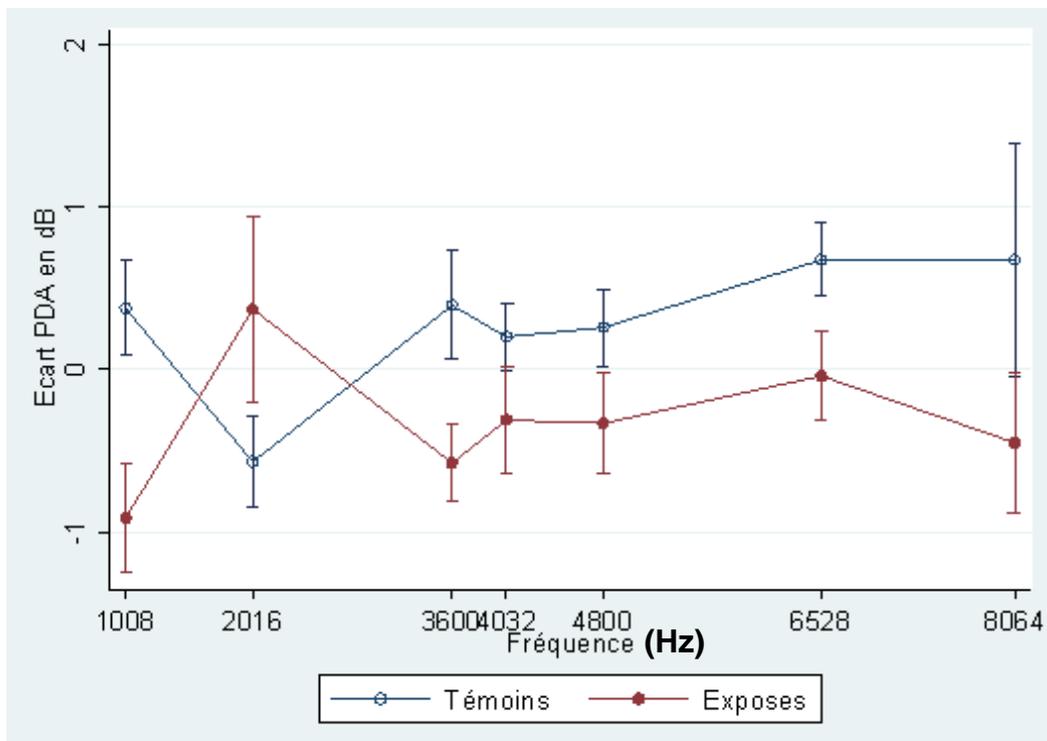


Figure 23-

Différence (FP-DP) d'amplitude du PDA cubique en fonction de la fréquence $f2$.

Les barres représentent l'erreur standard.

Les différences inter-groupes étaient significatives pour $f2 = 1008, 3600$ et 6528 Hz ($p < 0,05$).

II.2.3. Seuils du ROM

Que l'on considère R1S ou RCS, les différences de seuils du ROM mesurées entre fin de poste et début de poste (Seuils FP-DP) entre exposés et témoins ont été très significatives pour toutes les fréquences de bruit CONTRA testées (Tableau 12).

Dans la gamme des fréquences testées, aucune susceptibilité liée à l'âge n'a été retrouvée.

Tableau 12-

Différences de seuils du ROM entre fin de poste et début de poste en fonction de l'exposition, par fréquence de bruit stimulant.

NS = Non significatif

N = nombre de valeurs = nombre de sujets

** p < 0,01

*** p < 0,001

	Fréquence du bruit supresseur CONTRA					
	1000 Hz		2000 Hz		4000 Hz	
	R1S	RCS	R1S	RCS	R1S	RCS
Effet exposition	7,25***	6,66***	4,82**	5,01**	5,3**	7,3***
Effet âge	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Exposition × âge	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N	46	45	46	45	41	35

Discussion

En surveillant en temps réel l'exposition sonore subie par les participants volontaires de cette étude, il a été possible de mesurer dans le groupe « bruit » des effets lors d'expositions proches du $L_{EX,8h}$ réglementaire de 85 dB(A) (valeur d'exposition supérieure déclenchant l'action d'après la Directive « Bruit » 2003/10/CE). En effet, l'exposition sonore moyenne reçue dans le groupe « bruit » a été de 84,9 dB(A) (SD : 2,94) (Tableau 10).

La comparaison des mesures réalisées en début et en fin de poste de travail entre groupes « bruit » et « témoin » confirme néanmoins l'existence d'un impact de l'exposition sonore sur l'audition. Une fatigue auditive mesurable en audiométrie tonale liminaire a été retrouvée dans le groupe « bruit » au décours de l'exposition, à la fréquence 4000 Hz. Cette élévation de seuil est restée faible, en moyenne de 4,9 dB. La fatigue auditive a été mesurable également par les PDAs, qu'il s'agisse de procédure « entrée / sortie » ou de DPgramme. Cependant, à l'instar de l'audiométrie tonale, l'effet de l'exposition n'a pas été significativement mesurable pour toutes les fréquences, ni pour tous les niveaux de primaires.

A l'inverse, le seuil de déclenchement du ROM a été particulièrement sensible à l'exposition au bruit. En effet, la différence d'élévation du seuil de déclenchement du ROM a été statistiquement significative entre exposés et témoins pour toutes les fréquences testées. La mesure du seuil de déclenchement du ROM par EchoScan pourrait donc être un indicateur sensible des effets d'une exposition sonore, même lorsque cette exposition est considérée comme modérée par la législation. L'explication de cette sensibilité de l'EchoScan peut être en partie liée à la méthode de mesure elle-même : ce dispositif mesure l'amplitude du réflexe stapédien par la variation d'amplitude de PDA $2f_1-f_2$ sous l'effet d'un bruit déclencheur

controlatéral. En conséquence, l'EchoScan renseigne sur l'état de fonctionnement de tous les acteurs de l'arc réflexe, depuis le récepteur périphérique jusqu'à l'effecteur musculaire, en passant par les différentes voies nerveuses impliquées. Les perturbations de chacun de ces acteurs s'expriment donc dans la mesure obtenue.

D'autre part, la significativité des mesures est équivalente que l'on considère la valeur R1S ou RCS. Avec l'ambition d'optimiser l'ergonomie de l'EchoScan, ce résultat est particulièrement intéressant. En effet, il est possible de limiter la mesure à l'acquisition d'un premier déclenchement significatif du ROM (R1S). Ceci présenterait le double intérêt de raccourcir la durée de la mesure et de permettre aisément d'automatiser l'acquisition. En ne conditionnant pas la valeur retenue pour le seuil du ROM à l'interprétation de l'opérateur, la mesure gagne en objectivité et le dispositif gagne en ergonomie.

La fatigue auditive est définie habituellement avec des techniques audiométriques conventionnelles (audiométrie tonale liminaire, otoémissions acoustiques). Il apparaît que cette fatigue s'exprime également à l'étage de l'arc réflexe du ROM. Très récemment, Hope et al. (en 2013) ont montré, chez des sujets normo-entendants soumis à une exposition sonore n'ayant pas de retentissement mesurable en audiométrie tonale liminaire, que les seuils d'intelligibilité dans le bruit s'élevaient après exposition au bruit comparativement à des témoins non exposés. Il est à noter que ces données illustrent une fois encore l'insuffisance de l'audiométrie tonale liminaire pour la détection précoce des effets du bruit sur l'audition. Ces auteurs concluent à une altération du fonctionnement rétro-cochléaire, en d'autres termes, des voies centrales. Etant donné le rôle du ROM dans le démasquage du signal dans le bruit, les mesures de seuil du ROM évolueraient de façon similaire aux seuils d'intelligibilité dans le bruit après exposition sonore. Cependant, la mesure du ROM par EchoScan présente deux intérêts fondamentaux comparativement à l'audiométrie dans le bruit : objectivité et rapidité.

En conclusion, les résultats obtenus pour les sujets exposés au bruit apparaissent très encourageants. En particulier, la mesure de variation de seuil du ROM entre début et fin de poste pourrait être un indicateur précoce performant d'atteinte auditive liée à l'exposition au bruit. La sensibilité de cet indicateur sera testée prochainement lors de l'analyse des résultats obtenus chez des sujets exposés aux solvants et au bruit et aux solvants (inclusions en cours). Enfin, l'analyse statistique se poursuit pour tester l'intérêt de la variation de seuil du ROM mesuré par EchoScan sur une journée de travail, dans l'évaluation indirecte de l'exposition sonore subie à l'échelle individuelle.

Conclusion générale et perspectives

L'Institut National de Recherche en Sécurité est un établissement dont l'activité s'exerce suivant les directives et sous le contrôle de la CNAM des travailleurs salariés. Les missions de l'INRS sont définies par les Ministères de tutelle, et visent à l'amélioration de la sécurité et de l'hygiène au travail, et à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles. Les recherches effectuées au laboratoire d'accueil ont donc pour objectif final d'être appliquées à l'homme au travail.

En ce sens, une part importante des travaux futurs s'intéressera à promouvoir l'utilisation de l'EchoScan en médecine du travail. S'il ne peut se substituer à l'audiométrie tonale liminaire, indispensable pour déterminer le niveau auditif initial des salariés, ce dispositif pourrait par contre permettre un suivi auditif tout au long de leur vie professionnelle en cas d'exposition au bruit et/ou à des agents chimiques, à travers 2 examens objectifs et facilement réalisables :

- La mesure de l'amplitude du PDA cubique à différentes périodes de la vie professionnelle, comme indicateur précoce d'atteinte spécifique des CCE.
- La mesure du seuil du ROM en début et fin de poste, qui alerte le médecin du travail des expositions professionnelles potentiellement dangereuses pour l'audition des salariés.

L'analyse prochaine des données d'exposition des sujets exposés au bruit d'une part et des données à venir concernant les sujets exposés aux solvants ou au bruit et aux solvants d'autre part testera également la corrélation entre la variation d'amplitude du ROM sur une journée de travail et le niveau d'exposition. Nous pourrons ainsi déterminer si la mesure du seuil du

ROM en début et fin de poste peut être un bon indicateur de la contamination des salariés exposés.

Les multi-expositions sont la règle en milieu industriel. Celles-ci incluent les associations entre agent physique (bruit ou vibrations) et chimique, mais également entre plusieurs agents chimiques. D'après la base COLCHIC, créée en 1986 par l'INRS, les multi-expositions chimiques concernent 89% des agents chimiques recensés dans l'industrie. Or les associations entre produits chimiques peuvent aboutir à des effets non prévisibles et parfois regrettables: additivité, voir même synergie des effets (Campo et Lafon, 2012). Dans de telles ces circonstances, le respect des VLEPs de chaque agent ne garantie pas son innocuité. L'EchoScan pourrait être un outil de choix dans la caractérisation des effets pharmacologiques en situation de multi-expositions.

Enfin, les résultats obtenus sur le ROM avec le toluène ont été rapprochés des effets connus des anesthésiques sur ce même réflexe. L'effet dépresseur des anesthésiques sur le ROM est connu depuis 1975 (Borg et Möller, 1975). Une étude récente menée chez le rat Brown Norway a montré que le toluène s'opposait aux effets des anesthésiques sur le ROM de façon dose-dépendante (Campo et al., 2012). Cette étude a permis de mieux comprendre le mécanisme des effets du toluène sur les centres nerveux impliqués dans le ROM : il s'agirait d'une action non spécifique de perturbation de la membrane cellulaire elle-même. Par cette perturbation de la fluidité membranaire, le toluène provoquerait des modifications des canaux ioniques sur lesquels les anesthésiques agissent de façon allostérique (Parker et al., 1986 ; Franks et Lieb, 1994 ; Yamakura et al., 2000).

L'utilisation du ROM comme outil de monitoring de la profondeur d'anesthésie avait été proposé en 1986 par Sebel et al. Les performances de l'EchoScan offrent de nouvelles

perspectives dans ce domaine. Une pré-étude clinique est d'ores et déjà programmée pour tester la faisabilité de cette procédure dans un environnement de réanimation médicale.

Bibliographie

Arlien-Søborg P., Hansen L., Ladefoged O., et al. Report on a conference on organic solvents and the nervous system. *Neurotoxicology and Teratology*, 1992, 14 (1): 81–82.

Avan P., Bonfils P. Frequency specificity of human distortion product otoacoustic emissions. *Audiology*, 1993, 32 (1): 12–26.

Bapat U., Tolley N. Temporary threshold shift due to recreational firearm use. *The Journal of Laryngology and Otology*, 2007, 121 (10): 927–931.

Bekegy G. Sound pressure differences between oval and round windows, In *Experiments in Hearing*. McGraw, 1960. pp 121–126.

Bock G.R., Steel K.P. Use of albino animals for auditory research. *Hearing Research*, 1984, 13 (2): 201–202.

Borg E. On the neuronal organization of the acoustic middle ear reflex. A physiological and anatomical study. *Brain Research*, 1973, 49 (1): 101–123.

Borg E., Moller A. R. Effect of central depressants on the acoustic middle ear reflex in rabbit. A method for quantitative measurements of drug effect on the CNS. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1975, 94 (3): 327–338.

Brown A.M., Harris F.P., Beveridge H.A. Two sources of acoustic distortion products from the human cochlea. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 1996, 100 (5): 3260–3267.

Burns E.M., Harrison W.A., Bulen J.C., et al. Voluntary contraction of middle ear muscles: effects on input impedance, energy reflectance and spontaneous otoacoustic emissions. *Hearing Research*, 1993, 67 (1-2): 117–127.

Cacace A.T., McClelland W.A., Weiner J., et al. Individual differences and the reliability of 2f1-f2 distortion-product otoacoustic emissions: effects of time-of-day, stimulus variables, and gender. *Journal of Speech and Hearing Research*, 1996, 39 (6): 1138–1148.

Campo P., Blachère V., Payan J.P., et al. Toxicokinetic parameters of toluene in the rat and guinea pig: a comparative study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2005, 19(3): 555–559.

Campo P., Maguin K., Lataye R. Effects of aromatic solvents on acoustic reflexes mediated by central auditory pathways. *Toxicological Sciences*, 2007, 99 (2): 582–590.

Campo P., Venet T., Rumeau C., et al. Impact of noise or styrene exposure on the kinetics of presbycusis. *Hearing Research*, 2011, 280 (1-2): 122–132.

Campo P., Venet T., Thomas A., et al. Inhaled toluene can modulate the effects of anesthetics on the middle-ear acoustic reflex. *Neurotoxicology and Teratology*, 2012, 35C: 1–6.

Campo P., Lafon D. Conférence INRS 2012 sur les risques liés aux multi-expositions (Mixed-expo 2012). *Hygiène et Sécurité du Travail*, 2012, 228: 59–62.

Chatterjee M., Zwislocki J.J. Cochlear mechanisms of frequency and intensity coding. II. Dynamic range and the code for loudness. *Hearing Research*, 1998, 124 (1-2): 170–181.

Cooper N.P., Guinan J.J. Efferent-mediated control of basilar membrane motion. *The Journal of Physiology*, 2006, 576 (Pt 1): 49–54.

Crofton K.M., Lassiter T.L., Rebert C.S. Solvent-induced ototoxicity in rats: an atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hearing Research*, 1994, 80 (1): 25–30.

Davis, R.R., Murphy W.J., Snawder J.E., et al. Susceptibility to the ototoxic properties of toluene is species specific. *Hearing Research*, 2002, 166 (1-2): 24–32.

Décret 87-848 du 19 octobre 1987. *Journal Officiel de la République Française*, 1987.

Décret 2006-892 du 19 juillet 2006. *Journal Officiel de la République Française*, 2006 ; T14.

Décret 2007-1539 du 26 octobre 2007. *Journal Officiel de la République Française*, 2007 ; T13.

Directive "Bruit" 2003/10/CE du Parlement Européen. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, 2003 ; L42: 38–44.

Dreisbach L.E., Kramer S.J., Cobos S., et al. Racial and gender effects on pure-tone thresholds and distortion-product otoacoustic emissions (DPOAES) in normal-hearing young adults. *International Journal of Audiology*, 2007, 46 (8): 419–426.

Ehyai A., Freemon F.R. Progressive optic neuropathy and sensorineural hearing loss due to chronic glue sniffing. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 1983, 46 (4): 349–351.

Fechter L.D. Effects of acute styrene and simultaneous noise exposure on auditory function in the guinea pig. *Neurotoxicology and Teratology*, 1993, 15 (3): 151–155.

Fechter L.D., Chen G.D., Rao D. Chemical asphyxiants and noise. *Noise & Health*, 2002, 4 (14): 49–61.

Feeney M.P., Keefe D.H. Estimating the acoustic reflex threshold from wideband measures of reflectance, admittance and power. *Ear and Hearing*, 2001, 22 (4): 316–332.

Finlayson P.G., Kaltenbach J.A. Alteration in the spontaneous discharge patterns of single units in the dorsal cochlear nucleus following intense sound exposure. *Hearing Research*, 2009, 256 (1-2): 104–117.

Fornazzari L, Wilkinson D.A., Kapur B.M., Carlen P.L. Cerebellar, cortical and functional impairment in toluene abusers. *Acta Neurologica Scandinavica*, 1983, 67 (6): 319–329.

Franks N.P., Lieb W.R. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*, 1994, 367 (6464): 607–614.

Fredelius L., Viberg A., Canlon B. Succinic dehydrogenase histochemistry as an early marker for hair cell pathology. *Journal for Oto-rhino-laryngology and Its Related Specialties*, 2001, 63 (1): 12–18.

Fuente A., McPherson B., Muñoz V., et al. Assessment of central auditory processing in a group of workers exposed to solvents. *Acta Oto-laryngologica*, 2006, 126 (11): 1188–1194.

Gaskill S.A., Brown A.M. The behavior of the acoustic distortion product, 2f1-f2, from the human ear and its relation to auditory sensitivity. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 1990, 88 (2): 821–839.

Gates G.A., Cooper J.C., Kannel W.B., et al. Hearing in the elderly: the Framingham cohort, 1983-1985. part I. basic audiometric test results. *Ear and Hearing*, 1990, 11 (4): 247–256.

Gelfand S.A. The contralateral acoustic-reflex threshold. In *The Acoustic Reflex: basic principles and clinical applications*. Silman S. Ed. Orlando: Academic Press, 1984, pp 137–186.

Guinan J.J., McCue M.P. Asymmetries in the acoustic reflexes of the cat stapedius muscle. *Hearing Research*, 1987, 26(1): 1–10.

Guinan J.J., Backus B.C., Lilaonitkul W., et al. Medial olivocochlear efferent reflex in humans: otoacoustic emission (OAE) measurement issues and the advantages of stimulus frequency OAEs. *JARO*, 2003, 4(4): 521–540.

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

Guinan J.J., Salt A., Cheatham M.A. Progress in cochlear physiology after Békésy. *Hearing Research*, 2012, 293(1-2): 12–20.

Henley C.M., Owings M.H., Stagner B.B., et al. Postnatal development of 2f1-f2 otoacoustic emissions in pigmented rat. *Hearing Research*, 1990, 43(2-3): 141–148.

Hope A.J., Luxon L.M., Bamiou D.E. Effects of chronic noise exposure on speech-in-noise perception in the presence of normal audiometry. *The Journal of Laryngology and Otology*, 2013, 1: 1–6.

Jacob S., Johansson C., Fridberger A. Noise-induced alterations in cochlear mechanics, electromotility, and cochlear amplification. *Pflugers Archiv*, 2012 (sous presse).

Johnson A.C., Nylén P.R. Effects of industrial solvents on hearing. *Occupational Medicine*, 1995, 10 (3): 623–640.

Kaltenbach J.A., Zhang J. Intense sound-induced plasticity in the dorsal cochlear nucleus of rats: evidence for cholinergic receptors up-regulation. *Hearing Research*, 2007, 226 (1-2): 232–243.

Kishi R., Harabuchi I., Ikeda T., et al. Neurobehavioural effects and pharmacokinetics of toluene in rats and their relevance to man. *British Journal of Industrial Medicine*, 1988, 45 (6): 396–408.

Lataye R., Campo P., Loquet G. Combined effects of noise and styrene exposure on hearing function in the rat. *Hearing Research*, 2000, 139 (1-2): 86–96.

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

Lazar R.B., Ho S.U. Progressive optic neuropathy and sensorineuronal hearing loss due to chronic glue sniffing. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 1983, 46 (11): 1060.

Lee D.J., De Venecia R.K., Guinan J.J., et al. Central auditory pathways mediating the rat middle ear muscle reflexes. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 2006, 288 (4): 358–369.

Leist M., Single B., Castoldi A.F., et al. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 1997, 185 (8): 1481–1486.

Lieberman M.C., Brown M.C. Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. *Hearing Research*, 1986, 24 (1): 17–36.

Lieberman M.C., Puria S., Guinan J.J. The ipsilaterally evoked olivocochlear reflex causes rapid adaptation of the 2f1-f2 distortion product otoacoustic emission. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 1996, 99 (6): 3572–3584.

Lieberman M.C., Guinan J.J. Feedback Control of the auditory periphery: anti-masking effects of middle ear muscles vs. olivocochlear efferents. *Journal of Communication Disorders*, 1998, 31 (6): 471–482.

Lim D.J. Cochlear micromechanics in understanding otoacoustic emission. *Scandinavian Audiology Supplement*, 1986, 25: 17–25.

Lonsbury-Martin B.L., Harris F.P., Stagner B.B., et al. Distortion product emissions in humans. I. basic properties in normally hearing subjects. *The Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology. Supplement*, 1990, 147: 3–14.

Lonsbury-Martin B.L., Cutler W.M., Martin G.K. Evidence for the influence of aging on distortion-product otoacoustic emissions in humans. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 1991, 89 (4 Pt 1): 1749–1759.

Maguin K., Campo P., Parietti-Winkler C. Toluene can perturb the neuronal voltage-dependent Ca^{2+} channels involved in the middle-ear reflex. *Toxicological Sciences*, 2009, 107 (2): 473–481.

- Mäkitie A., Pirvola U., Pyykkö I. et al. Functional and morphological effects of styrene on the auditory system of the rat. *Archives of Toxicology*, 2002, 76 (1): 40–47.
- Mauermann M., Kollmeier B. Distortion product otoacoustic emission (DPOAE) input/output functions and the influence of the second DPOAE source. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 2004, 116 (4 Pt 1): 2199–2212.
- McFadden D. Sexual orientation and the auditory system. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2011, 32 (2): 201–213.
- Mills D.M., Norton S.J., Rubel E.W. Vulnerability and adaptation of distortion product otoacoustic emissions to endocochlear potential variation. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 1993, 94 (4): 2108–2122.
- Mills D.M., Rubel E.W. Variation of distortion product otoacoustic emissions with furosemide injection. *Hearing Research*, 1994, 77 (1-2): 183–199.
- Miyoshi N., Watanabe E., Osawa T., et al. ATP depletion alters the mode of cell death induced by benzyl isothiocyanate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1782 (10): 566–573.
- Morata T.C., Campo P. Ototoxic effects of styrene alone or in concert with other agents: a review. *Noise & Health*, 2002, 4 (14): 15–24.
- Morata T.C., Little M.B. Suggested guidelines for studying the combined effects of occupational exposure to noise and chemicals on hearing. *Noise & Health*, 2002, 4 (14): 73–87.
- Morioka I., Miyai N., Yamamoto H., et al. Evaluation of combined effect of organic solvents and noise by the upper limit of hearing. *Industrial Health*, 2000, 38 (2): 252–257.
- Moulin A., Collet L., Veuillet E., et al. Interrelations between transiently evoked otoacoustic emissions, spontaneous otoacoustic emissions and acoustic distortion products in normally hearing subjects. *Hearing Research*, 1993, 65 (1-2): 216–233.
- Müller J., Janssen T. Impact of occupational noise on pure-tone threshold and distortion product otoacoustic emissions after one workday. *Hearing Research*, 2008, 246 (1-2): 9–22.
- Nakajima T., Wang R.S., Elovaara E., et al. Cytochrome P450-related differences between rats and mice in the metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*, 1993, 45 (5): 1079–1085.
- Nakajima T., Wang R.S. Induction of cytochrome P450 by toluene. *The International Journal of Biochemistry*, 1994, 26 (12): 1333–1340.
- Neely S.T., Johnson T.A., Kopun J., et al. Distortion-product otoacoustic emission input/output characteristics in normal-hearing and hearing-impaired human ears. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 2009, 126 (2): 728–738.
- Norton S.J., Gorga M.P., Widen J.E., et al. Identification of neonatal hearing impairment: summary and recommendations. *Ear and Hearing*, 2000, 21 (5): 529–535.

- Oeken J., Lenk A., Bootz F. Influence of age and presbycusis on DPOAE. *Acta Otolaryngologica*, 2000, 120 (3): 396–403.
- Olszewski J., Miłośki J., Olszewski S, et al. Hearing threshold shift measured by otoacoustic emissions after shooting noise exposure in soldiers using hearing protectors. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 2007, 136 (1): 78–81.
- Parker I., Gundersen C.B., Miledi R. Actions of pentobarbital on rat brain receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Neuroscience*, 1986, 6 (8): 2290–2297.
- Pawlaczyk-Luszczyńska M., Dudarewicz A., Bak M., et al. Temporary changes in hearing after exposure to shooting noise. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 2004, 17 (2): 285–293.
- Prasher D., Morata T., Campo P., et al. NoiseChem: An European Commission research project on the effects of exposure to noise and industrial chemicals on hearing and balance. *Noise & Health*, 2002, 4 (14): 41–48.
- Prasher D., Al-Hajjaj H., Aylott S. et al. Effect of exposure to a mixture of solvents and noise on hearing and balance in aircraft maintenance workers. *Noise & Health*, 2005, 7 (29): 31–39.
- Pryor G.T., Rebert C.S., Howd R.A. Hearing loss in rats caused by inhalation of mixed xylenes and styrene. *Journal of Applied Toxicology*, 1987, 7 (1): 55–61.
- Puel J.L., Bobbin R.P., Fallon M. An ipsilateral cochlear efferent loop protects the cochlea during intense sound exposure. *Hearing Research*, 1988, 37 (1): 65–69.
- Pujol R. Lateral and medial efferents: a double neurochemical mechanism to protect and regulate inner and outer hair cell function in the cochlea. *British Journal of Audiology*, 1994, 28 (4-5): 185–191.
- Puria S., Guinan J.J., Liberman M.C. Olivocochlear reflex assays: effects of contralateral sound on compound action potentials versus ear-canal distortion products. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 1996, 99 (1): 500–507.
- Rasmussen G.L. The olivary peduncle and other fiber projections of the superior olivary complex. *The Journal of Comparative Neurology*, 1946, 84: 141–219.
- Rasmussen G.L. Further observations of the efferent cochlear bundle. *The Journal of Comparative Neurology*, 1953, 99 (1): 61–74.
- Rebert C.S., Boyes W.K., Pryor G.T., et al. Combined effects of solvents on the rat's auditory system: styrene and trichloroethylene. *International Journal of Psychophysiology*, 1993, 14 (1): 49–59.
- Rosenthal U., Pedersen K., Svanborg A. Presbycusis and noise-induced hearing loss. *Ear and Hearing*, 1990, 11 (4): 257–263.

Rouiller E.M., Capt M., Dolivo M., et al. Neuronal organization of the stapedius reflex pathways in the rat: a retrograde HRP and viral transneuronal tracing study. *Brain Research*, 1989, 476 (1): 21–28.

Rumeau C., Campo P., Venet T., et al. Toluene effect on the olivocochlear reflex. *Toxicological Sciences*, 2011, 121 (1): 140–145.

Saunders J.C., Canlon B., Flock A. Changes in stereocilia micromechanics following overstimulation in metabolically blocked hair cells. *Hearing Research*, 1986, 24 (3): 217–225.

Schmiedt R.A. Acoustic distortion in the ear canal. I. cubic difference tones: effects of acute noise injury. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 1986, 79 (5): 1481–1490.

Schrott A., Puel J.L., Rebillard G. Cochlear origin of 2f1-f2 distortion products assessed by using 2 types of mutant mice. *Hearing Research*, 1991, 52 (1): 245–253.

Sebel P.S., Ingram D.A., Flynn P.J., et al. Evoked potentials during isoflurane anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia*, 1986, 58 (6): 580–585.

Shaffer L.A., Withnell R.H., Dhar S., et al. Sources and mechanisms of DPOAE generation: implications for the prediction of auditory sensitivity. *Ear and Hearing*, 2003, 24 (5): 367–379.

Sliwińska-Kowalska M., Zamysłowska-Szmytke E., Szymczak W., et al. “Ototoxic effects of occupational exposure to styrene and co-exposure to styrene and noise.” *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 2003, 45 (1): 15–24.

Syka J. Plastic changes in the central auditory system after hearing loss, restoration of function, and during learning. *Physiological Reviews*, 2002, 82 (3): 601–636.

Tadros S.F., D’Souza M., Zhu X., et al. Apoptosis-related genes change their expression with age and hearing loss in the mouse cochlea. *Apoptosis*, 2008, 13 (11): 1303–1321.

Trautwein P., Hofstetter P., Wang J., et al. Selective inner hair cell loss does not alter distortion product otoacoustic emissions. *Hearing Research*, 1996, 96 (1-2): 71–82.

Venet T., Rumeau C., Campo P., et al. Neuronal circuits involved in the middle-ear acoustic reflex. *Toxicological Sciences*, 2011, 119 (1): 146–155.

Venet T., Campo P., Rumeau C., et al. EchoScan: a new system to objectively assess peripheral hearing disorders. *Noise & Health*, 2012, 14 (60): 253–259.

Vincent R. Inventaire des agents chimiques CMR utilisés en France en 2005. *Hygiène et Sécurité du Travail*, 2006, 205: 83–95.

Waniusiow D., Campo P., Venet T., et al. Toluene-induced hearing loss in the guinea pig. *Toxicological Sciences*, 2009, 111 (2): 362–371.

Warr W., Guinan J., White J. Organization of the efferent fibers: the lateral and medial olivocochlear system. In *Neurobiological of Hearing: The Cochlea*. Altschuler R.A., Hoffman D.W. and Bobbins R.P., Eds. Raven Press, New York. pp 333–348.

White J.S., Warr W.B. The Dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 1983, 219 (2): 203–214.

Whitehead M.L., McCoy M.J., Lonsbury-Martin B.L., et al. Dependence of distortion-product otoacoustic emissions on primary levels in normal and impaired ears. I. effects of decreasing L2 below L1. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 1995, 97 (4): 2346–2358.

Yamakura T., Borghese C., Harris R.A. A transmembrane site determines sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors to general anesthetics. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (52): 40879–40886.

Yano B.L., Dittenber D.A., Albee R.R., et al. Abnormal auditory brainstem responses and cochlear pathology in rats induced by an exaggerated styrene exposure regimen. *Toxicologic Pathology*, 1992, 20 (1): 1–6.

Annexes

- Venet T., Rumeau C., Campo P., Rieger B., Thomas A., Cour C. (2011) **Neuronal circuits involved in the middle-ear acoustic reflex.** *Toxicol. Sci.* 119, 146-155.
- Rumeau C., Campo P., Venet T., Thomas A., Cour C., Parietti-Winkler C. (2011) **Toluene effect on the olivocochlear reflex.** *Toxicol. Sci.* 121, 140-145.
- Venet T., Campo P., Rumeau C., Eluecque H., Parietti-Winkler C. (2012) **EchoScan: A new system to objectively assess peripheral hearing disorders.** *Noise Health* 14, 253-259.

Neuronal Circuits Involved in the Middle-Ear Acoustic Reflex

Thomas Venet, Cécile Rumeau, Pierre Campo,¹ Benoît Rieger, Aurélie Thomas, and Chantal Cour

Institut National de Recherche et de Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, 54519 Vandœuvre Cédex, France

¹To whom correspondence should be addressed. Fax: +33-3-83-50-20-96. E-mail: Pierre.campo@inrs.fr.

Received July 28, 2010; accepted September 30, 2010

Human and animal studies have shown that certain aromatic solvents such as toluene can cause hearing loss and can exacerbate the effects of noise. The latter effects might be due to a modification of responses of motoneurons controlling the middle-ear acoustic reflex. In the present investigation, the audition of Long-Evans rats was evaluated by measuring cubic ($2f_1 - f_2$) distortion otoacoustic emissions ($f_1 = 8000$ Hz; $f_2 = 9600$ Hz; $f_1/f_2 = 1.2$) prior to, during, and after activation of the middle-ear acoustic reflex. A noise suppressor was used to modify the amplitude of the $2f_1 - f_2$ distortion otoacoustic emissions. It was delivered either contralaterally (band noise centered at 4 kHz), or ipsilaterally (3.5 kHz sine wave) to test the role played by the central auditory nuclei. This audiometric approach was used to study the physiological efficiency of the middle-ear acoustic reflex during an injection of a bolus of Intralipid (as a vehicle) containing 58.4, 87.4, or 116.2mM toluene via the carotid artery. The results showed that toluene could either increase or decrease middle-ear acoustic reflex efficiency, depending on the toluene concentration and the ear receiving noise suppressor. A new neuronal circuit of the middle-ear acoustic reflex has been proposed to explain findings obtained in this investigation. Finally, the depressing action of toluene on the central auditory nuclei driving the middle-ear acoustic reflex might explain the synergistic effects of a co-exposure to noise and aromatic solvents.

Key Words: DPOAE; toluene; co-exposure; noise; middle-ear reflex.

While noise is clearly the predominant occupational hazard to hearing, research on hearing conservation proves that noise is often present in occupational settings where chemical exposure also occurs (EU-OSHA, 2010; Morata and Campo, 2001). For instance, aromatic solvents have been demonstrated to be ototoxicants and can even worsen the effects of noise exposure in animals (Lataye *et al.*, 2000) and humans (Morata *et al.*, 1994; Sliwinska-Kowalska *et al.*, 2003). However, neither the European directive (2003/10/EC) nor the American noise standards take complex exposures including chemicals into consideration.

Recently, our research team showed that toluene can act as an antagonist of neuronal acetylcholine receptors (Bale *et al.*,

2002, 2005; Lataye *et al.*, 2007), and more specifically as a blocker of neuronal voltage-dependant Ca^{2+} channels (Maguin *et al.*, 2009). Because of these effects, toluene might be capable of depressing the auditory nervous system driving the ear-protective reflexes and in particular the middle-ear reflex. The main physiological functions of the middle-ear acoustic reflex are to protect the inner ear from high-intensity noises by reducing the penetration of acoustic energy into the cochlea, and to reduce acoustic masking. To perform its protective role, high-intensity noises presented to either ear cause middle-ear acoustic reflex activation on both ears. This bilateral characteristic is well known, and is used by clinicians to diagnose ear or even facial-nerve pathologies (Prasher *et al.*, 2005; Silman *et al.*, 1988; Wilson and McBride, 1978).

In mammals, the auditory efferent system is a descending centrifugal pathway, with its source in the vicinity of the superior olivary complex (SOC). In the brainstem, this is divided into two main subsystems: the medial and lateral olivocochlear pathways (White and Warr, 1983). It is composed of crossed and uncrossed neurons constituting the efferent innervations of the organ of Corti. The majority of these neurons terminate on either the outer hair cells (OHCs) or the eight nerve ganglion cells beneath the inner ear cells (Pujol and Lenoir, 1986). While some neurons located outside the SOC are involved in the reflex arc of the middle-ear muscles (Rouiller *et al.*, 1989), most of the motoneurons controlling contraction of the stapedius and tensor tympani muscles are located in the vicinity of the facial or trigeminal nerve nuclei (Lee *et al.*, 2006). Because of the structure of the efferent system, the middle-ear acoustic reflex can be elicited by sound-evoked efferent feedback (Murata *et al.*, 1986). It has been demonstrated that contralateral acoustic stimulation of the efferent olivocochlear pathway is capable of decreasing the activity of auditory-nerve afferent fibers, even in anesthetized animals (Warren and Liberman, 1989). Thus, through stimulation of the facial and trigeminal nerve nuclei involved in the middle-ear acoustic reflex, a contralateral sound may decrease the activity in the opposing cochlea (Campo *et al.*, 2007; Maguin *et al.*, 2009).

Today, a noninvasive approach, distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) can be used to evaluate middle-ear acoustic reflex efficiency and the effects of aromatic solvents on the middle-ear acoustic reflex. DPOAEs are low-level sounds emitted by the cochlea through the middle-ear system, when the auditory receptor is stimulated by two tones: f_1 and f_2 . They can be measured by a sensitive microphone fitted into the outer-ear canal. As a result, they allow measurement of even slight modifications of middle-ear impedance. Among the different types of DPOAEs, cubic ($2f_1 - f_2$) DPOAEs can be recorded in anesthetized rats and in humans. They are reliable indicators of outer hair cell (OHC) function (Lim, 1986) and are also very sensitive to changes in middle-ear impedance. Consequently, $2f_1 - f_2$ DPOAEs are highly suitable for studying solvent effects on the middle-ear acoustic reflex. For almost two decades, $2f_1 - f_2$ DPOAEs have been used in humans (Bonfils *et al.*, 1994) and more recently they have been adapted for animal investigations (Pouyatos *et al.*, 2002).

In the present study, DPOAEs were recorded while the middle-ear acoustic reflex was activated by a noise suppressor tone emitted in the ipsilateral (IPSI) or contralateral (CONTRA) ear of the rat under investigation. Using this experimental approach, we were capable of evaluating the function of the peripheral auditory system in its entirety (namely: middle ear + inner ear), and completing the results obtained with electrophysiological measurements in previous experiments (Campo *et al.*, 2007; Maguin *et al.*, 2009).

The aims of the current project were: firstly, to develop a noninvasive audiometric tool to studying middle-ear reflex physiology; second, to confirm the depressant effects of toluene on motoneurons; and thirdly, to better understand the physiological meaning of the N-component identified in our previous studies (Campo *et al.*, 2007; Maguin *et al.*, 2009). Determining the anatomical relationship between the afferent and efferent pathways became of special interest with regard to the findings found from these series of toxicological investigations. In addition to DPOAE measurements, cochlear morphological studies were used to evaluate the role played by the auditory receptor relative to that played by the auditory nervous centers located in the brainstem. Results obtained over the course of the study led us to consider the relationship between the afferent and efferent pathways in more details. These considerations allow us to formulate a hypothesis as to how the input from the various nerve centers is integrated to generate an appropriate middle-ear acoustic reflex.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Adult Long-Evans rats weighing over 350 g were used in the present study ($n = 21$). The route taken by the different bolus injections from the carotid trunk up to the brainstem was traced in three additional animals. Animals were

purchased from Charles River breeder (Saint Aubin-les-Elbeuf, France) 2 weeks before the start of the experiments. They were housed in individual cages ($350 \times 180 \times 184$ mm) with irradiated pinewood bedding (supplier: Special Diets Services, France, ref: Gold cob 891180). Food and tap water were available *ad libitum*. The animals were on a normal day/night cycle: lighting was on 12 h/day. Room temperature and relative humidity were controlled in the animal facility at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and $55 \pm 10\%$, respectively. The animal facilities have full accreditation and while conducting the research described in this article, the investigators adhered to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals as promulgated by the French *Conseil d'Etat* through decree no. 87-848, published in the French *Journal Officiel* on 20 October 1987.

Anesthesia

General anesthesia was required to record DPOAEs in rats equipped with an intracarotid catheter. Levomepromazine (12.5 mg/kg) was given to animals by ip injection 15 min prior to the measurements. The aim of this premedication was to minimize stress in the subjects. Deep anesthesia was induced by injection of a mixture of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg). Supplemental doses of anesthesia of one fifth of the original bolus were administered approximately once per hour, or when the rat responded to a toe pinch. A heating pad system was used to maintain rectal body temperature at 38°C . Otoloscopic examination was carried out to verify that the tympanic membranes were exempt from any obstruction, infection, or other abnormalities before recording DPOAEs.

In complementary experiments, three animals were used to identify the tissue targeted within the brainstem. These experiments were carried out on animals anesthetized with a high dose of ketamine (75 mg/kg).

Reflex measurement

DPOAE Recording

All measurements were performed inside a sound-attenuated booth. The custom-designed DPOAE probe consisted of two transducers generating the primary tones: $f_1 = 8000$ Hz and $f_2 = 9600$ Hz and a microphone measuring the acoustic pressure within the outer ear canal. Primary tones f_1 and f_2 were delivered at 65 and 60 dB SPL, respectively, and delivered to the ipsilateral (left) ear. The level of the highest intensity sound was limited to 65 dB SPL so as not to activate the middle-ear acoustic reflex. The ratio of $f_1:f_2$ was 1.2, which is suitable both for rats (Henley *et al.*, 1989) and humans (Gaskill and Brown, 1990). The primary tone signals were produced by frequency synthesizers (Pulse, B&K 3110) and emitted by two miniature speakers (Microphone, B&K type 4191). These elicitor sounds were considered as the ipsilateral (IPSI) acoustic stimulation in our protocol, as illustrated in Figure 1. The frequencies of the primary tones were chosen to yield what is commonly referred to as cubic difference tones: $2f_1 - f_2$.

The calibration procedure ensured that the primary tones were always emitted at the target intensities. Calibration was performed with an 1/8 in. microphone (B&K type 4138) placed in a specifically designed cavity of volume equivalent to that of the outer ear canal of the rat. DPOAEs were recorded with a microphone (Knowles FG 23329-C05) fitted into the probe. The three transducers were enclosed in the probe, whose tip was pressed gently against the opening of the ear canal.

The emitted response was measured by a FFT analyzer (B&K PULSE 3110). DPOAE amplitude was determined from a linear averaged ($N = 148$) spectrum of 500 ms, knowing that each FFT epoch lasted 10 ms (overlap 66.7%). Spectrum averaging was recorded every 500 ms to trace the evolution of DPOAE amplitude as a function of middle-ear acoustic reflex activity.

Contralateral and Ipsilateral Acoustic Stimulations

Contralateral. The contralateral noise (noise suppressor) was an 800-Hz band noise centered at 4 kHz. Each tone burst lasted 2.5 s and was followed by a 9.5 s silent window before the next tone burst, as illustrated in Figure 1. Noise suppressor intensity for contralateral experiments was 100 dB SPL. The signal

was synthesized by a B&K Pulse 3109 and emitted by an Etymotic Research ER4 B earphone. DPOAEs were measured prior to and during the delivery of the noise suppressor.

Ipsilateral. The ipsilateral noise suppressor was a 3.5-kHz sine wave. Noise suppressor intensity was lower (75 dB SPL) than that used in the contralateral conditions so as not to disturb the $2f_1 - f_2$ DPOAEs measured in the same ear. Each tone burst lasted 2.5 s and was followed by a 9.5-s silent window before the next tone burst (Fig. 1). The signal was synthesized by a B&K Pulse 3110 and emitted by one of the transducers included in the probe. In fact, f_1 and f_2 were generated by one transducer and the noise suppressor tone by the other one. DPOAEs were measured prior to and during the delivery of the noise suppressor.

Catheter Implantation and Solvent Injections

A ventrolateral incision was made in the neck to expose the left carotid artery. The external carotid artery was ligated to drive the bolus toward the brainstem. A circular custom-made catheter (Te in polypropylene i.d. = 1.6 mm extended with silicon catheters i.d. = 0.635 mm) filled with a solution of NaCl 0.9% and heparin (50 IU/ml) was fitted into the common carotid trunk. This type of catheter allows normal blood flow to be maintained and the vehicle containing the solvent to be injected. An illustration of the catheter is available in Lataye *et al.* (2007).

Once inserted, the circular catheter was filled with vehicle, consisting of a 10% fatty emulsion of purified soya oil and essentials fatty acids (Intralipid Ref: 830513161; Fresenius Kabi company). All injections were performed with a syringe pump calibrated to deliver a 266 μ L bolus over 80 s (Fig. 1). Three concentrations of toluene (Prolabo, 20675294) were tested in this investigation: 58.4mM ($n = 4$), 87.4mM ($n = 5$) and 116.2mM ($n = 5$). The 0mM ($n = 4$) concentration corresponded to an injection of vehicle alone.

It is important to bear in mind that all concentrations are given as the concentrations inside the syringe, not to the effective concentrations reaching the brain and/or cochlea. Each animal was tested with a single concentration.

Histology

Evaluation of the Organ of Corti

Histological analysis of the cochleae was carried out to evaluate the physiological impact of the solvent and how it related to the DPOAE measurements. The succinate dehydrogenase (SDH) activity of the organ of Corti was estimated by evaluating SDH staining density in hair cells of the left cochlea (injection and ipsilateral side) using a colorimetric assay using nitroblue tetrazolium (NBT) monosodium salt. Stock solutions (0.1% NBT,

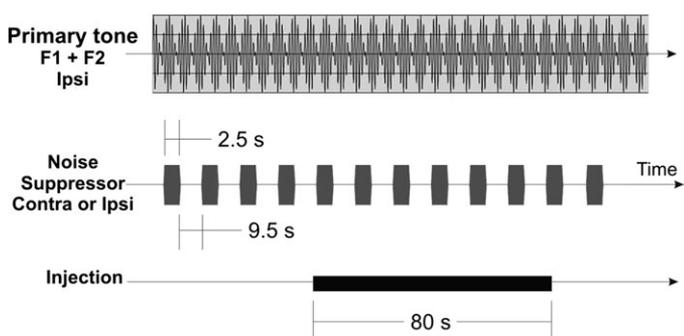


FIG. 1. Study schedule. The hearing tests were carried out with Long-Evans rats using $2f_1 - f_2$ DPOAEs. Primaries: $f_1 = 8000$ Hz at 65 dB SPL and $f_2 = 9600$ Hz at 60 dB SPL; $f_1/f_2 = 1.2$. The contralateral noise suppressor was an 800 Hz band noise centered at 4 kHz, whereas the ipsilateral noise suppressor was a 3.5 kHz sine wave.

0.2M sodium succinate and 0.2M phosphate buffer at pH 7.4) were prepared and stored at 4°C. Working solutions were always freshly prepared by mixing the stock solutions NBT, sodium succinate, and phosphate buffer in a 2:1:1 ratio. At the end of the hearing test, animals were anesthetized with an overdose of ketamine and sacrificed. The cochleae were quickly removed and perfused through the round window with the SDH staining solution. The excess of staining solution was allowed to drain out through the oval window. The cochleae were then incubated for 1 h at 37°C.

After SDH staining, the cochleae were perfused with 4% glutaraldehyde in 10mM phosphate-buffered saline at pH 7.5 and incubated overnight. After fixation, the cochleae were drilled and dissected. The bony wall and spiral ligament were removed before trisecting and examining the organ of Corti.

Tracing Study

To delineate the tissue targeted by the bolus of Intralipid containing the solvent, the tracer (OsO_4) was injected slowly into the carotid with a microsyringe. Before injecting the tracer, three rats were perfused with a mixture of saline solution and heparin. The tracing study was carried out on dead animals. After tracer injection, the brain was removed and frozen (-60°C). Frozen 20- μ m-thick sections were cut in the frontal plane through the relevant segment of the brainstem; -10.04 mm from bregma point).

Data Recording

The $2f_1 - f_2$ DPOAE changes measured with and without noise suppressor (NS and noNS) are illustrated in Figure 2. The middle-ear acoustic reflex metric followed the decrease in DPOAE amplitude, and could be modeled as follows:

$$\text{MIDDLEEAR ACOUSTIC REFLEX} = \text{DPOAE}_{(\text{noNS})} - \text{DPOAE}_{(\text{NS})}$$

In Figure 2, the gray squares correspond to middle-ear acoustic reflex efficiency upon noise suppressor tone emission.

In order to avoid the edge effects, only the four most central DPOAE measurements (open triangles) were taken into account. Transition values were excluded from the calculation (crosses in Fig. 2).

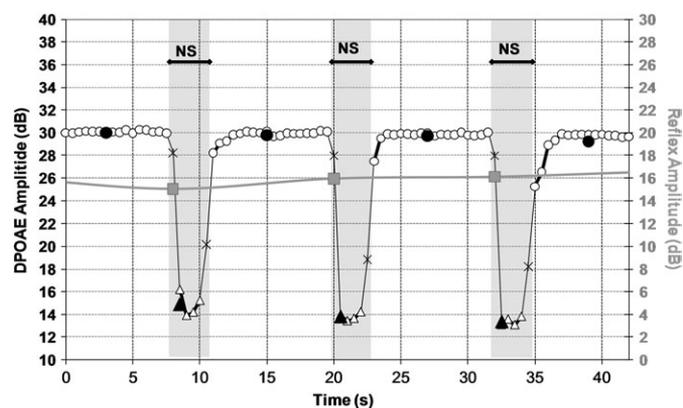


FIG. 2. Decrease in DPOAE amplitude provoked by the protective reflexes. Each noise suppressor (NS) tone lasted 2.5 s and was emitted at 100 dB SPL. NS was emitted in the contralateral ear. Left y-axis: DPOAE amplitude. Right y-axis: DPOAE NS-induced variation. Open circle: DPOAE measured for 500 ms without NS. Black circle: mean of 18 DPOAE measured in the absence of NS. Open triangle: DPOAE measured for 500 ms during NS burst emission. Black triangle: mean of four measurements performed during NS burst emission. Cross: DPOAE measurements excluded from the calculation. Gray squares correspond to the reflex amplitude: difference between the mean of the two black circles and the black triangle for each series of measurements.

Prior to injection, four middle-ear acoustic reflex values were recorded; they are plotted in Figures 3 and 4. The average magnitude of the middle-ear acoustic reflex (avgMER) was calculated for all animals using the four values recorded prior to injection.

During solvent injection, the increase in middle-ear acoustic reflex amplitude was called the N-component, or “negative” component. This corresponds to a decrease in the acoustic energy penetrating into the cochlea as middle-ear acoustic reflex amplitude increases. In contrast, the decrease in middle-ear acoustic reflex amplitude was called the P, or “positive” component, corresponding to an increase in the acoustic energy penetrating into the cochlea. Both components were differences calculated using the middle-ear acoustic reflex values obtained during the injection and the avgMER, obtained before injection.

Statistics

Statgraphics Centurion XV software was used to perform all statistical analyses. A one-way ANOVA was run to test the significance of the $2f_1 - f_2$ variations as a function of the experimental conditions. The statistical result is expressed as follows: $[F(df_b, df_i) = F\text{-ratio}; p = p\text{ value}]$ in which, df_b is the number of degrees of freedom between-groups and df_i , the number of degrees of freedom within a group. F -ratio is the mean square value between groups divided by the mean square value within a group. *Post hoc* analysis was performed using Bonferroni method. The 95% confidence interval was considered to evaluate the significance of statistical tests.

RESULTS

Toluene Effects on the Contraction of the Muscles in the Middle-ear

Contralateral Acoustic Stimulation

When measuring solvent effect in the contralateral ear, the $2f_1 - f_2$ DPOAE amplitudes were approximately 30 dB SPL (Figs. 3A and 3B). Prior to injection, the avgMER values were 12 dB (30–18) for animals receiving 58mM toluene (Fig. 3A) and 16 (30–14) for animals receiving 116mM toluene (Fig. 3B). Injection of toluene at 58mM elicited no P-component, and only one N-component, whose amplitude was approximately 8 dB (Fig. 3A). The amplitude of the N-component was increased for the first 30 s of the injection, it subsequently remained constant up to the end of the injection of interest.

Injection of toluene at 116mM provoked one N-component (3 dB) followed by one P-component (11 dB) (Fig. 3B). Thus, at this concentration, the toluene injection induced two successive components: first, the N-component, then the P-component. It is therefore clear that the concentration of solvent injected directly affects middle-ear acoustic reflex efficiency.

While the N-component lasted 30 s, as shown in Figure 3A, the P-component interacted with the N-component from about 20 s. As a result, the N-component was masked by the P-component at the 116mM concentration. Amplitude of the P-component peaked at the end of the injection period.

The changes of N-component amplitude as a function of toluene concentration are reported in Table 1. There was

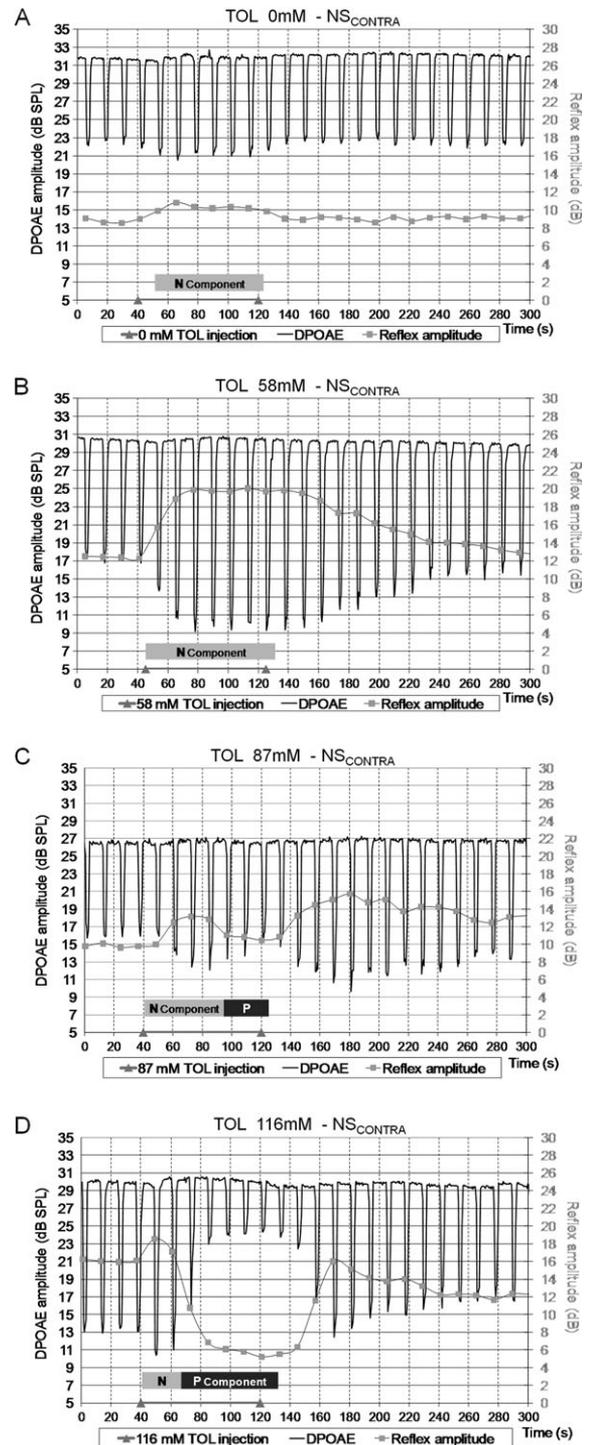


FIG. 3. Variations of $2f_1 - f_2$ DPOAE amplitude and middle-ear acoustic reflex efficiency prior to, during, and after toluene injection (A) 58mM; (B) 116mM toluene injection. A 266 μ L bolus of vehicle containing appropriate concentrations of toluene was injected over 80 s (gray triangles). Primary tones were delivered in the ipsilateral ear: $f_1 = 8000$ Hz and $f_2 = 9600$ Hz at $L_1 = 65$ dB SPL and at $L_2 = 60$ dB SPL, respectively. Frequency ratio was 1.2. The contralateral noise suppressor was an 800-Hz band noise centered at 4 kHz and emitted at 100 dB SPL. N-component: decrease of the acoustic energy entering the cochlea. P-component: increase of the acoustic energy entering the cochlea. This single representation is representative of the group ($n = 5$).

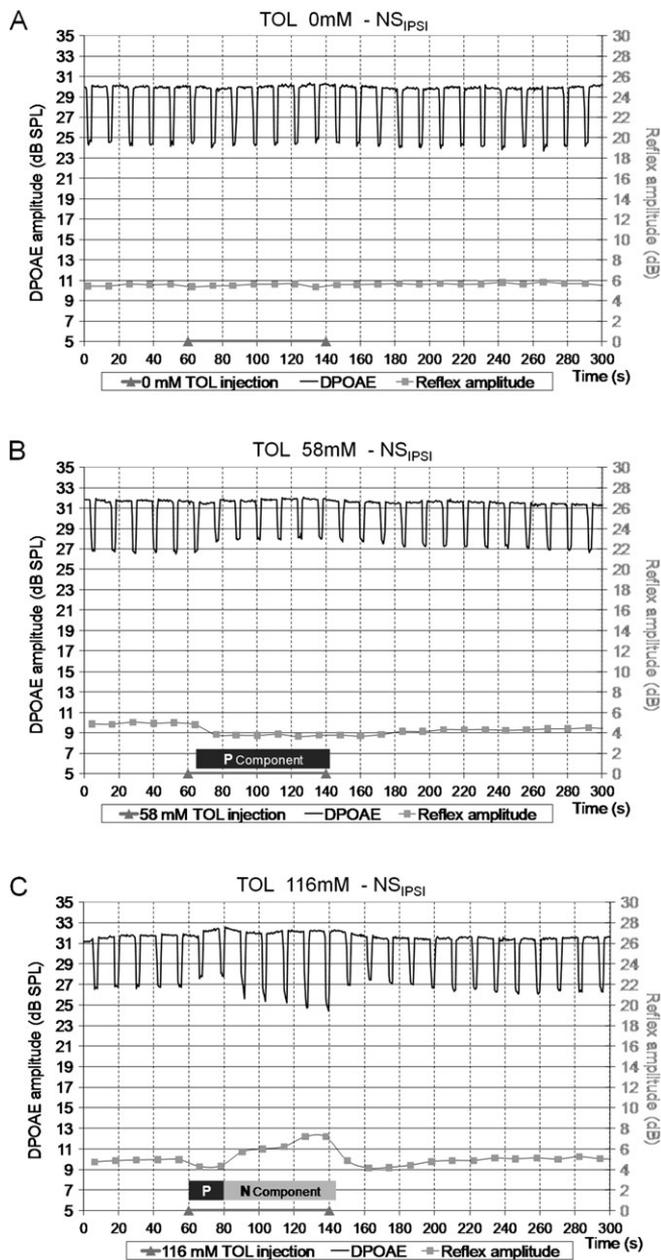


FIG. 4. Variations of $2f_1 - f_2$ DPOAE amplitude and middle-ear acoustic reflex efficiency in the ipsilateral ear prior to, during, and after injection of toluene. (A) 58mM; (B) 116mM toluene. A 266 μ L bolus of vehicle containing appropriate concentration was injected over 80 s (gray triangles). Primary tones $f_1 = 8000$ Hz and $f_2 = 9600$ Hz were emitted at $L_1 = 65$ dB SPL and $L_2 = 60$ dB SPL, respectively. Frequency ratio was 1.2. The ipsilateral noise suppressor was a 3.5-kHz sine wave emitted at 75 dB SPL. P-component: increase of the acoustic energy penetrating into the cochlea. N-component: decrease of the acoustic energy penetrating into the cochlea. This single representation is representative of the group ($n = 5$).

a significant [$F(3,14) = 3.4$; $p = 0.048$] difference between the amplitudes obtained at 0 and 58mM. At higher concentrations (87 and 116mM) the N-component amplitudes were masked by the presence of the P-component.

TABLE 1
Effect of Toluene Concentration on N/P Component Amplitude Obtained with a Contralateral Stimulation

Component	[Tol] mM	N	Mean dB	SD	Variance coefficient %	Bonferroni homogeneous groups	
N	0	4	2.6	0.9	34	X	
N	58	4	5.5	1.6	30	x	x
N	87	5	3.8	1.6	40	x	x
N	116	5	3.7	0.7	20		X
P	0	4	0.0	0.0		X	
P	58	4	0.0	0.0		X	
P	87	4	2.5	2.5	100	X	
P	116	6	7.5	4.9	65		X

Note. Significant differences between homogeneous groups are indicated with a X in bold.

There was a significant difference [$F(3,14) = 6.4$; $p = 0.006$] between the effects of toluene injections at 116mM and lower concentrations for the P-component (Table 1).

An Ipsilateral Acoustic Stimulation

When measuring solvent effect on the ipsilateral ear, injection of toluene at 58mM provoked no N-component and only one P-component (Fig. 4A). In contrast, 116mM toluene provoked two successive components having a different time-course from that shown in Figure 3B: first, P-component, then, N-component.

Thus, depending on the side to which the noise suppressor tone was applied, opposing effects of toluene injections were observed.

The P-component amplitude obtained in the ipsilateral ear was greater than 1 dB [$F(2,14) = 4.98$; $p = 0.03$] (Fig. 4A). The difference in amplitude between animals receiving no solvent (0mM) and those treated with 58mM toluene was found to be significant by Bonferroni *post hoc* analysis. The amplitude of the N-component was approximately 2 dB (Table 2). Lower amplitudes were expected in this series of experiments because of the noise suppressor intensities used (100 dB contra vs. 75 dB IPSI). The significant reduction of noise suppressor intensity was required in the ipsilateral side so as not to skew the $2f_2 - f_1$ DPOAEs measurements performed in the same ear.

The N-component amplitude obtained with 116mM toluene (Fig. 4B) was greater than 2.5 dB [$F(2,14) = 20.57$; $p < 0.001$]. Bonferroni *post hoc* analysis shows significant differences between 116 and [0 or 58mM] (Table 2).

Histology

Cochleae

Cochleae from a representative control subject and a subject having received a 266- μ L bolus of Intralipid containing 116mM of toluene were stained for SDH throughout the entire cochlea (Fig. 5). During acoustic stimulation, the toluene-exposed subject showed a clear inhibition of the middle-ear acoustic reflex during the injection; however, histological

TABLE 2
Effect of Toluene Concentration on N/P Component Amplitude
Obtained with an Ipsilateral Stimulation

Component	[Tol] mM	N	Mean dB	SD	Variance coefficient %	Bonferroni homogeneous groups	
N	0	5	0.1	0.1	81	X	
N	58	5	0.1	0.1	220	X	
N	116	5	2.0	0.8	45		X
P	0	4	0.3	0.2	77	X	
P	58	4	1.0	0.3	43		X
P	116	6	0.7	0.4	55	X	X

analysis of a control and toluene-exposed organs of Corti revealed no distinct effect of the solvent (Figs. 5A and 5B). Closer examination, using higher magnifications, also showed an absence of cochlear impairments, regardless of the turn

examined. Thus, no obvious differences in SDH staining density were observed in apical (Figs. 5C and 5F), medial (Figs. 5D and 5G), or basal turns (Figs. 5E and 5H).

Brainstem

To determine the route taken by the solvent injected into the ipsilateral carotid artery, a tracer (OsO_4) was used. The tracer was injected into the same artery in controls, and its route of travel to the brainstem observed. OsO_4 injected into the ipsilateral carotid colored the route taken by the solvent on its way to the brainstem. The basilar artery was well delineated at the level of the cerebellar trunk (Fig. 6A). The amount of tracer reaching the ipsilateral brain was greater than that reaching the contralateral brain (Fig. 6B). The two frozen slices show that the basal part of the cerebellar trunk is reached by the tracer (Figs. 6C and 6D). This means that the tracer, and thus presumably the solvent, has reached the SOC in our experimental conditions.

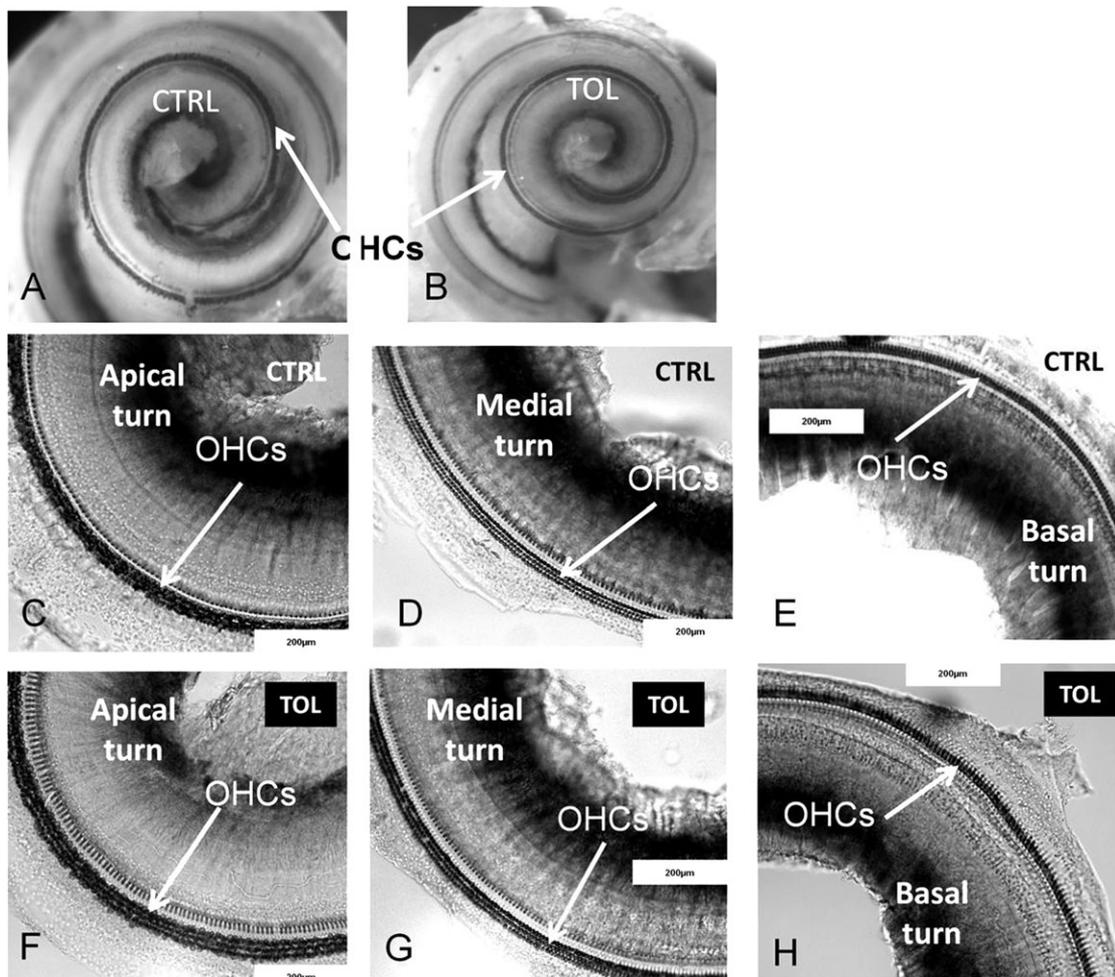


FIG. 5. Light micrographs showing a low power view ($G \times 35$) of left cochleae after injection of a 266- μL bolus of (A) Intralip containing toluene (116mM); (B) Intralip alone. The OHC were colored with NBT monosodium salt to evaluate SDH activity. Higher magnifications ($G \times \text{BRIEGER}$) of the organ of Corti show the three rows of OHCs in the (C/F) apical, (D/G) middle and (E/H) basal turns.

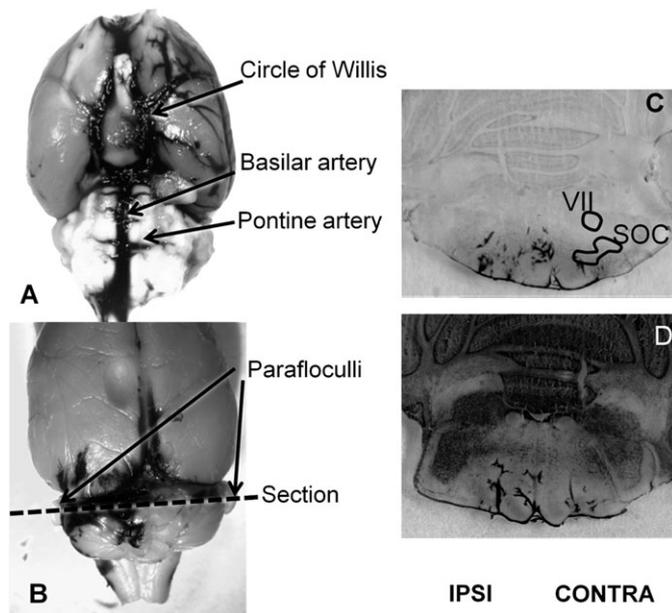


FIG. 6. Light micrographs showing the path taken by a tracer (OSO_4) injected into the common carotid trunk. (A) Ventral view showing the basilar artery, the pontine arteries, and the circle of Willis. (B) Dorsal view showing the relative distribution of the tracer between the IPSI and CONTRA side of the brain. (C, D) Transverse sections of the cerebellar trunk of two different rats showing the tissue targeted by a toxic agent injected via the carotid artery from the IPSI side. VII, facial motor nucleus.

DISCUSSION

As expected from previous experiments (Campo *et al.*, 2007; Lataye *et al.*, 2007), a bolus of 116mM toluene injected into the left carotid trunk provoked a biphasic effect regardless of the side of acoustic stimulation. The biphasic effect observed at 116mM could be due to a difference of toluene concentration reaching the targeted tissue. The time-course of the variations of the MER amplitudes in Figure 3D, before and after the P-component, suggests a smooth transition from low-concentration to high-concentration effect.

In a previous publication (Lataye *et al.*, 2007), we succeeded in identifying the nature of the P-component observed during solvent injection, it corresponded to an inhibition of the middle-ear acoustic contraction. With this new experimental approach, we know now that the N-component observed during solvent injection corresponds to an unexpected increase in middle-ear acoustic reflex efficiency. Surprisingly, a low concentration of toluene (58mM) can induce a stronger-contraction of the middle-ear muscles than that observed in physiological (no toluene) conditions (Fig. 3B). Thus, depending on its concentration, toluene can act on the auditory nervous centers to increase or decrease middle-ear acoustic reflex efficiency. However, that does not mean that toluene can have either exciting or inhibiting action on the same targeted tissue as a function of its concentration. Indeed, for similar

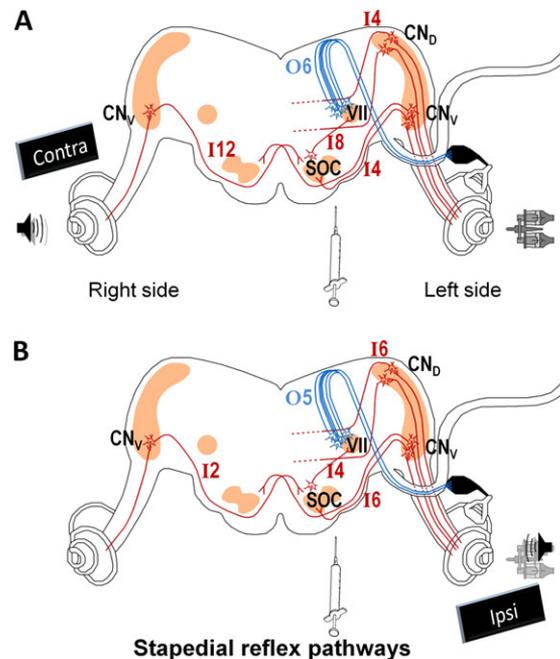


FIG. 7. General wiring diagram of the course of afferent (red line) and efferent (green line) limbs of the stapedius reflex in the rat. VII: facial motor nucleus. (A): Contralateral acoustic stimulation. (B): Ipsilateral acoustic stimulation. I: afferent spikes arbitrarily rated from 2 (ambient noise) to 12 (contralateral acoustic stimulation emitted at 100 dB SPL). O: efferent output eliciting the contraction of the middle-ear muscles in physiological conditions (without solvent injection).

toluene concentrations, opposing effects on middle-ear acoustic reflex were obtained depending on the side into which the noise suppressor was delivered (IPSI vs. CONTRA). The same toluene concentration cannot play an exciting or inhibiting role on the same targeted tissue. So, the toluene concentration cannot simply explain the findings reported in the present publication. It is clear that the side into which the noise suppressor is delivered appears to be a key parameter in determining the order of N- and P-components, either N then P (Fig. 3D), or P then N (Fig. 4C).

From our previous series of experiments, we knew that toluene could act on the central nervous system (Maguin *et al.*, 2009) although, based on these results, we could not completely discard a cochlear effect. In the present investigation, histological analysis confirmed that the solvent injection did not dramatically affect the cochlea. Indeed, no difference in physiological state was found between cochleae harvested from toluene-exposed rats and those from controls (Fig. 5). Moreover, the fact that no variation of $DPOAE_{(noNS)}$ amplitudes can be observed during or after injection proves that cochlea does not seem to be disturbed by toluene in these particular experimental conditions.

Only a disturbance at the central level could explain the toxicological results obtained in the present series of experiments.

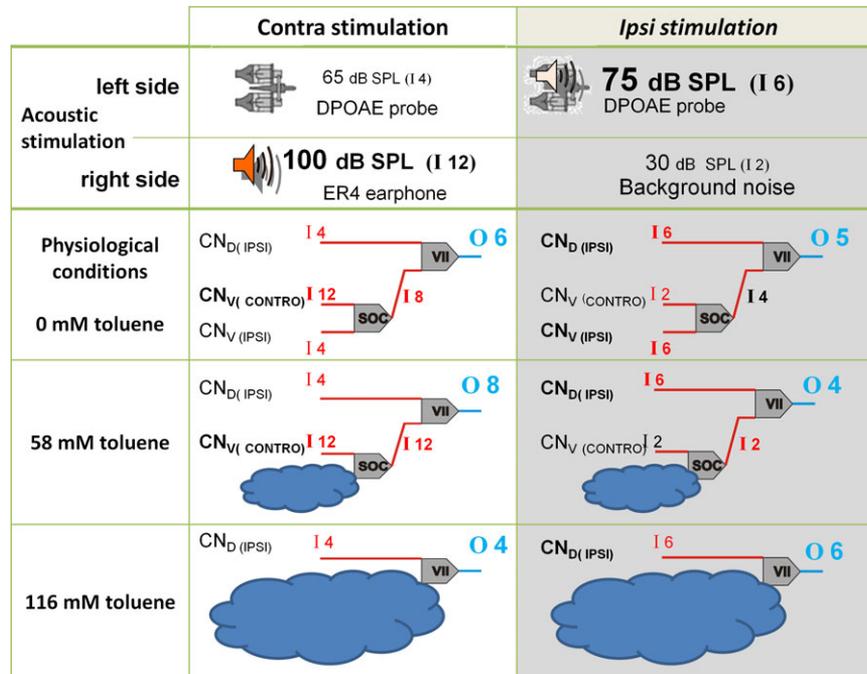


FIG. 8. Neuronal circuit involved in the middle-ear reflex deduced from physiological and toxicological data. I, afferent spikes arbitrarily rated from 2 (ambient noise) to 12 (contralateral acoustic stimulation emitted at 100 dB SPL); O, efferent output signal eliciting the contraction of the middle-ear muscles. Blue clouds correspond to the toluene-contaminated area.

A disturbance of the cerebellar trunk was suspected to be at the origin of this phenomenon. A tracer compound was used to determine the path taken by the solvent to reach the brainstem. This was found to be via the basilar and pontine arteries (Fig. 6A). Figures 6C and 6D shows the location of perifacial and medial olivary nuclei in the brainstem. Those nuclei play a major role in the auditory protective reflexes. As shown in the schema illustrated in Figure 7, the middle-ear acoustic reflex is controlled by a feedback loop wired with afferent and efferent auditory neurons. Most motoneurons are spatially distributed over perifacial nuclei (Lee *et al.*, 2006). While the role played by the motoneurons is clear, the physiological role played by the afferent neurons and the interneurons connected to auditory nuclei are still questioned.

The toxicological data obtained through the study described here can explain, at least partly, the key role played by the interneurons linking the nuclei to the cerebellar trunk.

Basically the dorsal and ventral cochlear nuclei (CN_D ; CN_V) and the SOC are all involved in the middle-ear acoustic reflex (Borg, 1973; Lee *et al.*, 2006; Rouiller *et al.*, 1989). In our opinion, the interneurons and the neurons from auditory nuclei are capable of interpreting different afferent spikes (I, Figs. 8 and 9), coming from both ears to generate single integrated response (O, Figs. 8 and 9) eliciting the middle-ear acoustic reflex. That means that through the interneurons, the auditory nuclei can adjust the middle-ear acoustic reflex response as a function of the intensities recorded in both ears (Figs. 8 and 9).

We have illustrated this theory in Figures 8 and 9 in which CONTRA stimulation elicits responses from central nuclei in the brainstem directly through the periolivary nucleus (SOC) or indirectly through the facial nucleus (VII). The auditory messages are coded with spikes traveling on crossed and uncrossed afferent fibers originating from ventral and dorsal cochlear nuclei (CN_V and CN_D). According to this model, the central nuclei have to compute at least three pieces of information in order to determine what sort of middle-ear acoustic reflex response to elicit.

To make the explanations as clear as possible, we will now provide a simple example, to describe what happened to the middle-ear acoustic reflex during solvent injection via the left carotid trunk. The CONTRA acoustic stimulation emitted at 100 dB SPL generated more numerous spikes (I12, Fig. 8) than those generated by the primary tones (I4) whose intensity was 65 dB SPL. Thus, in physiological conditions, the SOC integrates spikes coming from all ventral pathways (uncrossed I4 and crossed spikes I12) to give a balanced response $[(I12 + I4)/2 \Rightarrow I8]$. Then, the facial nucleus computes the SOC response (I8) with spikes (I4) coming from $CN_{D(IPSI)}$. Finally, the output signal $(I8 + I4 \Rightarrow O6)$, output signal 6) eliciting the contraction of the middle-ear muscles through efferent limbs takes all of the acoustic messages coming from both ears into consideration.

Considering O6 as the integrated output signal eliciting the middle-ear acoustic reflex, the toxicological data reported in

this article show that toluene can disturb one or two integration levels depending on its concentration (Fig. 8).

Thus, a bolus containing 58mM toluene disturbs only the first level of the cerebellar integration center: the spikes coming from the CN_{V(IPSI)} (Fig. 8). Consequently, the periolivary region receives only spikes coming from the CN_{V(CONTRA)} [I12], and the facial nucleus receives I12 and spikes coming from the CN_D regions (I4). As a result, injection of 58mM toluene results in an output signal rated O8. This high value explains why a low-concentration of toluene increases the amplitude of middle-ear acoustic reflex contraction over that observed in the absence of toluene with the same acoustic parameter (O8 > O6; Fig. 3A).

In contrast, a bolus containing 116mM toluene disturbs the SOC in its entirety (Fig. 8, 4th line), leading to an output signal rated O4 (O4 < O6) This explains why the amplitude of middle-ear acoustic reflex contraction was lower at this concentration (Fig. 3B).

As illustrated in Figure 7B, acoustic stimulations emitted on the IPSI side also elicit responses from auditory cerebellar regions. But, in these conditions, the totality of the spikes provoked comes from uncrossed afferents sources (Fig. 8, right column) originating in CN_V and CN_D. During this time, the CONTRA ear is only stimulated by the background noise. Consequently, we can class the spikes in two categories: I2 coming from the quiet side and I6 coming from the noisy side (Figs. 7B and 8). As previously, we will take a simple example.

Under physiological conditions, the crossed spikes are scarce (I2) because there is no acoustic stimulation on the IPSI side. On the contrary, spikes coming from the CN_{V(IPSI)} and CN_{D(IPSI)} are numerous: I6. Like in the previous example, the auditory nervous centers deal with spikes at two levels: first, in the vicinity of the SOC leading to spikes rated I4; second, at the facial nucleus generating an output signal rated O5.

A bolus containing 58mM toluene disturbs only the auditory spikes coming from the CN_V (Figs. 7B and 8). As a result, the periolivary region transfers I2 spikes to the facial nucleus, resulting in an output signal rated O4. Because O4 < O5, toluene at 58mM decreases the amplitude of the contraction induced by the middle-ear acoustic reflex (Fig. 4A). On the other hand, a bolus containing 116mM toluene disturbs the SOC as a whole, leading to an output signal O6. Because O6 > O5, toluene at 116mM increases the amplitude of the contraction induced by the middle-ear acoustic reflex (Fig. 4B). Consequently, O6 depends only on I6 spikes, which results from CN_D IPSI through the facial nucleus.

To conclude, the results obtained in these investigations can be explained by the presence of interneurons between the facial nucleus and the SOC, as suspected by Borg (1973) and Lee *et al.* (2006). They could analyze the intensity of the noise coming from both ears to adapt the middle-ear acoustic reflex response. Therefore, the neuronal circuits involved in the middle-ear acoustic reflex are more complex than those

previously described. A possible organization of the neuronal circuits has been proposed in the present paper. It should help the interpretation of clinical tests hampered by incomplete physiological and anatomical knowledge of the central routes involved in reflex activation for the middle-ear acoustic reflex. Finally, these findings show that toluene can depress the auditory nervous system driving the middle-ear acoustic reflex. That might explain, at least partly, the synergistic effects of a co-exposure to noise and solvent (Lataye and Campo, 1997).

FUNDING

This work was supported by the “Institut National de Recherche et de Sécurité” (INRS, France).

REFERENCES

- Bale, A., Meacham, A., Benignus, V., Bushnell, P., and Shafer, T. (2005). Volatile organic compounds inhibit human and rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **205**, 77–88.
- Bale, A., Smothers, C. T., and Woodward, J. J. (2002). Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by the abused solvent. *Toluene. Br. J. Pharmacol.* **137**, 375–383.
- Bonfils, P., Avan, P., Elbez, M., Deys, S., Erminy, M., and François, M. (1994). Auditory threshold evaluation by distortion-product oto-acoustic emissions using decision support system. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* **114**, 360–365.
- Borg, E. (1973). On the neuronal organization of the acoustic middle ear reflex. a physiological and anatomical study. *Br. Res.* **49**, 101–123.
- Campo, P., Maguin, K., and Lataye, R. (2007). Effects of aromatic solvents on acoustic reflexes mediated by central auditory pathways. *Toxicol. Sci.* **99**, 582–590.
- EU-OSHA. (2010). *Combined Exposure to Noise and Ototoxic Substances*, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. Available at: <http://europa.eu>.
- Gaskill, S., and Brown, A. (1990). The behavior of the acoustic distortion product 2f1-f2 from the human ear and its relation to auditory sensitivity. *J. Acoust. Soc. Am.* **88**, 821–839.
- Henley, C., Owings, M., Stagner, B., Martin, G., and Lonsbury-Martin, B. (1989). Postnatal development of 2f1-f2 otoacoustic emissions in pigmented rat. *Hear. Res.* **43**, 141–148.
- Lataye, R., and Campo, P. (1997). Combined effects of a simultaneous exposure to noise and toluene on hearing function. *Neurotoxicol. Teratol.* **19**, 373–382.
- Lataye, R., Campo, P., and Loquet, G. (2000). Combined effects of noise and styrene exposure on hearing function. *Hear. Res.* **139**, 86–96.
- Lataye, R., Maguin, K., and Campo, P. (2007). Increase in cochlear microphonic potential after toluene administration. *Hear. Res.* **230**, 34–42.
- Lee, D. J., De Venecia, R. K., Guinan, J. J., and Brown, M. C. (2006). Central auditory pathways mediating the rat middle ear muscle reflexes. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **288**, 358–369.
- Lim, D. (1986). Cochlear micromechanics in understanding otoacoustic emission. *Scand. Audiol.* **25**, 17–25.
- Maguin, K., Campo, P., and Parietti-Winkler, C. (2009). Toluene can perturb the neuronal voltage-dependant Ca²⁺ channels involved in the middle-ear reflex. *Tox. Sci.* **107**, 473–481.
- Morata, T., and Campo, P. (2001). Auditory function after single or combined exposure to styrene: a review. In *Noise-Induced Hearing Loss: Basic*

- Mechanisms. Prevention and Control* (D. Henderson, D. Prasher, R. Kopke, R. Salvi and R. Hamernik, Eds.), pp. 293–304. nRn, London.
- Morata, T., Dunn, D., and Sieber, W. (1994). Occupational exposure to noise and ototoxic organic solvents. *Arch Environ Health* **49**, 359–365.
- Murata, K., Ito, S., Horikawa, J., and Minami, S. (1986). The acoustic middle-ear muscle reflex in albino rats. *Hear. Res.* **23**, 169–183.
- Pouyatos, B., Campo, P., and Lataye, R. (2002). Use of DPOAEs for assessing hearing loss caused by styrene in the rat. *Hear. Res.* **165**, 156–164.
- Pujol, R., and Lenoir, M. (1986). Bobbin, R. (1986). The four types of synapses in the organ of Corti. In *Neurobiology of Hearing the Cochlea*, pp. 161–171. Raven Press, New York, NY.
- Prasher, D., Al-Hajjaj, H., Aylott, S., and Aksentijevic, A. (2005). Effect of exposure to a mixture of solvents and noise on hearing and balance in aircraft maintenance workers. *Noise Health* **7**, 31–39.
- Rouiller, E., Capt, M., Dolivo, M., and De Ribaupierre, F. (1989). Neuronal organization of the stapedius reflex pathways in the rat: a retrograde HRP and viral transneuronal tracing study. *Br. Res.* **476**, 21–28.
- Silman, S., Silverman, C., Gelfand, S., Lutolf, J., and Lynn, D. (1988). Ipsilateral acoustic-reflex adaptation testing for detection of facial-nerve pathology. *J. Speech Hear. Disord.* **53**, 378–382.
- Sliwinska-Kowalska, M., Zamysłowska-Szmytke, E., Szymczak, W., Kotylo, P., Fiszler, M., Wesolowski, W., and Pawlaczyk-Luszczynska, M. (2003). Ototoxic effects of occupational exposure to styrene and co-exposure to styrene and noise. *J. Occup. Environ. Med.* **45**, 15–24.
- Warren, E., and Liberman, C. (1989). Effects of contralateral sound on auditory-nerve responses. I. contributions of cochlear efferents. *Hear. Res.* **37**, 89–104.
- White, J., and Warr, W. B. (1983). The dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* **219**, 203–214.
- Wilson, R., and McBride, L. (1978). Threshold and growth of the acoustic reflex. *J. Acoust. Soc. Am.* **63**, 147–154.

Toluene Effect on the Olivocochlear Reflex

Cécile Rumeau,* Pierre Campo,*¹ Thomas Venet,* Aurélie Thomas,* Chantal Cour,* and Cécile Parietti-Winkler†‡

*Polluants et santé Department, Institut National de Recherche et de Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, 54519 Vandœuvre Cédex, France; †Service O.R.L. et Chirurgie Cervico-faciale CHU-Hôpital Central, 54035 Nancy, France; and ‡INSERM U954, Faculté de Médecine, Nancy-Université, 54000 Nancy, France

¹To whom correspondence should be addressed. Fax: +33 3 83 50 20 96. E-mail: pierre.campo@inrs.fr.

Received December 13, 2010; accepted January 22, 2011

Animal studies have shown that toluene can cause hearing loss and can exacerbate the effects of noise by inhibiting the middle ear acoustic reflex. In this investigation, carried out in Long-Evans rats, the tensor tympani tendon was cutoff and the stapedius muscle was electrocoagulated in one or both middle ears. Rat hearing was evaluated by measuring cubic distortion otoacoustic emissions ($2f_1$ - f_2 ; $f_1 = 8000$ Hz; $f_2 = 9600$ Hz; $f_1/f_2 = 1.2$) prior to, during, and after activation of the olivocochlear (OC) reflex. A band noise centered at 4 kHz was used as suppressor noise. It was delivered contralaterally to decrease $2f_1$ - f_2 amplitude. The strength of the inner ear acoustic reflex was tested by increasing contralateral noise intensity, and toluene injected into the carotid artery was used to study physiological efficacy. Results showed that the protective effect of the OC reflex is intensity dependent. In addition, the OC reflex was found to be less sensitive to toluene than the middle ear acoustic reflex. This may be because the efferent neurons involved in inner ear and middle ear reflexes are located differently. In conclusion, the synergistic effects on hearing of co-exposure to noise and aromatic solvents are because of solvents depressing the central nuclei, which mainly drive the middle ear acoustic reflex.

Key Words: DPOAE; toluene; noise; co-exposure; olivocochlear reflex.

Although noise is clearly the predominant occupational hazard to hearing, research on hearing conservation proves that noise is often present in occupational settings where chemical exposure also occurs (EU-OSHA, 2009; Johnson and Morata, 2010). For instance, aromatic solvents have been demonstrated to be ototoxicants and can even worsen the effects of noise exposure in animals (Lataye *et al.*, 2000) and humans (Morata *et al.*, 1994; Sliwinska-Kowalska *et al.*, 2003). However, neither the European directive (2003/10/EC) nor the American noise standards (OSHA) take complex exposures including chemicals into consideration.

Recently, our research team showed that toluene can affect the auditory nervous system involved in ear-protective reflexes, in particular the middle ear reflex. This reflex arc is elicited by sound-evoked efferent feedback and provokes contraction of the stapedius and tensor tympani muscles, reducing the acoustic energy penetrating the cochlea. Our previous results

showed that toluene can either increase or decrease efficiency of the middle ear reflex depending on the toluene concentration and the ear receiving the elicitor triggering middle ear muscle contraction (Venet *et al.*, 2011). Thus, toluene may depress the auditory nervous system involved in ear-protective reflexes, in particular the middle ear reflex.

How toluene affects the inner ear acoustic reflex remained unknown and could not be deduced from our previous experiments. Indeed, the protective effects induced by the inner ear reflex were too weak compared with those induced by the middle ear reflex (2 vs. 16 dB) to be accurately observed.

In spite of this difficulty, we knew from the literature that the inner ear reflex, also called olivocochlear (OC) reflex, can protect the ear from noise-induced temporary threshold shift (Patuzzi and Thompson, 1991; Reiter and Liberman, 1995; Zheng *et al.*, 1997). It was therefore of interest to study the toluene effect on the OC reflex.

The OC reflex mainly constituted by efferent neurons originates bilaterally from brain stem regions in and around the superior olivary complex (Warr *et al.*, 1986). In the brain stem, the latter is divided into two main subsystems: the so-called medial and lateral OC pathways (White and Warr, 1983). The medial efferent innervations of the organ of Corti are made up of crossed OC bundle (COCB) and uncrossed bundles (UOCB). The COCB contains twice as many neurons as the UOCB (Liberman, 1988). The majority of neurons terminate on either the outer hair cells (OHCs) or the eight nerve ganglion cells beneath the inner ear cells (Pujol and Lenoir, 1986). OC efferent neurons generate a sound-evoked reflex pathway to the inner ear, and activity in this pathway can suppress cochlear responses (Liberman *et al.*, 1996; Puria *et al.*, 1996).

To study the effects of toluene on the inner ear reflex more specifically, we carried out a series of experiments in rats with severed middle ear acoustic muscles. In these conditions, we could test the toluene effect on the OC reflex alone.

Distortion product otoemissions (DPOAEs) are low-level sounds emitted by the cochlea through the middle ear system when the auditory receptor is stimulated by two primary tones: f_1 and f_2 . Among the different types of DPOAEs,

cubic ($2f_1$ - f_2) distortion product otoacoustic emissions can be recorded in anesthetized rats and in humans. They can be measured by a sensitive microphone fitted into the outer ear canal. As a result, they allow even slight modifications because of changes in the middle ear or inner ear to be measured. They are considered reliable indicators of OHC function (Lim, 1986). Associated with a contralateral suppressor noise, $2f_1$ - f_2 DPOAEs can be used to evaluate middle ear (Puria *et al.*, 1996; Venet *et al.*, 2011) or inner ear acoustic reflex efficiency.

In the present study, $2f_1$ - f_2 DPOAEs were recorded while the inner ear acoustic reflex was activated by a noise suppressor (NS) emitted in the rat's contralateral ear. The aim was to characterize the inner ear reflex using $2f_1$ - f_2 distortion otoacoustic products and to analyze the impact of toluene on efferent pathways involved in the inner ear reflex.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Adult Long-Evans rats weighing over 350 g were used ($n = 22$). Animals were purchased from Charles River breeding laboratories (Saint Aubin-les-Elbeuf, France) 2 weeks before the start of experiments. They were housed in individual cages ($350 \times 180 \times 184$ mm) with irradiated pinewood bedding (supplier: Special Diets Services, France, ref: Gold cob 891180). Food and tap water were available *ad libitum*. A normal day/night cycle was maintained: lighting was on 12 h/day. Room temperature and relative humidity were controlled in the animal facility at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and $55 \pm 10\%$, respectively. The animal facilities have full accreditation, and experiments described in this article complied with the recommendations in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals as promulgated by the French *Conseil d'Etat* through decree no. 87 848, published in the French *Journal Officiel* on 20 October 1987.

Anesthesia. General anesthesia was required to record DPOAEs in rats equipped with an intracarotid catheter. To minimize stress in animals, levomepromazine (12.5 mg/kg) was administered ip 15 min prior to general anesthesia. Deep anesthesia was induced by injection of a mixture of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg). Supplemental doses of anesthesia, one-fifth of the original bolus, were administered approximately once per hour or when the rat responded to a toe pinch. A heating pad system was used to maintain rectal body temperature around 36°C . Before recording DPOAEs, otoscopic examination was used to verify that the tympanic membranes did not display any obstruction, infection, or other abnormalities.

Surgery. The tympanic bullae were ventrolaterally exposed and opened with the extremity of a surgical blade. The tendon of the tensor tympani muscles was cut with a pair of microscissors at the point where the tendon is attached to the malleus. The stapedius muscle was destroyed by electrocoagulation using an insulated platinum wire denuded at the tip.

To eliminate the possibility of a noise artifact in our measurements, the contralateral cochleae were destroyed in three additional rats ($n = 3$).

Reflex Measurement. DPOAE recording. All measurements were performed inside a sound-attenuated booth. The custom-designed DPOAE probe consisted of two transducers generating the primary tones: $f_1 = 8000$ Hz and $f_2 = 9600$ Hz and a microphone measuring the acoustic pressure within the outer ear canal. Primary tones f_1 and f_2 were delivered at 65 and 60 dB sound pressure level (SPL), respectively, to the ipsilateral (left) ear. The highest level of sound was limited to 65 dB SPL. The ratio of f_1 to f_2 was 1.2, which is suitable both for rats (Henley *et al.*, 1989) and humans (Gaskill and Brown, 1990). The primary tone signals were produced by frequency synthesizers (Pulse, B&K 3110) and emitted by two miniature speakers (Microphone, B&K type 4191). These elicitor

sounds were considered as the ipsilateral (ipsi) acoustic stimulation in our protocol, as illustrated in Figure 1.

The calibration procedure ensured that the primary tones were always emitted at the target intensities. Calibration was performed with a 1/8 inch microphone (B&K type 4138) placed in a specifically designed cavity of equivalent volume to the rat's outer ear canal. DPOAEs were recorded with a microphone (Knowles FG 23329-C05) fitted into the probe. The three transducers were enclosed in the probe. The probe tip was pressed gently against the opening of the ear canal.

The response was measured by a Fast Fourier Transform (FFT) analyzer (B&K PULSE 3110). DPOAE amplitude was determined from a linear averaged ($N = 148$) spectrum of 500 ms, given that each FFT epoch lasted 10 ms (overlap 66.7%). Spectrum averaging was recorded every 500 ms to trace the DPOAE amplitude evolution as a function of inner ear acoustic reflex activity.

Contralateral acoustic stimulations. The contralateral noise (NS) was an 800 Hz band noise centered at 4 kHz (BN 4 kHz). Each tone burst lasted 2.5 s and was followed by a 9.5-s silent window before the next tone burst, as illustrated in Figure 1. NS intensity for contralateral experiments varied between 90 and 120 dB SPL. The signal was synthesized by a B&K/7 Pulse 3110 and emitted by an Etymotic Research ER4 B earphone. DPOAEs were measured prior to and during delivery of the NS.

Catheter Implantation and Solvent Injections. A ventrolateral incision was made in the neck to expose the left (ipsilateral) or right (contralateral) carotid artery. The external carotid artery was ligated to drive the bolus toward the brain stem. A circular custom-made catheter (Te in polypropylene internal diameter (i.d.) = 1.6 mm extended with silicon catheters [i.d. = 0.635 mm]) filled with a solution of 0.9% NaCl and heparin (50 UI/ml) was fitted into the common carotid trunk. This type of catheter allows normal blood flow to be maintained while the vehicle containing the solvent is injected (Lataye *et al.*, 2007). Once inserted, the circular catheter was filled with vehicle consisting of a 10% fatty emulsion of purified soya oil and essential fatty acids (intralipid Ref: 830513161, Fresenius Kabi company). All injections were performed with a syringe pump calibrated to deliver a 266- μl bolus over 80 s (Fig. 1). Toluene (Prolabo 20675294) concentration was diluted to 116.2mM in vehicle prior to injection. It is important to bear in mind that the concentration is given as the concentrations inside the syringe, not the effective concentrations reaching the brain and/or cochlea. Each animal was tested with a single concentration.

Data Recording. The $2f_1$ - f_2 DPOAE changes measured with and without NS (noNS) are illustrated in Figure 2. The inner ear acoustic reflex metric followed the decrease in DPOAE amplitude and could be modeled as follows:

$$\text{inner ear acoustic reflex} = \text{DPOAE}_{(\text{noNS})} - \text{DPOAE}_{(\text{NS})}.$$

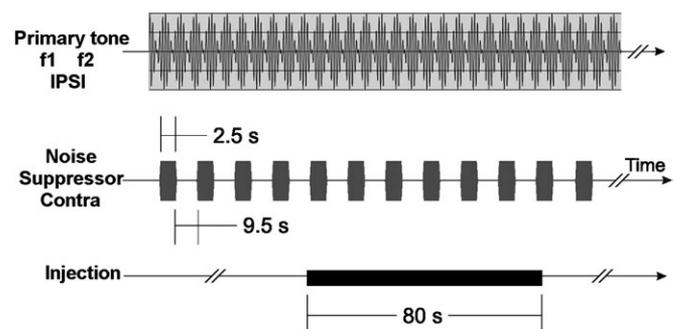


FIG. 1. Study schedule. Hearing tests were carried out with Long-Evans rats using $2f_1$ - f_2 DPOAEs. Primaries: $f_1 = 8$ kHz at 65 dB SPL and $f_2 = 9.6$ kHz at 60 dB; $f_1/f_2 = 1.2$. The contralateral NS was an 800-Hz BN 4 kHz. The scales for the three different time lines are different.

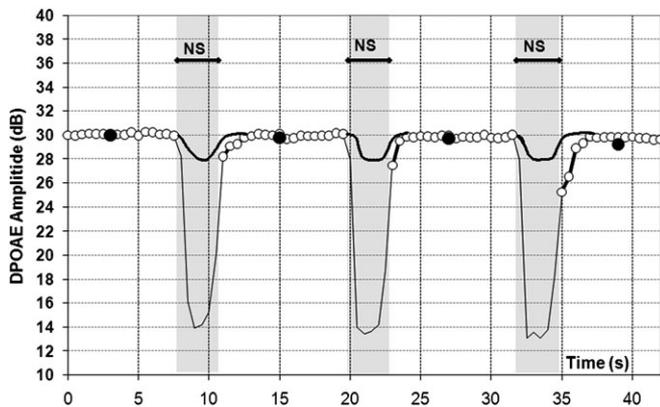


FIG. 2. Decrease in DPOAE amplitude provoked by inner ear reflex (bold black line) or middle ear reflex (black line). Middle ear reflex was measured prior to sectioning muscles. The data reported here were obtained from a representative subject. NS was emitted into the contralateral ear; each NS lasted 2.5 s and was emitted at 110 dB. Left Y-axis: DPOAE amplitude. Right Y-axis: DPOAE NS-induced variation. Open circle: DPOAE measured for 500 ms without NS. Black circle: mean of 18 DPOAE measured in the absence of NS.

Prior to injection, at least four inner ear acoustic reflex values were triggered. The average magnitude of the inner ear acoustic reflex (avgIER) was calculated for all animals using the four values recorded prior to injection.

Statistics. Statgraphics Centurion XV software was used to perform all statistical analyses. A one-way ANOVA was run to test the effect of the intensity on the $2f_1$ - f_2 variations and to compare the different experimental conditions. The statistical result is expressed as follows: ($F(df_b, df_i) = F$ -ratio; $p = p$ value), in which df_b is the number of degrees of freedom between groups and df_i the number of degrees of freedom within a group. F -ratio is the mean square value between groups divided by the mean square value within a group. *Post hoc* analysis was performed using Bonferroni method. Comparisons between groups used the Mann-Whitney (MW) test.

RESULTS

Measurement of the OC Reflex Amplitude

Despite the surgical interventions on the tested ear, $2f_1$ - f_2 DPOAE amplitudes of approximately 28 dB SPL were measured. In addition, we obtained a significant (MW = 0; $p = 0.002$) decrease in $2f_1$ - f_2 DPOAE amplitude because of the NS delivered to the contralateral side (Fig. 3A). The avgIER values obtained from four representative animals, as plotted in Figure 3, were approximately 1.8 dB.

In animals in which the contralateral cochlea was destroyed, no variations in $2f_1$ - f_2 amplitudes in the intact ipsilateral ear were measured (data not shown). Thus, inflexions of $2f_1$ - f_2 amplitudes observed in animals with intact cochlea were because of elicitation of the inner ear reflex and not artifact of transmission of the NS from one ear to the other. In other terms, sound conduction through the skull bones was not factor in generating our results.

The relationship between NS intensity (BN 4 kHz) and variations in $2f_1$ - f_2 amplitudes is shown in the Table 1. Tensor tympani and stapedius muscles were severed

TABLE 1
 $2f_1$ - f_2 Amplitudes as a Function of Level of Sound Pressure Delivered to the Contralateral Ear. Noise Spectrum: BN 4 kHz; Burst Duration: 2.5 s

	NS, intensity dB		
	90 Severed muscles	100 Severed muscles	120 Severed muscles
	0	0.5	2
	0	0.3	1.2
	0.5	0.7	1.2
	0.1	0.7	2
Mean ($n = 4$)	0.15	0.55	1.6
SD	0.15	0.15	0.15
Coefficient of variation	158	35	29

in the ipsilateral ear in all animals. The maximal amplitude measured with this technique was approximately 2 dB. Amplitude differences obtained with a NS delivered at 90, 100, or 120 dB were large enough to provide statistical reliability with the 95% confidence interval ($F(2,9) = 21.9$; $p < 0.05$). Bonferroni *post hoc* analyses showed that the 120 dB group was different from the 90 and 100 dB SPL groups.

Contralateral Stimulation, Intralipid Injection in Left or Right (ipsilateral/CONTRA) Artery, and Middle Ear Muscles Severed in Left Side (ipsilateral)

Injection of toluene at 0mM (intralipid alone) did not elicit variations in $2f_1$ - f_2 DPOAE amplitude, regardless of injection side. The data obtained with a representative subject, out of four rats tested in this control group ($n = 4$), are shown in Figure 3A.

Therefore, the vehicle (intralipid) is neutral in the phenomenon observed in this series of experiments. Only the effects of contralateral injection are illustrated in this paper (Fig. 3A).

The middle ear muscles of the tested ear were cut to allow inner ear reflex effects to be assessed using the acoustic setup described.

Contralateral Stimulation, Ipsilateral Toluene Injection, and Neutralization of Middle Ear Muscles

With contralateral stimulation combined with ipsilateral toluene injection and severing of the middle ear muscles, we obtained avgIER values of approximately 1.7 dB. As previously described, the data obtained with a representative subject, out of four rats tested in this group ($n = 4$), are shown (Fig. 3B). Toluene was injected into the ipsilateral (IPSI) artery, i.e., the artery connected to the ear into which the f_1 and f_2 primaries were emitted. Injection of 116mM toluene did not significantly change the average amplitude of the inner ear reflex (Bonferroni test before vs. during injection [0.014 ± 0.218]) (Fig. 3B).

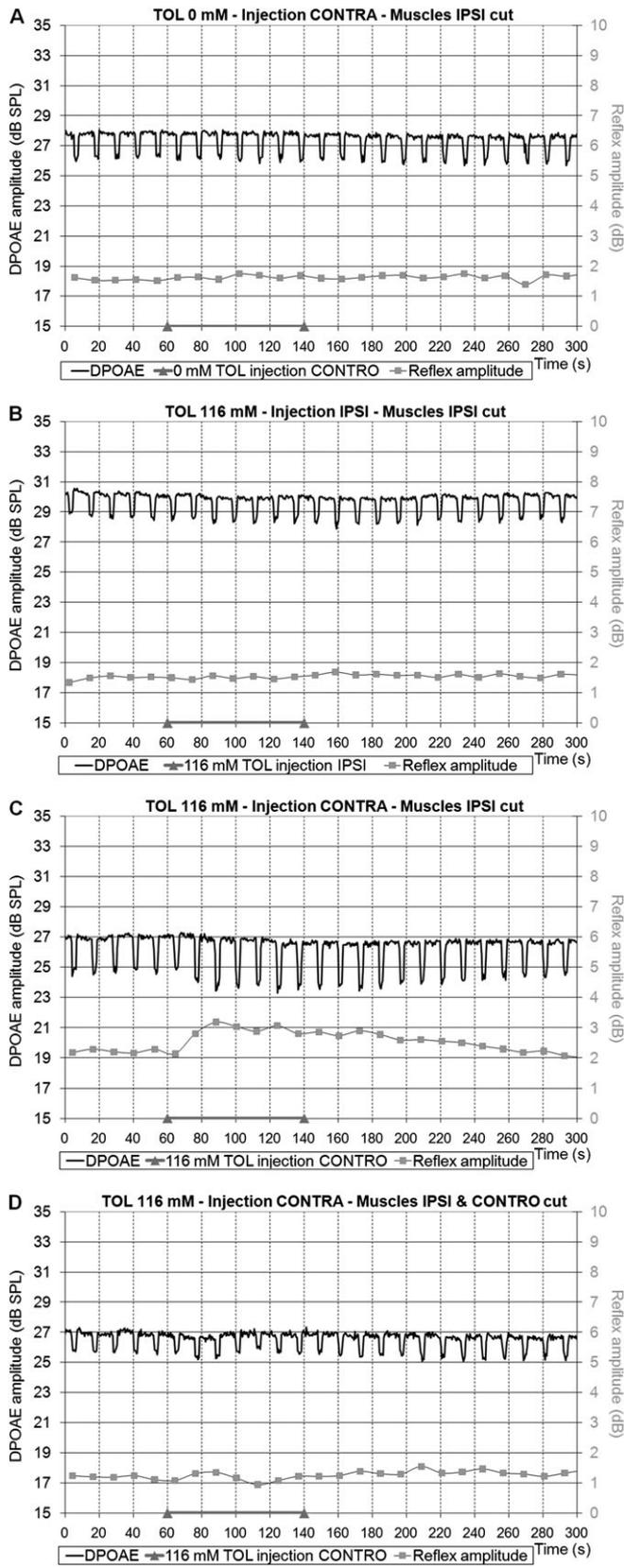


FIG. 3. Variations in 2f1-f2 DPOAE amplitude and inner ear acoustic reflex efficiency prior to, during, and after toluene injection. In all cases, tensor

Contralateral Stimulation, Toluene Injection, and Ipsilateral Neutralization of Middle Ear Muscles

In combination with severed ipsilateral middle ear muscles, contralateral stimulation in rats and injection of 116mM oluene on the same side provoked an unexpected increase in amplitude of the inner ear reflex (Fig. 3C). The increase from 2 to 3 dB SPL ($n = 4$) was significant ($F(4,25) = 10.8, p < 0.001$, Bonferroni test: significant difference 0.586 ± 0.218).

Contralateral Stimulation, Toluene Injection, and Bilateral Severing of Middle Ear Muscles

In rats where both sets of middle ear muscles had been severed, contralateral stimulation with or without toluene injection on the same side nevertheless gave rise to 2f1-f2 DPOAE amplitudes approximately 27 dB SPL and a decrease in amplitude of approximately 1.2 dB (Fig. 3D). Only three rats were tested in this experimental condition ($n = 3$). No significant difference between amplitudes for the inner ear reflex was found for before versus during toluene injection (Bonferrini test: 0.054 ± 0.239).

DISCUSSION

In a previous paper (Venet *et al.*, 2011), we showed that toluene could either increase or decrease the efficiency of the middle ear acoustic reflex depending on the toluene concentration applied and the ear receiving NS stimulation. Only the presence of interneurons between the facial nucleus and the superior olivary complex could explain these findings. The role played by the superior olivary complex in the middle ear reflex is therefore more important than that reported by the literature (Lee *et al.*, 2006). Because this complex also plays a key role in the inner ear reflex, a similar strong toluene effect was expected on this reflex.

OC efferent neurons form a sound-evoked reflex pathway to the inner ear. Activity in this pathway can control how sounds are processed in the auditory periphery, allowing improved detection of signals in background noise, also known as frequency discrimination. OC neuron activity can also decrease cochlear responses, protecting the peripheral receptor, the cochlea, from damage caused by overly loud sounds. This is mainly achieved through modification of cochlear

tympani and stapedius muscles were severed in the IPSI side. Primary tones $f1 = 8$ kHz and $f2 = 9.6$ kHz were emitted at $L1 = 65$ dB SPL and $L2 = 60$ dB, respectively. Frequency ratio was 1.2. The NS was an 800-Hz BN 4 kHz emitted at 110 dB. The darker traces were measured on the left hand Y-axis scale and the lighter traces on the right hand Y-axis scale. (A) 0mM toluene, using intralip as vehicle ($n = 4$); (B) 116mM toluene injected in the IPSI side ($n = 4$); (C) 116mM toluene injected in the CONTRA side ($n = 4$); (D) 116mM toluene injected in the CONTRA side with severed tensor tympani and stapedius muscles in both sides ($n = 3$). Data were obtained from individual representative subjects.

micromechanics. The OHCs play a crucial role in this modification (Cooper and Guinan, 2006; Lim, 1986; Pujol, 1994).

OC efferent neuron effects have been assessed in a number of ways using either auditory-evoked potentials (Puel *et al.*, 1988; Puria *et al.*, 1996) or evoked otoacoustic emissions (Liberman *et al.*, 1996). In the present investigation, otoacoustic emissions and more specifically $2f_1-f_2$ distortion product otoacoustic emissions were used as an efficient tool to assess the role played by OC system in cochlear protection. With contralateral sound suppression and neutralization of middle ear muscles, a modest but significant decrease in amplitude of $2f_1-f_2$ distortion product otoacoustic emission was measured (up to 3 dB). We succeeded in measuring intensity-dependent responses, despite the narrow amplitude range, 0.5–2 dB (Table 1). This finding is unexpected because mechanical inhibition induced by the OC efferent is strong for moderate intensities and become progressively weaker as intensity increases (Cooper and Guinan, 2006). How can our results be explained? The analysis performed considers the magnitude of the cubic distortion otoacoustic product measured at 6.4 kHz along the cochlear partition, namely, at the geometric mean of the two primary tones, rather than at 4 kHz, which is the characteristic frequency of the suppressor noise. By increasing NS intensity, we widened the segment of mechanically modified basilar membrane and thereby the mechanical impact on cubic distortion products.

$2f_1-f_2$ distortion product otoacoustic emissions decrease by ~ 2 dB because of inner ear reflex activity, as compared with a decrease of -12 dB measured after eliciting the middle ear reflex. This indicated huge differences in terms of ear protection (Venet *et al.*, 2011) and puts the protective effects of both reflexes into perspective: the middle ear reflex decreases the acoustic energy penetrating into the cochlea by modifying compliance of the tympano-ossicular chain, whereas the inner ear reflex modulates only the basilar membrane mechanics to absorb acoustic energy. Given the effectors targeted by each reflex, the scale of effects is not expected to be the same.

The toxicological data obtained during this study revealed that the inner ear reflex was more resistant to toluene (delivered via the carotid artery) than the middle ear reflex. A bolus of 116mM toluene injected into the left carotid trunk did not significantly modify the magnitude of $2f_1-f_2$ distortion product otoacoustic emissions (Fig. 3B). These findings indicate that injection of toluene into the common carotid trunk did not alter any of the elements constituting the OC reflex: be it the auditory receptor, the cochlea, or the medial OC nucleus.

In contrast, the same amount of toluene injected into the right carotid trunk significantly increased the OC reflex efficiency (Figs. 3C and 4B). For memory, the avgIER values were 2 dB before injection and increased to 3 dB during the first 20 s of injection. Based on our previous findings (Venet *et al.*, 2011), we immediately suspected an effect on the central nuclei involved in the contralateral sound-evoked middle ear reflex, the

perifacial and medial OC nuclei. This was confirmed by destruction of the middle ear muscles in both sides, which eliminated the increase in avgIER values (Fig. 4C). Thus, the results reported in Figure 3C can be explained by inhibition of the protection offered by the contralateral middle ear reflex, allowing penetration of a higher level of acoustic energy into the right cochlea. The OC reflex is bilateral, and its effects on $2f_1-f_2$ distortion product otoacoustic emissions are intensity dependent. Therefore, the increase in amplitude measured in the ipsilateral ear was due only to an increase in contralateral noise penetrating into the cochlea.

Inner ear reflex resistance to toluene can be explained by differential wiring of the efferent neurons involved in the inner ear and middle ear reflexes if the medial olivary nuclei are involved in both reflexes. First of all, the medial OC system consists of a crossed (COCB) and an uncrossed (UOCB) component (Warr *et al.*, 1986). Existing evidence suggests that the COCB responds best to ipsilateral acoustic stimulation,

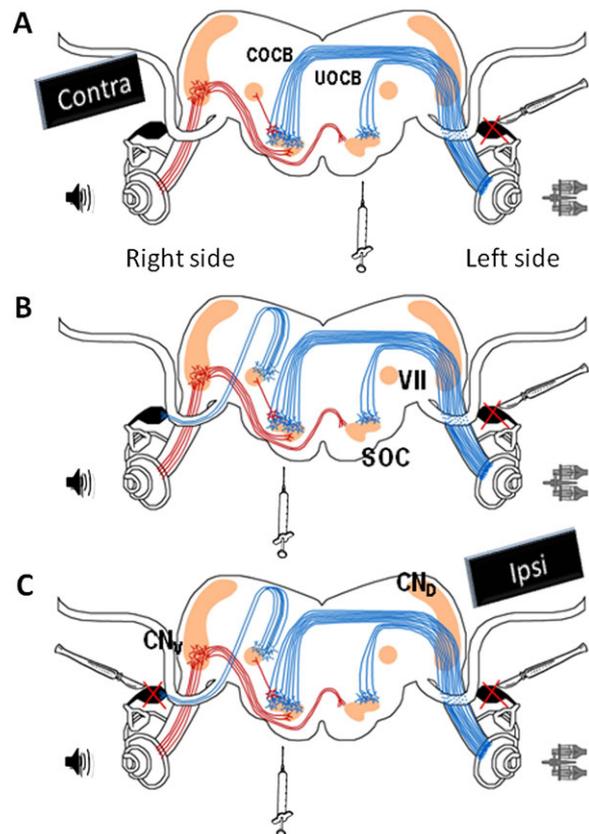


FIG. 4. General wiring of the course of afferent (red) and efferent (blue line) limbs of the OC and middle ear reflexes in the rat. NS, an 800-Hz BN 4 kHz, was delivered contralaterally (right side) at 110 dB. The acoustic probe for $2f_1-f_2$ ($f_1 = 8$ kHz at 65 dB; $f_2 = 9.6$ kHz at 60 dB; $f_1/f_2 = 1.2$) was positioned in the ipsilateral ear (left side). Tensor tympani and stapedius muscles of the left ear were severed in all cases. (A) 116mM toluene injected in the left carotid artery. (B and C) 116mM toluene injected in the right carotid artery. (C) Severed tensor tympani and stapedius muscles in both ears. SOC, superior olivary complex; VII, facial motor nucleus; CND and CNV, dorsal and ventral cochlear nuclei.

whereas UOCB responds best to contralateral acoustic stimulations (Liberman and Brown, 1986). Our toxicological data show that, in anesthetized rat, the COCB and UOCB components of the medial olivary complex system can affect the inner ear reflex to equivalent extents. One of the two components is sufficient to activate “normal” behavior of the inner ear acoustic reflex. In the experiments described here, either the COCB or the UOCB was preserved and was sufficient to ensure an appropriate inner ear reflex. In other terms, the intoxication pathway used in this study did not allow inhibition of the neuronal circuits of the inner ear reflex. Logically, toluene injection into both carotids would simultaneously inhibit the COCB and the UOCB, but it is also likely to be lethal and cannot therefore be used to measure acoustic reflexes. Consequently, it is necessary to develop and test novel injection pathway, which would allow simultaneous intoxication of both central nuclei. This method could be used to reveal the effects of toluene on the inner ear reflex.

In conclusion, like the middle ear reflex response, that of the inner ear reflex depends on noise intensity, even for amplitudes only varying over a narrow range. However, the central elements involved in the inner ear reflex, like the COCB and the UOCB, are less sensitive to solvent than those involved in the middle ear reflex because of their crossed structures. One single intact OCB would be sufficient to maintain inner ear reflex efficacy. Given the toluene effects on the inner ear reflex, it is clear that the synergistic effects of co-exposure to noise and aromatic solvents such as toluene are mainly because of the solvent depressing the central nuclei driving the middle ear acoustic reflex. Depression of the inner ear reflex, if it occurs, should mainly alter the capacity to discriminate between frequencies.

FUNDING

Institut National de Recherche et de Sécurité (France).

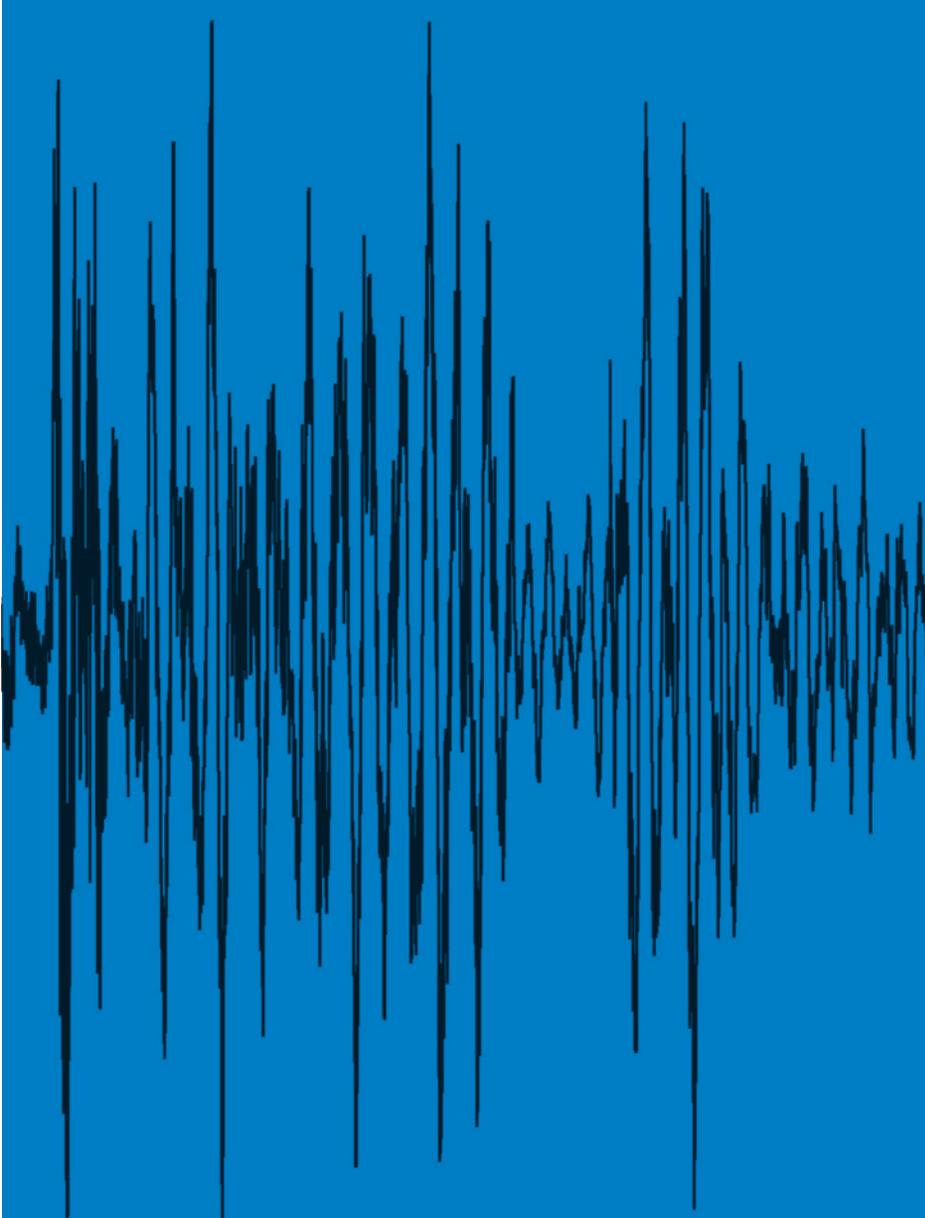
REFERENCES

- Cooper, N., and Guinan, J. (2006). Efferent-mediated control of basilar membrane motion. *J. Physiol.* **576**, 49–54.
- European Agency for Safety and Health at Work (EU-OSHA). (2009). Combined Exposure to Noise and Ototoxic Substances. 60 Available at: <http://europa.eu>.
- Gaskill, S., and Brown, A. (1990). The behavior of the acoustic distortion product 2f1-f2 from the human ear and its relation to auditory sensitivity. *J. Acoust. Soc. Am.* **88**, 821–839.
- Henley, C., Owings, M., Stagner, B., Martin, G., and Lonsbury-Martin, B. (1989). Postnatal development of 2f1-f2 otoacoustic emissions in pigmented rat. *Hear. Res.* **43**, 141–148.
- Johnson, A., and Morata, T. (2010). Occupational exposure to chemicals and hearing impairment. *Arbete och Hälsa* **44**, Available at: www.amm.se.
- Lataye, R., Campo, P., and Loquet, G. (2000). Combined effects of noise and styrene exposure on hearing function. *Hear. Res.* **139**, 86–96.
- Lataye, R., Maguin, K., and Campo, P. (2007). Increase in cochlear microphonic potential after toluene administration. *Hear. Res.* **230**, 34–42.
- Lee, D. J., De Venecia, R. K., Guinan, J. J., and Brown, M. C. (2006). Central auditory pathways mediating the rat middle ear muscle reflexes. *Anat. Record Part A* **288**, 358–369.
- Liberman, M. (1988). Response properties of cochlear efferent neurons: monaural versus binaural stimulation and the effect of noise. *J. Neurophysiol.* **60**, 1779–1798.
- Liberman, M., and Brown, M. (1986). Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. *Hear. Res.* **24**, 17–36.
- Liberman, M., Puria, S., and Guinan, J. (1996). The ipsilaterally evoked olivocochlear reflex causes rapid adaptation of the 2f1-f2 distortion product otoacoustic emission. *J. Acoust. Soc. Am.* **99**, 3584.
- Lim, D. (1986). Cochlear micromechanics in understanding otoacoustic emission. *Scand. Audiol.* **25**, 17–25.
- Morata, T., Dunn, D., and Sieber, W. (1994). Occupational exposure to noise and ototoxic organic solvents. *Arch. Environ. Health* **49**, 359–365.
- Patuzzi, R., and Thompson, M. (1991). Cochlear efferent neurones and protection against acoustic trauma: protection of outer hair cell receptor current and interanimal variability. *Hear. Res.* **54**, 45–58.
- Puel, J., Bobbin, R., and Fallon, M. (1988). An ipsilateral cochlear efferent loop protects the cochlea during intense sound exposure. *Hear. Res.* **37**, 65–70.
- Pujol, R. (1994). Lateral and medial efferents: a double neurochemical mechanism to protect and regulate inner and outer hair cell function in the cochlea. *Br. J. Audiol.* **28**, 185–191.
- Pujol, R., and Lenoir, M. (1986). The four types of synapses in the organ of Corti. In *“Neurobiology of Hearing: The Cochlea”* (R. Altschuler, D. Hoffman, and R. Bobbin, Eds.), pp. 161–171. Raven Press, New York, NY.
- Puria, S., Guinan, J., and Liberman, M. (1996). Olivocochlear reflex assays: effects of contralateral sound on compound action potentials versus ear-canal distortion products. *J. Acoust. Soc. Am.* **99**, 500–507.
- Reiter, E., and Liberman, M. (1995). Efferent-mediated protection from acoustic overexposure: relation to slow effects of olivocochlear stimulation. *J. Neurophysiol.* **73**, 506–514.
- Sliwiska-Kowalska, M., Zamysłowska-Szmytko, E., Szymczak, W., Kotylo, P., Fiszler, M., Wesolowski, W., and Pawlaczuk-Luszczynska, M. (2003). Ototoxic effects of occupational exposure to styrene and co-exposure to styrene and noise. *J. Occup. Environ. Med.* **45**, 15–24.
- Venet, T., Rumeau, C., Campo, P., Rieger, B., Thomas, A., and Cour, C. (2011). Neuronal circuits involved in the middle-ear acoustic reflex. *Toxicol. Sci.* **119**, 146–155.
- Warr, W., Guinan, J., and White, J. (1986). Organization of the efferent fibers: the lateral and medial olivocochlear system. In *Neurobiology of Hearing: The Cochlea* (R. Altschuler, D. Hoffman, and R. Bobbin, Eds.), pp. 333–348. Raven Press, New York, NY.
- White, J., and Warr, B. (1983). The dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* **219**, 203–214.
- Zheng, X., Henderson, D., MFadden, S., and Hu, B. (1997). The role of the cochlear efferent system in acquired resistance to noise-induced loss. *Hear. Res.* **104**, 191–203.

Indexed with
MEDLINE, EMBASE & SCI

ISSN 1463-1741

Impact Factor® for 2011:
1.254



Noise & Health

A Bi-monthly Inter-disciplinary International Journal
www.noiseandhealth.org

EchoScan: A new system to objectively assess peripheral hearing disorders

Thomas Venet, Pierre Campo, Cécile Rumeau, Hélène Eluecque¹,
Cécile Parietti- Winkler^{1,2}

National Institute of Research and safety (INRS) CS 60027, F-54519 vandoeuve Cedex, ¹ENT Department CHU- Central Hospital, Nancy, ²INSERM U954, Lorraine University School of Medicine, F-Nancy, France

Abstract

Pure-tone air-conduction audiometry (PTA) is the reference clinical test used in Europe and the United States to measure the extent of hearing loss. It is a subjective, behavioral test, which measures thresholds of hearing sensations and perceptions based on patient responses to frequency-specific pure-tone stimuli. PTA can detect hearing problems due to cochlear or retro-cochlear impairment, without identifying the source of the problem. In contrast, cubic distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) detect inner-ear dysfunctions, particularly those involving the outer hair cells sensitive to noise and ototoxicants. Recently, ototoxicants were shown to have an action on the central nuclei driving the middle-ear acoustic reflex. Therefore, a new device, called EchoScan, was conceived to collect and measure performance both in the middle- and inner-ear. Its originality: the use of a battery of DPOAE measurements associated with contralateral acoustic stimulation. Changes in DPOAE amplitude due to ageing and gender were incidentally detected and EchoScan was more sensitive than impedancemetry to detect the stapedial reflex. EchoScan can be used both in clinical investigations and in occupational medicine, especially for the auditory follow-up of people exposed to noise or ototoxic agents. EchoScan could be promising to assess early detection in programs to prevent hearing loss.

Keywords: DPOAE, hearing loss, noise, stapedial reflex

Introduction

Pure-tone air-conduction audiometry (PTA) is a subjective test relying on a patient's capacity to determine thresholds of hearing sensations to frequency-specific acoustic stimuli. Given the plasticity of the central auditory system, which can compensate slight inner-ear dysfunctions, threshold shifts measured by PTA may underestimate cochlear injuries.^[1-4] As a result, PTA should be completed by supplementary prevention tools. Today, clinicians and occupational physicians can measure distortion-product otoacoustic emissions (DPOAEs) to detect inner-ear dysfunctions, while isolating possible central influences. When two-tone stimulations with frequencies f_1 and f_2 , known as primaries, are presented simultaneously to the ear canal, several DPOAEs can be measured in only few seconds. The most

prominent DPOAE is the cubic-difference DPOAE at $2f_1-f_2$. The amplitude is much larger than that of other distortion products, and its existence requires a frequency-selective compressive nonlinearity in basilar membrane mechanics in the region where the primaries overlap.^[5,6] This nonlinearity is mainly due to the motility of outer hair cells.^[7] These cells are sensitive to noise^[8,9] and ototoxic agents.^[10,11]

On the other hand, the number of outer hair cells decreases with age.^[12] As a result, DPOAEs should be more suitable than PTA for detecting sub-clinical threshold alterations induced by a noise and ototoxic agents (solvents). Combined with contralateral acoustic stimulation, DPOAEs can be measured prior to, during and after triggering the stapedial reflex (middle-ear reflex: MER) providing useful information on the central nervous elements driving the middle-ear function.^[13,14] In order to evaluate the middle-ear and the outer-hair cell functions, the authors have designed a new device, and a specific procedure that they named EchoScan to optimize the measurement of the DPOAEs prior to, and during a simultaneous contralateral stimulation.

One of the aims of this study, conducted in hospital (CPP 10.0702; Affsaps UEC/AnnR/DA/2010-212), was to test whether EchoScan was capable of detecting a gender effect^[15]

Access this article online	
Quick Response Code:	Website: www.noiseandhealth.org
	DOI: 10.4103/1463-1741.102964
	PubMed ID: ***

and an age-related decline^[16] by measuring either the DPOAE magnitudes or the MER thresholds. Of particular interest were the effects of certain chemicals on the stapedial reflex and as such the investigators focused on how effectively EchoScan elicited MER thresholds.^[14,17]

Study participants

A population of fifty volunteers aged from 20 to 65 years old (24 women and 26 men) were included in this study [Table 1]. Hearing was tested by PTA (Interacoustics AC 40) for frequencies ranging from 500 to 8000 Hz. The subjects who suffered from 30 dB hearing loss at frequencies less than 4000 Hz were excluded from our population. Normal (type A) acoustic compliance was also checked by immittance (GSI Tymstar, 2000-97XX). Middle-ear immittance was performed in each ear using a 226 Hz probe tone with a static pressure change in the outer canal of 200 daPa/sec, varying from 200 to -200 daPa. Subjects had to have a stapedial reflex to be included in our population.

In summary, the selection of the subjects was essentially based on the PTA results, and the detection of the stapedial reflex at one or more frequencies by impedance audiometry. Anamnesis was also performed to exclude subjects who had suffered the influence of noise and ototoxic agents.

Methods

All measurements were performed in a sound-attenuated booth located in the Otolaryngology department (ENT) of University hospital Nancy, France. Three sets of measurements were taken on two consecutive days: D (1 set) and D+1 (two sets taken at a 1-hour interval). A possible effect of time of day on our results^[18] was minimized by performing tests on days D and D+1 with identical schedules.

Input/Output DPOAE procedure

The DPOAE probe (Etymotic Research ER10C) contained 2 transducers, with a bandwidth ranging from 200 Hz to 12 kHz at ± 10 dB. These generated f1 and f2, chosen to generate distortion-product otoacoustic emissions (DPOAEs) defined as 2f1-f2. The f2/f1 ratio was 1.2. The levels of the primaries were L2 = L1 - 6 dB HL.^[19-21] Two synthesizers (Pulse, B and K 3610) were connected to the probe to deliver f1 and f2 in the ipsilateral (left) ear; the highest intensity was limited

to 70 dB HL so as not to activate the middle-ear acoustic reflex. Four couples of frequencies were tested in the current investigation: (1000/1200), (2000/2400), (3000/3600), (4000/4800) Hz.

DPOAEs were recorded with a microphone which was also placed in the probe. The three transducers were enclosed in the probe, whose tip was inserted into the subject’s external ear canal. DPOAE amplitude was determined from a linear averaged (N = 4) spectrum of 250 ms with a frequency resolution of 8 Hz. For each frequency couple, DPOAE amplitudes were acquired as a function of primary intensities, which increased from 49 to 70 dB HL in 3 dB steps.

An Ear Simulator Type RA0045 GRAS (IEC 711) was used to perform a calibration procedure according to standards ISO 389-2 and IEC 60318-4. This ensured that f1 and f2 were always emitted at the target intensities. Notice that the intensities used to generate DPOAEs will be expressed in dB HL to be consistent with the usual convention. In contrast, the amplitude of the DPOAEs measured with EchoScan will be expressed in dB SPL.

The equivalence between the DPOAE stimuli from dB HL to dB SPL is illustrated by two examples. Using the ER10C probe driven by a 1 V sinus tone, the pressure level measured by the ear simulator type RA0045 GRAS (CEI 711 and CEI 60318-4:2010) was 67.5 dB SPL at 2 kHz and 81 dB SPL at 4 kHz. The equivalent hearing level value was 56.0 dB HL at 2 kHz and 66.0 dB HL at 4 kHz.

DPOAE pattern across frequency: DPgram

Participants were screened for DPOAEs across the f2 frequency ranging from 1008 to 8064 Hz, with a constant stimulation level: L1 = 62 dB HL and L2 = 56 dB HL. Notice that the measures of f1 and f2 were expressed in dB HL to make the comparison with PTA easier. In contrast, the DPOAE amplitude was measured in dB SPL, which is the usual convention. DPOAE pattern across frequency, or DPgrams were performed up to 8 kHz to make comparisons with PTA data possible.

Input/Output middle-ear reflex procedure

The earphone used to trigger the stapedial reflex was an Etymotic Research ER4 B, with a bandwidth ranging from 20 Hz to 16 kHz at ± 4 dB. It was fitted into the contralateral (right) ear, whereas the DPOAE probe was placed in the ipsilateral (left) ear. The contralateral emitter was calibrated as described for the DPOAE probe emitters. The noise was an 800 Hz band noise centered on a frequency, varying from 500 to 4000 Hz. Each burst lasted up to 2 seconds. The contralateral noise was synthesized by a B and K Pulse 3610, and emitted at an intensity between 65 and 95 dB HL. The upper intensity limit was fixed at 95 dB HL to preserve participants’ hearing. The procedure was performed to detect a decrease in DPOAE amplitude induced by activation of the stapedial reflex.

Table 1: Population distribution as a function of gender and age

	Age range (years)					
Gender	20-29	30-39	40-49	50-59	60+	Total
Female	7	6	2	8	1	24
	29.17%	25.00%	8.33%	33.33%	4.17%	100.00 %
Male	8	12	4	1	1	26
	30.77%	46.15%	15.38%	3.85%	3.85%	100.00 %
Total	15	18	6	9	2	50
	30%	36%	12%	18%	4%	100 %

Data recording schedule

Table 2 describes the schedule of the investigations carried out in the study.

EchoScan

A patent application has been lodged for EchoScan Figure 1 and the process used to measure the trigger threshold of the MER as a function of frequencies chosen based on a previous DPOAE I/O analysis.

Table 2: Test schedule summarizing the main steps and hearing tests performed in this study

	Day D	Day D + 1 (2 sets of measurements)
Hearing tests	EchoScan	EchoScan
Pure-tone audiometry from 500 to 8000 Hz	I/O DPAOE f2: 1200, 2400, 3600, 4800 DPgram from f2: 1008 to 8064 Hz at 56 dB HL	I/O DPAOE f2: 1200, 2400, 3600, 4800 DPgram from f2: 1008 to 8064 Hz at 56 dB HL
Acoustic compliance test	Trigger thresholds	Trigger thresholds
Impedancemetry to measure stapedial reflex from 500 to 4000 Hz	I/O MER from 500 to 4000 Hz	I/O MER from 500 to 4000 Hz

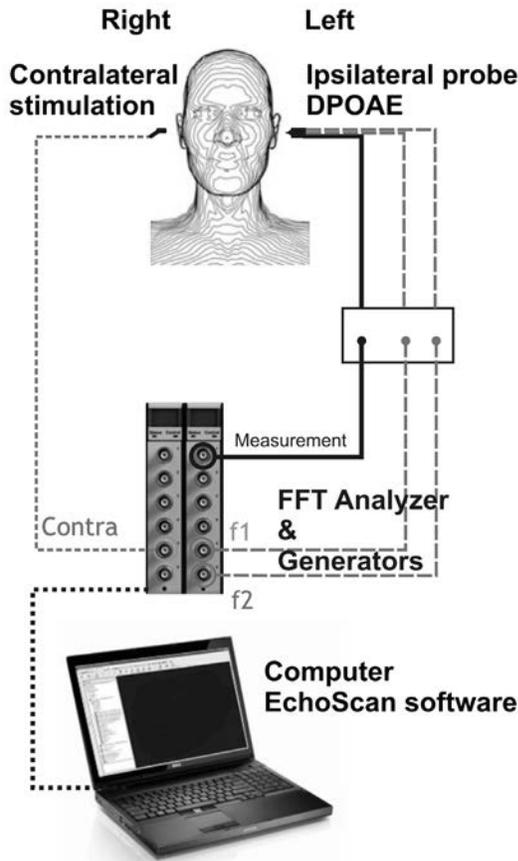


Figure 1: Details of the EchoScan. f1 and f2: primary frequencies. f2/f1 = 1.2. FFT: Fast Fourier Transform

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using mixed linear random effect models to evaluate the effects of age and gender. The significance of the MER threshold was determined by Student's *t-test*. Statistical significance was defined at an alpha level of 0.05 (significant at 95%). The linear association between the middle-ear reflex elicited by both impedance audiometry and EchoScan was measured by calculating correlation (Pearson's product moment correlation coefficient). Generally, the level of significance is indicated in tables by: * at 5%, and *** at 1/1000. All analyses were designed and performed by PW statistical consulting www.pw-statistical-consulting.eu.

Results

DPOAE input/output function

The DPOAE growth curves presented in Figure 2 are based on data obtained with subject # 7. They are representative of the majority of results. As illustrated in Figure 2a, the

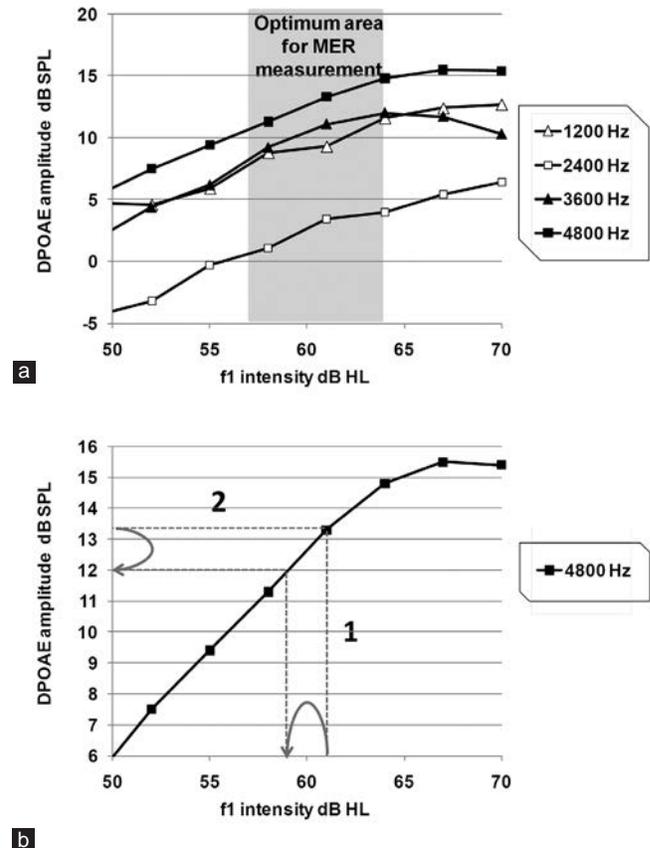


Figure 2: DPOAE amplitude vs. f1 intensity. Data for subject #7 are reported. (a) The grey area corresponds to the linear portion of the DPOAE growth curve, which was subsequently used to evaluate the trigger threshold of the middle ear reflex. (b) (1) A reduction in f1 intensity leads to a reduction in DPOAE amplitude (2) The frequency panels in (a,b) correspond to F2

intensity-magnitude DPOAE relationship was linear up to 65 dB HL at 3600 Hz and 4800 Hz. Above 65 dB HL the DPOAE amplitude saturated. It is important to determine the level of saturation so as not to underestimate the middle-ear reflex threshold. Indeed, when DPOAE amplitudes are saturated (e.g. over 65 dB HL at 4800 Hz) the MER trigger could have no effect on the DPOAE amplitude, and therefore remain undetectable. As a result, the choice of the primary intensities was determinant at this point in the experiment so as to avoid saturation of the growth curves Figure 2b.

DPOAE input/output vs. age and gender

Ageing and gender effects were observed at 4800 Hz [Table 3]. The decrease in amplitude, 0.14 dB per year noted at 4800 Hz was determined to be significant by the mixed random effects model. On the other hand, differences between men and women were only observed at the highest frequencies: A 1.8-dB difference was noted at 3600 Hz, and a significant 3.7 dB difference at 4800 Hz. Moreover, our findings showed that DPOAEs were present and repeatable for each volunteer across the time-period studied (Days D and D+1), for all the frequencies considered. The between-subjects variations were less than 5 dB, which is comparable to the variability generally reported with PTA. The “Intercept” term listed in Table 3 corresponds to the mean value predicted by the mixed random effects model for a 20 year-old man.

DPOAE patterns across frequencies: DPgram

As shown in Table 3, significant ageing and gender effects were observed at 4800 Hz, but higher frequencies, namely 6528 and 8064 Hz also showed these effects [Table 4]. DPgram gave clearer ageing effects than DPOAE I/O measurements, because it screened frequencies up to 8 kHz. A significant decrease in amplitude, of approximately 0.19 dB per year, was observed from 4800 Hz to 8064 Hz. Similarly, the differences between men and women were mainly observable at the highest frequencies. In general, the gender effect accounted for a 4 dB difference. Once again, our findings showed that DPOAEs were present, and reproducible in all volunteers for the time-period studied (Days D and D+1), for all frequencies tested. The

Table 3: Statistical analysis of DPOAE amplitudes as a function of age and gender

DPOAE max dB SPL	f2=1200 Hz	f2=2400 Hz	f2=3600 Hz	f2=4800 Hz
Ageing effect (dB/year)	-0.08	-0.05	-0.07	-0.14*
SE	0.06	0.05	0.06	0.06
Gender effect (dB)	0.52	0.25	1.83	3.73*
SE	1.33	1.25	1.29	1.46
Intercept	13.90	8.791	9.073	14.07
	***	***	***	***
SE	2.15	1.98	2.13	2.36
between-subject SD	4.19	3.99	4.36	4.96
same-subject SD	0.91	1.03	0.71	0.77
n measurements	112	121	137	143

* and *** correspond to respectively 5% and 0.1% level of significance, SE: Standard error; SD: Standard deviation; Intercept: mean value predicted by the mixed random effects model for a 20 year-old man

intercept listed in Table 4 corresponds to values predicted by the mixed random effects model for a 20 year-old man.

Comparing DPgram with subjective thresholds across frequencies

Subjective auditory thresholds were obtained using a typical PTA approach, whereas EchoScan was used to perform objective auditory measurements. The variations in DPgram amplitudes were quite similar [4-5 dB] to those measured with PTA [Table 5]. The different patterns observed for PTA and DPgram may be due to calibration differences. Two different standards were used for calibrate our equipments: standard ISO 389-2 and IEC 60318-4 for the EchoScan probe, and standard IEC 60645 for the audiometer.

In addition, we used dB HL to express PTA results, according to the consensus, whereas DPgram results were expressed in dB SPL. Note that the PTA measures were collected at the thresholds, whereas the DPgram was obtained with L1 = 62 dB HL (§3.1). These two measurements are not obtained in the same range of intensities. Moreover, PTA is a auditory sensory threshold, which is the result of the entire auditory system, from the auditory receptor to the cortical area. In contrast, DP gram mainly reflects the outer hair cell function. All these reasons can explain the difference of pattern observed between the PTA and DPgram curves. Nevertheless, line 2000 Hz and column 8064 Hz in Table 6 show relevant correlations (R>0.15) between the DPgram and PTA values.

MER thresholds elicited with echoscan, as a function of age

Although we did not find any gender difference for MER thresholds, an ageing effect at 4000 Hz was detected. The values obtained with a random-intercept proportional odds model are reported in Table 7. In spite of between-subject variations, the age effect was significant at the highest frequency tested.

Table 4: Statistical analysis of DPgram amplitudes as a function of age and gender

DPgram L1= 62 dB HL	f2 1008	f2 1200	f2 2016	f2 2400	f2 3264	f2 4032	f2 4800	f2 6528	f2 8064
Ageing effect (dB/year)	-0.06	-0.02	-0.03	-0.02	-0.10	-0.10	-0.18*	-0.20*	-0.19*
SE	0.05	0.07	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07
Gender effect (dB)	-0.92	-1.47	-1.64	-1.85	2.04	3.89	4.34*	3.66*	1.98
SE	1.16	1.56	1.45	1.37	1.38	1.78	1.76	1.65	1.55
Intercept	10.945	10.81	6.819	5.37	3.67	5.33	9.24	10.30	7.87
	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SE	0.99	1.42	1.32	1.30	1.26	1.60	1.61	1.54	1.43
btw subject SD	3.24	4.73	4.82	4.48	4.67	5.93	5.98	5.48	4.94
same-subject SD	1.28	1.12	1.04	0.99	0.10	0.92	0.74	1.63	2.90
n measures	96	110	123	128	140	138	142	137	128

* and *** correspond to respectively 5% and 0.1% level of significance, SE: Standard error; SD: Standard deviation; Intercept: mean value predicted by the mixed random effects model for a 20 year-old man

MER thresholds: EchoScan vs. impedance audiometry

MER thresholds at less than or equal to 95 dB HL were much better measured by EchoScan than by impedance audiometry. For instance, with impedance audiometry, 25% of MER thresholds could not be measured, whereas EchoScan only failed to find a threshold for 8% of measurements, regardless of frequency.

The comparison of threshold values measured with EchoScan and by impedance audiometry is illustrated in [Figure 3]. The

Table 5: Pure-tone audiometry (PTA) and DPOAE levels across frequency (DPgram)

DPgram	1008	1200	2016	2400	3264	4032	8064
Hz							
Mean	9.34	10.13	5.83	4.29	3.15	5.56	5.95
dB SPL							
SD	3.2	4.53	4.72	4.35	4.63	5.96	5.68
PTA	500	1000	2000	3000	4000	8000	
Hz							
Mean	11.78	11.98	10.72	9.26	10.19	11.2	
dB HL							
SD	3.80	4.82	4.52	5.57	5.36	7.89	

SD: Standard deviation. f1 & f2 generation were expressed in dB HL, whereas 2 f1-f2 amplitude was expressed in dB SPL. L1(f1)=62 dB HL and L2(f2)= 56 dB HL

X-axis represents the MER thresholds obtained by impedance audiometry, whereas the Y-axis corresponds to the MER thresholds obtained with the EchoScan. Equal sensitivity between the two tests would have resulted in values clustered along the diagonal red line. Obviously, EchoScan measures the stapedial reflex more sensitively.

Discussion

The findings reported in this study show a frequency-by-frequency correspondence between human DPOAES and PTA [Table 6]. However, the advantage of DPOAES is that they provide an objective measurement to evaluate biomechanical aspects of acoustic information processing

Table 6: Coefficient of correlation (R value) between PTA and DPgram values

DPgram /	2016 Hz	2400 Hz	3264 Hz	4032 Hz	4800 Hz	8064 Hz
PTA						
2000 Hz	0.32	0.41	0.49	0.37	0.38	0.42
3000 Hz	0.08	-0.07	0.18	0.07	0.14	0.37
4000 Hz	0.01	-0.11	0.20	0.15	0.27	0.27
8000 Hz	-0.04	0.06	0.22	0.23	0.27	0.38

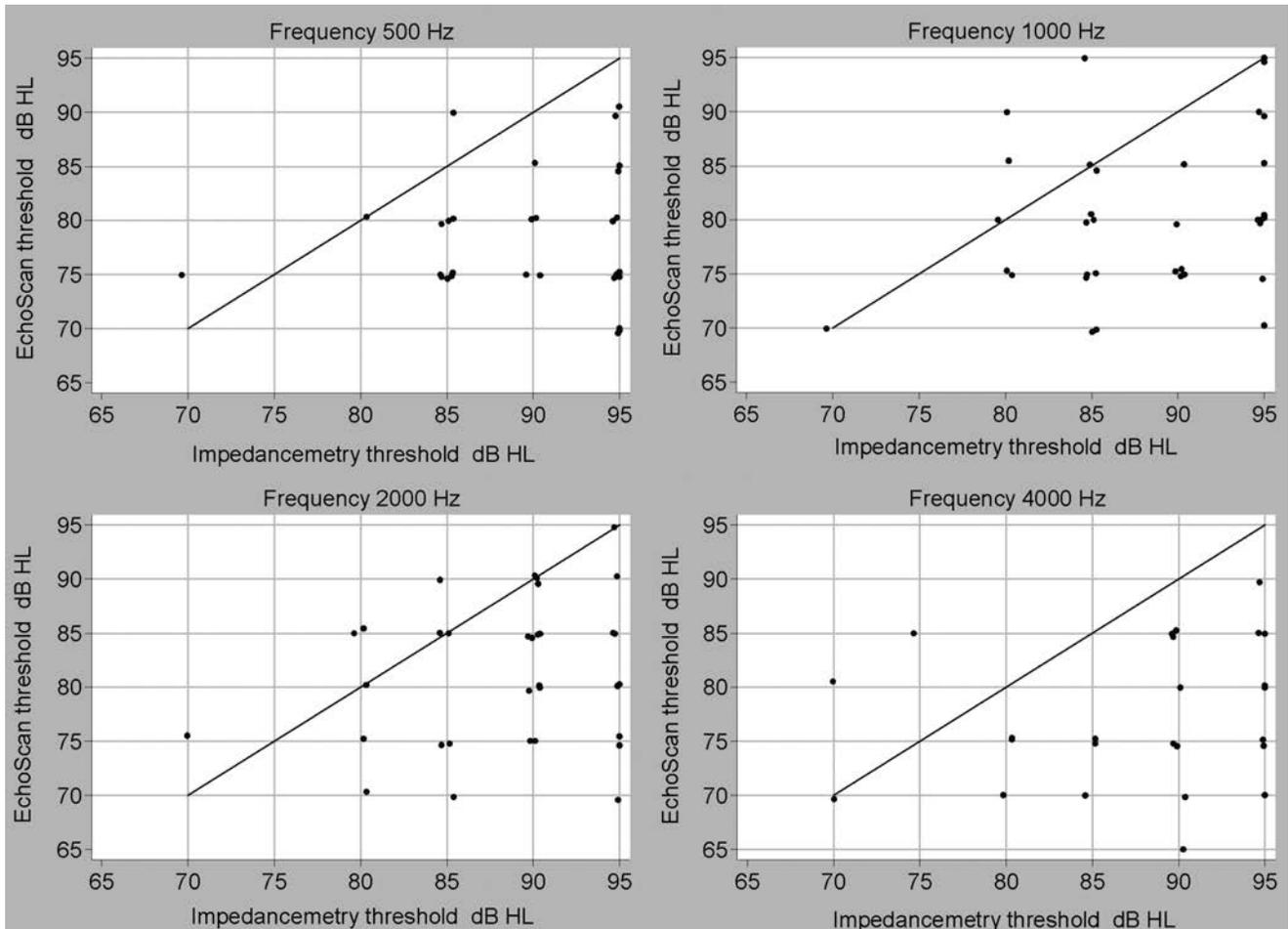


Figure 3: Comparison between stapedial reflex thresholds measured by impedance audiometry and with EchoScan; X axis: Impedance audiometry threshold in dB HL. Y axis: EchoScan threshold in dB HL

Table 7: Thresholds of middle-ear reflex elicited with DPOAE measurements as a function of age

Frequency Hz	Age classes years	Measurements n	Mean dB HL	SD
500	20	13	77.1	7.1
	30	16	77.0	4.9
	>40	17	79.4	4.9
1000	20	13	81.7	7.5
	30	16	78.9	4.9
	>40	16	80.3	7.2
2000	20	13	79.8	5.4
	30	16	80.8	4.9
	40	15	82.0	5.9
4000*	20	13	76.9	7.2
	30	16	79.5	5.6
	>40	16	82.5	6.8

*corresponds to a 5% level of significance

within the cochlea.^[22,23] Two separate portions of the input-output DPOAE growth curve were found with EchoScan for subjects with normal hearing: a linear and a saturated portion above 65 dB. DPOAE levels across frequency (DPgrams) are repeatable for the same subject Table 3, and although a between-subjects variation was measured, the degree of variation is very close to that obtained with PTA measurements [Table 5]. As a result, DPOAEs allow objective screening of cochlear performance over a wide frequency bandwidth. This is why DPOAEs were developed as an audiometric tool to detect cochlear hearing loss in newborns and infants.^[24] Surprisingly, DPOAEs are not used to perform clinical investigations in routine, and the technique is even ignored in occupational medicine.

By triggering the MER with a contralateral noise prior to, during and after DPOAE measurements, EchoScan allows study of both the inner- and middle-ear physiologies, provided that primary intensities are chosen within the linear portion of the DPOAE growth curve.^[25] By taking these precautions, this equipment could be used as a valuable system to screen for early signs of cochlear and middle-ear impairments. As far as the stapedial acoustic reflex is concerned, Venet *et al.*, showed the importance of eliciting the MER threshold in a hearing-loss prevention program. These authors showed that, in rats, the MER amplitude is sensitive to ototoxic agents, such as aromatic solvents.^[17] Thus, where multiple exposures are a problem, both inner-ear and middle-ear physiologies should be measured to appreciate the risk run by people exposed to both noise and ototoxic agents.

Before studying hearing loss, it is essential to keep in mind the decline in auditory performance with advancing age.^[12] Because the kinetics of presbycusis has become better known due to the increasing number of older people in our society, many studies documenting age-related hearing loss using either PTA or DPOAEs have been published.^[16,26-29] Based on findings reported in the present

study, EchoScan can be used to detect age-related hearing loss. Indeed, a significant decrease in DPOAE amplitude was found in high-frequencies as a function of age [Table 2: -0.134 dB per year, and Table 4]. Based on data reported in [Tables 3, 4, and 7], we can state that EchoScan is suitable to detect and monitor the kinetics of presbycusis. In line with the findings of Lonsbury-Martin *et al.*, this study also shows a gender-by-frequency interaction whereby female volunteers had larger DPOAEs amplitude than males [Table 2: 3.7 dB] at $f_2 = 4800$ Hz. Therefore, as for the ageing effect, the sensitivity of DPOAE measurements with EchoScan is sufficient to detect DPOAE changes due to gender differences, as recently reported by McFadden.^[30]

The major finding of this study concerns the detection of MER. Due to the sensitivity of the MER to certain ototoxicants, EchoScan was designed to allow easy measurement of the MER by clinicians and occupational physicians. In addition, EchoScan is the first equipment allowing evaluation of both inner-ear and middle-ear functions with a single set of hearing tests. The expected ageing effect on the MER at 4000 Hz was observed. This is likely due to age-related hearing loss in some subjects, which alone can explain a significant increase in MER thresholds.

In conclusion, the major aim of the current work was to test the efficiency of EchoScan and to offer it as alternative to subjective PTA for the detection of early-stage hearing impairments. It will be interesting to see it applied in occupational medicine. The clinical tests performed showed that EchoScan can provide innocuous, sensitive, objective, and reliable measurements of both inner- and middle-ear performances in subjects with normal hearing, taking both the age and gender of subjects into account. DPOAEs were present and reproducible over a contiguous 24-hour period (days D and D+1), for f_2 frequencies ranging from 1200 to 4800 Hz, and for primary levels varying between 55 and 75 dB SPL. The results obtained with EchoScan have shown: (1) a clear influence of presbycusis, and (2) an unexpected extensive influence of gender on DPOAE magnitudes. These influences were quite obvious in the high frequencies. The findings in this study demonstrate that EchoScan detects stapedial reflex thresholds more sensitively than impedance audiometry. Consequently, EchoScan is directly relevant to clinical settings allowing the incorporation of high-frequency DPOAEs into clinical protocols. In addition, EchoScan could be still more convincing in occupational medicine, where it could be used to follow up workers' hearing. It should be a promising tool to evaluate the early stages of presbycusis, the impact of ototraumatic and ototoxic agents on the cochlea, and the impact of occupational chemicals on the middle-ear reflex. It is very suitable for early detection in a hearing conservation program.

Perspectives

The EchoScan is currently being used in the workplace to test a cohort of noise-exposed workers. The aim of this first investigation is to test (1) the efficacy of the device in occupational environments (2) and the sensitivity of DPOAEs associated with a contralateral stimulus after a single working day in a moderate-intensity noise. This first on site investigation will be followed by other tests with workers exposed either to solvent or to noise and solvent.

Acknowledgment

The authors would like to thank Chantal Cour, Benoît Rieger, and Aurélie Thomas for their help throughout the clinical tests, and Aurélie Rémy (INRS) for her substantial help in interpreting the analyses.

Address for correspondence:

Dr. Pierre Campo,

National Institute of Research and Safety (INRS), CS60027,
54519 Vandoeuvre Cédex, France.

E-mail: pierre.campo@inrs.fr

References

- Salvi R, Wang J. Evidence of rapid functional reorganization in inferior colliculus and cochlear nucleus. In: Acoustical signal processing in the central auditory system. Editors: Syka, Plenum Press, N.Y.; 1997. p. 477-88.
- Syka J. Plastic changes in the central auditory system after hearing loss, restoration of function, and during learning. *Physiol Rev* 2002;82:601-28.
- Kaltenbach J, Zhang J. Intense-sound plasticity in the dorsal cochlear nucleus of rats: Evidence for cholinergic receptor upregulation. *Hear Res* 2007;226:232-43.
- Finlayson P, Kaltenbach J. Alterations in the spontaneous discharge patterns of single units in the dorsal cochlear nucleus following intense sound exposure. *Hear Res* 2009;256:104-17.
- Ruggero M, Rich N, Recio A, Narayan S. Basilar-membrane responses to tones at the base of the chinchilla cochlea. *J Acoust Soc Am* 1997;101:2151-63.
- Lopez-Poveda E, Johannesen P. Otoacoustic emission theories and behavioral estimates of human basilar membrane motion are mutually consistent. *J Assoc Res Otolaryngol* 2009;10:511-23.
- Dallos P. The active cochlea. *J Neurosci* 1992;12:4575-85.
- Hamernik R, Patterson J, Turrentine G, Ahroon W. The quantitative relation between sensory cell loss and hearing thresholds. *Hear Res* 1989;38:199-212.
- Lonsbury-Martin B, Whitehead M, Martin G. Distortion-product otoacoustic emissions in normal and impaired ears: Insight into generation processes. *Prog Brain Res* 1993;97:77-90.
- Campo P, Lataye R, Loquet G, Bonnet P. Styrene-induced hearing loss: A membrane insult. *Hear Res* 2001;154:170-80.
- EU-OSHA. Combined exposure to noise and ototoxic substances. Available from: <http://www.europa.eu>. [Last cited on 2010].
- Schucknecht H, Gacek M. Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993;102:1-16.
- Maguin K, Campo P, Parietti-Winkler C. Toluene can perturb the neuronal voltage-dependant Ca²⁺ channels involved in the middle-ear reflex. *Toxicol Sci* 2009;107:473-81.
- Venet T, Rumeau C, Campo P, Rieger B, Thomas A, Cour C. Neuronal circuits involved in the middle-ear acoustic reflex. *Toxicol Sci* 2011;119:146-55.
- Dunckley K, Dreisbach E. Gender effects on high frequency distortion product otoacoustic emissions in humans. *Ear Hear* 2004;25:554-64.
- Gates G, Cooper JC Jr, Kannel WB, Miller NJ. Hearing in the elderly: The Framingham cohort, 1983-1985. Part I. Basic audiometric test results. *Ear Hear* 1990;11:247-56.
- Campo P, Maguin K, Lataye R. Effects of aromatic solvents on acoustic reflexes mediated by central auditory pathways. *Toxicol Sci* 2007;99:582-90.
- Cacace A, McClelland W, Weiner J, McFarland D. Individual differences and the reliability of 2f1-f2 distortion-Product otoacoustic emissions: Effects of time-of-day stimulus variables, and gender. *J Speech Hear Res* 1996;39:1138-48.
- Gaskill S, Brown A. The behavior of the acoustic distortion product 2f1-f2 from the human ear and its relation to auditory sensitivity. *J Acoust Soc Am* 1990;88:821-39.
- Whitehead W, McCoy M, Lonsbury-Martin B, Martin G. Dependence of distortion-product otoacoustic emissions on primary levels in normal and impaired ears. Effects of decreasing L2 below L1. *J Acoust Soc Am* 1995;97:2346-58.
- Neely S, Johnson T, Kopun J. Distortion-product otoacoustic emission I/O characteristics in normal-hearing and hearing-impaired human ears. *J Acoust Soc Am* 2009;126:728-38.
- Lonsbury-Martin B, Harris M, Hawkins M, Stagner B, Martin G. Distortion product emissions in humans. Basic properties in normally hearing subjects. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;147:3-14.
- Avan P, Bonfils P. Frequency specificity of human distortion product otoacoustic emissions. *Audiology* 1993;32:12-26.
- Norton S, Gorga M, Widen J, Folsom R, Sininger Y, Cone-Wesson B, *et al.* Identification of neonatal hearing impairment: Summary and recommendations. *Ear Hear* 2000;21:529-35.
- Nieschalk M, Hustert B, Stoll W. Distortion-product otoacoustic emissions in middle-aged subjects with normal versus potentially presbycusis high-frequency hearing loss. *Audiology* 1998;37:83-99.
- Rosenhall U, Pedersen K, Svanborg A. Presbycusis and noise-induced hearing loss. *Ear Hear* 1990;11:257-63.
- Lonsbury-Martin B, Cutler W, Martin G. Evidence for influence of aging on distortion-product otoacoustic emissions in humans *J Acoust Soc Am* 1991;89:1749-59.
- Oeken J, Lenk A, Bootz F. Influence of age and presbycusis on DPOAE. *Acta Otolaryngol* 2000;120:396-403.
- Campo P, Venet T, Rumeau C, Thomas A, Rieger B, Cour C, *et al.* Impact of noise or styrene exposure on the kinetics of presbycusis. *Hear Res* 2011;280:122-32.
- McFadden D. Sexual orientation and the auditory system. *Front Neuroendocrinol* 2011;32:201-13.

How to cite this article: Venet T, Campo P, Rumeau C, Eluecque H, Parietti-Winkler C. EchoScan: A new system to objectively assess peripheral hearing disorders. *Noise Health* 2012;14:253-9.

Source of Support: Nil, **Conflict of Interest:** None declared.

ABSTRACT: The pure-tone audiometry is a reference tool to assess auditory function but it is able to measure only threshold elevations showing irreversible damages. Measurement of distortion products oto-acoustic emissions (DPOAEs), reflecting the cochlear function, allows early detection of alterations in the inner ear caused by noise or some ototoxic solvents. From paradigm based on a continuous record of cubic DPOAEs ($2f_1-f_2$) and a contralateral stimulation triggering the middle-ear reflex, we could explain, in rats, the pharmacological effects of toluene. This aromatic solvent can act on the centers involved in the middle-ear acoustic protection reflex. With the results obtained in animals, a device adapted to humans has been developed, called EchoScan. The EchoScan was tested on 50 healthy volunteers with normal hearing in a first clinical research protocol to verify in particular the reproducibility of its measurements. A second research protocol was then conducted to test this tool among company employees, according to several exposure conditions: unexposed controls, workers exposed to noise, exposed to solvents, exposed to noise and solvents. The results of the first two conditions are presented in this thesis. They confirm the relevance of the measurement of the middle ear reflex threshold in assessing the effects of noise exposure. The results of subjects exposed to solvents will further evaluate the sensitivity of EchoScan in detection of the pharmacological effects, and even in the characterization of chemical substances exposure (in progress). In the future, EchoScan should be particularly promising in occupational medicine, but other applications are already considered, such as the study of pharmacological effects of anesthetics on the middle ear reflex.

KEY-WORDS: Distortion product otoacoustic emissions, Noise, Solvent, Middle-ear reflex

RÉSUMÉ : L'audiométrie tonale liminaire est l'outil de référence pour évaluer le fonctionnement auditif, mais c'est un outil subjectif qui mesure des élévations de seuils témoignant de dégâts irréversibles sur le système auditif. La mesure des produits de distorsions acoustiques (PDAs), reflet du fonctionnement cochléaire, permet de dépister précocement des altérations de l'oreille interne causées par le bruit ou certains solvants ototoxiques. A partir d'un paradigme de mesure basé sur un enregistrement continu du PDA cubique ($2f_1-f_2$) et une stimulation controlatérale, nous avons pu expliquer, chez le rat, les effets pharmacologiques du toluène. Ce solvant aromatique agirait en particulier sur les centres nerveux impliqués dans le réflexe de protection acoustique de l'oreille moyenne. Devant les résultats obtenus chez l'animal, un prototype d'appareil adapté à l'homme a été mis au point, baptisé EchoScan. L'EchoScan a été testé sur 50 volontaires sains normo-entendant lors d'un premier protocole de recherche clinique pour vérifier la reproductibilité des mesures. Un second protocole a ensuite été conduit pour tester l'outil chez des salariés en entreprise, selon plusieurs conditions d'exposition : témoins non exposés, salariés exposés au bruit, exposés aux solvants, exposés au bruit et aux solvants. Les résultats des deux premières conditions sont présentés dans ce mémoire. Ils confirment la pertinence de la mesure du seuil du réflexe de l'oreille moyenne pour évaluer les effets de l'exposition au bruit. Les résultats des sujets exposés aux solvants évalueront la sensibilité de l'EchoScan dans la détection, voir la caractérisation des effets pharmacologiques de substances chimiques (inclusions en cours). Si l'avenir de l'EchoScan apparaît prometteur en médecine du travail, d'autres applications sont envisagées, comme l'étude des effets pharmacologiques des anesthésiques sur le réflexe de l'oreille moyenne.

MOTS CLEFS : Produits de distorsions acoustiques, Bruit, Solvant, Réflexe acoustique