



**HAL**  
open science

## Surdités cachées ; atteinte des cellules sensorielles cochléaires ou du nerf auditif ?

Marion Souchal

► **To cite this version:**

Marion Souchal. Surdités cachées ; atteinte des cellules sensorielles cochléaires ou du nerf auditif?. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAS003 . tel-02012141

**HAL Id: tel-02012141**

**<https://theses.hal.science/tel-02012141>**

Submitted on 8 Feb 2019

**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.

*ÉCOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ,  
AGRONOMIE ET ENVIRONNEMENT*

*Thèse*

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

Spécialité : Neurosciences

soutenue le 26 septembre 2017

**Marion SOUCHAL**

---

**Surdités cachées : atteinte des cellules sensorielles cochléaires  
ou du nerf auditif ?**

---

Présidente du jury : Pr. Christine COURTEIX (UCA, Clermont-Ferrand)  
Membres du jury : Pr. Natacha TEISSIER (USPC, Paris)  
Dr. Sirley CARVALHO (UFMG, Belo Horizonte)  
Rapporteurs : Dr. Benjamin DELPRAT (INM, Montpellier)  
Dr. Aziz EL AMRAOUI (Institut Pasteur, Paris)  
Directeur de thèse : Dr. Fabrice GIRAUDET (UCA, Clermont-Ferrand)  
Directeur du laboratoire : Pr. Paul AVAN



## Remerciements

Aux membres du jury,

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

A Monsieur le **Docteur Aziz EL AMRAOUI**, merci d'avoir accepté de juger et critiquer mes travaux de thèse en tant que rapporteur et d'avoir fait partie de mon comité de thèse.

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

A Madame la **Docteur Sirley CARVALHO**, merci de m'avoir accueillie au Brésil et d'avoir accepté d'être membre du jury de ma thèse.

A Madame la **Professeure Natacha TEISSIER** et Madame la **Professeure Christine COURTEIX**, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie des membres du jury.

Aux financeurs,

Je remercie le groupe **ENTENDRE** d'avoir accepté de financer mes 3 années de thèses et plus particulièrement Monsieur **Jean-Robert FIOLEAU**, Monsieur **Laurent PIRON**, Monsieur **Laurent CROS** et Madame **Fabienne DESABRES**. Je vous remercie également pour vos invitations régulières à venir présenter mes travaux lors de vos réunions nationales et régionales.

A l'équipe du laboratoire de biophysique neurosensorielle,

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

A Madame **Laurence CHAUVET**, merci pour ton soutien à toute épreuve et pour ton aide logistique et administrative.

A Madame **Christine CERCY**, merci pour ton aide, notamment dans la réalisation des coupes histologiques et des colorations.

A mes chères collègues de bureau, **Blandine LOURENÇO, Julie DURON, Sandra TORRECILLIA**, merci pour toutes nos discussions et pour les bons moments passés avec vous.

A l'équipe d'Echodia,

A **Thierry HASSOUN, Romain MOURA, Grégory GERENTON, Nathanaël CHASSAGNE** et **Jefferson DA SILVA**, merci pour tous les bons moments partagés avec vous et merci pour votre aide technique pendant la réalisation de ma thèse.

A l'équipe de Neurodol,

Je remercie les personnes qui ont participé de près ou de loin à mon projet de thèse et plus particulièrement le **Docteur Méлина BEGOU**, le **Docteur Jérôme BUSSEROLLES**, le **Docteur Youssef AISSOUNI, Amélie DEMOSTHENES, Sylvain LAMOINE**.

A l'équipe du CICS,

Je remercie Mesdames **Christelle BLAVIGNAC, Lorraine GAMEIRO** et **Claire SZCZEPANIAK** pour leur aide technique dans la préparation des échantillons et dans l'utilisation des microscopes.

A l'équipe brésilienne,

A Madame le **Docteur Ludimila LABANCA**, merci de ton accueil au Brésil, de ton aide dans la réalisation du projet sur la toxoplasmose et merci pour ta bonne humeur permanente que ce soit là-bas ou en France.

A Madame le **Docteur Luciana RESENDE**, merci de m'avoir fait confiance pour la réalisation du projet brésilien et merci pour ton accueil.

A **Bianca EUGENIO**, merci pour tous les bons moments passés ensemble.

A Madame le **Docteur Caroline VACHIAS**, merci pour ton aide technique en microscopie confocale.

A Madame le **Docteur Raphaëlle CASSEL**, merci pour ton accueil à Marseille, ta disponibilité et tes nombreux conseils.

A mes proches,

A mes parents, à mon grand-père, merci pour votre soutien sans faille et votre dévouement de chaque instant.

A ma grand-mère, disparue avant d'avoir pu voir l'aboutissement de ce travail, je n'oublierais ni ton courage, ni ton amour et tu continueras de m'inspirer tout au long de ma vie.

A mon frère **Martin** et ma sœur **Juliette**, merci d'avoir été toujours présents et de m'avoir soutenu durant ces trois années.

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

A mes amis, merci pour les moments de décompression, et plus particulièrement merci **Alice** pour ton écoute et ta présence depuis tant d'années.

A **Julien**, merci de ta présence, de ta patience, de ton écoute et de ton aide toujours précieuse.



## Liste des publications et communications

### Publication:

**Souchal M.**, Labanca L., Carvalho S., Resende L., Blavignac C., Avan P., Giraudet F. (2017)  
Transient abnormalities in masking tuning curve in early progressive hearing loss mouse model.  
(soumis à Hearing Research)

### Communications affichées :

« Un nouveau profil auditif pathologique »

**37<sup>ème</sup> congrès des audioprothésistes**, Paris, 10 au 12 avril 2015

« A new pathological cochlear profile »

**52rd Inner Ear Biology congress**, Rome, 12 au 15 septembre 2015

«La surdité cachée ou quand l’audiogramme ne nous dit pas tout !»

**38<sup>ème</sup> congrès des audioprothésistes**, Paris, 18 au 20 mars 2016

« La surdité cachée ou quand l’audiogramme ne nous dit pas tout ! »

**19<sup>ème</sup> journées de l’école doctorale**, Clermont-Ferrand, 2 et 3 juin 2016

« Hidden hearing loss or when the audiogram doesn’t tell us everything! »

**53rd Inner Ear Biology congress**, Montpellier, 17 au 21 septembre 2016

«Discordance entre seuils auditifs et otoémissions : quel test pour approcher la réalité ?»

**39<sup>ème</sup> congrès des audioprothésistes**, Paris, 24 au 26 mars 2016



Communications orales :

« Caractérisations fonctionnelles et histologiques d'une nouvelle entité pathologique de distorsion cochléaire »

**Réunion nationale ENTENDRE**, Marne-la-Vallée, 23 novembre 2014

« La surdité cachée ou quand l'audiogramme ne nous dit pas tout ! »

**Réunion régionale Ouest ENTENDRE**, Carnac, 4 juillet 2016

« La surdité cachée ou quand l'audiogramme ne nous dit pas tout ! »

**Réunion nationale ENTENDRE**, Marne-la-Vallée, 27 novembre 2016

« Hidden hearing loss induced by platinum drug »

**8th International Workshop Clermont Audiology**, Clermont-Ferrand, 28 et 29 mars 2017

« Une surdité cachée induite par un anticancéreux »

**20<sup>ème</sup> journées de l'école doctorale**, Clermont-Ferrand, 18 et 19 mai 2017

« Platinum-induced hidden hearing loss »

**54rd Inner Ear Biology congress**, Hannovre, 13 au 17 septembre 2017

# Table des matières

<b>Remerciements .....</b>	<b>3</b>
<b>Liste des publications et communications .....</b>	<b>7</b>
<b>Table des figures.....</b>	<b>13</b>
<b>Abréviations .....</b>	<b>17</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>21</b>
<b>Chapitre 1 : Le codage des signaux acoustiques par l'oreille .....</b>	<b>23</b>
<b>1. L'oreille externe et l'oreille moyenne .....</b>	<b>24</b>
<b>2. L'oreille interne .....</b>	<b>26</b>
2.1. L'organe de Corti, siège de la perception auditive .....	30
2.2. Le rôle central de la CCE dans la sélectivité fréquentielle .....	31
2.2.1. Physiologie de la CCE.....	34
2.2.2. Evaluation fonctionnelle des CCE.....	36
2.3. La CCI, point de départ du message auditif nerveux.....	37
<b>3. Le nerf cochléaire .....</b>	<b>41</b>
3.1. Le système afférent .....	41
3.1.1 La transmission du message auditif nerveux de la cochlée au tronc cérébral .....	41
3.1.2. Evaluation objective et électrophysiologique du système afférent .....	44
a. L'électrocochléographie .....	44
b. La mesure des potentiels évoqués auditifs précoces (PEAp).....	44
3.2. Le système efférent .....	47
3.2.1. Le système olivocochléaire médian.....	47
3.2.2. Le système olivocochléaire latéral.....	47
3.2.3. Neurotransmetteurs du système efférent .....	49
3.2.4. Evaluation fonctionnelle du système efférent.....	49

<b>Objectif général de la thèse .....</b>	<b>53</b>
<b>Chapitre 2 : Surdité cachée, atteinte des CCE et désorganisation cochl�otopique.....</b>	<b>55</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>55</b>
1.1. Atteinte des cellules ciliées externes et troubles d'intelligibilité dans le bruit .....	56
1.1.1. Déficiences cachées liées à une perte de fonction des CCE chez l'humain.....	56
1.1.2. La courbe d'accord de masquage, un outil pour évaluer la sélectivité fréquentielle de la cochlée	57
1.2. La souris comme modèle d'étude de la surdité .....	59
1.2.1. Un modèle présentant de nombreux avantages.....	59
1.2.2. Le profil « Nherf1-/- », des souris mutantes présentant une surdité subtile .....	60
1.2.3. La CD1, un modèle de surdité lié à l'âge .....	61
1.3. Objectif de l'étude.....	62
<b>2. Protocole général.....</b>	<b>62</b>
<b>Article.....</b>	<b>63</b>
<b>3. Résultats principaux.....</b>	<b>93</b>
<b>4. Discussion.....</b>	<b>95</b>
<b>Chapitre 3 : Surdité cachée, atteinte du nerf et oxaliplatine.....</b>	<b>101</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>101</b>
1.1. Atteinte cachée du nerf auditif à la suite d'une surexposition sonore .....	101
1.2. Ototoxicité et sels de platine .....	104
1.3. La neurotoxicité, un effet secondaire de l'oxaliplatine .....	105
1.4. L'oxaliplatine, une drogue ototoxique ?.....	106
1.4.1. Des cas d'ototoxicité chez l'humain.....	106
1.4.2. Ototoxicité chez l'animal.....	107
1.5. Objectif de l'étude.....	108
<b>2. Matériel et Méthode .....</b>	<b>109</b>
2.1. Animaux.....	109

2.2.	Préparation et injections des drogues .....	110
2.3.	Tests fonctionnels.....	113
2.3.1.	Mesures des produits de distorsions acoustiques.....	113
2.3.2.	Mesure des potentiels évoqués auditifs précoces .....	113
2.3.3.	Electrocochléographie .....	114
2.3.4.	Test de suppression controlatérale des otoémissions.....	115
2.4.	Histologie .....	116
2.4.1.	Microscopie optique .....	116
2.4.2.	Microscopie confocale.....	117
2.5.	Analyse statistique.....	118
<b>3.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>119</b>
3.1.	Effet d'un cycle de traitement d'oxaliplatine sur le système auditif .....	119
3.1.1.	Évolution des seuils auditifs obtenus avec la mesure des potentiels évoqués auditifs précoces (PEAp) 119	
3.1.2.	Évolution de la latence de l'onde I des PEAp .....	121
3.1.3.	Effet de l'oxaliplatine sur l'anatomie et la physiologie des CCE .....	121
a.	Mesure des produits de distorsion acoustiques (PDA) .....	121
b.	Observation de la conformation des cellules ciliées.....	123
3.1.4.	Effet de l'oxaliplatine sur la sélectivité fréquentielle de la cochlée.....	125
3.1.5.	Effet de l'oxaliplatine sur le nerf auditif.....	126
a.	Évolution de l'amplitude du PAC .....	126
b.	Effet de l'oxaliplatine sur les cellules du ganglion spiral .....	127
c.	Effet de l'oxaliplatine sur les fibres du nerf auditif.....	129
d.	Effet de l'oxaliplatine sur le système efférent.....	131
3.2.	Effet d'un cycle de traitement avec l'oxaliplatine sur le système auditif à long terme .....	135
3.2.1.	Évolution des seuils auditifs mesurés avec les PEAp à long terme .....	135
3.2.2.	Évolution de la latence de l'onde I des PEAp à long terme.....	136
3.2.3.	Évolution des PDA à long terme .....	137
3.2.4.	Observation des cellules du ganglion spiral un an après le traitement avec l'oxaliplatine .....	138
3.3.	Effet de plusieurs cycles de traitement d'oxaliplatine sur le système auditif .....	141

3.3.1. Évolution des seuils auditifs mesurés avec les PEAp après plusieurs cycles de traitement.....	141
3.3.2. Évolution de la latence de l'onde I des PEAp après plusieurs cycles de traitement .....	142
3.3.3. Évolution des PDA après plusieurs cycles de traitement avec de l'oxaliplatine.....	143
3.3.4. Observation du ganglion spiral après plusieurs cycles de traitement.....	145
3.4. Effet de différentes doses d'oxaliplatine injectées par voie transtympanique .....	147
3.4.1. Évolution des seuils auditifs mesurés avec les PEAp après injection transtympanique d'oxaliplatine .....	147
3.4.2. Évolution de la latence de l'onde I des PEAp après injection transtympanique d'oxaliplatine ..	149
3.4.3. Évolution des PDA après injection transtympanique d'oxaliplatine.....	150
3.4.4. Observation des cellules du ganglion spiral après injection transtympanique d'oxaliplatine .....	153
<b>4. Discussion.....</b>	<b>156</b>
<b>5. Perspectives.....</b>	<b>162</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>165</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>169</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>189</b>

# Table des figures

(Une partie des schémas présentés dans ce mémoire ont été réalisés par mes soins)

<b>Figure 1.1 :</b> Représentation schématique de l'appareil auditif chez l'homme. ....	24
<b>Figure 1.2 :</b> Représentation schématique des deux organes sensoriels de l'oreille interne : .....	27
<b>Figure 1.3 :</b> Représentation schématique d'une coupe de cochlée. ....	28
<b>Figure 1.4 :</b> Représentation schématique d'une section transversale du tube cochléaire.....	30
<b>Figure 1.5 :</b> Photomicrographe montrant les empreintes laissées dans la membrane tectoriale par les stéréocils .....	32
<b>Figure 1.6 :</b> Représentation schématique d'une cellule ciliée externe. ....	33
<b>Figure 1.7 :</b> Schéma comparatif des cartes fréquentielles des cochlées humaine et murine. ....	34
<b>Figure 1.8 :</b> Représentation schématique d'une cellule ciliée interne. ....	38
<b>Figure 1.9 :</b> Schéma de l'innervation des CCI par les projections terminales du nerf cochléaire. ....	40
<b>Figure 1.10 :</b> Représentation schématique des voies auditives primaire et non primaire. ....	42
<b>Figure 1.11 :</b> Représentation schématique des voies auditives avec les sites anatomiques associés aux cinq ondes des PEAp.....	46
<b>Figure 1.12 :</b> Représentation schématique des voies efférentes auditives médianes et latérales. ....	48
<b>Figure 1.13 :</b> Graphique montrant l'amplitude des PDA d'une souris en réponse à l'envoi de deux sons de fréquences f1 et f2 [...] .....	50
<b>Figure 2.1 :</b> Graphique représentant un exemple de courbe d'accord de masquage correspondant à une audition normale.....	58
<b>Figure 3.1 :</b> Chronogramme expérimental.....	112
<b>Figure 3.2 :</b> Le traitement avec l'oxaliplatine n'entraîne pas de modification des seuils auditifs évalués par les PEAp. ....	120
<b>Figure 3.3 :</b> Le traitement avec l'oxaliplatine n'entraîne pas de modification de la latence de l'onde I des PEAp.....	121
<b>Figure 3.4 :</b> Le traitement avec l'oxaliplatine ne modifie pas les PDA. ....	122
<b>Figure 3.5 :</b> Le traitement avec l'oxaliplatine n'entraîne pas d'atteinte des CCE et des CCI.....	124

<b><u>Figure 3.6</u> : Le traitement avec l'oxaliplatine n'entraîne pas de modification de la sélectivité fréquentielle de la cochlée.....</b>	<b>125</b>
<b><u>Figure 3.7</u> : L'amplitude du PAC à 32 kHz est diminuée chez les souris ayant reçu des injections d'oxaliplatine.....</b>	<b>126</b>
<b><u>Figure 3.8</u> : Le traitement avec l'oxaliplatine entraîne une diminution de la densité des cellules du ganglion spiral à la base de la cochlée.....</b>	<b>128</b>
<b><u>Figure 3.9</u> : Le traitement avec l'oxaliplatine entraîne une diminution de la densité des fibres auditives au niveau des tours intermédiaire et basal de la cochlée.....</b>	<b>130</b>
<b><u>Figure 3.10</u> : Le traitement avec l'oxaliplatine semble entraîner une diminution du réflexe du SEOCM.</b>	<b>132</b>
<b><u>Figure 3.11</u> : Le traitement avec l'oxaliplatine semble entraîner une diminution de la densité des fibres efférentes auditives au niveau des tours intermédiaire et basal de la cochlée.....</b>	<b>133</b>
<b><u>Figure 3.12</u> : Les seuils auditifs sont peu affectés, un an après le traitement avec l'oxaliplatine.....</b>	<b>135</b>
<b><u>Figure 3.13</u> : Aucune modification de la latence de la première onde des PEAp n'est constatée un an après le traitement avec l'oxaliplatine.....</b>	<b>136</b>
<b><u>Figure 3.14</u> : Les PDA ne sont pas altérés un an après le traitement avec l'oxaliplatine.....</b>	<b>137</b>
<b><u>Figure 3.15</u> : Une diminution de la densité des cellules du ganglion spiral de la base de la cochlée est observée, un an après le traitement avec l'oxaliplatine.....</b>	<b>139</b>
<b><u>Figure 3.16</u> : Après 5 cycles d'injection d'oxaliplatine, les seuils auditifs sont affectés à haute fréquence</b>	<b>141</b>
<b><u>Figure 3.17</u> : La latence de la première onde des PEAp n'est pas modifiée après 5 cycles de traitement avec l'oxaliplatine.....</b>	<b>142</b>
<b><u>Figure 3.18</u> : La fonctionnalité des CCE n'est pas affectée après 5 cycles de traitement avec de l'oxaliplatine.....</b>	<b>144</b>
<b><u>Figure 3.19</u> : L'oxaliplatine diminue la densité des cellules du ganglion spiral à la base de la cochlée après 5 cycles de traitement avec de l'oxaliplatine.....</b>	<b>146</b>
<b><u>Figure 3.20</u> : Les seuils auditifs mesurés avec les PEAp sont atteints de façon dose-dépendante par l'oxaliplatine injectée en transtympanique.....</b>	<b>148</b>
<b><u>Figure 3.21</u> : À haute dose, l'injection transtympanique d'oxaliplatine modifie la latence de l'onde I des PEAp.....</b>	<b>149</b>
<b><u>Figure 3.22</u> : L'amplitude des PDA est diminuée par l'oxaliplatine injectée en transtympanique à haute dose.....</b>	<b>151</b>

**Figure 3.23 :** Les seuils auditifs évalués à l'aide des PDA sont affectés de façon dose-dépendante par l'oxaliplatine injectée en transtympanique..... 152

**Figure 3.24 :** La densité des cellules du ganglion spiral est diminuée à la base de la cochlée après injection transtympanique d'oxaliplatine. .... 155





## Abréviations

ACh	AcétylCholine
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Méthylisozol-4-Propionate Acid
AP	<i>Action Potential</i>
ASR	<i>Acoustic Startle Reflex</i>
BIAP	Bureau International d'AudioPhonologie
CapeOx	Capecitabine Oxaliplatine
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CCE	Cellule Ciliée Externe
CCI	Cellule Ciliée Interne
CEMEEA	Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
ChAT	Choline AcétylTransférase
CICS	Centre d'Imagerie Cellulaire et Santé
COS	Complexe Olivaire Supérieur
dB	décibel
dB SPL	<i>decibel Sound Pressure Level</i>
DRO	Dérivé Réactif de l'Oxygène
EcoG	Electrocochléographie
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
f	fréquence
FEG	<i>Field Emission Gun</i>
FOLFOX	<i>FOLinic acid, Fluorouracil, OXaliplatin</i>
G	Gauge
GABA	$\gamma$ - <i>Gamma-AminoButyric Acid</i>
HES	Hématoxyline Eosine Safran
HCN	<i>Hyperpolarisation-activated Cyclic Nucleotides-gated cation channel</i>

HMDS	Hexamethyldisilazane
Hz	Hertz
i.p.	Intrapéritonéale
K+	Potassium
L	<i>Level</i>
M	Molaire
MTC	<i>Masking Tuning Curve</i>
Na+	Sodium
NF	NeuroFilament
Nherf1	<i>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor 1</i>
OAE	Otoémission acoustique
OAEP	Otoémission acoustique provoquée
OAES	Otoémission acoustique spontanée
Oct1	<i>Organic Cation Transporter 1</i>
Oct2	<i>Organic Cation Transporter 2</i>
ORL	Oto-Rhino-Laryngologie
OSL	Olive Supérieure Latérale
OSM	Olive Supérieure Médiane
P	Post-natal
Pa	Pascal
PAC	Potentiel d'Action Composite
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDA	Produit de Distorsion Acoustique
PEAp	Potentiel Evoqué Auditif précoce
PFA	ParaFormAldéhyde
PHEM	Pipes, Hepes, EGTA, Magnésium
PMC	Potentiel Microphonique Cochléaire
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SEOCL	Système Efférent Olivocochléaire Latéral

SEOCM	Système Efférent Olivocochléaire Médian
SP	<i>Summating potential</i>
TEN-test	<i>Threshold equalizing noise test</i>
TREK-1	<i>TWIK1-related K<sup>+</sup>channel</i>
TRP	<i>Transient Receptor Potential</i>
TrxR	<i>Thioredoxine Reductase</i>
5-FU	5-FluoroUracile



## Introduction générale

L'ouïe nous permet d'analyser notre environnement en permanence, les messages sonores constituent plus d'un tiers des informations données par nos sens. Ces informations sont constamment triées par notre cerveau auditif. Ainsi nous ne prêterons pas attention au bruit de fond continu de la ventilation alors que nous réagirons immédiatement lorsque la sonnerie du téléphone retentira. L'ouïe est également essentielle pour l'apprentissage du langage et pour la communication. Nous apprenons à décoder un message auditif tel que la parole selon son rythme, son intonation ou même son accentuation et à réagir de façon adaptée.

L'âge, l'exposition au bruit ou à des substances chimiques, certaines mutations génétiques, sont autant de facteurs pouvant causer une surdité. Dans le cas de la surdité liée au vieillissement, la perte auditive s'établit de manière progressive avec une élévation des seuils auditifs, notre cerveau s'habitue à percevoir de moins en moins d'informations et il en devient paresseux ! Pour pallier cela, il est possible de procéder à un appareillage adapté.

La surdité dite classique, ou neurosensorielle, est caractérisée par des seuils auditifs élevés associés à la mort d'une catégorie des cellules sensorielles de l'oreille interne : les cellules ciliées externes. Les surdités peuvent également être causées par une atteinte du nerf auditif qui ne transmet alors plus correctement les informations nerveuses au cerveau. D'autres types de surdités existent, comme les surdités de transmission, liées à un blocage de l'information sonore au niveau de l'oreille externe ou moyenne, comme l'otite.

Depuis quelques années, les équipes de chercheurs travaillant sur les pathologies auditives périphériques, notamment celle de Charles Liberman (Massachusetts, États-Unis), ont montré que les surdités n'étaient pas forcément liées à une élévation des seuils auditifs. En effet, il est

possible, par exemple, d'être exposé à un bruit important pendant une durée limitée, mais suffisante pour entraîner une élévation temporaire des seuils auditifs. Une récupération peut s'opérer dans les jours suivants et ces seuils seront redevenus normaux, aucune perte auditive ne pourra alors être détectée de façon classique, par la mesure de l'audiogramme. Cependant, cette courte exposition au bruit peut avoir causé des dommages irréversibles au niveau des fibres du nerf auditif. Il existe un système de compensation au niveau de ce dernier qui rend cette atteinte « cachée ». Les sujets concernés peuvent se plaindre de problèmes d'intelligibilité plus marqués dans un environnement bruyant, mais ils ne sont pas pris en charge par les médecins, car présentant des seuils auditifs corrects.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse, il est maintenant acquis qu'un audiogramme normal n'est pas gage d'un système auditif parfaitement fonctionnel, il est donc nécessaire de mieux identifier ces atteintes subtiles de l'audition.

# Chapitre 1 : Le codage des signaux acoustiques par l'oreille

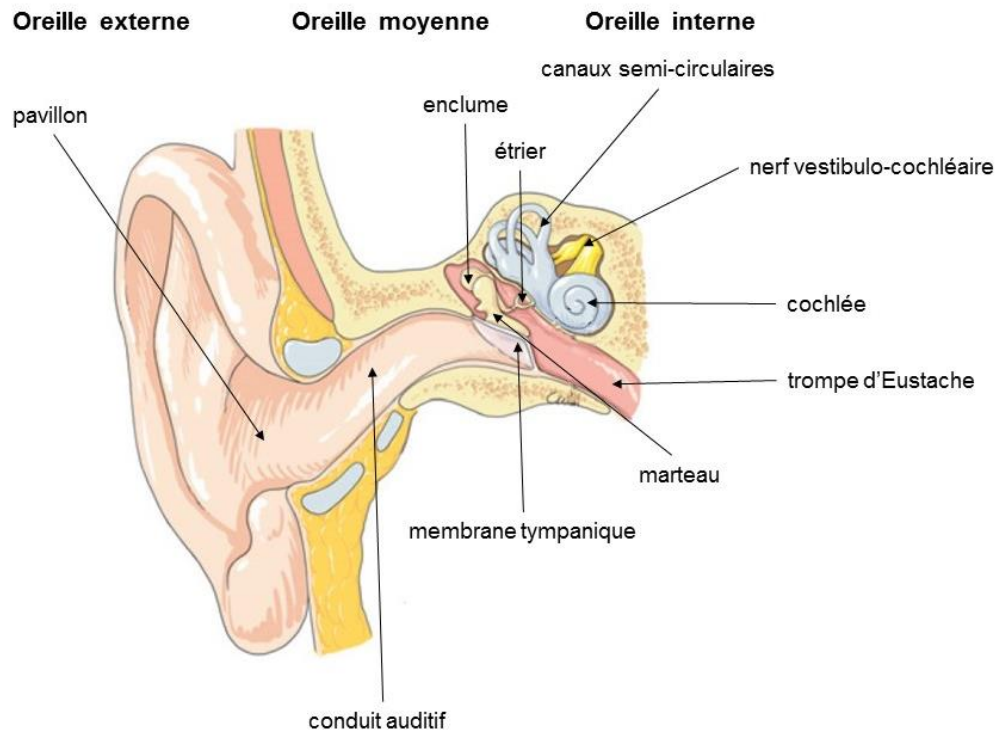
Le son est une onde qui se propage dans un milieu matériel gazeux ou liquidien. Il entraîne une succession de compressions et de dilatations des molécules de ce milieu, qui retournent ensuite à leur position initiale. Il est caractérisé par son intensité exprimée en décibels (dB) ainsi que sa fréquence en Hertz (Hz).

L'intensité correspond à la puissance du son, elle permet de distinguer un son faible d'un son fort. Le décibel (dB) indique la différence relative entre deux pressions acoustiques. La pression acoustique absolue est notée en dB SPL. La référence du niveau de pression acoustique est fixée à la limite inférieure de la capacité auditive de l'oreille humaine normale, c'est-à-dire à 20  $\mu$ Pa. Par conséquent, 0 dB SPL est équivalent à une pression acoustique de 20  $\mu$ Pa.

La fréquence correspond à la hauteur du son : plus un son est grave, plus sa fréquence est basse et au contraire, plus il est aigu, plus sa fréquence est haute. Le Hertz (Hz) indique le nombre d'allers-retours qu'effectue une membrane (vibration) sous l'effet d'un son. Il est possible de distinguer les sons purs, qui contiennent une seule fréquence, des sons complexes qui sont décomposables en multiples fréquences. Les signaux naturels possèdent souvent plusieurs composantes fréquentielles. Jean-Baptiste Joseph Fourier a montré que tout son complexe pouvait être considéré comme un ensemble de sons purs. Il est à l'origine d'un outil mathématique pouvant déterminer la composition fréquentielle d'un son complexe : la Transformée de Fourier ou analyse spectrale.

L'oreille est constituée de telle manière qu'elle peut capter les sons et les transformer en messages interprétables pour notre cerveau. Elle peut être divisée en trois parties : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne (Figure 1.1).





**Figure 1.1 :** Représentation schématique de l'appareil auditif chez l'homme.  
(d'après Saroul et al., 2015)

## **1. L'oreille externe et l'oreille moyenne**

L'oreille externe a un rôle de protection et d'amplification, elle capte les sons provenant majoritairement de l'avant et du côté de la tête. Elle est composée du pavillon et du conduit auditif externe, fermé à son extrémité par la membrane tympanique. Le pavillon est une lame fibrocartilagineuse qui constitue la partie visible de l'oreille. De par ses nombreux replis, il a pour rôle d'amplifier les sons de fréquences entre 2 et 7 kHz et de les diriger vers le conduit auditif. Il est également important pour la localisation des sources sonores. Chez certains mammifères, le pavillon possède une mobilité, il peut être dirigé vers la source sonore pour mieux capter les sons, ou au contraire replié lorsque le son est assourdissant.

Le message sonore arrive ensuite au niveau du tympan, une membrane mince et translucide, constituée de tissu conjonctif fibreux, qui délimite l'oreille moyenne ou caisse du tympan. Les ondes sonores font vibrer cette membrane, entraînant le mouvement de la chaîne ossiculaire. Trois osselets constituent cette chaîne et sont reliés entre eux par des ligaments : le marteau (ou *malleus*), l'enclume (ou *incus*) et l'étrier (ou *stapes*). Le marteau est attaché au tympan, prolongé par l'enclume qui le relie à l'étrier. La platine de l'étrier est reliée à la fenêtre ovale qui délimite l'oreille interne. La chaîne des osselets entraîne une amplification des sons de fréquences entre 1 et 10 kHz de l'ordre de 20 à 30 dB. En cas de pathologie de l'oreille moyenne, cette amplification disparaît et entraîne une mauvaise transmission du message auditif.

L'oreille moyenne est reliée à l'arrière de la gorge et au nez par la trompe d'Eustache, qui a un rôle dans l'équilibrage des pressions de part et d'autre de la membrane tympanique, très important pour sa libre vibration. L'oreille moyenne a différentes fonctions : elle transmet les vibrations sonores du milieu extérieur, aérien, à l'oreille interne qui est un milieu liquidien, jouant ainsi un rôle d'adaptateur d'impédance. Elle protégerait également l'oreille interne des sons trop forts via les réflexes stapédien et du muscle tenseur du tympan.

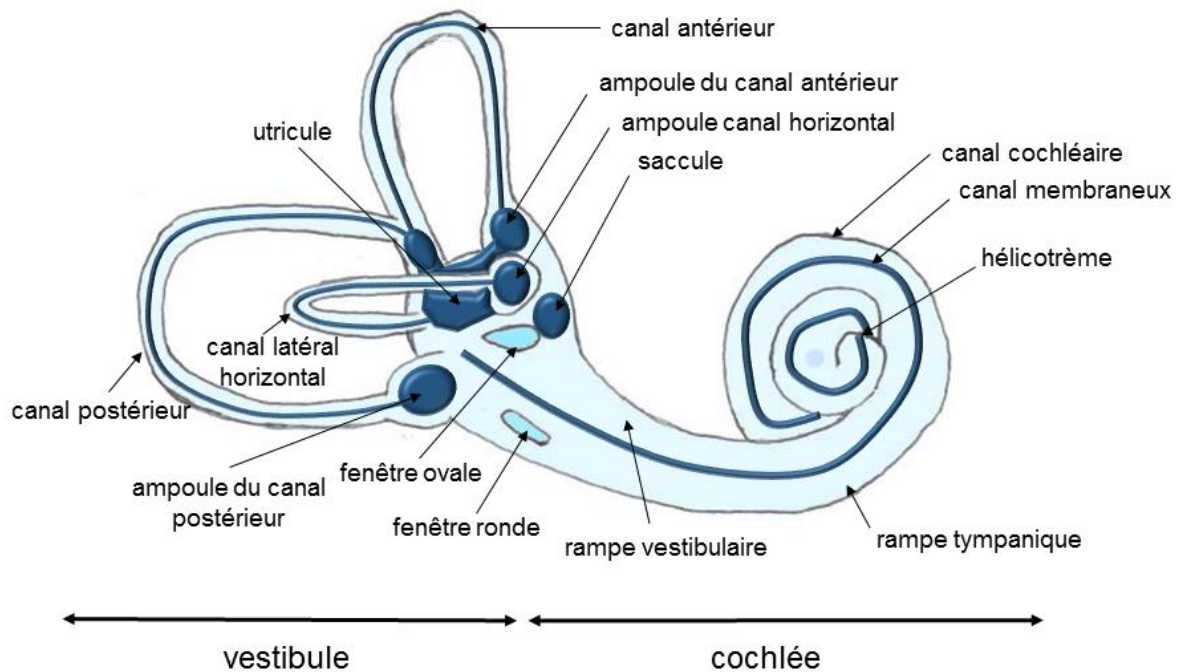
Ces boucles s'activent en réponse à des stimulations auditives intenses et ont pour but d'éviter des dommages au niveau de l'oreille. Ils ont également un rôle pour le sujet dans l'atténuation de la perception de sa propre voix lors de la vocalisation. Le réflexe stapédien (réflexe acoustique) est le plus important chez l'homme, il est déclenché par un son d'intensité supérieure à 80 dB. L'information est transmise par le nerf auditif jusqu'au tronc cérébral. La boucle réflexe passe par le nerf facial et entraîne la contraction du muscle de l'étrier. Le deuxième réflexe est celui du muscle du marteau et a une importance secondaire chez l'homme. La contraction du muscle se fait suite à l'activation du nerf trijumeau (nerf V crânien).

Ces deux réflexes entraînent une augmentation de la rigidité de la chaîne ossiculaire et par conséquent une limitation du déplacement des osselets aux fréquences inférieures à 2000 Hz. Ils protègent donc l'oreille des stimulations sonores trop intenses, mais restent limités. En effet, ils n'interviennent pas pour des sons de hautes fréquences et ils sont fatigables donc peu efficaces contre les sons de longue durée. De plus, ils sont mis en jeu trop tardivement pour protéger l'oreille d'un bruit impulsionnel, comme un tir d'arme à feu, leur latence étant d'environ 30 ms.

## **2. L'oreille interne**

(Avan and Bonfils, 1991)

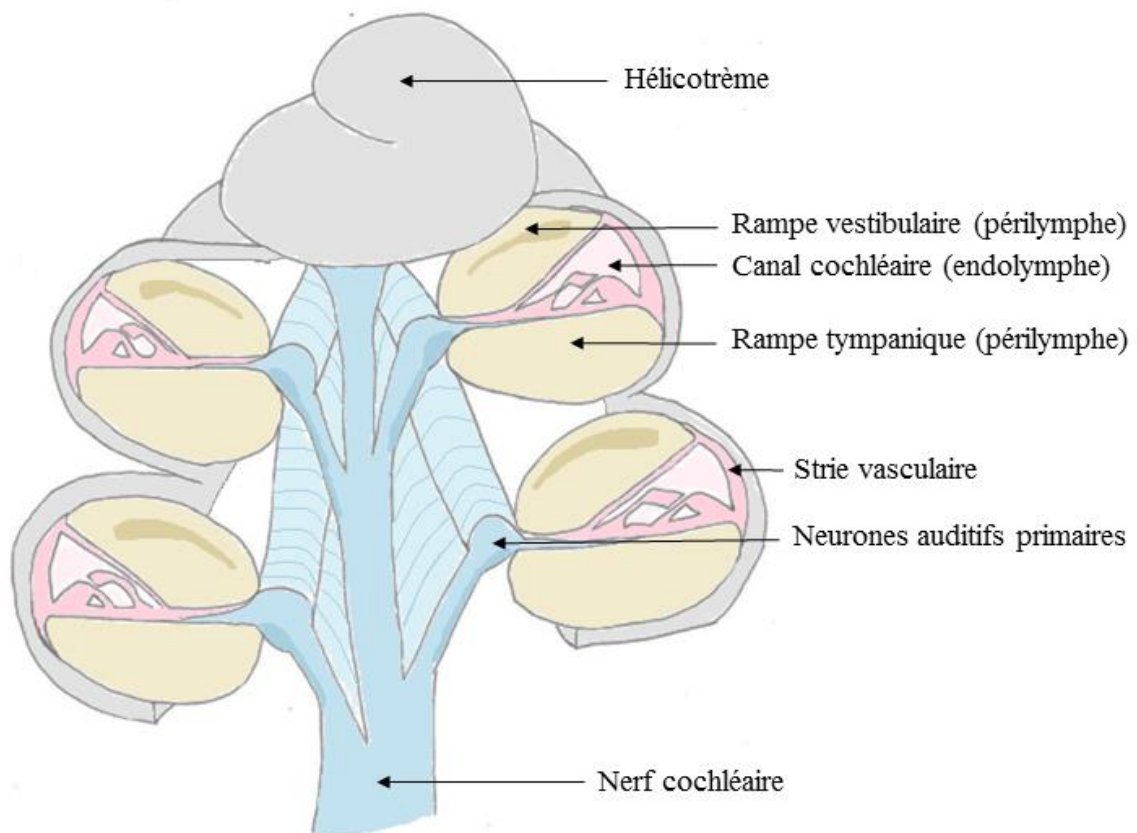
L'oreille interne est formée de deux parties distinctes : du côté postérieur, on trouve le vestibule et les canaux semi-circulaires, organe de l'équilibration, et du côté antérieur, la cochlée qui est l'organe responsable de l'audition (Figure 1.2). Les cavités de la cochlée sont connectées aux cavités du vestibule et elles sont remplies de liquide.



**Figure 1.2 :** Représentation schématique des deux organes sensoriels de l'oreille interne : le vestibule, organe de l'équilibre et la cochlée, organe de l'audition.

Le labyrinthe osseux de la cochlée s'enroule autour d'un axe osseux central, le modiolus, et il est divisé sur toute sa longueur par la lame spirale osseuse dont la largeur diminue de la base à l'apex de la cochlée. La lame spirale présente de petites perforations nommées *habenula perforata*, par lesquelles passent les fibres nerveuses, après avoir perdu leur gaine de myéline. La membrane basilaire s'insère dans cette lame spirale osseuse et sépare la rampe tympanique, contenant de la périlymphe, du canal cochléaire, contenant de l'endolymphe (Figure 1.3). Le canal cochléaire est séparé de la rampe vestibulaire, composée de périlymphe, par la membrane de Reissner. Cette membrane avasculaire est composée de deux couches de cellules (Raphael and Altschuler, 2003). Elle a un rôle dans l'équilibre ionique des fluides en pompant sélectivement certains ions via des canaux ioniques présents au pôle apical de ses cellules épithéliales.

Les deux rampes communiquent au niveau de l'apex de la cochlée par l'hélicotrème et elles se terminent à la base par deux membranes qui font face à l'oreille moyenne : la fenêtre ovale et la fenêtre ronde. La base de l'étrier agit comme un piston et crée des ondes de pression dans la cochlée. Cette pression est équilibrée par l'intermédiaire de la membrane de la fenêtre ronde qui se déplace soit vers l'oreille moyenne, soit vers l'oreille interne.



**Figure 1.3 : Représentation schématique d'une coupe de cochlée.**

Le tube cochléaire est divisé en trois compartiments : la rampe vestibulaire, la rampe tympanique et le canal cochléaire renfermant l'organe de Corti. Les corps cellulaires des neurones auditifs primaires se trouvent au niveau du ganglion spiral, les fibres nerveuses provenant des différents étages de la cochlée se rejoignent ensuite dans le modiolus pour former le nerf cochléaire.

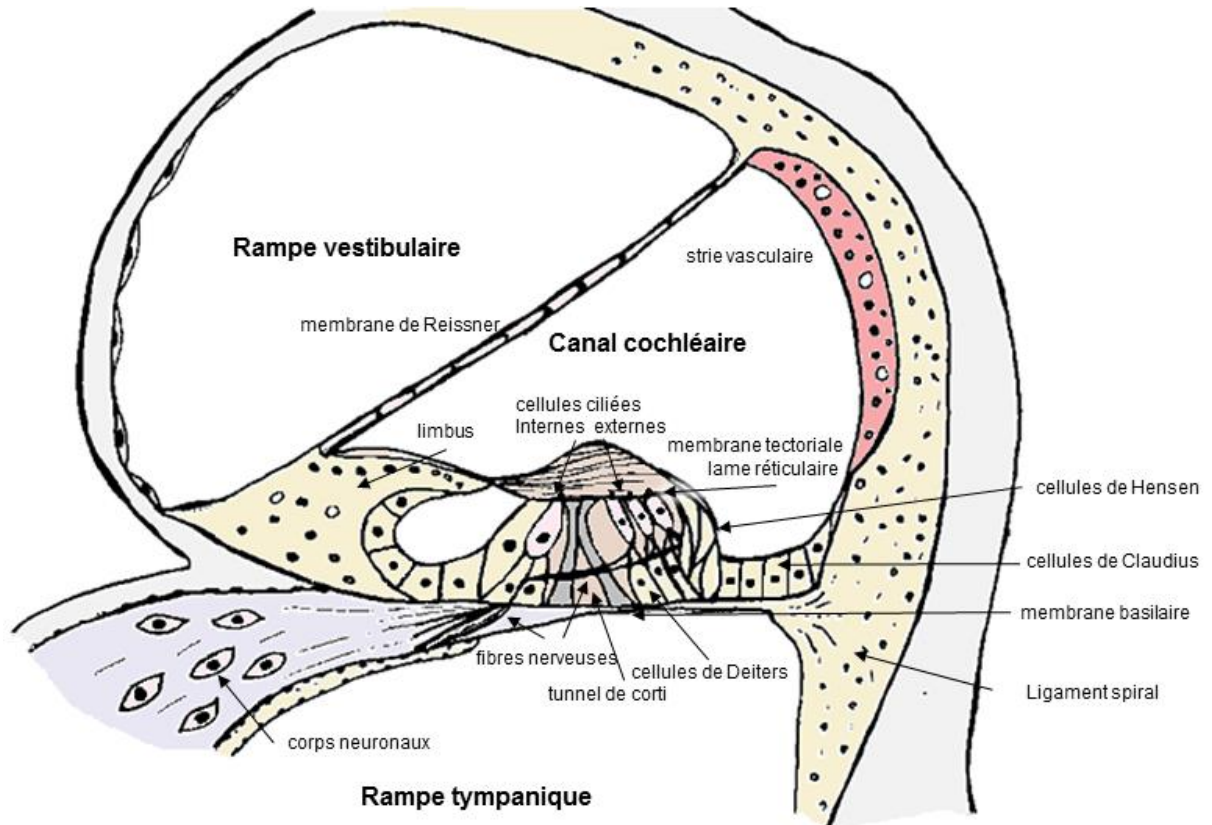
La membrane basilaire est un tissu conjonctif, sa largeur et son épaisseur varient de la base à l'apex de la cochlée (Saroul et al., 2015 ; Ruggero, 1992). Sa largeur est de 150  $\mu\text{m}$  à la base et elle atteint 450  $\mu\text{m}$  à l'apex. L'organe de Corti, composé de cellules sensorielles, repose sur cette membrane et il est recouvert par la membrane tectoriale. La membrane tectoriale est composée de tissu conjonctif acellulaire, elle recouvre les cellules ciliées et elle est rattachée au limbus spiral médialement (Ross, 1974). Sa taille varie également de la base à l'apex de la cochlée et son rôle est crucial dans la mécanique de l'organe de Corti.

La paroi externe de la cochlée est formée de la strie vasculaire, un épithélium vascularisé divisé en deux couches de cellules : l'une est formée des cellules marginales et la seconde est composée des cellules basales et intermédiaires (Takeuchi et al., 2000 ; Hinojosa et al., 1966). L'espace extracellulaire entre ces deux couches de cellules est très étroit, il est appelé espace intrastrial. Des jonctions gap, formées de connexines, connectent les différents types de cellules au ligament spiral et permettent des échanges intercellulaires d'ions (Kikuchi et al., 2000). Les cellules marginales présentent des microvillosités et ont un rôle de sécrétion/absorption, assurant ainsi les transferts ioniques entre l'endolymphe et les vaisseaux sanguins.

La strie vasculaire a un rôle central dans l'homéostasie de la cochlée, elle fait passer les ions potassium ( $\text{K}^+$ ) du sang à l'endolymphe, et les ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) de l'endolymphe au sang, malgré un gradient de concentration défavorable (Hibino and Kurachi, 2006). Ce transport actif implique différents transporteurs et échangeurs d'ions. Le potentiel endocochléaire (+ 80-100 mV chez le rongeur) dépend de la sécrétion active d'ions  $\text{K}^+$  par la strie vasculaire et de la diffusion passive des ions  $\text{K}^+$  dans les cellules ciliées. La strie vasculaire maintient ainsi une forte concentration en  $\text{K}^+$  dans le canal cochléaire, alors que sa concentration en  $\text{Na}^+$  est faible. Elle fournit ainsi l'énergie nécessaire à la mécanique de l'organe de Corti (Stöver and Diensthuber, 2011). La périlymphe a une composition proche du liquide céphalo-rachidien : elle est riche en  $\text{Na}^+$  et pauvre en  $\text{K}^+$ .

## 2.1. L'organe de Corti, siège de la perception auditive

L'organe de Corti est composé de cellules sensorielles ciliées et de cellules de soutien. Il existe deux types de cellules sensorielles : les cellules ciliées internes (CCI), disposées sur une rangée, et les cellules ciliées externes (CCE) réparties en trois rangées chez la souris, le long du canal cochléaire (Figure 1.4).



**Figure 1.4 :** Représentation schématique d'une section transversale du tube cochléaire. Le canal cochléaire renferme l'organe de Corti contenant les cellules sensorielles dont le rôle est de transformer le message sonore en message nerveux.

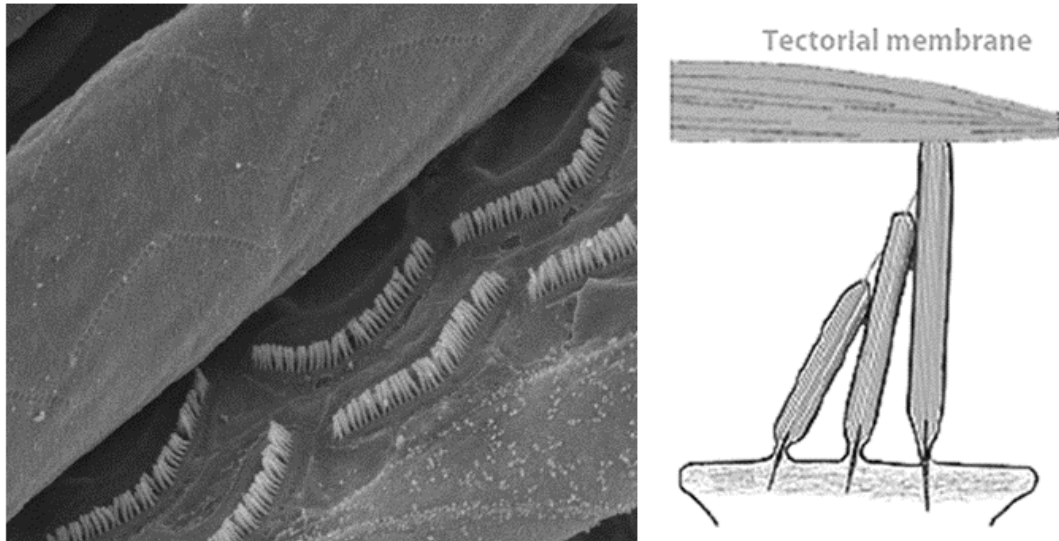
Les cellules de soutien supportent les cellules ciliées et reposent sur la membrane basilaire (Kimura, 1975). Elles sont de plusieurs types : les cellules piliers, réparties en une rangée externe et une rangée interne, délimitent à leur apex le tunnel de Corti ; les cellules de Deiters soutiennent les CCE et bornent les espaces de Nuel ; enfin, les cellules de Hensen, situées à l'extérieur des CCE, contiennent des granules lipidiques qui pourraient constituer la réserve énergétique de l'organe de Corti.

Chez les mammifères, il n'y a pas de cellules basales indifférenciées dans l'organe de Corti, ce qui est assez inhabituel pour un tissu épithélial. Ceci a pour conséquence que les cellules ciliées, une fois mortes, ne peuvent être remplacées.

## **2.2. Le rôle central de la CCE dans la sélectivité fréquentielle**

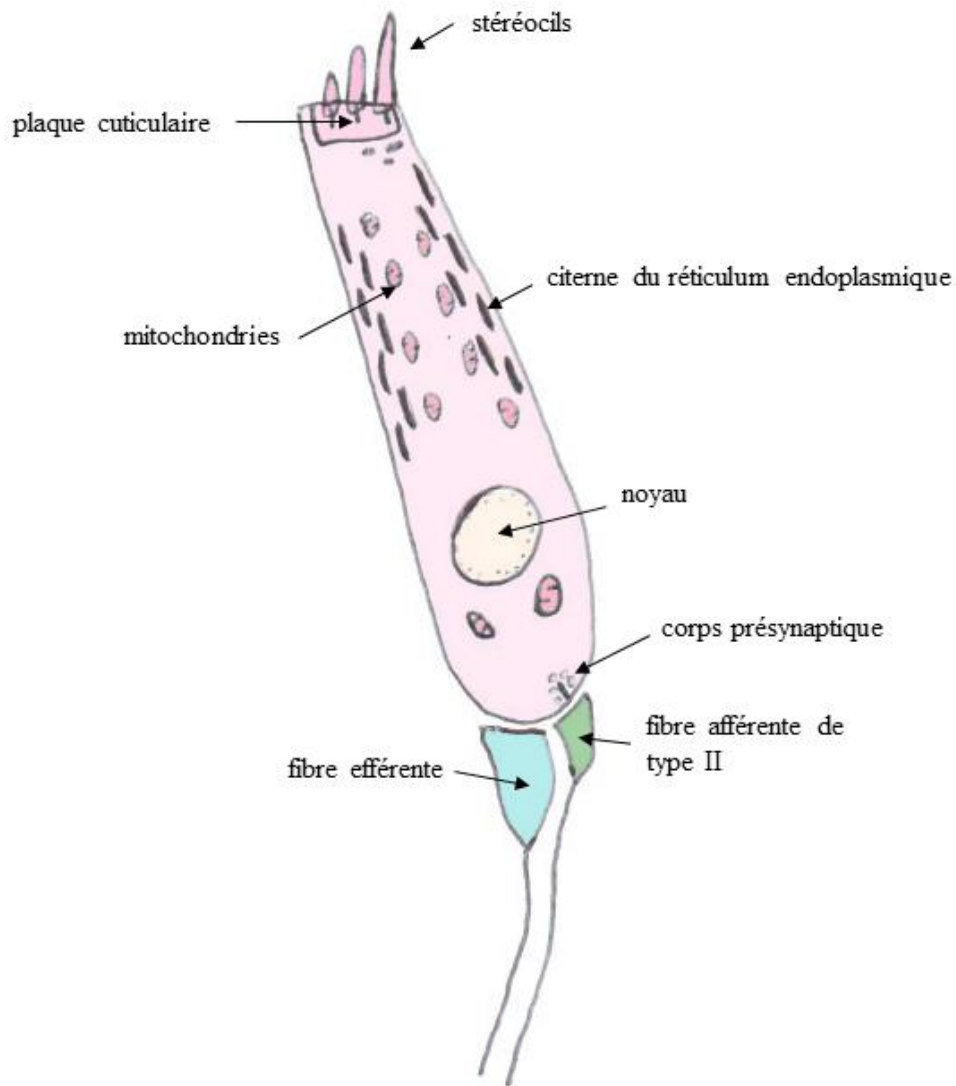
Trois rangées de stéréocils, implantés dans la plaque cuticulaire, sont disposées sur le pôle apical des CCE en forme de « W ». L'ouverture de l'angle de la touffe stéréociliaire est croissante de l'apex à la base de la cochlée. La taille des rangées de stéréocils augmente de l'intérieur vers l'extérieur de la touffe stéréociliaire. Plusieurs types de liens unissent les différents stéréocils : les liens terminaux ou « tip-links », constitués de cadhérine-23 et de protocadhérine-15, les « top connectors », les « lateral links » et les « ankle links » (Kazmierczak et al., 2007; Tsuprun and Santi, 2002).





**Figure 1.5 :** Photomicrographe montrant les empreintes laissées dans la membrane tectoriale par les stéréocils (gauche) et schéma montrant l’insertion de la rangée des plus grands stéréocils dans la membrane (droite) (photographie du laboratoire et schéma modifié d’après Richardson et al., 2011).

Les plus grands stéréocils des CCE voient leur partie apicale insérée dans la membrane tectoriale et il est possible de visualiser leur empreinte dans la partie inférieure de cette membrane (Figure 1.5). Les protéines impliquées dans cet ancrage sont l’ $\alpha$ -tectorine et la stéréociline (Verpy et al, 2011). Le cytosquelette d’un stéréocil est composé de filaments d’actine. La partie basale du stéréocil est ancrée dans la plaque cuticulaire des CCE par des racines constituées de différentes protéines contractiles : actine, myosine, tropomyosine (Figure 1.6). La paroi latérale de la CCE présente des citernes latérales et des mitochondries ainsi qu’une protéine membranaire contractile : la prestine (Zheng et al, 2000).

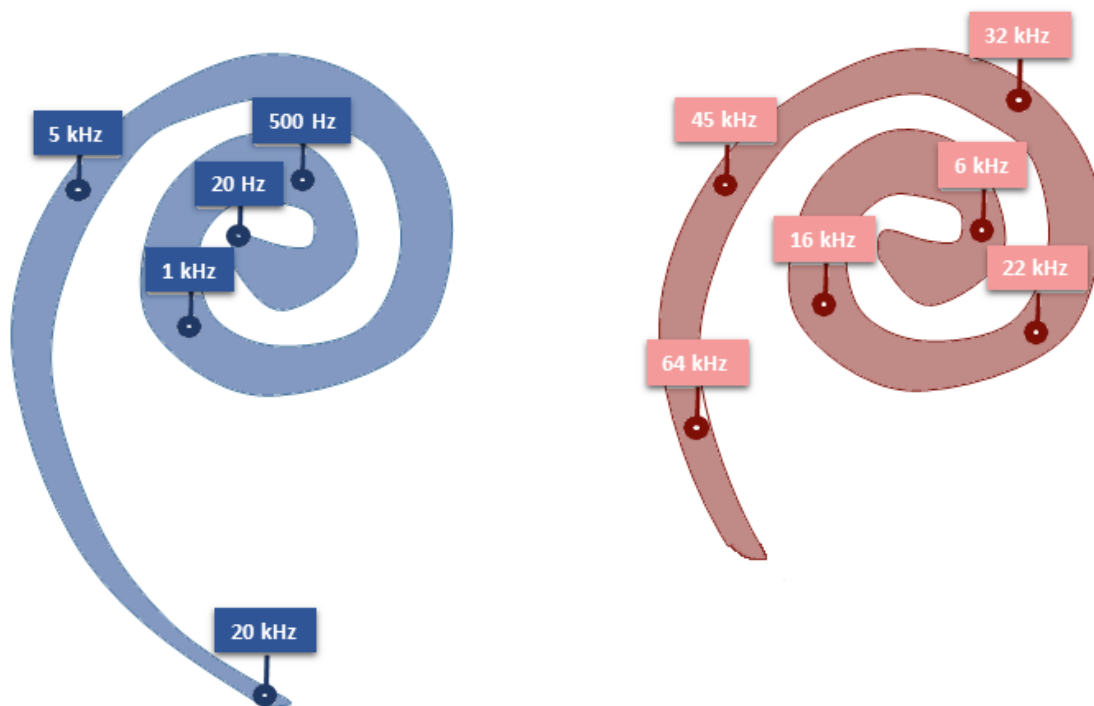


**Figure 1.6 : Représentation schématique d'une cellule ciliée externe.**

Les stéréocils sont implantés dans la plaque cuticulaire située au pôle apical de la cellule. Les citernes du réticulum endoplasmique ainsi que les mitochondries sont alignées latéralement le long de la membrane plasmique. Le noyau est en position basale, au-dessus du corps présynaptique. La CCE est connectée à deux types de fibres nerveuses : des fibres du système efférent olivocochléaire médian et des fibres afférentes de type II.

### 2.2.1. Physiologie de la CCE

Lorsqu'un son arrive au niveau de l'oreille, il va entraîner la vibration du tympan puis le mouvement des osselets. L'étrier va alors mettre en mouvement la membrane de la fenêtre ovale située à la base de la cochlée. La vibration va ensuite se propager dans les liquides cochléaires et faire vibrer la membrane basilaire grâce à ses propriétés morphologiques.



**Figure 1.7 :** Schéma comparatif des cartes fréquentielles des cochlées humaine (gauche) et murine (droite).

Le champ auditif de l'homme s'étend de 20 Hz à 20 kHz pour un tube cochléaire de 35 mm (2,5 tours de spire) tandis que celui de la souris est compris entre 5 kHz à 70 kHz et son tube cochléaire est long de 6 mm (2 tours de spire).

La membrane basilaire présente une sélectivité fréquentielle originale. Elle va vibrer au niveau de la base de la cochlée pour les sons de hautes fréquences et au niveau de l'apex pour les sons de basses fréquences (Figure 1.7) : c'est la notion de tonotopie dans la cochlée (Von Békésy, 1955). Cette vibration entraîne une inclinaison des stéréocils ce qui va provoquer une contraction des CCE conduisant à un mouvement amplifié de la membrane basilaire.

Le pôle apical des cellules ciliées baigne dans l'endolymphe riche en potassium. Lorsque les CCE entrent en mouvement, leurs stéréocils sont déviés vers la rangée la plus externe, les « tip-links » vont alors être stimulés et provoquer l'ouverture d'un canal à transduction mécano-électrique auquel ils sont reliés (Richardson et al., 2011 ; Hudspeth, 1995 ; Pickles and Corey, 1992). Ce canal appartient à la famille des Transient Receptor Potential (TRP). Le K<sup>+</sup> se trouvant dans l'endolymphe va entrer passivement, du fait de la surcharge potassique de l'endolymphe, et la CCE va être dépolarisée (Dulon et al., 1988). Lorsque les stéréocils sont déviés dans l'autre sens, les canaux sont fermés et il y a hyperpolarisation des CCE. La sortie des ions K<sup>+</sup> se fait également de manière passive, car la concentration en potassium, à l'intérieur de la cellule, est plus importante qu'à l'extérieur de son corps cellulaire qui lui, baigne dans la périlymphe.

La dépolarisation au niveau des CCE va conduire à la contraction de la protéine de prestine et induire une modification de la longueur (raccourcissement) de la taille des CCE (Zheng et al., 2000). Les CCE jouent donc le rôle d'oscillateurs qui amplifient localement la vibration de la membrane basilaire (Ashmore, 2008 ; Dallos, 2008 ; Brownell et al., 1985 ;). Cette propriété des CCE augmente la sensibilité de la cochlée et améliore sa sélectivité fréquentielle, c'est-à-dire sa capacité à discriminer de manière différentielle des fréquences très proches.

### 2.2.2. Evaluation fonctionnelle des CCE

Les otoémissions acoustiques (OEA) sont des émissions sonores de la cochlée et constituent un indicateur de l'intégrité et de l'électromotilité des CCE. Les stéréocils de ces cellules sont le siège de la distorsion acoustique (Verpy et al, 2008). Les OEA se propagent par voie rétrograde en direction du conduit auditif externe où il est possible de les enregistrer avec un microphone (Kemp, 1978). Si les CCE disparaissent ou subissent des altérations, les OEA seront absentes ou d'amplitudes réduites.

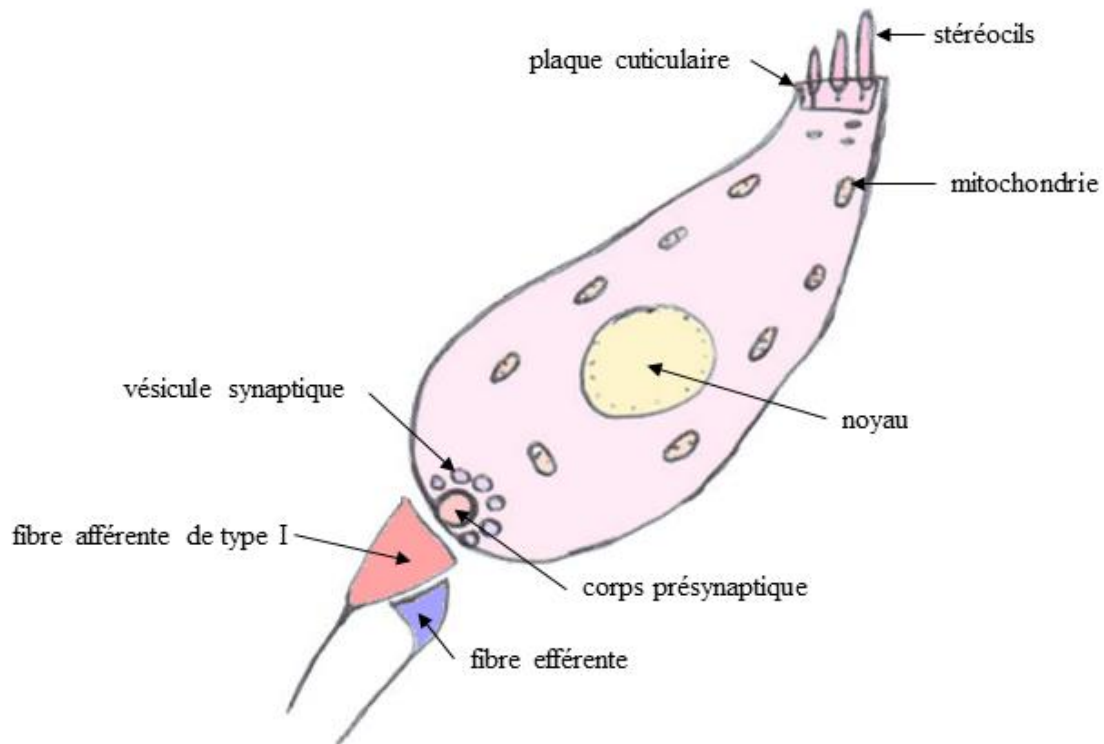
Il existe différentes catégories d'OEA : les otoémissions acoustiques spontanées (OEAS), générées en l'absence de stimulation, et les otoémissions acoustiques provoquées (OEAP), générées en réponse à une stimulation acoustique brève contenant un large spectre de fréquences : le click. La mesure des OEAP constitue un test objectif rapide et non invasif spécifique de la fonctionnalité des CCE. Ce test est notamment utilisé pour l'exploration fonctionnelle en ORL, dans le dépistage de surdité cochléaire chez le nouveau-né.

Les produits de distorsions acoustiques (PDA) constituent une autre sous-catégorie d'OEA (Avan et al., 2013 ; Kemp and Brown, 1984). Il est possible de les mesurer à l'aide d'une sonde (composée d'un microphone et de deux haut-parleurs) placée dans l'oreille d'un humain ou d'un animal. Deux sons de fréquences données  $f_1$  et  $f_2$  proches (conventionnellement,  $f_2/f_1=1, 20$ ) et de niveaux  $L_1$  et  $L_2$  (soit égaux, soit légèrement asymétriques avec  $L_1 > L_2$ ) sont émis dans le conduit auditif externe. Ils vont stimuler les CCE d'une zone précise de la cochlée dévolue au codage de ces mêmes fréquences. Ainsi stimulées, les CCE vont se contracter et conduire à la mise en mouvement de la membrane basilaire, des liquides cochléaires, de la chaîne ossiculaire et du tympan. Le tympan va alors vibrer et émettre un son avec une signature particulière : le produit de distorsion. Toutes les zones de la cochlée peuvent être stimulées en faisant varier les fréquences des sons  $f_1$  et  $f_2$ .

Les résultats peuvent être présentés sous la forme d'une courbe « dose-réponse », avec l'amplitude des PDA en fonction de l'intensité du son de fréquence  $f_2$ , ou sous la forme d'un PDA-gramme, avec l'amplitude des PDA en fonction de la fréquence  $f_2$ . En dehors de toute atteinte de l'oreille moyenne, l'absence de PDA est associée à une élévation du seuil auditif avec une perte auditive minimale de 50 dB.

### **2.3. La CCI, point de départ du message auditif nerveux**

Les mouvements de la membrane tectoriale et des stéréocils des CCE provoquent des courants liquidiens, ce qui va entraîner le déplacement des stéréocils des CCI. En conséquence, les ions  $K^+$  présents dans l'endolymphe vont entrer dans la cellule et entraîner sa dépolarisation. Les canaux calciques, sensibles au potentiel, situés à la base de la CCI vont s'ouvrir et provoquer l'entrée du calcium ( $Ca^{2+}$ ) au voisinage des corps présynaptiques ou « rubans » (Rutherford and Pangršič, 2012; Brandt et al., 2003; Beutner et al., 2001) (Figure 1.8). Le calcium va se fixer sur les domaines C2 de la protéine otoferline localisée sur les vésicules synaptiques, ce qui va entraîner leur fusion avec la membrane plasmique (Beurg et al. ; 2008 ; Roux et al., 2006). Les CCI vont alors libérer un neurotransmetteur : le glutamate, qui va activer les récepteurs à l' $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate (AMPA) du complexe post-synaptique (Glowatzki and Fuchs, 2002; Puel, 1995). Un potentiel d'action va alors se former au niveau des fibres afférentes et va se propager vers les noyaux cochléaires. Chaque CCI est reliée à une dizaine de complexes synaptiques, chacun étant composé d'une terminaison du système afférent et d'une terminaison du système efférent latéral.



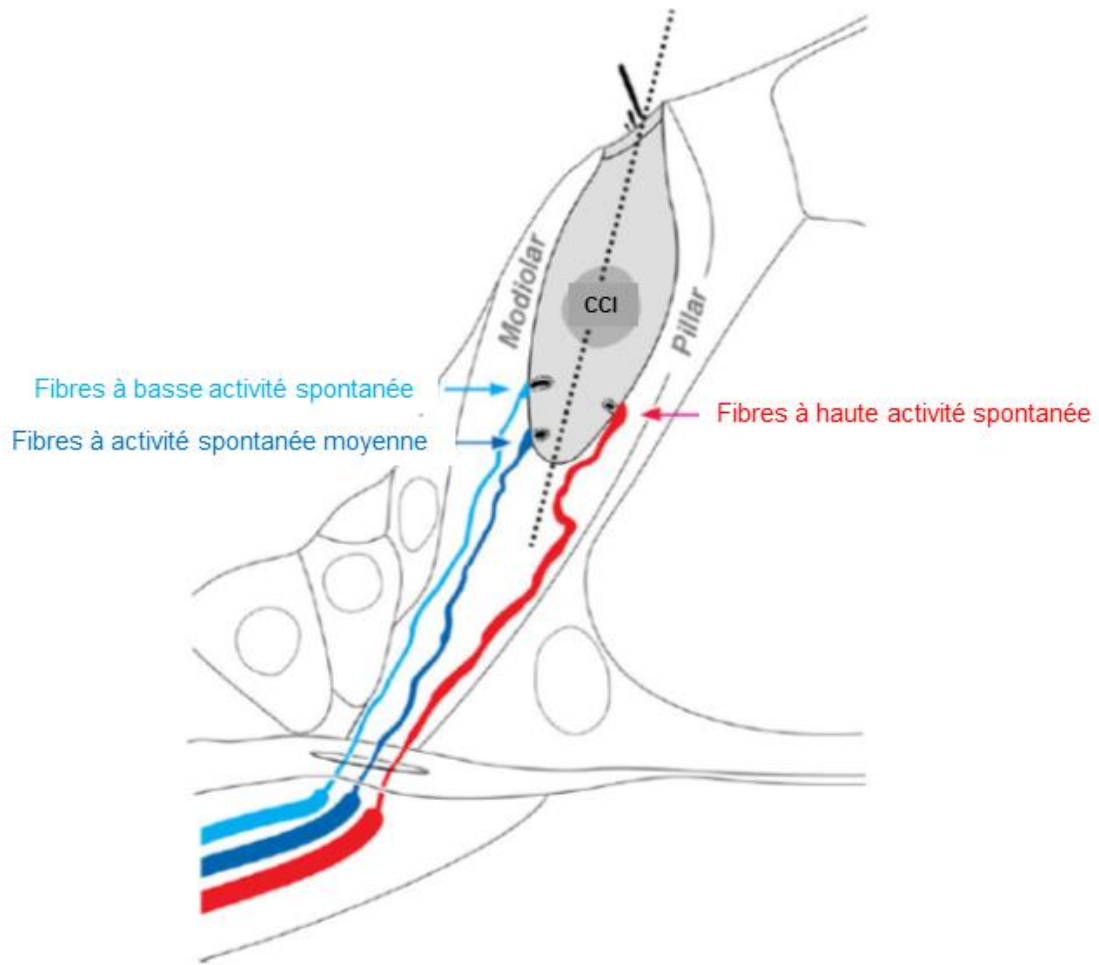
**Figure 1.8 : Représentation schématique d'une cellule ciliée interne.**

Comme pour la CCE, les stéréocils sont implantés dans la plaque cuticulaire au pôle apical de la cellule. La CCI présente un noyau en position centrale, sa base est constituée d'un corps présynaptique entouré de vésicules contenant le neurotransmetteur. Le complexe synaptique sous la CCI se compose d'une synapse afférente et d'une synapse efférente.

La CCI assure la transduction de la vibration sonore en signal électrique et le transfert de l'information par la libération de neurotransmetteur vers les neurones auditifs primaires. Le codage en fréquence pour les sons de fréquences inférieures à 3 kHz se fait par le verrouillage en phase (Goutman, 2012). Chaque dépolarisation de la CCI entraîne une libération de glutamate puis une émission de potentiels d'action en synchronisation avec la fréquence de la stimulation (Russell and Sellick, 1983). Au-dessus de 3 kHz, les fibres ne répondent plus en phase avec la fréquence du son, le codage se fait alors en accord avec la tonotopie cochléaire. L'intensité du son est codée par le niveau d'activité des fibres auditives (émission des potentiels d'action) qui augmente avec la force du son.

La CCI est connectée à différentes populations de fibres afférentes (Merchan-Perez and Liberman, 1996; Liberman, 1980). On distingue : les fibres à bas seuil et activité spontanée élevée, qui entrent en jeu pour des intensités faibles, mais saturent rapidement ; les fibres à seuil moyen et activité spontanée moyenne qui prennent le relais des fibres à bas seuil lorsque l'intensité du son est intermédiaire ; enfin les fibres à haut seuil et activité spontanée faible agissent pour de hautes intensités. Le recrutement progressif de ces trois populations de fibres permet une dynamique cochléaire étendue d'environ 100 dB du seuil de la perception au seuil de la douleur. Les fibres à bas seuil et à haute activité spontanée ont des densités post-synaptiques étendues et sont connectées à des rubans synaptiques compacts de petite taille, c'est l'inverse pour les fibres de haut seuil (Figure 1.9). L'amplitude de l'influx calcique serait corrélée à l'activité spontanée des fibres.





**Figure 1.9 :** Schéma de l'innervation des CCI par les projections terminales du nerf cochléaire.

Il existe une séparation spatiale entre les différents types de fibres afférentes. Les fibres à hautes activités spontanées, de gros diamètres, se situent du côté des piliers. Les fibres à basse et moyenne activité spontanée, de petit diamètre, se situent du côté du modiolus (schéma modifié d'après Bharadwaj et al., 2014).

### **3. Le nerf cochléaire**

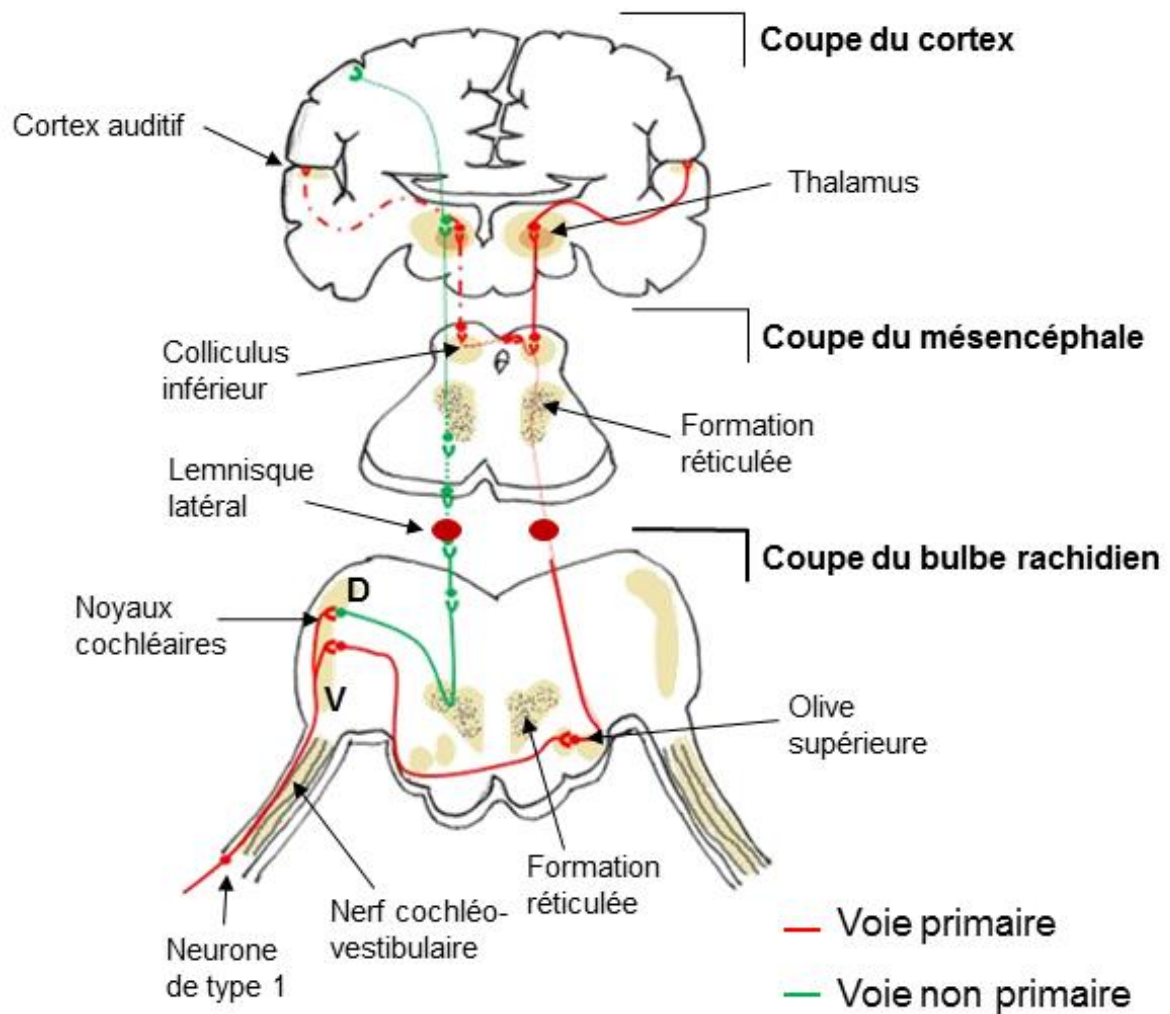
#### **3.1. Le système afférent**

##### **3.1.1 La transmission du message auditif nerveux de la cochlée au tronc cérébral**

Le nerf cochléaire conduit le signal auditif transmis par les cellules ciliées internes par des fibres myélinisées de type I de grande taille (12 à 20  $\mu\text{m}$ ), elles représentent environ 95 % des neurones du nerf auditif (Biacabe et al., 1999). Chaque neurone cochléaire est en contact avec une CCI (environ 10 connexions par cellule ciliée) et a son corps cellulaire dans le ganglion spiral situé sous la lame spirale (Liberman et al., 1982). Le ganglion spiral contient également 5 à 10 % de cellules non myélinisées de type II de petite taille (8 à 12  $\mu\text{m}$ ) (Spendlin, 1972). Ces neurones innervent chacun une dizaine de CCE, en général, de la même rangée, avec pour rôle d'informer les centres supérieurs de l'état de leur contraction. Les axones des neurones auditifs afférents des différents étages de la cochlée se rejoignent au niveau du modiulus pour former le nerf cochléaire.

Le nerf cochléaire se projette vers les noyaux cochléaires, premiers relais de la voie auditive ascendante (Figure 1.10). Une première partie du traitement du signal est effectuée à cette étape, en termes de durée, d'intensité et de fréquence.

Au niveau des noyaux cochléaires, quelques fibres rejoignent la voie non primaire. Cette voie ascendante polysensorielle effectue plusieurs relais au niveau des formations réticulées du tronc cérébral et du mésencéphale avant de se projeter sur le cortex polysensoriel. Elle a pour fonction de trier les informations provenant des différents sens et intervient dans l'éveil et la motivation.



**Figure 1.10 : Représentation schématique des voies auditives primaire et non primaire.**

La voie primaire contient 3 à 4 relais, elle est rapide grâce à ses grosses fibres myélinisées et aboutit au cortex auditif primaire. L'information est véhiculée depuis la cochlée et est décodée et interprétée à chaque relais. La voie non primaire regroupe différents messages sensoriels et se projette en direction du cortex polysensoriel.

Le deuxième relais majeur situé dans le tronc cérébral est le complexe olivaire supérieur (COS) (Simon et al., 2009). Le COS est une structure complexe, composée de plusieurs noyaux. Son rôle est central dans l'analyse fine du message auditif et dans la protection du système auditif, notamment grâce à la mise en place de réflexes (voir partie III.2 sur le système efférent). Il intervient également dans la localisation spatiale des sons (Irving et al., 2011). Parmi les différentes structures du COS, on distingue le noyau du corps trapézoïde, dont l'organisation est tonotopique. Ses fibres se projettent vers les noyaux moteurs du tronc cérébral, participant

au réflexe de sursaut. Ce dernier a également un rôle dans l'adaptation des CCE avec le noyau médial du COS.

Les noyaux du lemnisque latéral constituent le troisième relais de la voie auditive, ils ont pour fonction l'analyse des sons complexes, ce qui participe à la compréhension du langage chez l'homme.

Les afférences auditives se projettent ensuite sur le colliculus inférieur qui intervient dans la localisation des sons dans l'espace, la représentation spatiale auditive et visuelle et la sélectivité tonale. Il est impliqué dans l'identification et l'analyse fréquentielle des sons.

Les afférences provenant du colliculus inférieur parviennent au corps genouillé médian, une aire polysensorielle recevant à la fois des afférences auditives, vestibulaires, visuelles et somesthésique. Il intervient dans la décomposition fréquentielle des sons. Enfin, le message auditif arrive au niveau des aires primaires, secondaires et associatives du cortex auditif.

### **3.1.2. Evaluation objective et électrophysiologique du système afférent**

#### *a. L'électrocochléographie*

L'électrocochléographie (EcoG) est une technique d'enregistrement des potentiels cochléaires. L'électrocochléogramme, correspondant au potentiel cochléaire composite, peut être mesuré à l'aide d'une électrode placée dans le conduit auditif externe ou avec une électrode transtympanique s'appuyant sur le promontoire de la cochlée (Sohmer and Feinmesser, 1967).

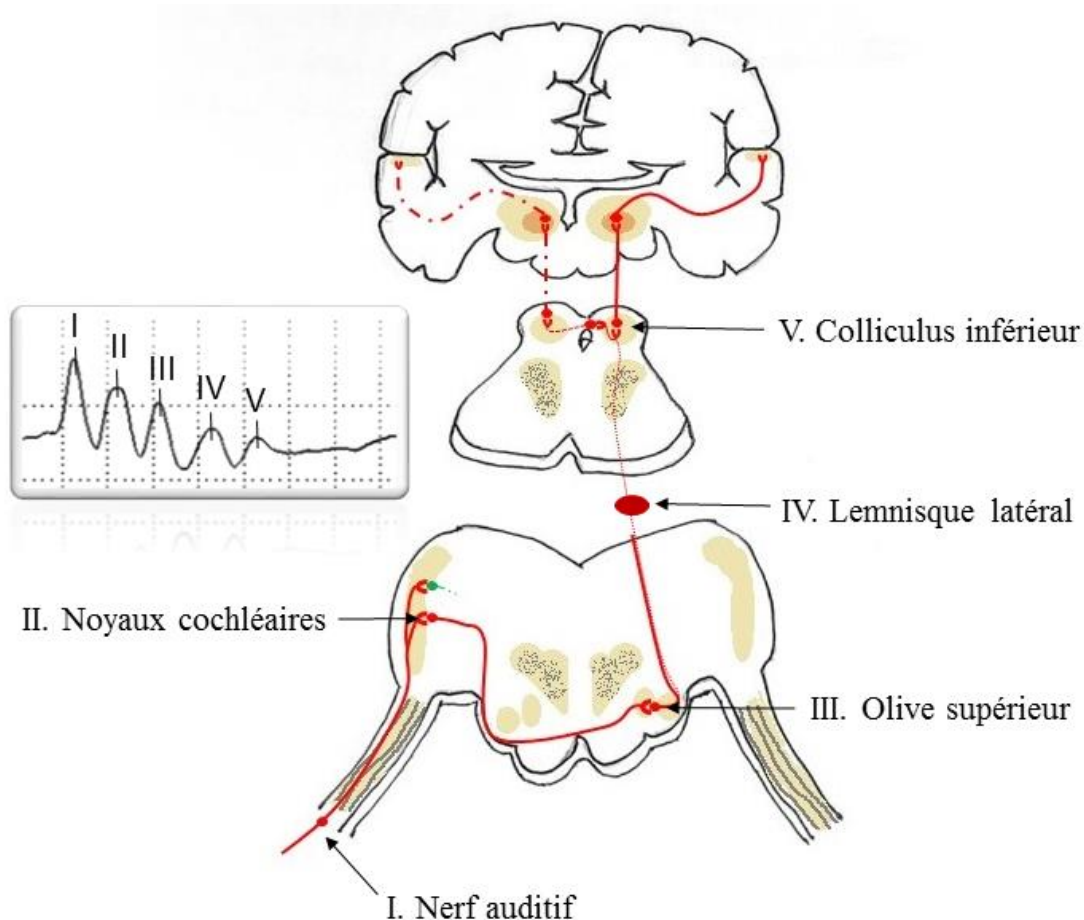
Le potentiel cochléaire composite reflète l'activité synchrone de l'ensemble des fibres nerveuses du nerf auditif et l'activité électrique des cellules sensorielles au niveau de la cochlée (Bourien et al., 2014). Il est composé de potentiels de natures différentes pouvant être isolés grâce à différents filtres : le potentiel d'action composite (PAC), le potentiel de sommation (SP) et le potentiel microphonique (PMC). À l'aide d'un filtre passe-bas, il est possible d'isoler le SP, qui reflète le potentiel de récepteur des cellules ciliées internes ainsi que le PAC avec ses deux ondes N1 et P1, représentant l'activité du nerf auditif. Au contraire, avec un filtre passe-haut, on peut mettre en évidence le potentiel microphonique qui reflète le potentiel de récepteur des CCE.

#### *b. La mesure des potentiels évoqués auditifs précoces (PEAp)*

La mesure des potentiels évoqués auditifs précoces (PEAp) est utilisée pour déterminer les seuils d'audition chez les humains et chez les animaux. L'étude de la morphologie (latence, amplitude) des ondes des PEA<sub>p</sub> peut également être utile dans le diagnostic de pathologies auditives et neurologiques. Les PEA<sub>p</sub> sont le reflet des activités cochléaires et des voies nerveuses auditives périphériques jusqu'au tronc cérébral (Jewett et al., 1970). Ils sont composés de cinq ondes, numérotées en chiffres romains de I à V, reflétant les différents relais générateurs ou synaptiques (Figure 1.11).

Pour obtenir les PEAp, un son est envoyé par un écouteur placé dans une oreille et les réponses électrophysiologiques, survenant entre 1 et 10 ms après la stimulation, sont recueillies grâce à des électrodes placées au contact de la peau.

En clinique, à l'aide de stimulations acoustiques brèves (les clicks, non spécifiques en fréquence), les PEAp sont utilisés pour évaluer la synchronie du nerf auditif, la conduction de la voie nerveuse et la détermination d'un seuil d'audition. Expérimentalement, il est aussi possible d'établir un audiogramme objectif chez l'animal. Pour cela, les stimulations acoustiques utilisées sont des bouffées tonales (tone burst) avec un contenu fréquentiel (typiquement chez la souris de 5 à 32 kHz) et dont l'intensité sonore est progressivement atténuée. Pour chaque fréquence, un seuil d'intensité au-delà duquel les ondes des PEAp ne sont plus détectées est déterminé.



**Figure 1.11 : Représentation schématique des voies auditives avec les sites anatomiques associés aux cinq ondes des PEAp.**

L'onde I correspond au point de départ du nerf auditif dans la cochlée, l'onde II aux noyaux cochléaires, l'onde III à l'olive supérieur, l'onde IV au lemnisque latéral et l'onde V au colliculus inférieur.

## **3.2. Le système efférent**

### **3.2.1. Le système olivocochléaire médian**

Le système efférent olivocochléaire médian (SEOCM) provient de la partie médiane du complexe olivaire supérieur, 30 % de ses fibres myélinisées innervent la cochlée ipsilatérale et 70 % innervent la cochlée controlatérale en croisant la ligne médiane (Figure 1.12). La densité de l'innervation efférente est plus importante au niveau de la base de la cochlée et elle décroît en direction de l'apex (Liberman et al., 1990). De plus, il apparaît que la quantité de terminaisons efférentes est décroissante du premier au troisième rang de CCE.

Les fibres efférentes se projettent bilatéralement sur les CCE par une synapse cholinergique et agissent sur leurs propriétés électromotiles (Rabbitt and Brownell ; 2011). Pour des stimulations acoustiques d'intensités modérées à fortes, le rétrocontrôle efférent réduit l'amplification normalement effectuée par les CCE (Guinan, 2006).

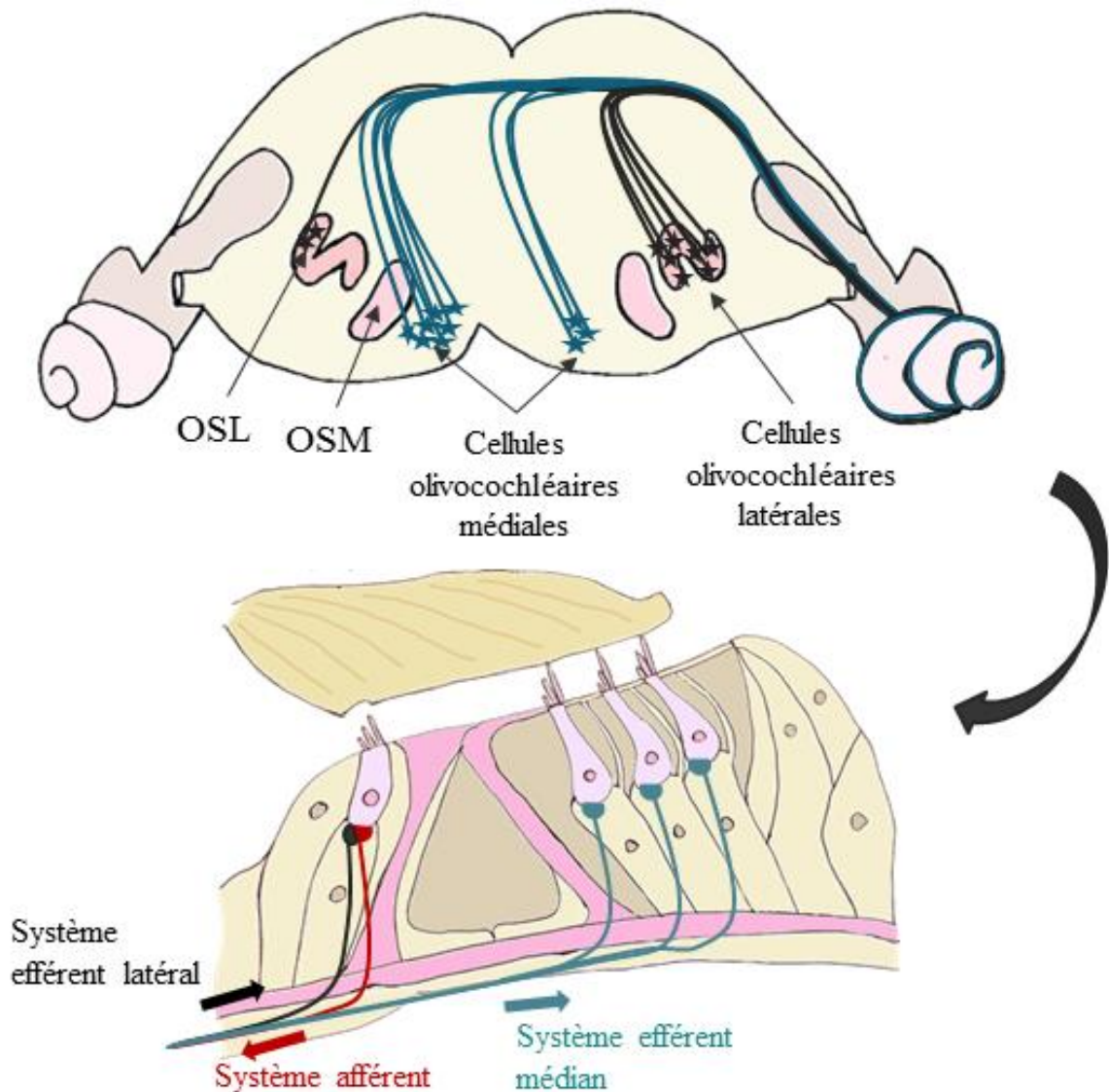
Lorsque les fibres du SEOCM sont stimulées électriquement, une diminution rapide de la sensibilité cochléaire est observée. Le SEOCM a donc un rôle dans l'attention auditive, en focalisant l'oreille sur une zone de fréquence d'intérêt, ce qui permet de réduire l'effet de masquage d'un fond sonore bruyant (Guinan, 2014). De plus, ce mécanisme pourrait intervenir dans la protection de l'oreille (Fuente, 2015). En effet, il a été montré qu'une dé-efférentation chirurgicale accélérât la perte des synapses du nerf cochléaire chez des souris qui n'avaient pas été surexposées acoustiquement (Liberman et al., 2014).

### **3.2.2. Le système olivocochléaire latéral**

Le système efférent olivocochléaire latéral (SEOCL) provient de la partie latérale du COS, ses fibres non myélinisées se projettent sur les synapses situées entre les CCI et les fibres



afférentes du nerf cochléaire (Figure 1.12). Elles sont impliquées dans l'excitation ou l'inhibition de la transmission. Lorsque les fibres du SEOCL sont stimulées électriquement, un changement de l'excitabilité neurale cochléaire est observé, ce qui a un rôle dans l'ajustement de l'équilibre binaural et dans la précision de la localisation des sons (Darrow et al., 2006).



**Figure 1.12 :** Représentation schématique des voies efférentes auditives médianes et latérales.

OSL : Olive Supérieure Latérale ; OSM : Olive Supérieure Médiane. Le système efférent latéral provient de neurones de l'olive supérieure homolatérale et exerce un rétrocontrôle sur la synapse de la fibre afférente au niveau de la CCI. Le système efférent médian est issu de neurones bilatéraux de l'OSM et se projette sur les CCE afin de moduler leur activité.

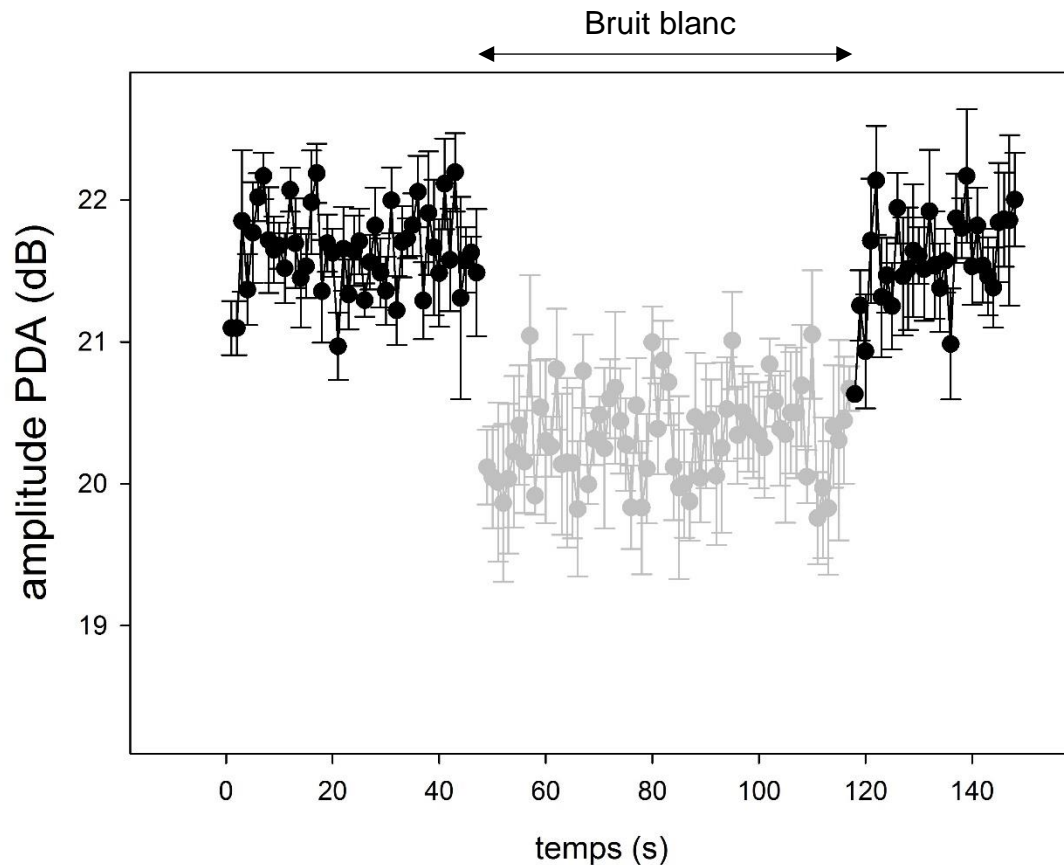
### **3.2.3. Neurotransmetteurs du système efférent**

Le neurotransmetteur principal des synapses efférentes latérales et médianes est l'acétylcholine (ACh) (Maison et al., 2003). La choline acétyltransférase (ChAT) est l'enzyme qui synthétise l'acétylcholine à partir de la choline. Ce marqueur est utilisé pour mettre en évidence l'existence de synapses cholinergiques en microscopie optique, électronique et fluorescente.

D'autres vésicules du bouton présynaptique des fibres efférentes contiennent un neuropeptide : le calcitonin gene-related peptide (CGRP). Certaines microvésicules renferment également de l'acide  $\gamma$ -amino-butérique (GABA) principalement au niveau de l'apex de la cochlée.

### **3.2.4. Evaluation fonctionnelle du système efférent**

La fonctionnalité du SEOCM peut être évaluée de façon non invasive par le test de suppression controlatérale des otoémissions. Environ un tiers des fibres du SEOCM de chaque oreille répond mieux aux sons dans l'oreille opposée. Quand elles sont activées, ces fibres suppriment la contribution des CCE à l'amplification cochléaire, diminuant ainsi le niveau des otoémissions ipsilatérales (Figure 1.13) (Kujawa and Liberman, 2001).



**Figure 1.13 :** Graphique montrant l'amplitude des PDA d'une souris en réponse à l'envoi de deux sons de fréquences  $f_1$  et  $f_2$  (avec  $f_2=16$  kHz et  $L_1=L_2=52$  dB) au cours du temps. Un bruit blanc d'une intensité de 73 dB SPL est envoyé dans l'oreille controlatérale à 50 secondes, provoquant l'activation du système efférent olivocochléaire médian qui va moduler l'activité des CCE, provoquant une diminution du signal. Lorsqu'il n'y a plus de bruit blanc, à 120 secondes, le signal revient à sa ligne de base.

Il est difficile d'interpréter le test de suppression controlatéral, car la stimulation controlatérale peut aussi activer les réflexes des muscles de l'oreille moyenne, particulièrement celui du muscle stapédien qui réduit la transmission du son et atténue la réponse de la cochlée (Goodman and Keefe, 2006; Bassim et al., 2003). Chez l'animal, une des difficultés rencontrées est que la profondeur de l'anesthésie agit sur la force du réflexe des muscles de l'oreille moyenne ainsi que sur le réflexe du SEO CM. Chez la souris, il est possible de réaliser ce test sur animal éveillé, l'atténuation du niveau des otoémissions en réponse au bruit controlatéral est alors directement liée au réflexe du SEO CM (Chambers et al., 2012).

Chez l'animal anesthésié, la contribution du SEOCM dépend des paramètres du stimulus, quand le stimulus ipsilatéral est de forte intensité (70-80 dB SPL), la suppression controlatérale est majoritairement due au SEOCM alors qu'à basse intensité (25-35 dB SPL), la suppression controlatérale est due aux réflexes des muscles de l'oreille moyenne (Maison et al., 2012).



## **Objectif général de la thèse**

Depuis quelques années, un nouveau concept de pathologies auditives a fait son apparition dans le monde de la recherche sur l'audition et fait l'objet de nombreuses publications scientifiques. Ces nouvelles déficiences auditives sont définies par un audiogramme normal associé à des troubles supraliminaires, elles sont connues sous le terme de « surdité cachée » ou « hidden hearing loss » en anglais. Ce terme regroupe en réalité diff erents types d'atteintes auditives p riph eriques, pouvant toucher les cellules ciliées internes, les synapses ou certaines fibres aff erentes.

Mon projet de thèse, qui s'inscrit dans ce contexte, a pour objectif de mieux caractériser deux types de déficiences cachées : l'une liée à des altérations des cellules ciliées externes, et l'autre liée à une atteinte du nerf auditif, chez deux modèles murins. Les « surdités cachées » ont beaucoup été étudiées chez l'animal, pour diff erentes raisons parmi lesquelles, la possibilité d'associer un profil fonctionnel à un profil histologique. L'évaluation de troubles auditifs, chez des modèles animaux pr sentrant un système auditif proche de celui de l'homme, comme la souris, permet de développer des outils de diagnostic pouvant être utilisés par la suite en clinique. Cette étape reste indispensable dans le processus de recherche scientifique et a permis de nombreux progrès dans le domaine médical.

L'ensemble de mon travail de thèse s'est articulé en deux parties. La première partie de mon travail de thèse a porté sur la caractérisation de l'installation de la surdité liée à l'âge chez un modèle animal de dégénérescence rapide des cellules ciliées externes, la souris CD1. Dans cette étude, nous avons montré, chez certains animaux, qu'il existe une fenêtre temporelle avant la

survenue de la surdité liée à l'âge, où malgré des seuils auditifs subnormaux, une atteinte des cellules ciliées externes de la base de la cochlée est présente.

La deuxième partie de ma thèse traite de l'étude d'une atteinte cachée du nerf auditif chez un modèle de souris. Dans cette étude, les souris ont reçu des injections d'oxaliplatine, un sel de platine utilisé dans le cadre du traitement du cancer colorectal et connu pour entraîner le développement de neuropathies périphériques. Lors de la première phase de traitement avec cette drogue, les seuils auditifs et la fonction des cellules ciliées externes étaient préservés, illustrant une absence d'ototoxicité. Cependant, une neurotoxicité de l'oxaliplatine a été mise en évidence par une approche histologique et des tests électrophysiologiques.

## **Chapitre 2 : Surdité cachée, atteinte des CCE et désorganisation cochl otopique**

### **1. Introduction**

L'audiométrie tonale est le test standard utilisé en clinique pour évaluer l'audition. Cet examen, réalisé pour les principales fréquences du spectre auditif humain, permet de détecter une éventuelle perte auditive. Une classification des surdités (BIAP - Bureau International d'AudioPhonologie), allant d'une d ficiency légère avec une perte située entre 20 et 40 dB à une d ficiency totale lorsque la perte est  $\geq 120$  dB, permet de rendre compte de la sévérité de l'atteinte. En fonction des résultats, les patients peuvent être orientés vers un audioprothésiste pour un appareillage adéquat.

Toutefois, certaines atteintes auditives ne peuvent être détectées par une simple audiométrie tonale. Les neuropathies auditives, par exemple, regroupant des troubles auditifs associés à une fonction présynaptique cochléaire préservée, sont détectées par la présence de PEAp anormaux, indicatifs d'un dysfonctionnement neural (Moser and Starr, 2016; Zeng et al., 2005; Starr et al., 1996).

De plus, des études récentes chez l'animal montrent que l'audiogramme, mesuré par les PEAp, donne en réalité une information incomplète sur la d ficiency auditive lorsqu'elle est liée à des atteintes subtiles du système auditif. En effet, suite à une surexposition acoustique suivie d'une phase de récupération, des seuils auditifs normaux sont associés à une synaptopathie et à une perte d'une catégorie de fibres du nerf auditif (voir Chapitre III) (Kujawa and Liberman, 2009; Liberman and Kujawa, 2017; Oxenham, 2016). Chez l'humain, les conséquences d'une telle atteinte cochléaire, connue sous le terme de « surdité cachée » (hidden hearing loss), n'ont pas encore été investiguées. Cependant, il a été suggéré qu'elle pourrait



contribuer à des troubles de perception supraliminaires, comme des difficultés de compréhension de la parole dans le bruit (Lieberman et al., 2016).

Indépendamment de ces déficiences auditives cachées dues à des altérations du nerf auditif, de récents travaux ont révélé une implication de la fonction des CCE dans les performances supraliminaires (Hoben et al., 2017 ; Léger et al., 2012).

## **1.1. Atteinte des cellules ciliées externes et troubles d'intelligibilité dans le bruit**

### **1.1.1. Déficiences cachées liées à une perte de fonction des CCE chez l'humain**

Des travaux ont montré que des pertes auditives minimales ( $\leq 30$  dB) dans la région des basses et des moyennes fréquences avaient des effets délétères sur la perception de la parole. Ce déficit résulterait de déficiences auditives supraliminaires causées par une atteinte des CCE et par des facteurs associés à l'âge (Léger et al., 2012). Une autre étude a également associé une mauvaise fonctionnalité des CCE, évaluée par la mesure des PDA, à des seuils audiométriques sub-normaux (Hoben et al., 2017). Ce profil était associé à de mauvaises performances aux tests de compréhension de la parole dans le bruit. Ces études suggèrent que des atteintes de la fonctionnalité des CCE pourraient contribuer à l'installation de « surdités cachées ».

Les patients ayant une perte de fonction des CCE auraient donc davantage de difficultés de compréhension de la parole dans un environnement bruyant. Cette plainte est souvent retrouvée chez des patients souffrant de troubles auditifs. Pour une meilleure prise en charge des patients concernés, il apparaît nécessaire de mieux caractériser ces déficiences. Ceci aiderait à clarifier l'implication des diverses structures cochléaires dans le traitement du son et la manière dont ils interagissent en condition normale et en condition pathologique. Plus particulièrement, connaître les bases cellulaires du décodage des sons complexes, comme la compréhension de

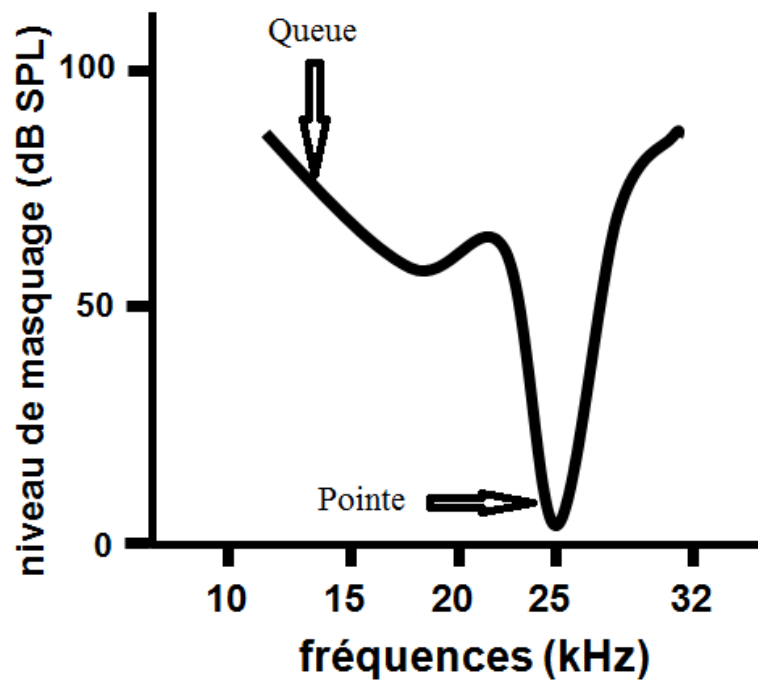
la parole dans un environnement bruyant semble essentiel pour une amélioration des diagnostics.

Chez des patients présentant une atteinte cachée des CCE, l'interprétation de l'évaluation audiométrique est biaisée par une perte auditive apparemment légère (mesurée en audiométrie), mais qui est en réalité plus importante. Cette atteinte peut être révélée par la recherche d'incohérences entre les seuils auditifs audiométriques et les seuils en PDA.

De plus, les problèmes d'intelligibilité liés à une altération de la fonction des CCE pourraient être mieux caractérisés par l'établissement de courbes d'accord de masquage. En effet, ce test permet d'évaluer la sélectivité fréquentielle de la cochlée, autrement dit la faculté à distinguer deux sons émis simultanément.

### **1.1.2. La courbe d'accord de masquage, un outil pour évaluer la sélectivité fréquentielle de la cochlée**

Les courbes d'accord de masquage (Masking Tuning Curves – MTC), obtenues de façon non invasive, permettent une évaluation fiable de la sélectivité fréquentielle de la cochlée. Pour établir une MTC, on recherche le niveau d'intensité d'un son de fréquence donnée suffisant pour qu'il vienne masquer un son cible (bouffée tonale). Pour cela, la technique des PEAp est utilisée : une bouffée tonale de fréquence fixée est envoyée à un niveau d'intensité situé légèrement au-dessus du seuil auditif et un son continu (son masquant) est diffusé en fond. L'ensemble de ces sons va être produit en même temps via un écouteur placé dans le conduit auditif. Le masquage va influencer l'amplitude des ondes de PEAp produites en réponse au son cible. Le niveau d'intensité minimum nécessaire pour que le son continu masque les ondes produites par l'envoi de la bouffée tonale cible est mesuré.



**Figure 2.1 :** Graphique représentant un exemple de courbe d'accord de masquage correspondant à une audition normale. Elle a été déterminée pour un son cible de 25 kHz.

La pointe de la courbe de masquage est située au niveau de la fréquence à laquelle le son masquant masque le plus efficacement le son cible (Figure 2.1). Dans une cochlée normale, la pointe se trouve à une fréquence proche de celle du son cible (fréquence caractéristique). Plus le son masquant active la région qui détecte le son test, plus il est efficace à bas niveau.

Une courbe d'accord normale présente également un large segment au niveau des basses fréquences, moins sensible que la pointe de la MTC, appelé la queue de la MTC. Dans cette zone de la courbe, le son masquant basse fréquence exerce son effet sur le son cible à forte intensité.

Lorsqu'il y a une atteinte des CCE, la largeur de la pointe de la MTC augmente et sa sensibilité diminue, alors que la sensibilité de la queue de la MTC peut être augmentée. Un décalage en fréquence de la pointe de la MTC indique une écoute hors fréquence, qui

correspond à des patients présentant des zones cochléaires mortes, définies comme une bande cochléaire dans laquelle les CCI et/ou leurs neurones associés ne sont plus fonctionnels (Moore and Alcantara, 2001). Cependant, un son de forte intensité peut révéler l'activité de zones adjacentes aux zones mortes, ce qui entraîne le décalage en fréquence de la courbe d'accord. Environ 60 % des personnes souffrant de pertes auditives supérieures à 70 dB ont des zones cochléaires mortes.

## **1.2. La souris comme modèle d'étude de la surdité**

### **1.2.1. Un modèle présentant de nombreux avantages**

Les modèles animaux sont couramment utilisés pour étudier les bases génétiques et physiologiques du vieillissement et des pathologies liées à l'âge. Ils sont nécessaires, car ces études chez l'humain sont compliquées par la longévité, l'influence de l'environnement, l'hétérogénéité génétique et la question de l'éthique.

En particulier, les souris de laboratoire sont devenues un modèle robuste et fiable pour étudier les pathologies auditives humaines de par leur courte durée de vie, leur manipulation aisée, leur fond génétique défini et le fait qu'elles sont élevées dans un environnement contrôlé (Olhemiller et al., 2016). Les différentes souches de souris consanguines présentent une large gamme de sensibilités auditives et des vieillissements auditifs plus ou moins rapides. Cette variété permet l'étude des pathologies auditives liées à l'exposition au bruit ou au vieillissement.

De plus, le système auditif des souris présente une structure très similaire à celui des humains et environ 99 % des gènes murins ont un orthologue chez l'humain (Bowl and Dawson, 2014). La petite taille de la cochlée murine représente également un avantage puisqu'elle

permet des études morphométriques rapides et moins coûteuses que chez d'autres modèles animaux ou que chez l'humain (Olhemiller et al., 2006). La caractérisation basique de la cochlée de souris a aussi permis d'établir une carte fréquentielle, très utile pour les études histologiques (Ou et al., 2000).

Les modèles de souris constituent des outils importants pour étudier les gènes responsables de pertes auditives (Dror and Avraham, 2010). Plus de 400 mutants présentant des troubles de l'audition ont été identifiés parmi les souches de souris de laboratoires (Kikkawa et al., 2012).

### **1.2.2. Le profil « Nherf1-/- », des souris mutantes présentant une surdité subtile**

L'utilisation de modèles de souris transgéniques en recherche a permis des progrès considérables dans l'identification de gènes responsables de surdités congénitales, permettant une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires, cellulaires et physiologiques entrant en jeu dans ces pathologies.

Récemment, un profil auditif atypique avec une perte de fonction des CCE associée à une sensibilité auditive subnormale et des performances supraliminaires altérées a été décrit chez un modèle de souris transgénique. Ces souris KO (knock-out) étaient mutantes pour la protéine Nherf1 (PDZ Protein Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor-1), une protéine composant les stéréocils des CCE. Elles présentaient une faible augmentation des seuils auditifs à haute fréquence (environ 20 dB), mesurés par les PEAp, associée à une absence de PDA (Kamiya et al., 2014). Ceci suggérait une perte importante de la fonctionnalité des CCE au niveau de la base de la cochlée. De plus, l'évaluation de la sélectivité fréquentielle a été réalisée par l'établissement de courbes d'accord de masquage dont la pointe était inhabituellement décalée vers les basses fréquences pour des sons cibles de hautes fréquences. Il y avait donc un

masquage efficace de stimuli de hautes fréquences par de sons de basses fréquences. Ces évaluations fonctionnelles étaient appuyées par des observations histologiques, mettant en évidence des anomalies de conformation des touffes stéréociliaires des CCE, essentiellement au niveau de la base de la cochlée.

### **1.2.3. La CD1, un modèle de surdité lié à l'âge**

Les souris transgéniques présentent des déficiences très ciblées, liées à la perte de fonction d'un gène. Elles constituent de bons outils pour mieux comprendre le rôle et l'implication des protéines dans l'installation des surdités. Néanmoins, les processus qui mènent à des déficiences auditives sont liés à de nombreux facteurs et ces modèles restent éloignés des atteintes retrouvées chez l'homme.

De nombreuses souches de souris de laboratoire développent des surdités liées à l'âge, dont l'évolution se rapproche de celles observées chez l'humain. Ces modèles murins permettent d'étudier les processus qui entraînent l'apparition des surdités chez l'humain. Parmi eux, la souche de souris CD1 est connue pour développer une surdité précoce, qui s'installe progressivement des hautes vers les basses fréquences (Le Calvez et al., 1998 a b ; Shone et al., 1991). Chez ces souris, la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) provoque des dommages oxydatifs et une apoptose dans certaines régions de la cochlée, entraînant l'installation d'une perte auditive prématurée (Riva et al., 2006).

## **Présentation de l'article**

### **1.3. Objectif de l'étude**

Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle de souris CD1 afin de mieux documenter le rôle joué par les CCE dans la fonction auditive supraliminaire. Nous avons réalisé un suivi longitudinal et observé une progressivité de la déficience auditive. Toutefois, une discordance surprenante a été mise en évidence. En effet, durant une courte fenêtre temporelle, les seuils des hautes fréquences restent proches des valeurs normales, mais associés à des PDA absents. Les MTC montrent un décalage des pointes vers les basses fréquences. Ces données indiquent que les CCE de la base ne sont plus fonctionnelles et que la perception des hautes fréquences est perturbée. En outre, des observations histologiques en microscopie électronique à balayage ont révélé une conformation anormale de la touffe stéréociliaire des CCE au niveau de la base de la cochlée. Ces données témoignent d'une désorganisation de la tonotopie cochléaire.

## **2. Protocole général**

Des CD1 mâles (n=15) ont été utilisées dans cette étude. La fonction cochléaire a été évaluée aux âges de 18, 21, 25 et 30 jours. Les seuils auditifs ont été déterminés avec les PEAp, les seuils en PDA ont également été mesurés ainsi que les courbes d'accord de masquage aux fréquences de 10, 15, 22 et 32 kHz. Au terme des évaluations fonctionnelles, les souris ont été sacrifiées et leurs cochlées ont été prélevées en vue de visualiser les touffes stéréociliaires des CCE au microscope électronique à balayage.

**Article:**

**“TRANSIENT ABNORMALITIES IN MASKING TUNING CURVE  
IN EARLY PROGRESSIVE HEARING LOSS MOUSE MODEL”**

Marion SOUCHAL<sup>1</sup>, Ludimila LABANCA<sup>1</sup>, Sirley CARVALHO<sup>2</sup>, Luciana RESENDE<sup>2</sup>,  
Christelle BLAVIGNAC<sup>3</sup>, Paul AVAN<sup>1</sup>, Fabrice GIRAUDET<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Neurosensory Biophysics, INSERM UMR 1107, Clermont Auvergne University, Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup> Speech Therapy and Audiology Department, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>3</sup> Cellular Health Imaging Center, Clermont Auvergne University, Clermont-Ferrand, France





## **Abstract**

Damage to cochlear outer hair cells usually induces a loss of frequency selectivity that correlates with the increase in hearing thresholds. Discrepancies, i.e., clinically normal hearing sensitivity yet difficulties in speech intelligibility, especially in noisy environments, are attributed to auditory neuropathies and synaptopathies. In this study, we document the part played by OHCs in influencing suprathreshold auditory function with an animal model of age-related hearing loss, the CD1 strain of mice. In this model, during a few days between postnatal days 18 and 30, a discrepancy between absence of distortion products at high frequencies and near-normal audiometric thresholds was observed. This transient “discordant profile” was associated with a shift toward low frequencies of the tip of masking tuning curves, which plot the level of interfering sound necessary to mask the response to a probe tone against masking frequency. In addition, scanning electron microscopy revealed OHC hair bundle shape abnormalities in the basal cochlea, despite OHC survival and preserved coupling with the tectorial membrane. These results suggest a transient cochlear tonotopy disorganization. Transposed to patients, an enhanced efficiency of low frequency maskers on high frequency stimuli could generate speech-in-noise difficulties.

Keywords: age-related hearing loss, disorganized tonotopy, outer hair cell, stereocilia bundle, suprathreshold auditory impairment, masking tuning curve

### Highlights:

- In CD1 mice, abnormal OHC function can come with near-normal auditory thresholds
- The discrepancy occurs where hair-cell to tectorial-membrane connections are abnormal
- Masking of high by low frequencies in CD1 mice is excessive
- Performance at threshold hides suprathreshold auditory impairment

Abbreviations: ABR: Auditory brainstem response; CM : Cochlear microphonic; DPOAE : Distortion product otoacoustic emission; ENT: Ear, nose, and throat; FEG: Field emission gun; HL: Hearing loss; HMDS: Hexamethyldisilazane; IHC: Inner hair cell; MTC: Masking tuning curve; OAE: Otoacoustic emission; OHC: Outer hair cell; PBS: Phosphate buffer saline; PFA: paraformaldehyde; PHEM: Pipes Hepes Egtazic acid Magnesium; SNHL: Sensorineural hearing loss; SPL: Sound pressure level; TM: Tectorial membrane

## 1. Introduction

The causes of sensorineural hearing loss (SNHL) are diverse comprising hereditary (genetic mutations, age-related hearing loss), acquired (noise exposure, ototoxic drugs and ischemia) and idiopathic conditions. SNHL are primarily caused by pathology in the inner ear affecting the sensory receptors (outer hair cells, OHC; inner hair cells, IHC) or primary auditory neurons (afferent fibers) (Schuknecht et al., 1973, Yamasoba et al., 2013, Wong and Ryan, 2015, Moore et al., 2008).

Pure-tone audiometry is the routine clinical audiological test used for measuring hearing sensitivity. Accordingly, the evaluation of hearing-loss severity rests on average hearing threshold levels (International Bureau of Audiophonology, American Speech-language-Hearing Association). This audiometric classification of hearing impairments is the main basis upon which ENT physicians and audiologists determine their rehabilitation choice.

For years, it has been acknowledged that some subjects with clinically normal hearing (with normal audiometric thresholds) could report difficulties in speech intelligibility, especially in noisy environments. The disproportionate difficulty in understanding speech was found mainly in two recently identified disorders that widely differ from the “typical” SNHL, namely, auditory neuropathies and synaptopathies.

The concept of “auditory neuropathy”, widely used to label a spectrum of auditory dysfunctions (Moser and Starr, 2016; Starr et al., 1996), contrasts the presence of intact presynaptic cochlear function (as represented by existence of OAEs or CM or both, and on the behavioral level by sub-normal pure-tone audiogram) with abnormal neural responses (absent or distorted auditory brainstem responses (ABR) and abnormal acoustic reflexes).

In the framework of this newly acknowledged concept, the prevailing view of noise-induced hearing loss with OHC as cellular targets undergoing hair-bundle damage and loss

(Bohne and Harding, 2000) has turned out to be incomplete. Recent studies in animal models identified more insidious consequences of noise exposure, with considerable damage to ribbon synapses between IHCs and some type-I afferent auditory nerve fibers, despite normal OHC function and normal audiometric thresholds (Kujawa and Liberman, 2009, 2015). The clinical perceptual consequences of this “hidden hearing loss”, as it may be silent at threshold levels, remain unknown but have been suggested as a likely contributor to a variety of perceptual suprathreshold abnormalities, including speech-in-noise difficulties (Kujawa and Liberman, 2017; Liberman et al., 2016; Oxenham et al., 2016).

So, these examples of auditory dysfunctions illustrate the limitations of pure-tone audiometry to determine the site of a lesion of the peripheral auditory system and its lack of predictive value for suprathreshold auditory perception tasks (Merchant and Nadol, 2010).

The fact that normal auditory sensitivity does not preclude suprathreshold auditory impairment due to synaptic or neuronal lesions rests on well-accepted knowledge of the respective parts played by micromechanical vs transduction and action-potential generation stages in the cochlea. Recent papers stress the importance of OHC function as a determinant of speech-in-noise performance, highlighted by its decrease with decreased OAEs in a sample of subjects with audiometric thresholds within the normal range (Léger et al., 2012, Hoben et al., 2017). In other words, these studies suggest that OHC damage contributes to hidden hearing loss, yet it calls for deeper investigations.

Another recent example in which OHC damage leads to discrepancies between subnormal hearing sensitivity and strongly impaired suprathreshold performance was provided by *Nherf1*<sup>-/-</sup> mice (*Nherf1* being exclusively expressed in OHC hair bundles at the mature stage). Their mild ABR hearing threshold elevation at high frequencies was inconsistent with an absence of high-frequency distortion product otoacoustic emissions (DPOAE) (Kamiya et al., 2014). Moreover, the frequency selectivity evaluation revealed an unusual sensitivity of

mid/high frequencies to low-frequency maskers. This non-conventional functional pattern came with peculiar OHC hair-bundle shape anomalies in the basal part of the cochlea.

The goal of the present work is to better document the part played by OHCs in influencing suprathreshold auditory function. To bridge the gap between transgenic or knockout mouse models with precisely targeted deficits, and human data in subjects for whom the causes of SNHL are difficult to track with unknown combinations of genetics, aging and exposure to environmental factors, we sought to investigate a rapidly progressive sensorineural auditory impairment in a strain of non-inbred mice, CD1 mice. These mice are known to exhibit early onset of hearing loss, and to offer between around 3 and 8 weeks after birth a broad range of degrees and frequency intervals of hearing loss and in the proportion of damaged OHCs (Le Calvez et al., 1998 a b; Shone et al., 1991).

We performed a longitudinal functional study in CD1 mice in the first 30 postnatal days and observed progressive hearing loss, yet with a discrepancy between high-frequency audiometric thresholds, close to normal, and absence of DPOAE. Masking tuning curves were built to test basal OHC functionality and scanning electron microscopy, to study OHC hair-bundle shape anomalies in the basal cochlea. Observations suggested a transient disorganization of the cochlear tonotopy.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Animals*

Male CD1 mice (n=15) from Janvier Labs were included in this study at 18 days of age. The animals were maintained in temperature and humidity-controlled facilities. Ambient sound pressure levels inside the cages were below 40 dB SPL. For all hearing test experiments, mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg, i.p.) and xylazine (20 mg/kg, i.p.). Body temperature was maintained at 37 °C (Microprobe Thermometer, BAT-12, WPI) with an isothermal pad (Homeothermic Blanket System, Harvard Apparatus). Prior to testing and to exclude middle ear damage, an otoscopic examination (using a binocular operating microscope) was performed on each mouse. Cochlear function was assessed via ABR and DPOAE at postnatal days 18, 21, 25 and 30 (i.e., P18, P21, P25 and P30). All the auditory tests were performed in a sound attenuated and electrically shielded recording chamber. After the final auditory test, animals were sacrificed for histological processing and scanning electron microscopy analyses of hair-cell stereocilia. All procedures were approved by the Regional ethics committee for animal experiments in France (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale Auvergne; EC 92-12).

### *2.2. DPOAE recording*

All testing was conducted using a stimulation and acquisition chain (EPL Cochlear Function Test Suite-Eaton-Peabody Laboratories-Harvard Medical School) controlled by a computer (NI PXI-1031, National Instrument). A miniaturized acoustic system (consisting of two speakers and one microphone) was gently sealed into the ear canal. Using a dedicated software (EPL Cochlear Function Test Suite-Eaton-Peabody Laboratories-Harvard Medical School), the parameters used for the stimulation were  $f_2/f_1=1.20$  with  $L_1 = L_2$ . DPOAEs were measured for  $f_2 = 10, 15, 22$  and  $32$  kHz, with  $L_1$  and  $L_2$  from 10 dB to 80 dB in steps of 5 dB.

DPOAE threshold was defined as the lowest sound level producing a DPOAE with an amplitude of at least 7 dB above the noise floor. Absence of instrumental DPOAE was verified in dead mice from the same batch at each frequency.

### *2.3. ABR thresholds*

Responses were recorded with needle electrodes (stainless steel, diameter: 0.4 mm, Medtronic Xomed Inc) inserted through the skin at the vertex (active electrode), ipsilateral mastoid (negative electrode) and in the neck region (ground). All electrode impedances were similar and  $<5$  k $\Omega$  at the start of the test. The responses from the electrodes were amplified ( $\times 100\,000$ ), filtered (100–3 000 Hz), digitally converted and averaged (300 sweeps) by a two-channel recording system (Neuropack  $\mu$ @-MEB 9104, Nihon Kohden). The acoustic stimulus was generated by an arbitrary waveform generator (TG4001, Thurlby Thandar Instruments) which produced tone bursts at 5, 10, 15, 22, 27 and 32 kHz. The envelope of the tone burst was built using the Blackman-Harris formula (with the whole stimulus window containing 60 periods of the tone), in order to remove the artefact impulse sound produced when an earphone receives a too steeply rising signal. The acoustic stimulus intensity was controlled by an attenuator (PA4/SM3/HB6/XB1, Tucker Davis Technologies) then it was sent to the high-frequency earphone in the external ear canal (No. 40-137 8 $\Omega$  70W 8A4, Radio Shack Japan). The intensity at which an ABR waveform was still visually detected above noise floor was defined as the ABR threshold.

### *2.4. Masking Tuning Curve (MTC)*

The probe stimulus was the same as for the measurement of ABR, emitted 10 dB above the ABR threshold, at the target frequencies of 10, 22 and 32 kHz. The masking sound was a pure tone generated by a second generator (TG4001, Thurlby Thandar Instruments) and sent by



a separate electronic and acoustic track to avoid electric distortion. The intensity of the masking sound considered effective induced a reduction of 50% of the ABR wave I amplitude generated in response to the target stimulus. It was determined for different masking frequencies swept above and below the target frequency.

### *2.5. Electron microscopy*

The mice were deeply anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg) and sacrificed by transcardiac perfusion with freshly prepared 4% PFA in 0.1 M PBS. The cochleas were removed from the temporal bones under a binocular microscope in PHEM buffer (Pipes, Hepes, EGTA, Magnesium) and fixed in 2.5% glutaraldehyde overnight at 4 °C. The next day, samples were dehydrated in a series of alcohol baths from 25° to 100° then HMDS (Hexamethyldisilazane) and metalized to be visualized with a scanning electron microscope with a field emission gun (FEG) (JSM-6060LV, JEOL). A count of normal, altered and missing OHC stereocilia bundles in the apical (corresponding to the place coding frequencies around 10 kHz) , middle (place coding frequencies around 20 kHz) and basal regions (place coding frequencies around 32 kHz) at each postnatal age was achieved. Hair bundles were considered altered when they had asymmetrical, linear or hooked shapes.

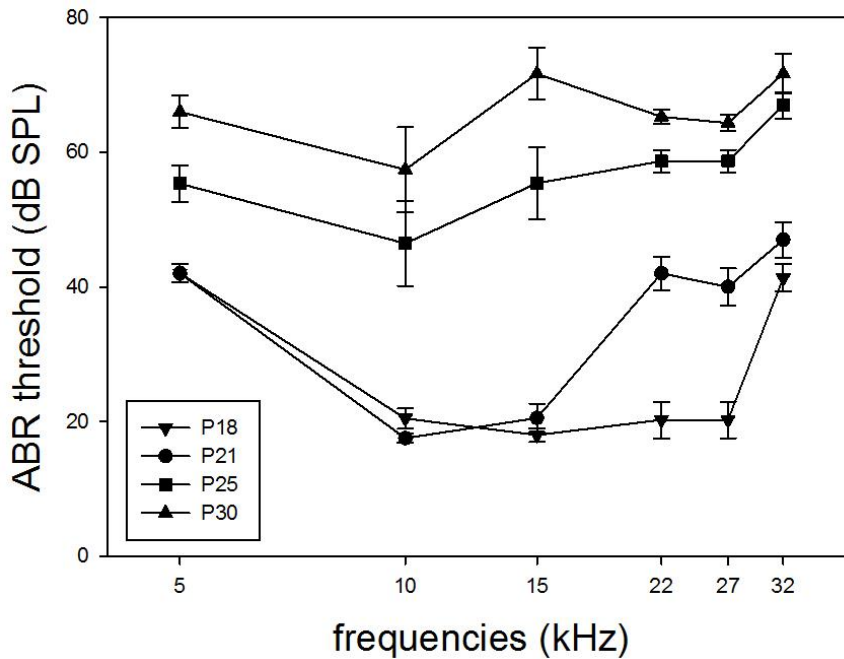
### *2.6. Data analysis*

Graphs represent either individual plots or means  $\pm$  standard error of the mean (sem). Statistical analysis was performed using Shapiro-Wilk test (Sigmaplot<sup>®</sup>, Systat Software Inc.). Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Progressive age-related hearing loss of CD1 mice

##### 3.1.1. ABR threshold changes with age



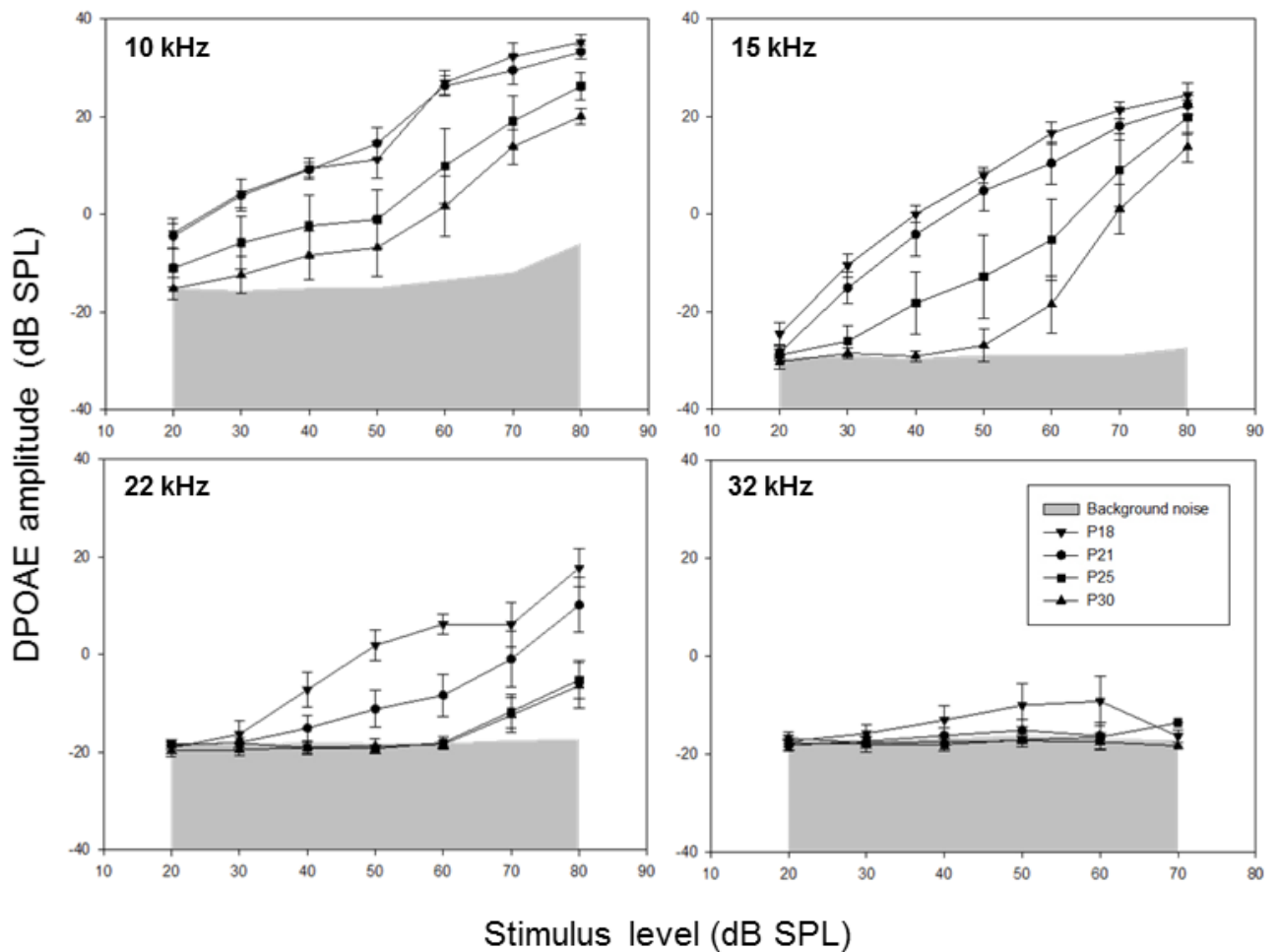
**Figure 2: ABR hearing thresholds of the CD1 mouse as a function of age.**

Mean ABR hearing thresholds ( $\pm$ sem) measured for P18, P21, P25 and P30 CD1 mice ( $n=15$ ) with tone-bursts at 5, 10, 15, 22, 27 and 32 kHz.

We first assessed the hearing sensitivity in the 5 to 32 kHz frequency range. The changes in ABR hearing thresholds (mean  $\pm$ sem) over time are illustrated in figure 1. Hearing loss in CD1 mice was significant and progressive. A few days after the onset of hearing, on P18, mean ABR hearing thresholds are consistent with a normal hearing sensitivity at frequencies from 10 to 27 kHz but not at 32 kHz ( $41 \pm 2$  dB SPL). Three days later, the hearing loss had progressed substantially at 22 and 27 kHz, from normal hearing to mild hearing loss (increase of between 20 and 22 dB in average compared to P18). At P25, the hearing impairment was more pronounced for high frequencies from 22 to 32 kHz with ABR thresholds reaching 59 to  $67 \pm 2$  dB SPL. For middle frequencies, the ABR hearing threshold increase was 35 dB for 15 kHz, 29 dB for 10 kHz and 15 dB for 5 kHz. At 1 month, the ABR audiogram was flat at all frequencies tested with near 50 dB hearing loss.

So, there was a progressive elevation of the hearing threshold extending from high to low frequencies with a clear deterioration between P18 and P25. Between P25 and P30, the elevation of ABR thresholds slowed down.

### 3.1.2. Progressive impairment of DPOAE growth functions



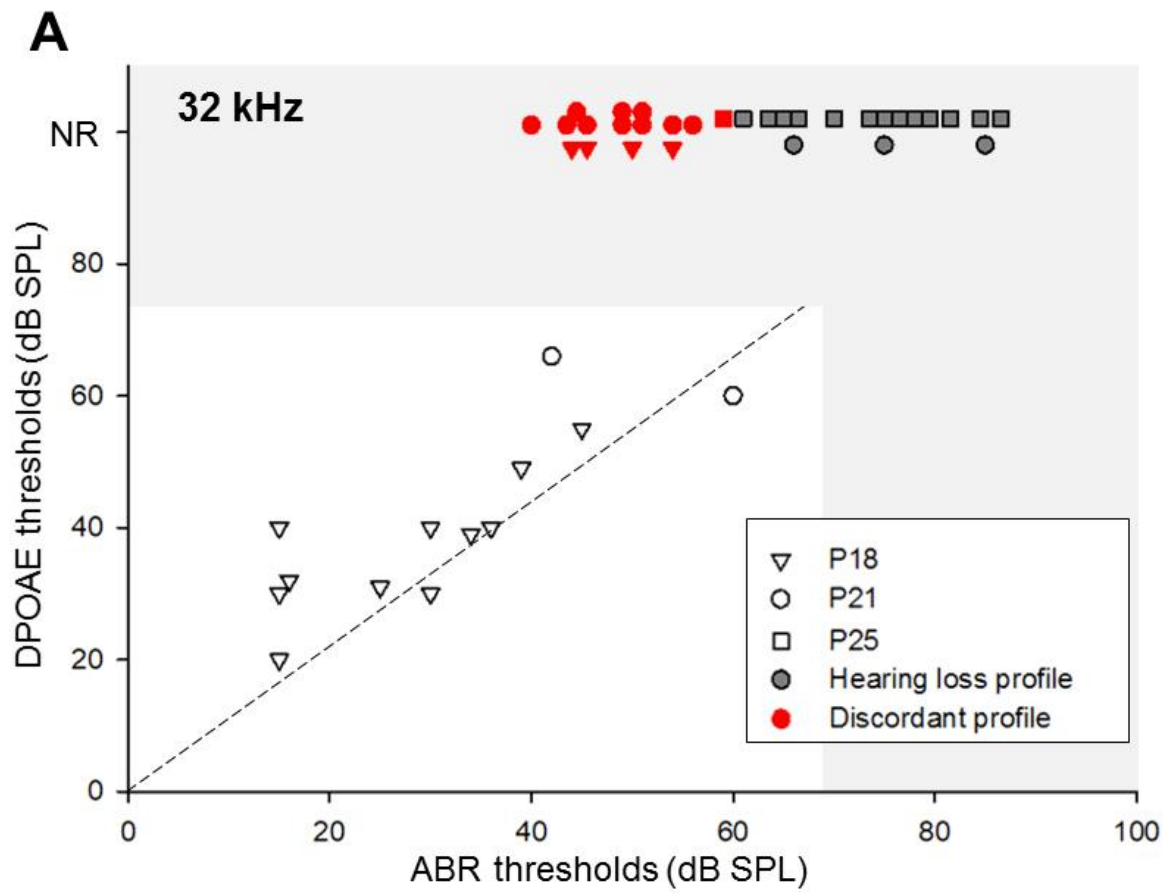
**Figure 3:** DPOAE growth functions illustrating mean DPOAE amplitudes ( $\pm$ sem) for primary levels ranging from 20 to 80 dB SPL in P18, P21, P25 and P30 CD1 mice at 10, 15, 22 and 32 kHz.

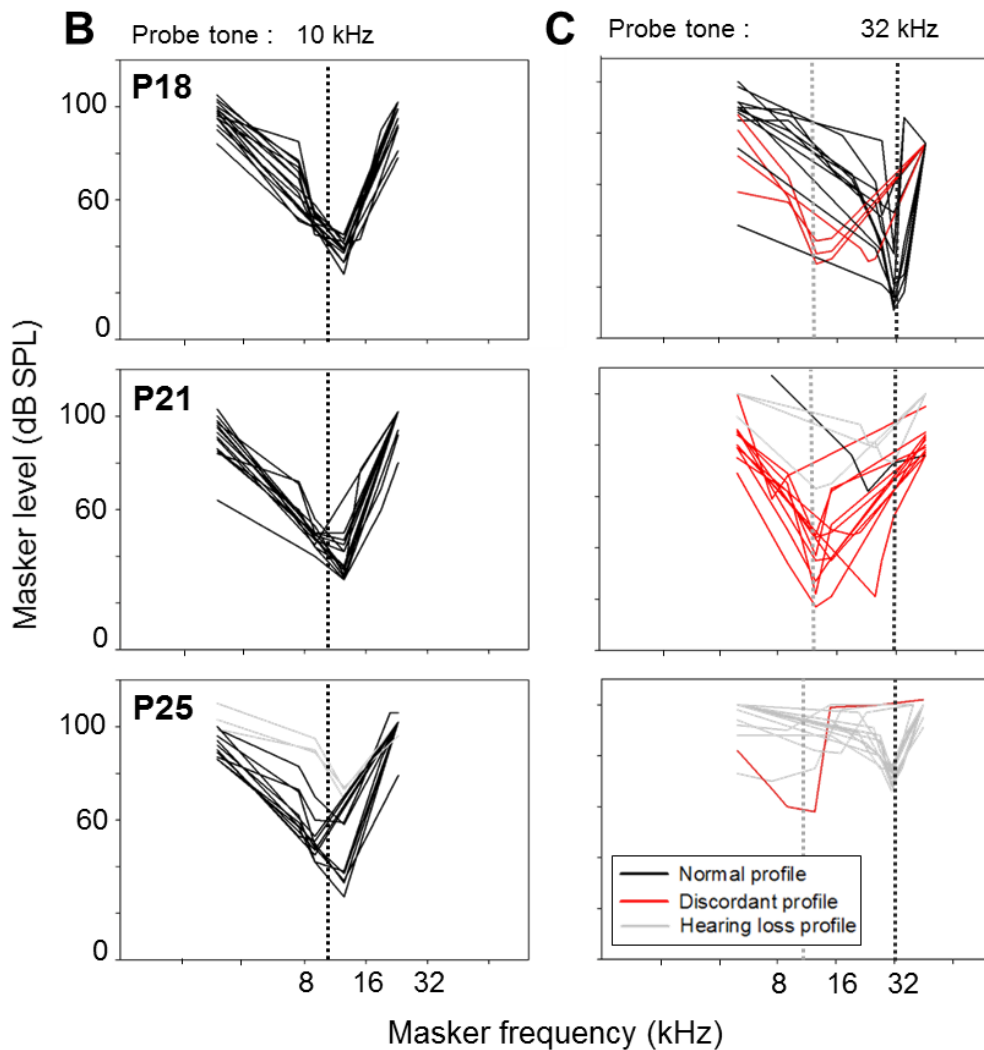
The mean DPOAE amplitudes as a function of the f2 primary level, i.e. its growth functions, are shown in figure 2 for 4 frequencies 10, 15, 22 and 32 kHz at P18, P21, P25 and P30. Except for the higher frequency (32 kHz) at P18, the general shape of the growth functions

was characterized by a monotonically increasing DPOAE amplitude. At 32 kHz frequency, only P18 mice had detectable DPOAEs with very small amplitudes, with a signal-to-noise ratio of 7 ( $\pm 5$ ) for L2=60 dB. At all other frequencies, the growth functions shifted to the right more or less rapidly with increasing age. At P21 and lower frequencies 10 and 15 kHz, growth functions showed no significant change and only a little more than 10 dB downward shift at P25, and an additional 5 to 10 dB decrease at P30. Higher frequencies showed faster changes, -5 to -15 dB changes as soon as P21 at 22 kHz while DPOAEs hardly emerged above noise at the highest stimulus levels after P25.

Relative to P18, ABR thresholds only increased by 30 to 40 dB at P25, suggesting the persistence of some degree of amplification by the cochlear amplifier, thought to normally have a 60 dB gain (Dallos, 2008; Hudspeth, 2008, 1997; Robles and Ruggero, 2001). If OHCs are still functional enough to produce some gain, one might expect DPOAEs to persist at higher levels at least at high stimulus intensities. We therefore decided to look at individual cases assessed with the ABR and DPOAE in order to highlight the possible discrepancies between these two techniques.

3.2. Slight increase in ABR hearing thresholds contrasts with defective responses of the OHCs at the base and shifted tips of masking tuning curves



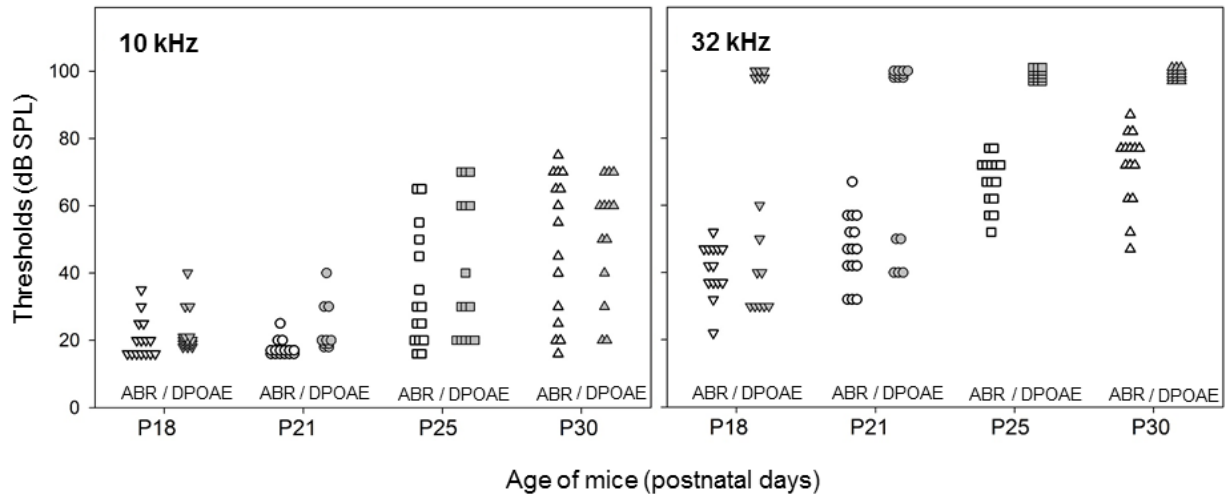


**Figure 4: Relationships between ABR and DPOAE thresholds and MTC at high frequencies.**

Scatterplots of the individual DPOAE thresholds as a function of ABR thresholds at 32 kHz (A). Diagonal line: DPOAE and ABR thresholds are equal. Red symbols and red MTC correspond to individual with only slight increase in ABR thresholds ( $\leq 35$  dB) but increase of DPOAE thresholds  $\geq 40$  dB or non-recordable DPOAE (NR). The shaded areas correspond to the thresholds for which it is thought that OHCs have lost their function as they do not either generate gain -hence a 60 dB ABR threshold elevation-, or emit distortion products. Individual masking tuning curves are presented for a probe tone at 10 kHz (B) and 32 kHz (C). Different symbols for different ages (see insert in A). Different lines for different MTC profiles (see insert in C).

The scatterplot of DPOAE thresholds at 32 kHz as a function of ABR thresholds and individual MTCs for a 32 kHz probe are represented in figure 3 (A and C, respectively). In some ears, the thresholds measured with these two techniques seemed well correlated, approximately along the diagonal line of the plot (Figure 3, A, dashed line). In view of these

cases, a surprising discrepancy appears, with ears showing mild ABR threshold elevations yet no DPOAE (Figure 3, A, “discordant” points in red). The MTCs plotted in these cases at 32 kHz (Figure 3, C, red lines) contrast with the MTCs built in animals with a good correspondence between ABR and DPOAE thresholds (Figure 3, C, black lines), and with all MTCs built at 10 kHz, a frequency at which the animals kept normal thresholds between P18 and P25 (Figure 3, B). More precisely, MTCs in black display a V-shaped profile with a deep tip at a frequency slightly above the probe frequency, corresponding to the most efficient frequency at which the masker interferes with the probe. At tip frequency, probe and masker levels are very close to each other. MTCs in red, in contrast, have no identifiable tip around the probe frequency, and the most efficient masker has a much lower frequency often lying around 12 kHz, but sometimes between 16 and 32 kHz. A possible reading of these MTCs is that they only display a hypersensitive tail while the tip has become too shallow to be visible. The discordant profile, already observed at P18 (3 cases) occurred more frequently at P21 (10 cases), but almost vanished at P25 (one case, with most MTCs showing a blunt and elevated tip at the probe frequency).

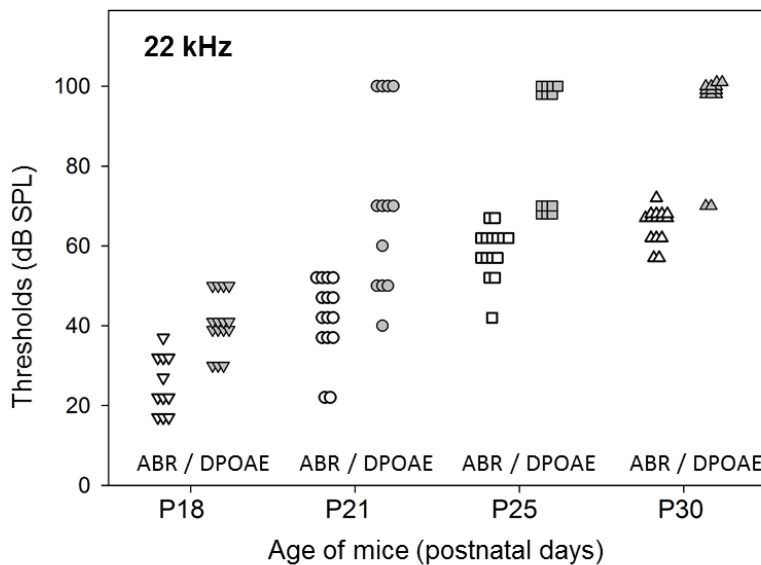
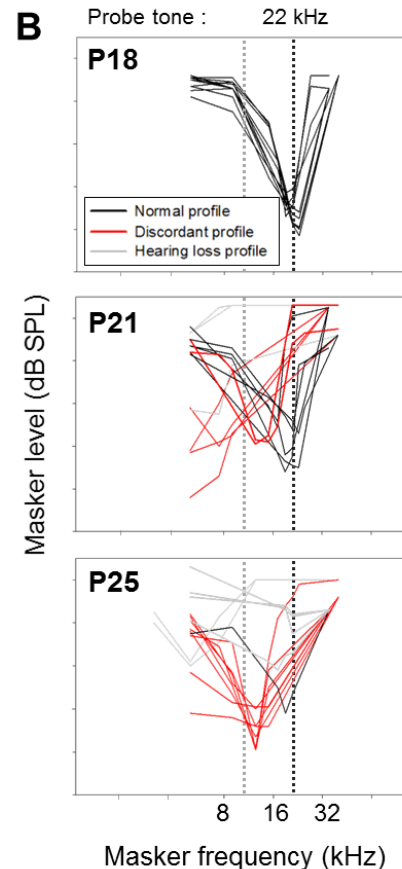


**Figure 5: ABR thresholds and DPOAE thresholds as a function of age.**

Individual ABR hearing thresholds and individual DPOAE thresholds measured for P18, P21, P25 and P30 CD1 mice (n=15, different symbols at different ages) at 10 and 32 kHz

The distributions of ABR and DPOAE thresholds as a function of age at 10 and 32 kHz differ in the following manner. At 10 kHz, DPOAE and ABR thresholds tended to co-vary. They were normal ( $\leq 40$  dB SPL) and not much scattered at P18 and P21. At P25 and P30, both thresholds were more scattered and tended to increase by similar degrees, from 20 up to 75 dB SPL. This is not what happened at 32 kHz. Already at P18, despite ABR thresholds not exceeding 55 dB SPL, 6 mice already had lost their DPOAEs. The difference between ABR and DPOAE thresholds (when DPOAEs were still present) could reach 40 dB. At increasing ages, the ABR thresholds gradually shifted upwards. The discrepancy between ABRs and DPOAEs was still present with no DPOAE in 10 mice at P21, and no DPOAE in all mice at P25 and P30.

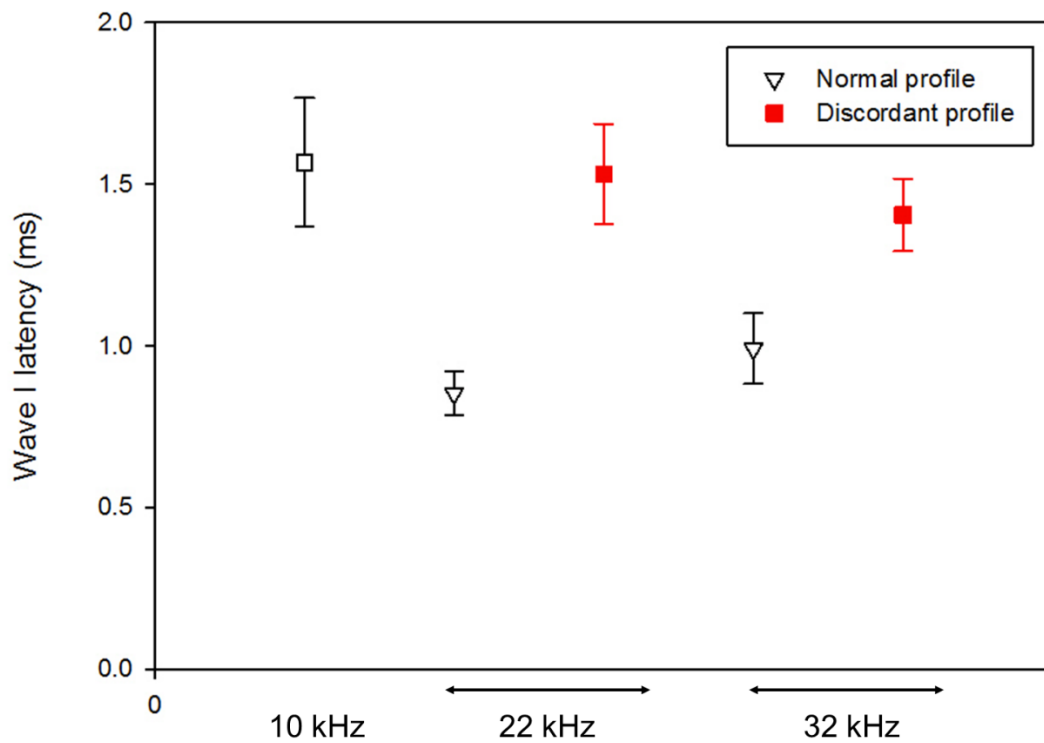


**A****B**

**Figure 6: Distribution of ABR hearing thresholds and DPOAE thresholds and MTC at 22 kHz.**

Individual ABR hearing thresholds and individual DPOAE thresholds measured for P18, P21, P25 and P30 CD1 mice (n=15, different symbols at different ages) at 22 kHz (A). Individual masking tuning curves for a probe tone at 22 kHz (B).

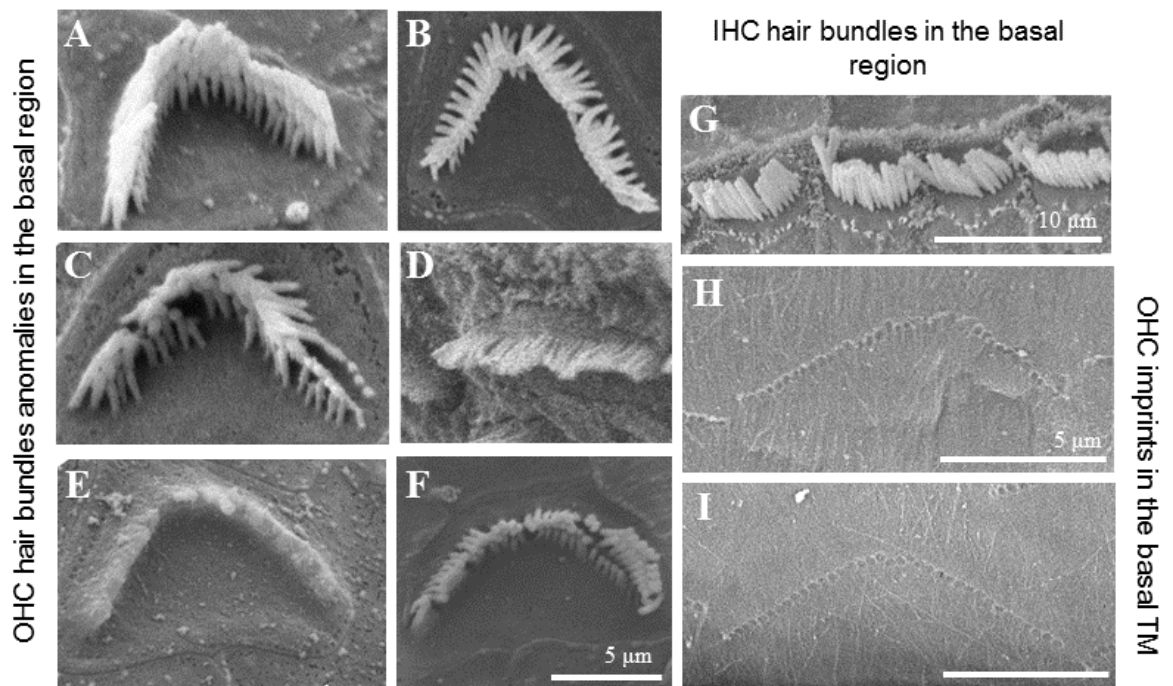
At the intermediate frequency 22 kHz, ABR thresholds and DPOAE thresholds were still similar at P18 with corresponding MTC tips near the probe frequency (Figure 5, A, B). At P21, 5 mice had no DPOAE despite only mildly elevated ABR thresholds, <40 dB SPL for some individuals (normals around 20 dB SPL). For those mice, the most efficient masking shifted towards lower frequencies (Figure 5, B, red curves). At P25, 8 mice presented a discordant profile similar to that previously described at 32 kHz and in 6 mice no MTC tip or tail could be identified (Figure 5, A, B). Among the mice with discordant profile, some animals still had residual DPOAEs yet with a threshold near 70 dB SPL.



**Figure 7:** ABR wave-I latency at 10, 22 and 32 kHz for a stimulus sound level of 40 dB SPL in mice presenting normal and discordant profiles.

In all mice, ABR wave I latencies in response to a 10 kHz probe were around 1.5 ms for a stimulus at 40 dB SPL. At 22 and 32 kHz, for normal mice, they were respectively 0.85 and 1 ms (Figure 6). The difference in ABR wave I latencies at this sound level between 10 kHz and 22 and 32 kHz was consistent with the base-to-apex cochlea frequency map. In mice with discordant profiles, wave I latency at 22 and 32 kHz was near 1.5 ms, thus in the same range as for 10 kHz tone-bursts.

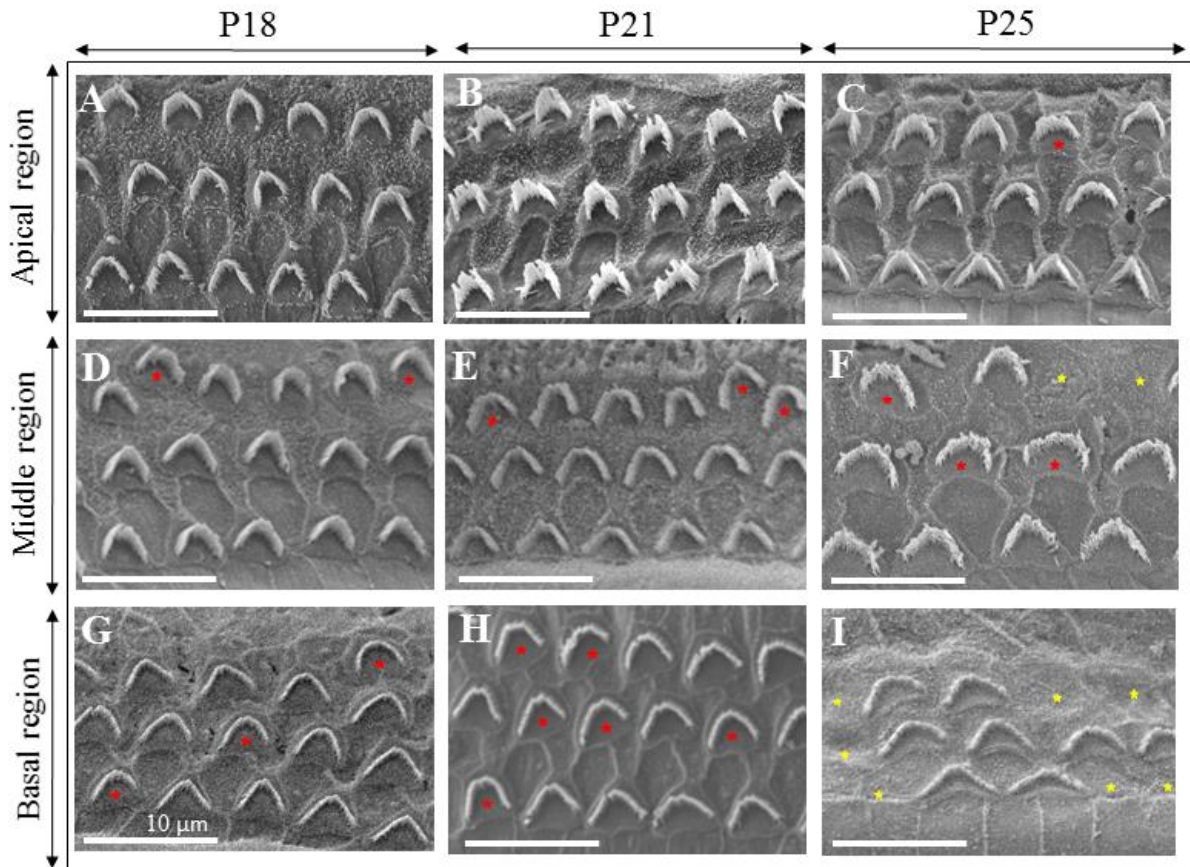
### 3.3. Morphological features observed with scanning electron microscope (SEM)



**Figure 8: Abnormal hair bundle shapes observed in the basal cochlear region.**

SEM pictures of organ of Corti sections (A-G) and of tectorial membrane (TM) (H, I) from CD1 mice. A: Normal OHC hair bundle; B: Asymmetrical hair bundle; C: OHC with damaged stereocilia; D: Linear OHC hair bundles; E: OHC with fused stereocilia; F: Hook-shaped OHC hair bundle; G: normal appearance of IHCs; H, I: imprints left by abnormal (H) and normal (I) OHC stereocilia bundles in the TM in the basal region of cochlea.

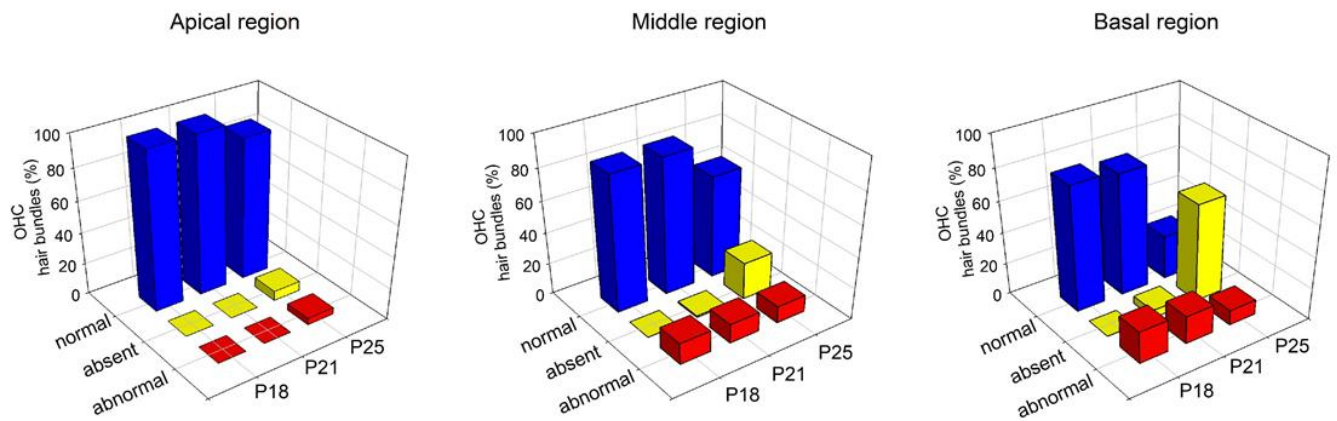
We next looked at the OHC hair bundle aspect in different regions of the cochlea in CD1 mice (Figure 7, Figure 8). SEM analysis of the middle and basal regions of the cochlea showed hair bundle anomalies in OHCs, but not IHCs (Figure 7, A-G). Some OHC hair bundles in this region displayed altered, asymmetrical, linear or hooked shapes (Figure 7, A-F). In the basal region, OHC hair bundles remained anchored in the tectorial membrane (TM) by their taller row of stereocilia even when bundles had abnormal shapes (Figure 7, H, I).



**Figure 9: Abnormal OHC hair bundle shapes observed at the cochlear base in CD1 mice.** SEM pictures of organ of Corti sections from CD1 mice at P18 (A, D and G), P21 (B, E and H) and P25 (C, F, I). A, B: In the apical region, the OHC stereocilia bundles are normal at P18 and P21. C: This apical section contains one OHC with an abnormal linear shape (red star). D, E, F: In the middle region at P18, P21 and P25, abnormal stereocilia bundles are found (asymmetric, linear or hook-shaped) (red stars), and a few OHCs are missing at P25 (yellow stars) G, H, I: in the basal region, abnormal stereocilia bundles are observed at P18 and P21 (red stars, G, H) and OHC losses are seen at P25 (yellow stars, I)

A count of normal, altered and missing OHC stereocilia bundles for each group of mice in the apical, the middle and the basal region of the cochlea was achieved, and the results are shown in Figure 9. CD1-related OHC abnormalities are most evident in the basal region, with abnormal hair bundles in about 20% cells from the earliest stage on (Figure 8, red stars; Figure 9, rightmost diagram). After P21, the main defect is the large percentage of missing OHCs, up to 62% (Figure 8, yellow stars). In the middle region, the progression of OHC abnormalities is qualitatively similar yet milder, with about 10% abnormally shaped hair bundles, stable during the period of interest, and only 23% missing OHCs at P25 (Figure 8;

Figure 9, middle). The apical part of the CD1 cochlea is almost immune from defects at P18 and P21 (Figure 8, A, B, C; Figure 9, left), and only at P25, 5 and 6% of OHCs show disorganized bundles or are absent.



**Figure 10: The percentage of abnormal stereocilia bundles is greater at the base of the CD1 cochlea.**

Amount of normal, abnormal and absent OHC stereocilia bundles for P18 (N=4), P21 (N=6) and P25 (N=4) CD1 mice in the apical, middle and basal region

#### 4. Discussion

In CD1 mice, progressive hearing loss, already present at high frequencies at P18, rapidly extends to lower frequencies by P25 as already reported (Shone et al., 1991, Le Calvez et al. a b, 1998). In some mice, hearing loss combined an increase in ABR thresholds with a concomitant increase in DPOAE detection thresholds at the same frequencies, accompanied by a gradual loss of OHCs. However, a subgroup of mice displayed discrepancies, at high frequencies, between elevated DPOAE thresholds and less affected ABR thresholds. When DPOAEs become undetectable (i.e., thresholds well above 70 dB SPL), this indicates a loss of OHC function in the basal cochlea, which is not consistent with the small elevation ( $\leq 35$  dB) of ABR thresholds from 22 kHz up. The OHCs, a key element of the cochlear amplifier, are thought to increase cochlear sensitivity by 50-60 dB (Dallos, 2008; Hudspeth, 1997, 2008; Robles and Ruggero, 2001). Complete loss of OHC function signaled by complete loss of DPOAEs should therefore lead to an increase in hearing levels well above 35 dB, which is not the case in the “discordant profile” presented by these CD1 mice.

This profile is associated with a tonotopic disorder, revealed by a large shift in the best masking frequency of MTC toward the low frequencies when the probe tone-burst is set within the interval with discordant DPOAE vs ABR thresholds. A possible pitfall of the MTC technique relates to the presence of a transient low-frequency artefact sound in addition to the high-frequency stimulus, which if intense enough would produce a spurious ABR response from the still normally sensitive apical part of the cochlea. However, the envelope of the probe tone-burst was a Blackman-Harris window that optimally softens the rising and falling transients driving the earphone. Although tone bursts at and above 20 kHz did present a secondary low-frequency artefact around 10-12 kHz, its amplitude was more than 45 dB below the main stimulus peak. Thus, with a high-frequency probe level  $< 65$  dB SPL for plotting a

MTC, this artefact is too low for the apical cochlea, even when still normally sensitive, to respond.

A normal masking curve is made of two parts, a sharp tip centered on the probe frequency at which masking is obtained for the lowest masker level, and a broad tail at lower frequencies, at which maskers about 40-50 dB above probe level can still exert efficient masking. Hypersensitive tails have received a first explanation from the study of Liberman and Dodds (Liberman and Dodds, 1984) where single unit tuning curves presenting a hypersensitive low-frequency region were reported, particularly from neurons coming from cochlear places with disconnected OHCs. A systematic description of the phenomenon on the single-unit level was performed in noise exposed guinea pigs (Versnel et al., 1996). While the loss of the tip reflects the loss of active resonance of the cochlear amplifier, when OHCs no longer exert amplification, increased sensitivity to masking at low frequencies is attributed to the increased mobility of the TM, due to loss of coupling with the organ of Corti in absence of OHC (Guinan, 2012) that confers to the cochlear base an increased sensitivity to low frequency maskers. In less severe circumstance, where OHC are damaged but present, the MTC tip is located at the characteristic frequency and an increase in tail sensitivity is also visible (Versnel et al., 1996).

The “discordant profile” of CD1 mice does not correspond to already described models of hypersensitive masking tail, in that the masking of high-frequency probes by low-frequency maskers is greater with MTCs forming a marked drop, down to levels near the probe level (Figure 3, C). In MTC with standard “hypersensitivity of the tail”, the masking effect occurs at a level only about 20 dB lower than in a normal MTC. The “discordant profile” is thus more reminiscent of “dead regions”, where the neuronal response to stimuli at frequencies corresponding to these zones in which inner hair cells or neurons are lost, is shifted to functional adjacent areas (Moore et al., 2001). Thus, the MTC obtained in this case have their tip at a frequency corresponding to the nearest functional region, as it is from this region that neuronal

responses to the probe come. The stimulus must be of sufficient intensity for the vibration to propagate to the functional area. In the case of the CD1 “discordant profile”, it seems difficult, however, to assume that a probe stimulus at 32 kHz and at about 65 dB SPL would be sufficient to produce a response of the place tuned to the MTC tip, around 12 kHz.

The “discordant profile” of CD1 seems correlated with a presence of basal OHC but whose stereociliary bundles sometimes exhibit abnormal conformations, as it tends to disappear once significant OHC losses appear (Figure 3, C at P25). A coupling persists between these disorganized stereociliary bundles and the overhanging TM, as evidenced by the imprints found on its inferior side (Figure 7, H). This profile resembles the recently reported *Nherf1*<sup>-/-</sup> mice profile, which present shifted MTC tips and extant yet totally nonfunctional basal OHCs with deeply altered hair bundles. The hypothesis formulated in the study of *Nherf1*<sup>-/-</sup> mice was that the tip of MTCs revealed that the responses to high-frequency probes actually came from more apical places than allowed by the normal tonotopy. Propagation of sound waves along the basilar membrane, as happens in the case of basal dead regions, would have been too attenuated to allow deep tips to be observed and it was proposed that propagation occurred along the TM in relation to its persistent coupling with non-functional OHCs, able to leak vibrations without filtering them. Whereas the *Nherf1*<sup>-/-</sup> profile is caused by the genetic lack of one molecule of the hair bundle, resulting in targeted alterations of the OHC stereocilia, the “discordant profiles” found in the outbred strain CD1 do not occur in all mice, whose degrees of hearing loss and patterns of stereocilia defects are highly variable, and occur in variable degrees (Figure 3, A, C). Indeed, from P25 to 32 kHz, this profile is replaced by a more traditional sensorineural hearing loss. Of course, one cannot exclude that the “discordant profiles” of CD1 mice represent a form of extreme “hypersensitivity of the tail”, with the place responding to high-frequency probe tones being still at its normal tonotopical place. The unusual intensity with which distorted modes of vibration occur in response to lower frequency maskers would be due to the



abnormal basal mechanics produced by a peculiar coupling between the TM and abnormal OHCs.

Some CD1 mice presented a less pure “discordant profile” than *Nherf1*<sup>-/-</sup> mice with the presence of residual DPOAE at 22 kHz (Figure 5). A persistent ability to generate small DPOAEs, absent in *Nherf1*<sup>-/-</sup> mice and in CD1 mice at 32 kHz, does not preclude that coupling with the TM might be at the origin of a perturbed tonotopy as hypothesized above.

Irrespective of the explanatory mechanics, the expected perceptive consequences of a “discordant” functional pattern as described here are a rather better sensitivity to high frequencies than the one predicted with totally nonfunctional OHCs, allowing a sort of off-frequency listening to occur. As a counterpart, the “better than expected” ability to detect high frequencies, with an optimistic pure-tone audiogram that does not attract the clinician’s attention, comes with no guarantee that suprathreshold behavior is normal, with the additional penalty of increased sensitivity to low-frequency masking. In clinical studies, it has been reported that minimal losses on high frequencies ( $\leq 30$  dB), observed in some subjects, have deleterious effects on speech perception, normally associated with low or medium frequencies (Léger et al., 2012). This decrease in intelligibility could result from suprathreshold deficiencies caused by OHC damage. Recently, another study found a correlation between loss of OHC function and reduced speech in noise performance, in subjects with minimal high-frequency hearing loss (Hoben et al., 2017). The “discordant profile” presented by some CD1 mice may therefore correspond to a reality in some patients, complaining of impaired intelligibility, but with normal audiometric thresholds and no neural alteration.

In conclusion, although it has been rightly emphasized that a clinical pattern with difficulties in the presence of noise out of proportion with the pure-tone audiogram should raise the possible diagnosis of auditory-neuropathy spectrum disorder (Liberman et al., 2016), such difficulties may also be the hallmark of abnormal OHC function, when atypical OHC lesions

occur (Kamiya et al., 2014), which the present work confirms. An easy means for separating the two frameworks lies beyond pure-tone audiometry, with a contrast between extant OAEs and distorted ABRs in the case of neuropathy, and absent OAEs and normal ABRs, in the case of “discordant profile”.

## **Funding**

The research was initiated with the supports of Fondation des Gueules Cassées (grant 20-2013) and Capes-Cofecub (n° Me861/15 DANPE). One of the authors (MS) received a grant from Groupe Entendre (GIPA2).

## **References**

- American Speech-Language-Hearing Association, 1996. Central auditory processing: Current status of research and implications for clinical practice. *American Journal of Audiology*, 5, 41–54.
- Bohne, B.A., Harding, G.W., 2000. Degeneration in the cochlea after noise damage: primary versus secondary events. *Am J Otol* 21, 505–509.
- Chermak, G. D., and Musiek, F. E., 1997. Central auditory processing disorders: New perspectives. San Diego, CA: Singular.
- Dallos, P., 2008. Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 370–376.
- Jerger, J.F., Hayes, D., 1976. The cross-check principle in pediatric audiometry. *Arch Otolaryngol* 102, 614–620.
- Hoben, R., Easow, G., Pevzner, S., Parker, M.A., 2017. Outer Hair Cell and Auditory Nerve Function in Speech Recognition in Quiet and in Background Noise. *Front Neurosci* 11, 157.
- Hudspeth, A.J., 2008. Making an effort to listen: mechanical amplification in the ear. *Neuron* 59, 530–545.
- Hudspeth, A., 1997. Mechanical amplification of stimuli by hair cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 480–486.
- Kamiya, K., Michel, V., Giraudet, F., Riederer, B., Foucher, I., Papal, S., Perfettini, I., Le Gal, S., Verpy, E., Xia, W., Seidler, U., Georgescu, M.-M., Avan, P., El-Amraoui, A., Petit, C., 2014. An unusually powerful mode of low-frequency sound interference due to defective hair bundles of the auditory outer hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 9307–9312.

- King, K., Stephens, D., 1992. Auditory and psychological factors in “auditory disability with normal hearing.” *Scand Audiol* 21, 109–114.
- King, P.F., 1954. Psychogenic deafness. *J Laryngol Otol* 68, 623–635.
- Kujawa, S.G., Liberman, M.C., 2015. Synaptopathy in the noise-exposed and aging cochlea: Primary neural degeneration in acquired sensorineural hearing loss. *Hear. Res.* 330, 191–199.
- Kujawa, S.G., Liberman, M.C., 2006. Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth. *J. Neurosci.* 26, 2115–2123.
- Le Calvez, S., Avan, P., Gilain, L., Romand, R., 1998. CD1 hearing-impaired mice. I: Distortion product otoacoustic emission levels, cochlear function and morphology. *Hear. Res.* 120, 37–50.
- Le Calvez, S., Guilhaume, A., Romand, R., Aran, J.M., Avan, P., 1998. CD1 hearing-impaired mice. II. Group latencies and optimal f2/f1 ratios of distortion product otoacoustic emissions, and scanning electron microscopy. *Hear. Res.* 120, 51–61.
- Liberman, M.C., Epstein, M.J., Cleveland, S.S., Wang, H., Maison, S.F., 2016. Toward a Differential Diagnosis of Hidden Hearing Loss in Humans. *PLoS ONE* 11, e0162726.
- Moore, B. C. J., 2007. *Cochlear hearing loss: Physiological, psychological, and technical issues* (2nd ed.). Chichester, England: Wiley.
- Merchant, S. N., and Nadol, J. B., 2010. *Schuknecht’s Pathology of the Ear*, 3<sup>rd</sup> Edition. Shelton Shelton: People’s Medical Publishing House
- Moser, T., Starr, A., 2016. Auditory neuropathy--neural and synaptic mechanisms. *Nat Rev Neurol.* 2016 Mar;12 (3):135-49.
- Musiek, F. E., and Chermak, G. D., 2007. *Handbook of central auditory processing disorder: Volume I: Auditory Neuroscience and Diagnosis*. Plural Publishing. p. 448.
- Oxenham, A.J., 2016. Predicting the Perceptual Consequences of Hidden Hearing Loss. *Trends Hear* 20, 2331216516686768.
- Rance, G., Starr, A., 2015. Pathophysiological mechanisms and functional hearing consequences of auditory neuropathy. *Brain* 138, 3141–3158.
- Robles, L., Ruggero, M.A., 2001. Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiol. Rev.* 81, 1305–1352.
- Saunders, G.H., Haggard, M.P., 1989. The clinical assessment of obscure auditory dysfunction-1. Auditory and psychological factors. *Ear Hear* 10, 200–208.
- Schuknecht, H.F., Kimura, R.S., Naufal, P.M., 1973. The pathology of sudden deafness. *Acta Otolaryngol.* 76, 75–97.

- Shone, G., Raphael, Y., Miller, J.M., 1991. Hereditary deafness occurring in cd/1 mice. *Hear. Res.* 57, 153–156.
- Starr, A., Picton, T.W., Sininger, Y., Hood, L.J., Berlin, C.I., 1996. Auditory neuropathy. *Brain* 119 ( Pt 3), 741–753.
- Smith, R.J.H., Bale, J.F., White, K.R., 2005. Sensorineural hearing loss in children. *Lancet* 365, 879–890.
- Wong, A.C.Y., Ryan, A.F., 2015. Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea. *Front Aging Neurosci* 7, 58.
- Wu, T., Marcus, D.C., 2003. Age-related changes in cochlear endolymphatic potassium and potential in CD -1 and CBA/CaJ mice. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 4, 353–362.
- Yamasoba, T., Lin, F.R., Someya, S., Kashio, A., Sakamoto, T., Kondo, K., 2013. Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. *Hear. Res.* 303, 30–38.
- Zeng, F.-G., Kong, Y.-Y., Michalewski, H.J., Starr, A., 2005. Perceptual consequences of disrupted auditory nerve activity. *J. Neurophysiol.* 93, 3050–3063.



### **3. Résultats principaux**

La mesure des seuils auditifs avec les PEAp a montré une élévation progressive de seuils auditifs mesurés avec les PEAp, depuis les hautes fréquences (32 kHz) vers les basses fréquences (5 kHz) de P18 à P25 chez les souris CD1 (Figure 1). Dès P25, les seuils auditifs sont élevés à toutes les fréquences testées et ils évoluent peu jusqu'à P30.

L'évaluation de la fonction des CCE par les PDA a révélé une atteinte de ces cellules à haute fréquence (32 kHz) dès P21, alors que les seuils auditifs en PEAp sont moins affectés à cet âge (Figure 2). Nous avons donc décidé comparer les profils individuels des souris, évalués par les PEAp et par les PDA, pour mettre en évidence de possibles discordances entre ces deux techniques.

Les données obtenues ont montré des écarts surprenants entre les seuils auditifs obtenus avec les PEAp et les seuils des PDA à haute fréquence chez certaines souris (Figure 3). Ceci nous a poussés à étudier la corrélation entre les seuils auditifs mesurés avec ces techniques à 22 et 32 kHz. Les courbes d'accord de masquage des souris ont également été établies pour ces mêmes fréquences.

Les résultats obtenus ont montré que certaines souris ont des seuils auditifs subnormaux mesurés avec les PEAp (15 dB SPL) à 22 kHz, mais des pertes de 40 à 50 dB en PDA (Figure 4, D). D'autres souris présentent des pertes auditives minimales mesurées avec les PEAp à 32 kHz ( $\leq 35$  dB) associées à des PDA absents (Figure 4, E). Ces profils sont associés à un décalage de la pointe des courbes d'accord de masquage vers les basses fréquences à P21 et P25 (Figure 4, B, C). De plus, une augmentation de la latence de l'onde I des PEAp est également observable chez ces souris à 22 et 32 kHz (Figure 5). Ces résultats révèlent la présence d'une anomalie dans la tonotopie cochléaire entre P18 et P25. En effet, le traitement des hautes fréquences semble avoir lieu dans une région normalement dévolue aux basses fréquences.

Les touffes stéréociliaires des CCE des différentes portions cochléaires (tour apical, tour intermédiaire, tour basal) ont ensuite été observées au microscope électronique à balayage pour une partie des souris CD1. Certaines touffes stéréociliaires, notamment à la base de la cochlée, présentent des conformations anormales (linéaires, en crochet, fusionnées, désorganisées), différentes du « W » normalement observé (Figure 6, A-F). Le comptage de ces anomalies au niveau des différentes régions et pour les différents âges, a montré une prédominance des touffes stéréociliaires anormales au niveau de la base de la cochlée à P18 et P21 (Figure 7 et 8). Chez les souris plus âgées, une diminution des anomalies de conformation est associée à une disparition des CCE.

La présence de touffes stéréociliaires de conformations anormales entre P18 et P25 au niveau de la base de la cochlée est donc corrélée avec l'existence d'une anomalie de la tonopie cochléaire à ces mêmes âges (mise en évidence par le décalage des pointes des courbes d'accord de masquage).

#### **4. Discussion**

Chez les souris CD1, une perte auditive progressive, présente dès P18 à haute fréquence, s'est rapidement étendue vers les basses fréquences à partir de P25, comme cela avait déjà été rapporté (Shone et al., 1991 ; Le Calvez et al. a b, 1998) (Figure 1). Pour une partie des souris étudiées, une surdité neurosensorielle classique s'est développée avec une élévation des seuils auditifs, mesurés avec les PEAp, associée à une diminution de l'amplitude des PDA. Ces modifications fonctionnelles étaient accompagnées de la perte progressive des CCE liée au vieillissement auditif précoce.

De façon plus surprenante, nous avons relevé des discordances à haute fréquence, chez certaines souris, entre des seuils de PDA élevés et des seuils en PEAp moins affectés (Figure 4, D-E). Des PDA indétectables (seuils supérieurs à 80 dB SPL) indiquent une perte de fonction des CCE de la base de la cochlée, ce qui ne concorde pas avec la faible élévation observée ( $\leq 35$  dB) des seuils auditifs en PEAp à partir de 22 kHz. Les CCE, éléments clés de l'amplification cochléaire, augmentent la sensibilité cochléaire de 50 à 60 dB. Une perte totale de la fonctionnalité des CCE devrait donc entraîner une augmentation des seuils auditifs bien supérieure à 35 dB, ce qui n'est pas le cas dans le « profil discordant » présenté par certaines souris CD1.

Ce profil est associé à un trouble de la tonotopie, révélé par des MTC dont la pointe était décalée vers les basses fréquences pour des stimuli de hautes fréquences ( $\geq 22$  kHz) (Figure 4, B-C). De prime abord, il est possible de penser que ce décalage puisse être produit par la présence d'un son artefact de basse fréquence en plus du stimulus de haute fréquence, qui entraînerait une réponse en PEAp provenant de l'apex de la cochlée. En réalité, l'enveloppe de la bouffée tonale, utilisée comme stimulation, était une fenêtre de Blackman-Harris qui permet d'adoucir les transitions montantes et descendantes lors de l'envoi du son par le haut-parleur.



Bien que les bouffées tonales de fréquences supérieures à 20 kHz présentent un artefact de basse fréquence proche de 10-12 kHz, l'amplitude de ce dernier était plus de 45 dB en dessous du niveau de la stimulation. Avec une bouffée tonale inférieure à 65 dB, utilisée pour l'établissement des MTC, cet artefact est donc trop faible pour induire une réponse apicale significative.

Une MTC normale est composée de deux parties : une pointe marquée centrée sur la fréquence de la stimulation (fréquence caractéristique) et une queue plus large, située au niveau des basses fréquences (voir I.1.2). Un modèle d'« hypersensibilité de la queue » a été décrit dans l'étude de Liberman et Dodds (1984), dans lequel les MTC ne présentent pas de pointe centrée sur la fréquence cible, mais une queue plus marquée au niveau des basses fréquences. Dans cette étude, les MTC étaient établies à partir de réponses unitaires des neurones auditifs innervant les CCI au niveau de régions cochléaires dépourvues de CCE. Cet aspect des MTC indique une sensibilité augmentée des régions codant les basses fréquences. Une description de ce phénomène a également été réalisée chez des cochons d'Inde exposés au bruit (Versnel et al., 1996). La perte de la pointe des MTC est normalement attribuée à la perte de l'amplification active des CCE. Toutefois, dans le cas d'une « hypersensibilité de la queue », l'augmentation de la sensibilité à basse fréquence est liée à une mobilité plus importante de la membrane tectoriale due à un relâchement de son couplage avec l'organe de Corti en l'absence de CCE (Guinan, 2012). Ceci confère à la base de la cochlée une sensibilité augmentée pour les sons basses fréquences. Dans une situation moins sévère, où des CCE sont endommagées, mais présentes, une pointe de la MTC est située au niveau de la fréquence cible et une augmentation de la sensibilité de la queue est également visible à basse fréquence (Versnel et al., 1996).

Le « profil discordant » des CD1 ne correspond pas aux modèles d'« hypersensibilité de la queue » précédemment décrits. Dans ce profil, l'effet masquant des sons de basses fréquences, d'intensités basses, sur des stimuli de hautes fréquences, est plus important (Figure 4, B-C). En

effet, les MTC forment une pointe marquée, située à une intensité proche de celle du stimulus. Pour les MTC avec une « hypersensibilité de la queue », l'effet masquant est présent à basse fréquence pour des intensités seulement 20 dB inférieures à celles d'une MTC normale.

Ce « profil discordant » rappelle celui des « zones mortes », où la réponse neuronale à des stimuli, de fréquences correspondant à ces zones dépourvues de CCI et de neurones, est décalée vers des zones adjacentes fonctionnelles (Moore et al., 2001). Ainsi, les MTC obtenues dans ce cas présentent des pointes décalées vers les fréquences correspondant à la zone fonctionnelle la plus proche. Ce décalage des MTC indique que les réponses neuronales proviennent en réalité des zones fonctionnelles. Le stimulus doit être d'une intensité suffisamment forte pour que la vibration sonore se propage jusqu'à cette zone fonctionnelle. Dans le cas du « profil discordant » des CD1, un stimulus de faible intensité ( $\leq 45$  dB SPL) était utilisé et suffisait à provoquer une réponse plus apicale. Cette différence de propagation des vibrations sonores de hautes fréquences vers des zones apicales fonctionnelles est probablement liée au couplage entre l'organe de Corti et la membrane tectoriale. Dans le cas des « zones mortes », plus aucun couplage ne persiste, les cellules sensorielles ayant disparu. Le « profil discordant » des CD1 est, lui, corrélé à une présence de CCE basales mais dont les touffes stéréociliaires présentent parfois des conformations anormales. Un couplage persiste entre ces touffes stéréociliaires désorganisées et la membrane tectoriale, comme en témoignent les empreintes retrouvées sur la face inférieure de la membrane (Figure 6, H).

Ce profil ressemble à celui des souris *Nherf1*<sup>-/-</sup>, qui présentent des pointes de MTC décalées et des CCE basales non fonctionnelles avec des touffes stéréociliaires altérées (Kamiya et al., 2014). L'hypothèse avancée dans l'étude des souris *Nherf1*<sup>-/-</sup> est que le décalage des pointes des MTC montre que les réponses aux stimuli de hautes fréquences proviennent en réalité de régions plus apicales. La propagation des ondes sonores le long de la membrane tectoriale, comme elle a lieu dans le cas des « zones mortes », aurait été trop atténuée pour former des

MTC avec une pointe aussi marquée. Il a donc été proposé que la propagation des ondes sonores le long de la membrane tectoriale des souris *Nherf1*<sup>-/-</sup>, était liée au couplage particulier entre les touffes stéréociliaires altérées des CCE et la membrane tectoriale.

Cependant, le profil *Nherf1*<sup>-/-</sup> est dû à la perte d'une protéine des stéréocils, ce qui entraîne des altérations très ciblées au niveau des touffes stéréociliaires des CCE. Le « profil discordant » des CD1 n'est, quant à lui, observable que chez certaines souris et les anomalies de conformation des CCE sont variables et plus ou moins nombreuses. De plus, dès P25 à 32 kHz, ce profil est remplacé par un profil de surdité neurosensorielle plus classique.

Il n'est pas exclu que le « profil discordant » retrouvé chez certaines souris CD1 représente une forme extrême d'« hypersensibilité de la queue », où la région répondant aux stimuli de haute fréquence serait en réalité toujours à sa place tonotopique normale. L'intensité inhabituelle avec laquelle des vibrations distordues apparaissent en réponse à des sons masquant de basses fréquences pourrait être due à la mécanique basale anormale produite par le couplage aberrant des CCE avec la membrane tectoriale.

Les conséquences attendues de ce modèle « discordant » sur la perception sont une sensibilité plus élevée aux hautes fréquences que celle prédite avec des CCE totalement non fonctionnelles, ce qui permet une écoute hors fréquence. En contrepartie, la « meilleure » capacité à détecter les hautes fréquences, avec un audiogramme tonal optimiste qui n'attire pas l'attention du clinicien, ne garantit pas que le comportement supraliminaire est normal. De plus, la sensibilité accrue au masquage à basse fréquence représente une pénalité supplémentaire.

En clinique, il a été rapporté que des pertes minimales sur les hautes fréquences ( $\leq 30$  dB) observées chez certains sujets, ont des effets délétères sur la compréhension de la parole, normalement associée aux basses ou moyennes fréquences (Léger et al., 2012). Cette baisse d'intelligibilité pourrait résulter de déficiences supraliminaires causées par une atteinte des

CCE. Récemment, une autre étude a établi une corrélation entre une perte de fonction des CCE et une diminution de la compréhension de la parole dans le bruit chez des sujets présentant des pertes auditives minimales (Hoben et al., 2017). Le « profil discordant » présenté par certaines souris CD1 pourrait donc correspondre à une réalité chez certains patients se plaignant de problème d'intelligibilité dans le bruit, mais présentant des seuils audiométriques normaux et pas d'atteinte neurale.

En conclusion, il a été souligné à juste titre qu'un modèle clinique avec des difficultés de compréhension exagérées en présence de bruit et un audiogramme tonal normal correspondrait plutôt à un trouble de type neuropathie auditive (Liberman et al., 2016). Cependant, ces difficultés peuvent aussi être la marque d'une fonction anormale des CCE, lorsque des atteintes atypiques des touffes stéréociliaires se produisent (Kamiya et al., 2014), ce que cette étude confirme. Pour diagnostiquer ces deux pathologies auditives « cachées », l'audiométrie tonale ne suffit pas. Il est nécessaire de réaliser des examens fonctionnels et électrophysiologiques plus poussés. Les neuropathies pourront alors être détectées par des PDA présents associés à des PEAp anormaux et le « profil discordant » par des PDA absents associés à des PEAp normaux.



## **Chapitre 3 : Surdité cachée, atteinte du nerf et oxaliplatine**

### **1. Introduction**

En 1934, Dandy avait partiellement sectionné le nerf auditif de patients atteints de la maladie de Ménière, dans le but de soulager leurs symptômes. Il n'avait alors observé aucune modification de leurs seuils auditifs, même lorsque de larges portions du nerf avaient été retirées (Dandy et al., 1934). Une perte auditive minime était présente uniquement à haute fréquence. Des sections sélectives du nerf auditif avaient également été réalisées chez l'animal, et les résultats montraient que les seuils auditifs étaient maintenus, pour une fréquence donnée, lorsque 20   40 % des cellules du ganglion spiral étaient toujours présentes dans la zone codant cette fréquence (Schuknecht and Woellner., 1953). En dessous de 20 %, une élévation des seuils était observable.

Plus récemment, le rôle du nerf auditif a été de nouveau étudié chez un modèle animal (Kujawa and Liberman, 2009; Liberman and Kujawa, 2017; Kobel et al., 2017) dans le cas d'une surexposition acoustique induisant une élévation temporaire des seuils auditifs. Il a été démontré que, malgré une récupération de la sensibilité auditive, une dégénérescence du nerf cochléaire apparaissait.

#### **1.1. Atteinte cachée du nerf auditif à la suite d'une surexposition sonore**

Les corps cellulaires des neurones auditifs afférents se trouvent au niveau du ganglion spiral de la cochlée. Chaque neurone envoie une dendrite en direction d'une CCI de l'organe de Corti, avec laquelle il fait synapse, et un axone central qui va relayer les informations sensorielles au noyau cochléaire.

Chez l'animal, lors d'une atteinte cochléaire, qui peut être due à une surexposition acoustique ou à une exposition à une drogue ototoxique, les dommages subis par les cellules sensorielles cochléaires sont visibles dans les minutes qui suivent et leur apoptose se déclenche en quelques jours. La perte des cellules du ganglion spiral est, elle, beaucoup plus tardive et intervient dans les semaines ou les mois suivants (McFadden et al., 2004). Les dendrites des neurones disparaissent progressivement suite à la fragmentation de leur gaine de myéline. Puis une dégénérescence rétrograde a lieu en direction du corps cellulaire (Spoendlin, 1975).

Il avait été suggéré par le passé que la disparition des cellules du ganglion spiral, dans le cas de pertes auditives neurosensorielles, apparaissait à la suite de la mort des cellules ciliées et constituait donc une dégénérescence « secondaire » (Spoendlin, 1984). Cependant, cette hypothèse n'a jamais été réellement démontrée.

Après une surexposition sonore, une élévation des seuils auditifs est souvent observée. La récupération intervient dans les 24 heures ou jusqu'à trois semaines après l'exposition, selon la sévérité du traumatisme initial. Les seuils peuvent être totalement récupérés dans le cas d'une élévation temporaire, ou bien se stabiliser à une valeur élevée dans le cas d'une élévation permanente des seuils.

Des travaux effectués chez la souris, ont récemment montré que, même lorsque les seuils auditifs, mesurés par les PEAp ou par les PDA, sont revenus à la normale après une surexposition acoustique, une perte de plus de 50 % des cellules du ganglion spiral peut être observée (Kujawa and Liberman, 2009). Ces neurones dégénèrent dans les mois suivants le traumatisme acoustique, sans qu'il y ait de perte de cellules ciliées. Cette dégénérescence neurale semble être ici la conséquence « primaire » de la surexposition acoustique et précède la perte des cellules sensorielles.

Dans le cas d'une élévation temporaire des seuils auditifs, il n'y a donc pas de mort des cellules ciliées, mais une excitotoxicité est présente au niveau des synapses dans les 24 heures après l'exposition sonore (Ruel et al., 2007 ; Pujol and Puel, 1999 ; Robertson et al., 1983). La perte extensive et irréversible de ces synapses est observée durant ce délai (Kujawa and Liberman, 2015; Fernandez et al., 2015; Jensen et al., 2015). Les neurones auditifs du ganglion spiral sont donc fonctionnellement déconnectés des CCI juste après le traumatisme acoustique.

Les fibres du nerf auditif contactant une CCI varient selon leur taux de décharge spontané et leurs seuils acoustiques d'activation. Il est possible de distinguer les fibres de hauts seuils et à faible taux de décharge des fibres de bas seuils et à taux de décharge élevé. Les fibres de haut seuil seraient les plus sensibles aux traumatismes acoustiques, et ceci s'expliquerait par une plus grande vulnérabilité à l'excitotoxicité au glutamate (Furman et al., 2013).

Les seuils auditifs, mesurés avec les PEAp, et les PDA, sont insensibles à cette perte neuronale sélective, mais une diminution de l'onde I de ces PEAp est observable à haute fréquence (Kujawa and Liberman, 2009). L'amplitude des ondes des PEAp est, en effet, fonction du nombre de fibres répondant de façon synchrone à une stimulation sonore.

La dégénérescence des neurones auditifs après une surexposition sonore est probablement observable de la même façon chez l'humain et pourrait diminuer la robustesse du codage du stimulus dans des conditions où le rapport signal sur bruit est faible. Autrement dit, elle pourrait altérer les performances supraliminaires, la capacité à comprendre la parole dans le bruit et pourrait contribuer à l'installation d'autres troubles auditifs, tels que l'hyperacousie.

Cette « surdité cachée » étant due à une atteinte sélective d'une catégorie de fibres du nerf auditif, il est possible d'imaginer qu'elle puisse être provoquée par une autre cause que l'exposition au bruit comme, par exemple, une exposition à un toxique. De nombreux



médicaments sont connus pour induire des atteintes du système auditif, parmi eux, certains sels de platines utilisés en cancérologie.

## **1.2. Ototoxicité et sels de platine**

Les sels de platine sont couramment utilisés en chimiothérapie dans le cadre du traitement du cancer. En effet, leur efficacité n'est plus à démontrer dans l'inhibition de différents processus cellulaires impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses. Le mécanisme de ces anticancéreux passe par une action cytotoxique non sélective, qui peut également toucher des cellules saines à prolifération rapide, engendrant des effets indésirables tels que des neuropathies périphériques (Grisold et al., 2012). Certains sels de platine, comme la cisplatine ou le carboplatine, sont aussi connus pour leur ototoxicité. En conséquence, les patients, de plus en plus nombreux à guérir du cancer, ont une diminution notable de leur qualité de vie après le traitement. À la suite d'un traitement ototoxique, l'installation d'une surdité peut avoir pour conséquence une isolation sociale ou un déclin cognitif accéléré (Amieva et al., 2015).

L'ototoxicité de la cisplatine est la conséquence de plusieurs mécanismes, parmi lesquels un stress oxydatif avec la création de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et des dommages aux acides nucléiques par l'activation des caspases (Rybak, 2007). Ceci entraîne une atteinte des CCE, des cellules de soutien, des cellules marginales de la strie vasculaire et des cellules du ganglion spiral (van Ruijven et al., 2005). Les CCE sont les plus affectées, elles subissent une dégénérescence par apoptose, davantage marquée au niveau de la base de la cochlée. Cette disparition des CCE a pour conséquence une élévation des seuils audiométriques à haute fréquence, qui s'étend progressivement vers les basses fréquences lorsque la thérapie se poursuit.

Chez l'homme, l'utilisation du carboplatine en chimiothérapie n'entraîne que peu ou pas de perte auditive. Seules les thérapies utilisant de hautes doses de ce médicament ont pour conséquence des pertes auditives sévères. Cependant, chez le chinchilla, il provoque une atteinte ciblée des CCI et des neurones de type I du ganglion spiral, due à la production de radicaux libres dans ces cellules (Ding et al., 1999). Le potentiel microphonique et les PDA ne sont pas modifiés par cette drogue, indiquant que la fonctionnalité des CCE est préservée. La destruction d'une partie des CCI (30 à 40 %) entraîne une diminution de l'amplitude du PAC. Toutefois, les fibres des neurones de type I en contact avec les CCI restantes continuent à répondre aux stimulations sonores. Les seuils auditifs ne sont modifiés par le traitement qu'au niveau des hautes fréquences et lorsque la dégénérescence des CCI est supérieure à 80 % (Lobarinas et al., 2013). Ainsi, le carboplatine semble induire une « surdité cachée » chez ces animaux.

Un autre sel de platine de troisième génération, l'oxaliplatine (R, R-1, 2-diaminocyclohexane platinum), est utilisé dans le traitement du cancer colorectal et d'autres types de cancers digestifs. Ce sel de platine provoque rarement une ototoxicité chez les patients (voir I.3 pour les rapports de cas), cependant il entraîne l'installation d'une neuropathie aiguë, se manifestant par une hypersensibilité au froid au niveau des extrémités, et d'une neuropathie périphérique chronique douloureuse (Grothey, 2003).

### **1.3. La neurotoxicité, un effet secondaire de l'oxaliplatine**

L'oxaliplatine est un agent antineoplasique utilisé en combinaison du fluorouracil et de la leucovorine. Les cures se déroulent par cycles répétés toutes les 2 semaines pendant 6 mois (12 cycles). La dose est ajustée en fonction de la tolérance du patient et de l'efficacité du traitement, elle est en moyenne de 85 mg/m<sup>2</sup>. La cure se fait par une infusion intraveineuse d'oxaliplatine

souvent associée avec du fluorouracile (5-FU) et de l'acide folinique. L'association de ces molécules a pour acronyme FOLFOX.

L'utilisation de l'oxaliplatine s'accompagne d'effets indésirables au niveau hématologique, digestif et neurologique. La toxicité la plus connue de cette molécule est la neurotoxicité, qui touche 90 % des patients traités (Culy et al., 2000). Elle existe sous une forme précoce aiguë, qui survient chez la majorité des patients dans les 48 heures suivant la première cure, et une forme chronique plus tardive (Grothey, 2003). La neurotoxicité de l'oxaliplatine est responsable de l'installation d'une neuropathie douloureuse et de troubles sensoriels touchant les extrémités et les régions proches de la bouche et de la gorge (Cersosimo, 2005). Ces troubles sensoriels comprennent une paresthésie (trouble de la sensibilité tactile désagréable, mais non douloureux), une dysesthésie (diminution ou exagération de la sensibilité) et une hypoesthésie (une diminution de la sensibilité du toucher face à des stimuli). Les symptômes sont exacerbés par une exposition au froid. La neurotoxicité de l'oxaliplatine est due à une atteinte nerveuse périphérique dont le mécanisme reste encore peu connu.

#### **1.4. L'oxaliplatine, une drogue ototoxique ?**

##### **1.4.1. Des cas d'ototoxicité chez l'humain**

Une étude clinique a été menée en 2014, chez des patients ayant subi 6 cycles de chimiothérapie basés sur l'utilisation d'oxaliplatine, soit en combinaison avec du fluorouracil/leucovorin (FOLFOX) soit avec du capecitabine (CapeOx). Des évaluations auditives ont été réalisées avant et après les cycles. Les tests pratiqués étaient une mesure des seuils auditifs par audiométrie tonale à haute fréquence (de 500 Hz à 16 000 Hz) et une mesure des otoémissions acoustiques (Yüce et al., 2014). Ces tests n'ont révélé aucune atteinte auditive et l'étude a conclu à une absence d'ototoxicité de l'oxaliplatine.

Cependant, quelques cas de surdités sévères irréversibles survenues directement après une chimiothérapie avec de l'oxaliplatine ont déjà été rapportés (Güvenç et al., 2016 ; Malhotra et al., 2010 ; Hijri et al., 2013). La raison pour laquelle certains patients sont victimes de pertes auditives à la suite du traitement reste encore inconnue à ce jour. Il est donc nécessaire de clarifier la relation exacte entre ototoxicité et oxaliplatine.

#### **1.4.2. Ototoxicité chez l'animal**

Des études pharmacocinétiques chez l'animal ont montré que l'absorption d'oxaliplatine par la cochlée est très inférieure à celle de la cisplatine, ce qui pourrait expliquer son plus faible potentiel ototoxique (Hellberg et al., 2009). Cela peut être en partie expliqué par le fait que l'oxaliplatine est éliminée plus rapidement du sang que la cisplatine. En effet, sa demi-vie plasmatique est brève (environ 14,1 minutes), alors que celle de la cisplatine est plus longue (25 minutes), ce qui pourrait influencer sa biodisponibilité au niveau cochléaire (Ehrsson et al., 2002 ; Andersson et al., 1996). Ainsi, le degré d'absorption cochléaire des sels de platine serait corrélé à l'importance de la perte auditive. La différence d'absorption entre oxaliplatine et cisplatine pourrait également être expliquée par des transporteurs différents, en effet, la neurotoxicité de l'oxaliplatine passerait par les transporteurs de cations organiques 1 (Oct1) et 2 (Oct2), ce qui n'est pas le cas de la cisplatine et du carboplatine (Zhang et al., 2006).

Cependant, l'oxaliplatine entraîne bien des dommages lorsqu'elle pénètre dans la cochlée. Des cultures d'organes de Corti de rat traitées avec cette drogue ont montré une atteinte sélective des fibres du nerf auditif à des doses faibles (1  $\mu\text{M}$ ) (Dalian et al., 2013 ; Ding et al., 2012). De plus, à une dose plus élevée (50  $\mu\text{M}$ ), l'oxaliplatine était également toxique pour les cellules ciliées externes. Ces résultats montrent que les axones du nerf auditif sont plus vulnérables à l'oxaliplatine que les cellules sensorielles. L'oxaliplatine, tout comme la

cisplatine, ciblerait la thioredoxine reductase (TrxR) en l'inhibant (Dammeyer et al., 2014). La TrxR est une enzyme ayant un rôle dans la défense cellulaire antioxydante et serait un médiateur de l'ototoxicité due à la cisplatine.

### **1.5. Objectif de l'étude**

Dans cette étude, nous avons décrit les effets de l'oxaliplatine sur le système auditif de souris CBA/J adultes. Dans un premier temps, la fonction auditive, évaluée par les PEAp et les PDA, n'était pas modifiée chez les souris traitées avec l'oxaliplatine. Cependant, des tests électrophysiologiques plus poussés associés à une étude histologique ont montré une atteinte surprenante des neurones auditifs du ganglion spiral chez ces souris. Dans un deuxième temps, en répétant les cycles d'injection d'oxaliplatine sur plusieurs mois, l'atteinte de ces neurones était accompagnée d'une élévation des seuils auditifs. Enfin, nous avons étudié l'effet d'injections, par voie transtympanique, de différentes doses d'oxaliplatine. Cette fois, les tests fonctionnels ont mis en évidence une atteinte des CCE en plus des dommages engendrés au niveau du nerf auditif.

## **2. Matériel et Méthode**

### **2.1. Animaux**

Des souris mâles CBA/J de 30 jours provenant de Janvier Labs ont été utilisées pour cette étude. Cette souche de souris a été choisie pour la stabilité de ses performances auditives, elle présente une bonne audition jusqu'à au moins un an postnatal (Ohlemiller et al., 2010). Toutes les souris ont été maintenues dans une animalerie avec contrôle de la température, de l'hygrométrie, de la lumière et de l'ambiance sonore (<40 dB SPL).

Un groupe de souris (n=8) a subi un cycle d'injections d'oxaliplatine, sur 3 semaines (voir II.), un groupe de souris contrôle a été utilisé pour comparaison (n=4). Un groupe de souris (n=5) a subi un cycle d'injections puis a été suivi pendant un an pour voir les effets à long terme, un groupe contrôle a également été utilisé pendant cette durée (n=5). Un autre groupe de souris (n=5) a subi 5 cycles d'injections, un groupe contrôle (n=4) a servi de comparaison. Des injections transtympaniques d'oxaliplatine à différentes doses ont également été réalisées chez quatre groupes de souris (n=21), un groupe de souris contrôle véhicule (n=6) a reçu des injections avec du sérum glucosé à 5 % (Voir paragraphe 2.2.).

Avant tous les tests fonctionnels, le bon état des oreilles externes et moyennes des souris a été contrôlé sous loupe binoculaire afin d'écartier une éventuelle surdité due à une atteinte de l'oreille moyenne. Les animaux ont été anesthésiés avec un mélange de kétamine (10 mg/kg ; i.p. ; Virbac) et de xylazine (20 mg/kg ; i.p. ; Rompun). Leur température a été maintenue à 37 °C (Microprobe Thermometer, BAT-12, WPI) à l'aide d'une couverture chauffante (Homeothermic Blanket System - Harvard Apparatus) pendant toute la durée de l'expérience et de la phase de réveil.

La fonction cochléaire a été évaluée par des tests fonctionnels avant, pendant et après le traitement d'oxaliplatine. Les tests ont été réalisés dans des conditions standards, dans une

cabine isolée acoustiquement et protégée des artefacts électriques. Après les tests auditifs, les cochlées ont été prélevées puis préparées en vue d'être observées au microscope optique. Le protocole de cette étude a été approuvé par le Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne (CEMEAA).

## **2.2. Préparation et injections des drogues**

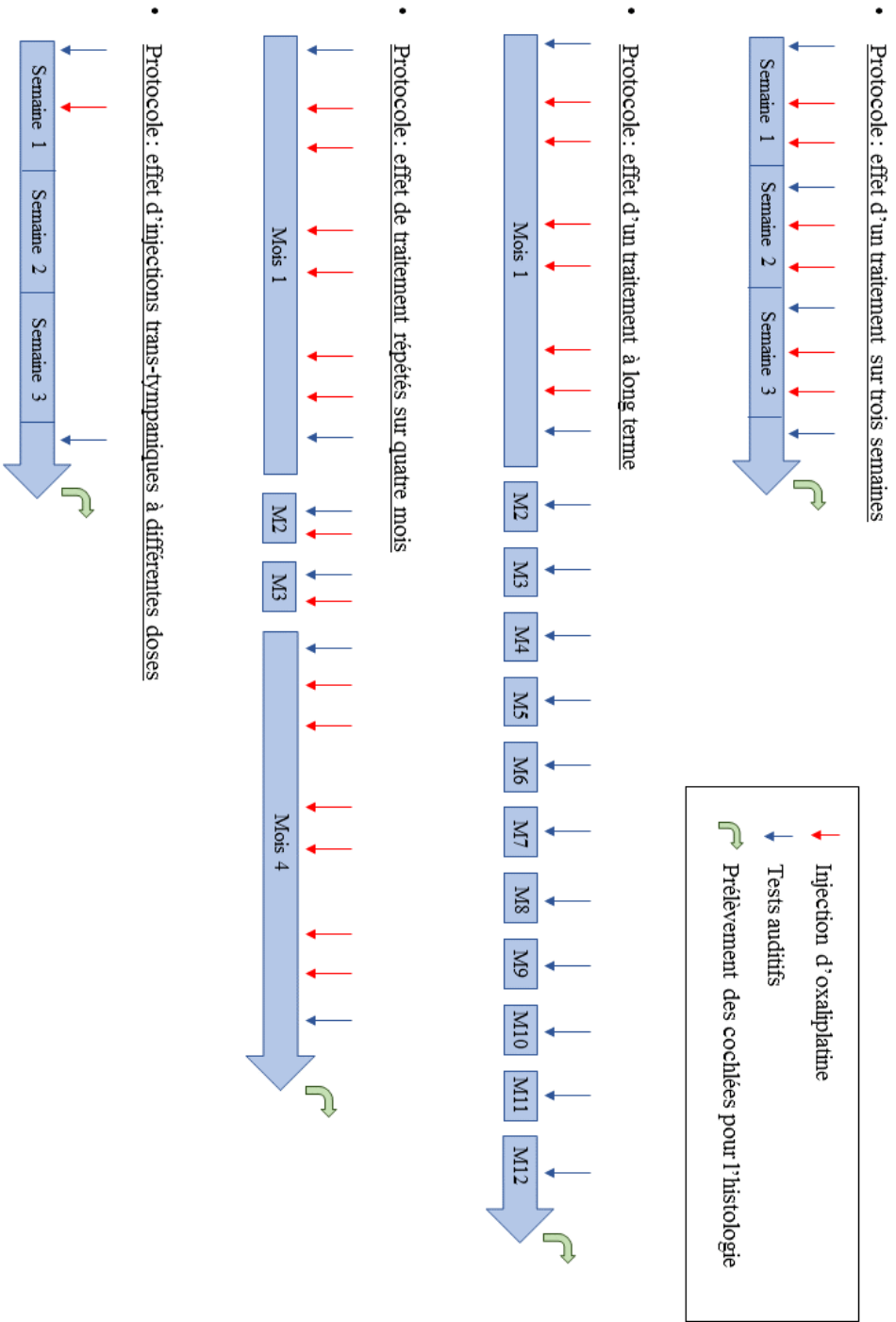
L'oxaliplatine (Leancare Limited) a été diluée dans du sérum glucosé à 5 % à la concentration de 0,3 mg/mL. Les injections intrapéritonéales (i.p.) ont été effectuées deux fois par semaine pendant 3 semaines à la dose de 3 mg/kg (un cycle). Pour étudier l'effet d'injections chroniques à plus long terme, nous avons réitéré ce cycle 5 fois chez un autre groupe de souris. Un chronogramme expérimental est présenté en figure 3.1.

En parallèle, des injections transtympaniques d'oxaliplatine à différentes concentrations ont également été réalisées chez quatre groupes de souris. Les doses ont été choisies à partir de résultats obtenus dans des études portant sur le traitement d'organes de Corti en culture (Ding et al., 2013). Dans ces études, il a été montré que les concentrations de 50 et 100  $\mu\text{M}$  étaient les plus délétères pour la cochlée. Cependant, les notions de perméabilité au niveau de la fenêtre ronde et la biodisponibilité de l'oxaliplatine au niveau cochléaire ne sont pas connues. Nous avons donc choisi de réaliser des injections chez une partie des souris avec une forte dose : 2 mM (n=6), avec des doses intermédiaires : 700  $\mu\text{M}$  (n=5) et 100  $\mu\text{M}$  (n=5) et avec une dose faible : 50  $\mu\text{M}$  (n=5). Des souris contrôles ont reçu des injections avec le véhicule (sérum glucosé à 5 %) pour comparaison.

Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane (Virbac) pendant toute la durée de l'opération. Leurs températures corporelles ont été maintenues à 37 °C grâce à une couverture chauffante (Homeothermic Blanket System - Harvard Apparatus). Les injections ont été

réalisées sous loupe binoculaire à l'aide d'un système composé de deux guides canules de 25 et 30 G (Phymep) collés ensemble et d'un cathéter (Phymep) reliés à une seringue placée dans un pousse-seringue (Harvard Apparatus). Dans un premier temps, le tympan de l'oreille droite a été percé puis le système a été positionné à l'aide d'un micromanipulateur de façon à placer le guide canule de 30 G dans l'oreille moyenne. Ensuite, 20  $\mu$ L de solution d'oxaliplatine ont été injectés en 2 minutes à l'aide d'un pousse seringue. Le système a ensuite été retiré et la souris a été placée sur le côté gauche pendant 30 minutes, toujours sous anesthésie gazeuse, afin que le liquide pénètre bien.





**Figure 3.1 : Chronogramme expérimental**

## **2.3. Tests fonctionnels**

### **2.3.1. Mesures des produits de distorsions acoustiques**

Les produits de distorsions acoustiques (PDA) ont été mesurés grâce à une chaîne de stimulation et d'acquisition fabriquée sur mesure, pilotée par un ordinateur et une plateforme de génération et d'acquisition (NI PXI-1031 National Instrument). Pour cela, un système acoustique miniaturisé (composé de deux haut-parleurs et d'un microphone) a été délicatement inséré dans le conduit auditif externe de la souris.

Un logiciel dédié (EPL Cochlear Function Test Suite - Eaton-Peabody Laboratories - Harvard Medical School) a permis de générer une stimulation composée de deux sons de fréquences  $f_1$  et  $f_2$  avec  $f_2/f_1=1, 20$ . Les niveaux d'amplitude des sons  $f_1$  et  $f_2$ , respectivement L1 et L2, sont identiques. Les PDA ont été mesurés en réponse à des sons d'intensités de 10 à 80 dB SPL par pas de 5 dB. Ils ont été examinés pour des fréquences  $f_2$  de 10, 16, 22 et 32 kHz.

Les PDA étaient considérés comme présents et représentatifs d'une réalité fonctionnelle lorsque le rapport signal/bruit était supérieur ou égal à 7 dB.

### **2.3.2. Mesure des potentiels évoqués auditifs précoces**

Les potentiels évoqués auditifs précoces (PEAp) ont été recueillis à l'aide d'électrodes aiguilles (Medtronic Xomed Inc) placées sous la peau de la souris : l'électrode passive au niveau du vertex, l'électrode active au niveau de la mastoïde et la terre (ou masse) au niveau du dos entre les omoplates. Les impédances des électrodes étaient inférieures à 5 k $\Omega$  au début du test. La réponse provenant des électrodes a été amplifiée (x100 000), filtrée (100-3000 Hz), convertie numériquement et moyennée (500 balayages) par un enregistreur à deux canaux (Neuropack  $\mu$ ® - MEB 9104, Nihon Kodan). Les ondes ont été visualisées avec le logiciel

Examination Manager. Les seuils auditifs ont été définis comme l'intensité sonore minimale produisant les plus petites ondes de PEAp détectables.

Les PEAp ont été obtenus en réponse à une bouffée tonale (20 sinus de montée, 20 sinus de plateau, 20 sinus de descente, avec un filtre de Blackman-Harris, durée=10 ms, cadence=21,1 Hz, polarité alternée, 500 présentations). Le stimulus acoustique a été généré par un générateur de forme arbitraire (TG4001-Thurlby Thandar Instruments) aux fréquences de 10, 16, 22 et 32 kHz. L'intensité du stimulus acoustique a été atténuée grâce à un atténuateur (PA4/SM3/HB6/XB1- Tucker Davies Technologies) puis il a été envoyé à un haut-parleur haute fréquence (FT17H - Fostex) placé dans le conduit auditif externe de la souris.

### **2.3.3. Electrocochléographie**

Pour mesurer le potentiel d'action composite (PAC) du nerf auditif, l'implantation chirurgicale d'une électrode de recueil au niveau de la fenêtre ronde des souris a été nécessaire. Dans un premier temps, la peau a été rasée et nettoyée à l'arrière du pavillon de l'oreille testée puis elle a été incisée. Dans un deuxième temps, les différents plans musculaires ont été dégagés afin de visualiser la bulle osseuse tympanique et une ouverture a été réalisée à l'aide d'une aiguille. Une électrode préparée à partir d'un fil de platine gainé de Téflon a ensuite été introduite jusqu'à atteindre la fenêtre ronde. Elle a été placée dans la niche de la fenêtre ronde pour la durée de l'enregistrement du PAC. Une électrode de référence a également été placée sous la peau du dos de la souris. A la fin de la mesure, l'électrode a été retirée puis la peau de l'animal a été refermée à l'aide d'un fil de suture aseptisé.

Le PAC a été mesuré en réponse à une bouffée tonale (20 sinus de montée, 20 sinus de plateau, 20 sinus de descente, avec un filtre de Blackman-Harris, durée=10 ms, cadence=21,1 Hz, polarité alternée, 200 présentations). Le stimulus acoustique a été généré par

un générateur de forme arbitraire (TG4001-Thurlby Thandar Instruments) aux fréquences de 10, 16, 22 et 32 kHz. L'intensité du stimulus acoustique a été atténuée grâce à un atténuateur (PA4/SM3/HB6/XB1- Tucker Davies Technologies) puis il a été envoyé à un haut-parleur haute fréquence (FT17H - Fostex) placé dans le conduit auditif externe de la souris. L'amplitude N1-P1 du PAC a été mesurée pour des niveaux de stimulation allant de 20 à 90 dB SPL par pas de 10 dB.

#### **2.3.4. Test de suppression controlatérale des otoémissions**

Le test de suppression controlatérale des otoémissions a été effectué avec un Otophyllab (RT lab) sur les différents groupes de souris, sous anesthésie (injection i.p. d'un mélange de kétamine et de xylazine). Les PDA ont été enregistrés avec les paramètres :  $f_2=16$  kHz avec  $f_1/f_2=1.25$  et  $L_1=L_2=55$  dB SPL. Un bruit blanc (3-30 kHz) a été émis dans l'oreille controlatérale avec un haut-parleur (FT17H - Fostex) à une intensité de 73 dB SPL. Il a été généré avec un générateur (8904A Multifunction Synthesizer DC-600kHz - Hewlett-Packard) et atténué avec un atténuateur (PA5 Programmable Attenuator - Tucker-Davis Technologies) avant d'être injecté dans le haut-parleur. Chaque point sur le tracé obtenu est la moyenne des réponses obtenues avec 40 stimulations. Un cycle de stimulation était composé d'1 minute sans bruit blanc et d'1 minute avec bruit blanc. Des cycles ont été effectués en continu jusqu'au réveil de la souris pour obtenir la variation  $\Delta$ PDA maximale. Cette variation étant fonction de l'état d'éveil de l'animal. Le  $\Delta$ PDA a été établi en soustrayant l'amplitude minimale des PDA obtenue lors de l'envoi du bruit blanc à la valeur moyenne basale obtenue sans bruit blanc.

## **2.4. Histologie**

### **2.4.1. Microscopie optique**

A la fin des manipulations, les os temporaux ont été prélevés après sacrifice des souris par surdosage de pentobarbital. Ils ont ensuite été disséqués sous loupe binoculaire dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline, Sigma-Aldrich) afin de récupérer les cochlées. Elles ont été placées dans du PFA à 4 % (Paraformaldéhyde, Sigma-Aldrich) une nuit à 4 °C. Le jour suivant, les échantillons ont été rincés 3 fois pendant 10 minutes avec du PBS à 0,1 M puis placés dans une solution d'EDTA (Acide éthylène diamine tétraacétique, Sigma-Aldrich) à 0,5 M pendant 7 jours. La solution d'EDTA a été renouvelée tous les jours pendant cette période. Les échantillons ont été rincés 3 fois au PBS pendant 10 minutes puis ils ont été mis dans de l'alcool à 70 °C. Ils ont été placés dans un automate pour la nuit et ont été déshydratés dans différents bains d'alcool (de 70 ° à 100 °) puis dans un bain de solvant Ottix plus (Diapath). Les cochlées ont ensuite été incluses en paraffine puis les blocs obtenus ont été coupés au microtome par tranche de 5 µm. Les coupes ont été déparaffinées puis colorées selon le protocole de coloration hématoxyline éosine safran (HES). Enfin, elles ont été montées entre lame et lamelle avec de la colle Eukitt (Sigma-Aldrich). Les lames ont été visualisées avec un microscope optique (Revelation III LED, LW Scientific) et les photos ont été prises à l'aide d'une caméra et du logiciel dédié ISCapture. Pour le comptage des cellules du ganglion spiral, un masque correspondant à un rectangle de 90x80 µm a été superposé aux images dans la zone d'intérêt, et toutes les cellules visibles dans cette zone ont été dénombrées à l'aide du logiciel ImageJ. Un total de 4 à 5 coupes a été compté par cochlée pour chaque zone du ganglion spiral (tour apical, tour intermédiaire et tour basal).

### 2.4.2. Microscopie confocale

Après fixation au PFA à 4 % pendant 1 heure, les cochlées ont été rincées dans du tampon PBS à 0,1 M et placées dans de l'EDTA à 0,5 M pendant une nuit afin de les décalcifier. Elles ont ensuite été rincées une nouvelle fois avec du PBS à 0,1 M et disséquées afin de retirer la capsule osseuse, la strie vasculaire et la membrane tectoriale. Chaque tour de cochlée (apex, medium, base) a été séparé puis placé dans une solution de blocage contenant 0,1 M de PBS, 4 % de TritonX100 (Sigma-Aldrich) et 5 % de sérum d'âne (Sigma-Aldrich) pendant 90 minutes.

Les préparations d'organe de Corti ont été rincées au PBS et incubées 48 heures à 4 °C sous agitation avec les anticorps primaires dans une solution contenant 0,1 M de PBS, 0,1 % de TritonX100 et 1 % de sérum d'âne. Les anticorps primaires étaient : un anti-neurofilament 200 (anti-NF) (Sigma-Aldrich) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> et un anti-choline acétyltransférase (anti-ChAT) (Millipore) dilué au 1/100<sup>ème</sup>. Les préparations ont ensuite été rincées au PBS à 0,1 M et incubées pendant 24 heures à température ambiante avec les anticorps secondaires dans 0,1 M de PBS et 0,1 % de TritonX100. Les anticorps secondaires étaient fabriqués l'un chez la chèvre (Invitrogen) et l'autre chez l'âne (Millipore). Les préparations ont été une dernière fois incubées avec du Topro3 (Sigma-Aldrich) au 1 :1000<sup>ème</sup> pour marquer les noyaux des cellules et une partie d'entre elles ont également été incubées avec de la Phalloïdine-Atto 488 (Sigma-Aldrich) au 1 :2000<sup>ème</sup> pour marquer l'actine présente dans les stéréocils. Enfin, les préparations ont été montées entre lame et lamelle dans du milieu Fluoroshield (Sigma-Aldrich). Les lames ont été visualisées au microscope confocal (Leica tcs Sp5).

## **2.5. Analyse statistique**

Sur les graphiques, les valeurs moyennes sont exprimées  $\pm$  une fois l'erreur standard ( $\pm$ SEM). Lorsque les conditions d'application d'un test paramétrique étaient respectées (distribution normale des échantillons), la comparaison de deux groupes a été effectuée à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk. Sinon, un test non paramétrique a été utilisé, le test Wilcoxon-Mann-Whitney. Les comparaisons ont été effectuées entre chaque groupe de souris traitées avec l'oxaliplatine et le groupe de souris contrôle. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Sigma-plot (Systat Software Inc).

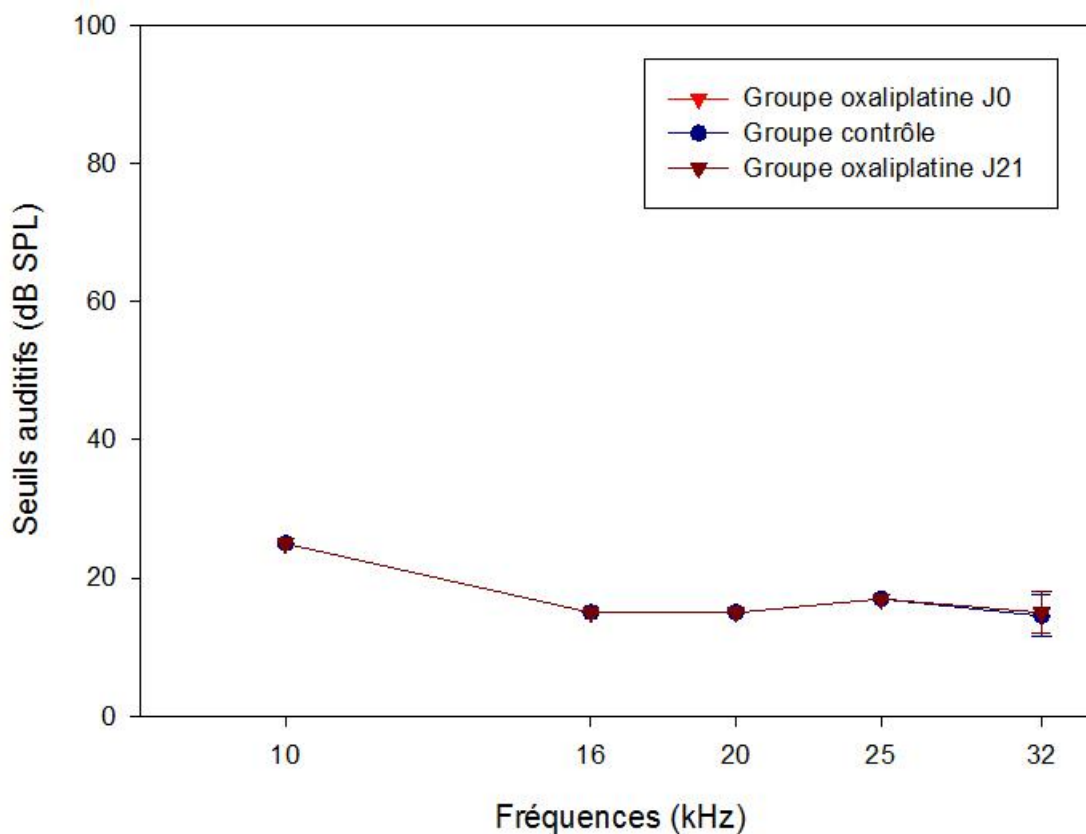
### **3. Résultats**

#### **3.1. Effet d'un cycle de traitement d'oxaliplatine sur le système auditif**

##### **3.1.1. Évolution des seuils auditifs obtenus avec la mesure des potentiels évoqués auditifs précoces (PEAp)**

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet d'un traitement d'oxaliplatine sur le système auditif, avec 2 injections à 3 mg/kg par semaine, pendant 3 semaines. Les seuils auditifs ont été mesurés avec les PEA<sub>p</sub>, pour le groupe de souris contrôles et de souris traitées avant le début des injections d'oxaliplatine (J0). Les audiogrammes ont également été déterminés à la fin du traitement (J21). Les seuils auditifs ont été mesurés en réponse à des bouffées tonales, aux fréquences de 10, 16, 20, 25 et 32 kHz, ils sont présentés en figure 3.2.



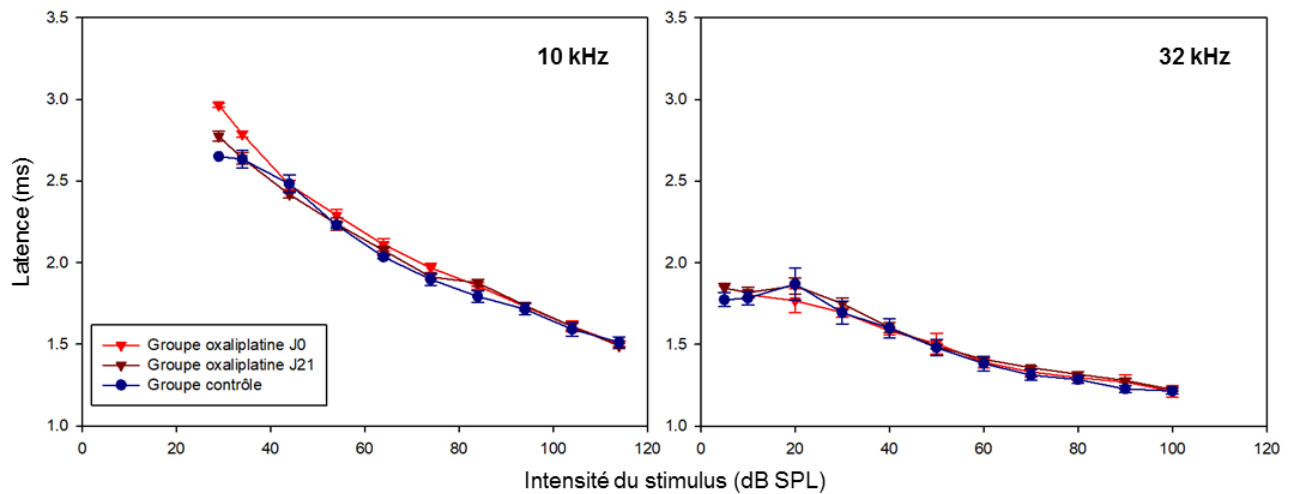


**Figure 3.2 :** Le traitement avec l'oxaliplatine n'entraîne pas de modification des seuils auditifs évalués par les PEAp.

Seuils auditifs moyens ( $\pm$ SEM) mesurés à l'aide des potentiels évoqués auditifs aux fréquences de 10, 16, 20, 25 et 32 kHz pour le groupe de souris traitées (n=8) et le groupe de souris contrôles (n=4) avant (J0) et après le traitement (J21).

Les souris traitées avec l'oxaliplatine présentent des audiogrammes subnormaux pendant toute la durée de l'expérimentation, leurs seuils auditifs moyens sont de 25 dB SPL à 10 kHz, et de 15 dB SPL à 16, 20, 25 et 32 kHz. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les seuils auditifs, évalués avec les PEAp, des souris contrôles et ceux des souris qui ont reçu les injections d'oxaliplatine.

### 3.1.2. Évolution de la latence de l'onde I des PEAp



**Figure 3.3 :** Le traitement avec l'oxaliplatine n'entraîne pas de modification de la latence de l'onde I des PEAp.

Latence de l'onde I des PEAp ( $\pm$ SEM) en fonction de l'intensité du stimulus à 10 et 32 kHz pour les groupes contrôle (n=4) et ayant reçu les injections d'oxaliplatine (n=8).

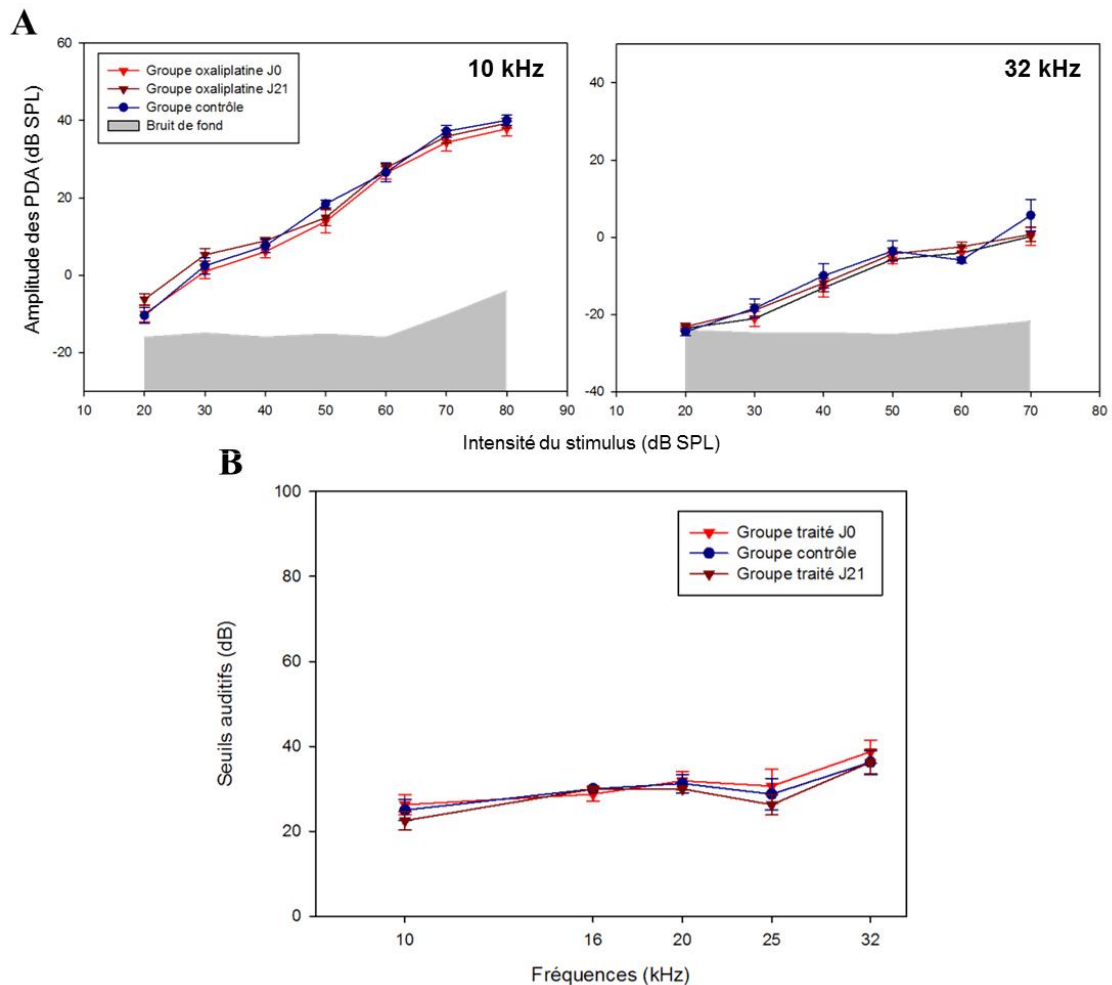
L'évolution de la latence de l'onde I des PEAp en fonction de l'intensité du stimulus est présentée en figure 3.3. À 10 kHz, la latence de l'onde I est comprise entre 1,9 et 3 ms, chez les souris du groupe oxaliplatine, il n'y a pas de différence significative avec les souris contrôles. À 32 kHz la latence de l'onde I évolue entre 1,2 et 1,8 ms et, là encore, il n'y a statistiquement pas de différence entre le groupe contrôle et le groupe oxaliplatine.

### 3.1.3. Effet de l'oxaliplatine sur l'anatomie et la physiologie des CCE

#### a. Mesure des produits de distorsion acoustiques (PDA)

Pour déterminer si l'oxaliplatine a un effet délétère sur la fonction des CCE, nous avons mesuré les PDA des souris contrôles et des souris ayant reçu les injections d'oxaliplatine à J0 et J21. Ainsi, l'amplitude des PDA et les seuils des PDA ont été déterminés aux fréquences de

10, 16, 20, 25 et 32 kHz (Figure 3.4). Les PDA ont été considérés comme représentatifs d'une réalité fonctionnelle lorsque le rapport signal sur bruit était supérieur ou égal à 7 dB.



**Figure 3.4 :** Le traitement avec l'oxaliplatine ne modifie pas les PDA.

Amplitude des PDA ( $\pm$ SEM) en fonction de l'intensité du stimulus envoyé pour les fréquences de 10 et 32 kHz (A) et seuils des PDA ( $\pm$ SEM) aux fréquences de 10, 16, 20, 25 et 32 kHz pour le groupe de souris traitées (n=8) et pour le groupe de souris contrôles (n=4) à J0 et J21 (B).

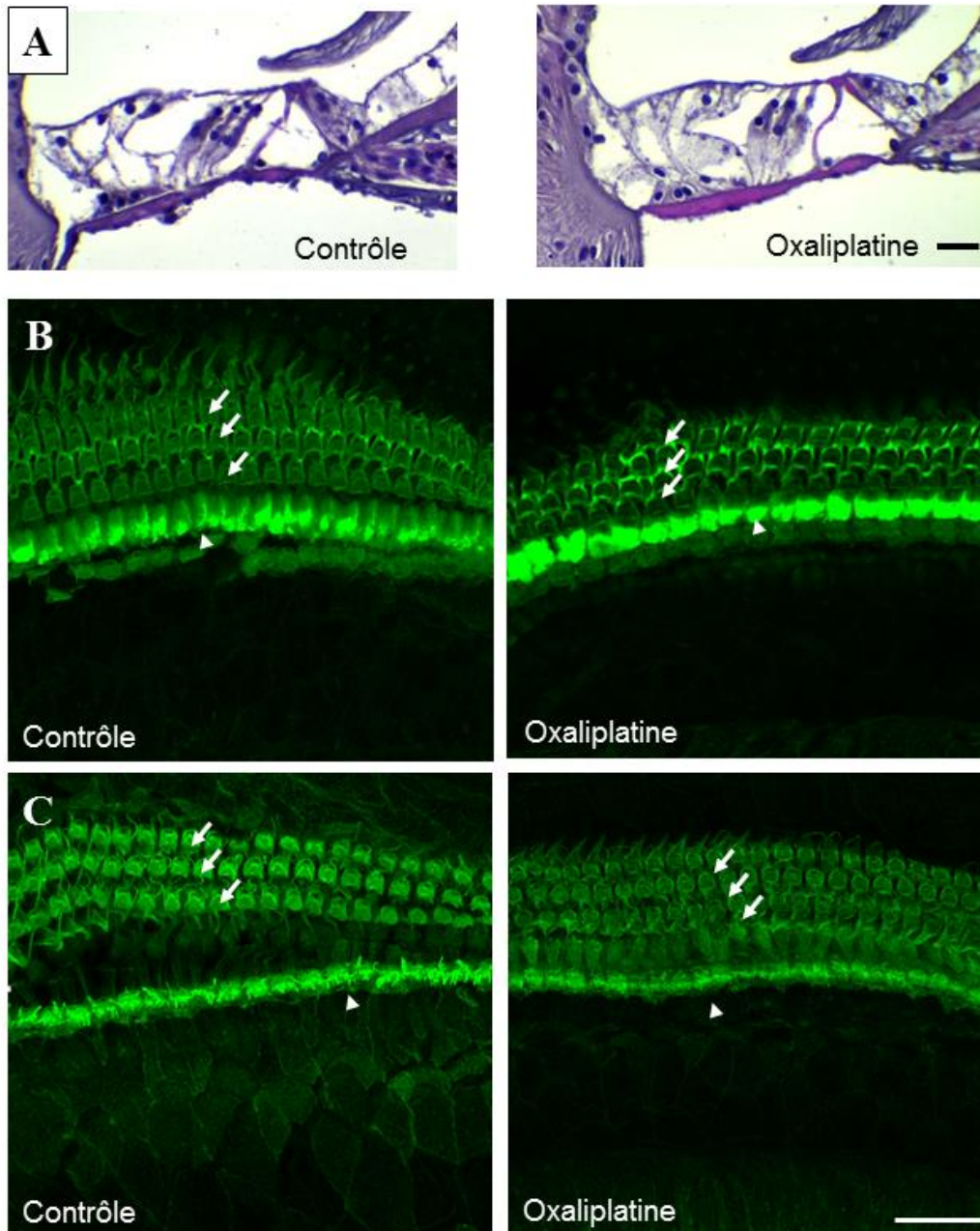
Les amplitudes des PDA des souris ayant reçu les injections d'oxaliplatine ne sont pas significativement différentes de celles des souris contrôle à 10 kHz et 32 kHz. De la même façon, les seuils des PDA sont similaires chez les deux groupes de souris.

La fonction des CCE semble donc préservée. Pour confirmer cette constatation fonctionnelle, ainsi que pour visualiser l'aspect des CCI, nous avons réalisé des analyses histologiques.

*b. Observation de la conformation des cellules ciliées*

Les CCE présentes au niveau des tours intermédiaire et basal de la cochlée ont été visualisées au microscope optique et au microscope confocal. Les images sont présentées en figure 3.5.

Sur les coupes de cochlée des souris contrôles et des souris traitées à l'oxaliplatine, les trois rangées de CCE et la rangée de CCI du tour basal ne présentent pas d'altération (Figure 3.5, A). De plus, les images acquises en microscopie confocale montrent que les touffes stéréociliaires des cellules sensorielles des tours intermédiaire et basal de la cochlée ne présentent pas non plus d'atteinte à la suite du traitement avec l'oxaliplatine (Figure 3.5, B, C).

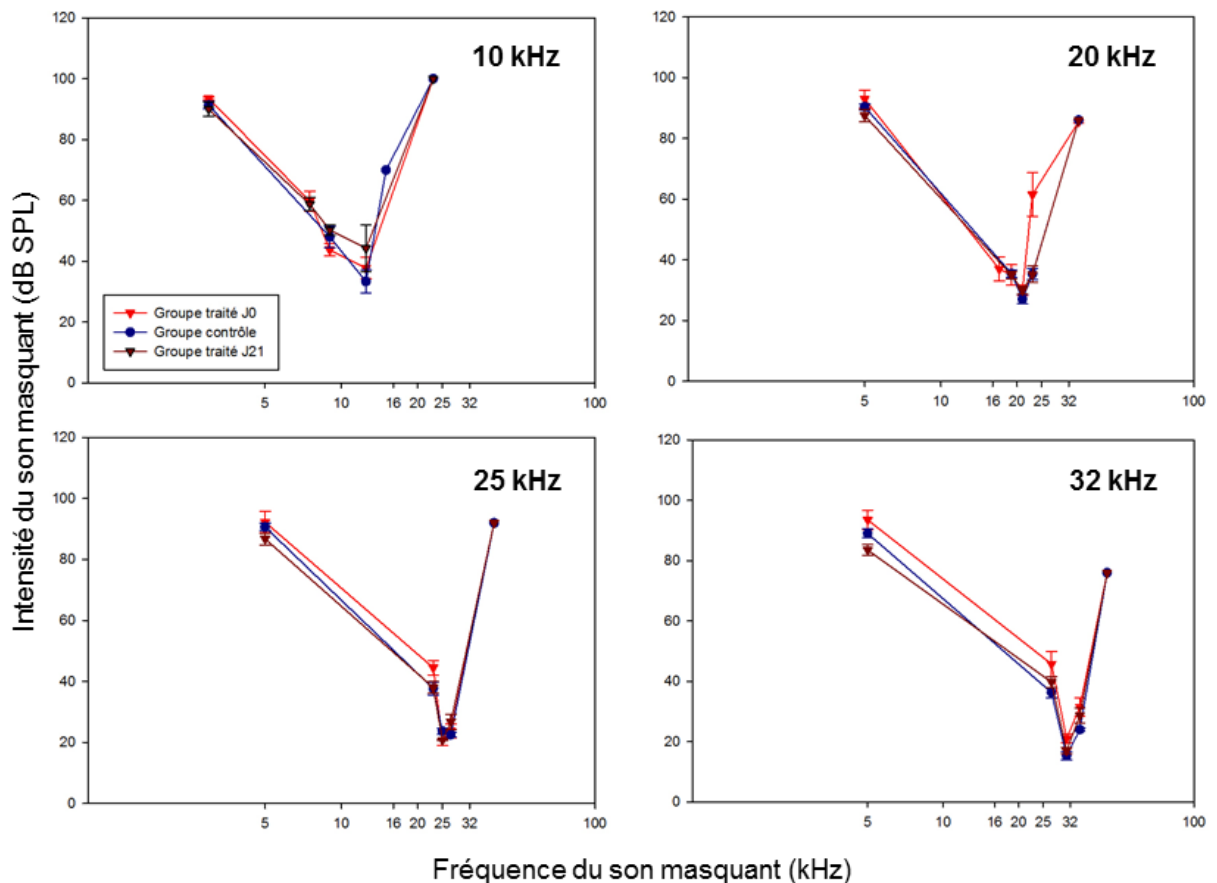


**Figure 3.5 :** Le traitement avec l'oxaliplatine n'entraîne pas d'atteinte des CCE et des CCI.

Images de coupes de cochlées correspondant au tour basal de la cochlée de souris contrôles et traitées avec de l'oxaliplatine, acquises avec un microscope optique (A). Photomicrographies de section d'organe de Corti des tours intermédiaire (B) et basal (C) de la cochlée de souris contrôles et de souris ayant reçu des injections d'oxaliplatine visualisées avec un microscope confocal. Sur ces sections, l'actine a été immunomarquée à l'aide de la phalloïdine les trois rangées de CCE sont bien visibles (flèches) ainsi que la rangée de CCI (têtes de flèche). À : Barre d'échelle : 15  $\mu\text{m}$ . B-C : Barre d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.4. Effet de l'oxaliplatine sur la sélectivité fréquentielle de la cochlée

L'effet de l'oxaliplatine sur la sélectivité fréquentielle de la cochlée a été évalué avec l'établissement de courbes d'accord de masquage à J0 et J21. Elles sont présentées en figure 3.6 pour les fréquences de 10, 20, 25 et 32 kHz.



**Figure 3.6 :** Le traitement avec l'oxaliplatine n'entraîne pas de modification de la sélectivité fréquentielle de la cochlée.

Courbes d'accord de masquage moyennes ( $\pm$ SEM) aux fréquences cibles de 10, 20, 25 et 32 kHz pour les groupes contrôle (n=3) et oxaliplatine (n=4) à J0 et J21.

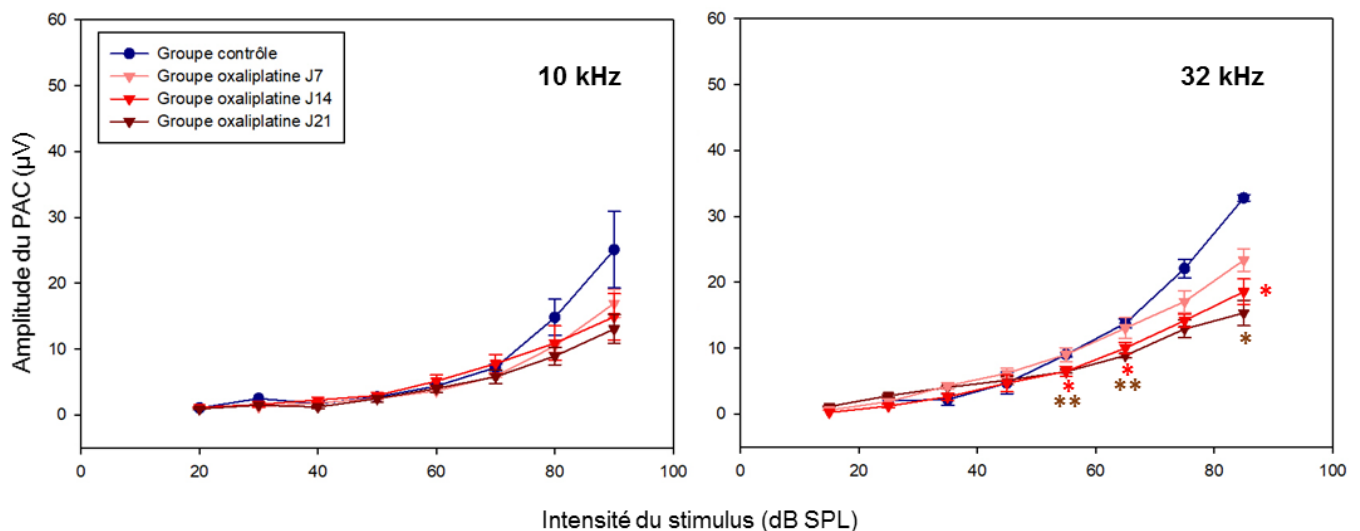
Pour les sons cibles de 10 à 32 kHz, les courbes d'accord de masquage sont identiques et centrées sur la fréquence caractéristique chez les souris contrôles et les souris ayant reçu les injections d'oxaliplatine. La pointe de la courbe d'accord où le masquage est le plus efficace

est située au niveau de la fréquence cible proche du seuil auditif mesuré avec les PEAp ( $\pm 10$  dB).

### 3.1.5. Effet de l'oxaliplatine sur le nerf auditif

#### a. Évolution de l'amplitude du PAC

Pour détecter une éventuelle atteinte des fibres du nerf auditif, nous avons mesuré l'amplitude des ondes N1-P1 du PAC en plaçant une électrode au niveau de la fenêtre ronde chez des souris contrôle et des souris ayant reçu des injections d'oxaliplatine. Les résultats sont présentés en figure 3.7 pour des stimuli de 15 à 90 dB SPL aux fréquences de 10 et 32 kHz.



**Figure 3.7 :** L'amplitude du PAC à 32 kHz est diminuée chez les souris ayant reçu des injections d'oxaliplatine.

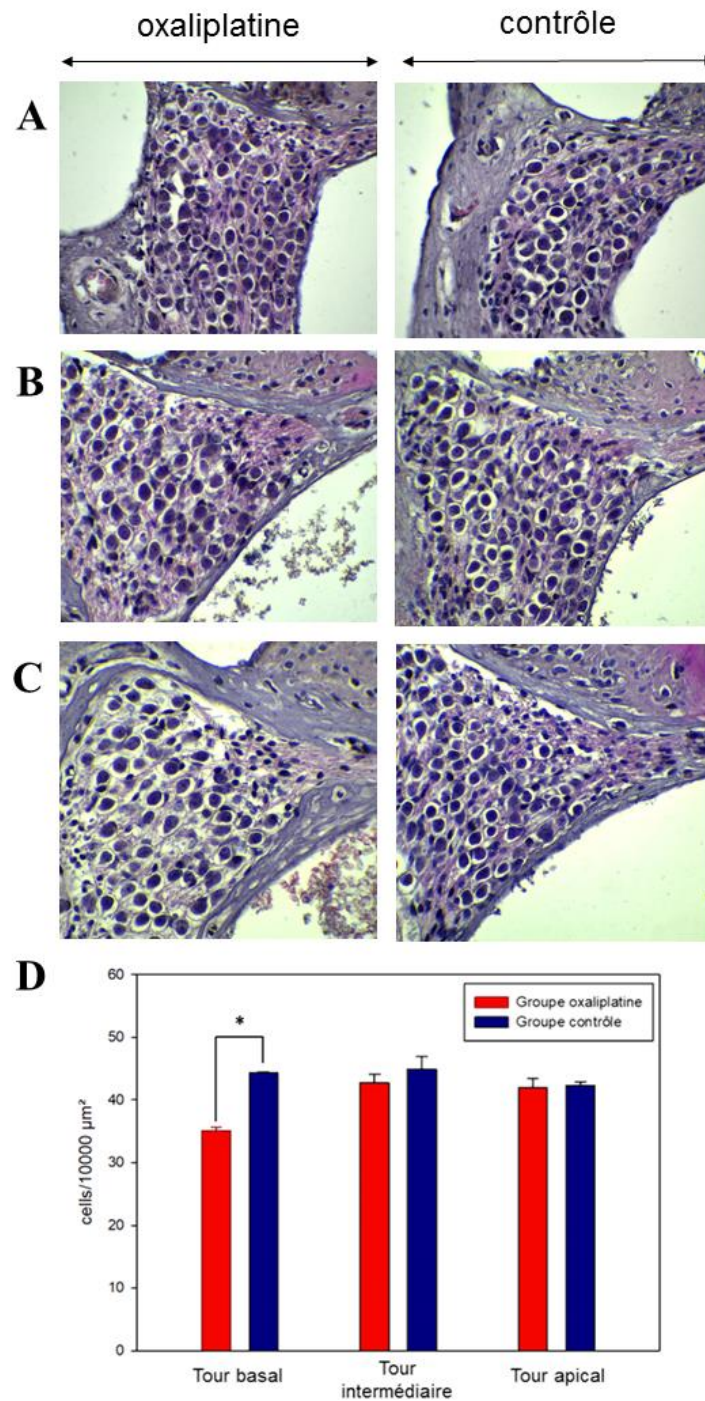
Amplitude N1-P1 du PAC ( $\pm$ SEM) en fonction de l'intensité du stimulus envoyé aux fréquences de 10 et 32 kHz pour le groupe contrôle (n=3) et pour le groupe ayant reçu des injections d'oxaliplatine (n=3) à J7, J14 et J21. (\*p<0,05)

À 10 kHz, l'amplitude moyenne du PAC des souris ayant reçu les injections d'oxaliplatine n'est pas significativement différente de celle des souris contrôle malgré une diminution à haute intensité. À 32 kHz, il y a une différence significative entre les deux groupes de souris dès 2 semaines de traitement. L'amplitude moyenne du PAC des souris contrôles est de  $33 \pm 0,5 \mu\text{V}$  pour un stimulus de 85 dB SPL, chez les souris oxaliplatine elle n'est plus que de  $15,3 \pm 1,9 \mu\text{V}$  à J21. Cette amplitude est également significativement diminuée pour des stimuli de 55 et 65 dB SPL.

*b. Effet de l'oxaliplatine sur les cellules du ganglion spiral*

Afin de déterminer si l'oxaliplatine a un effet sur le ganglion spiral qui contient les corps cellulaires des neurones auditifs, nous avons réalisé des coupes longitudinales de cochlée. Ainsi nous avons pu visualiser les ganglions spiraux de l'apex, du niveau intermédiaire et de la base de la cochlée. Nous avons également réalisé un comptage des cellules se situant dans ces ganglions spiraux chez les souris contrôles et chez les souris ayant reçu les injections d'oxaliplatine. Les résultats sont présentés en figure 3.8.





**Figure 3.8 : Le traitement avec l'oxaliplatine entraîne une diminution de la densité des cellules du ganglion spiral à la base de la cochlée.**

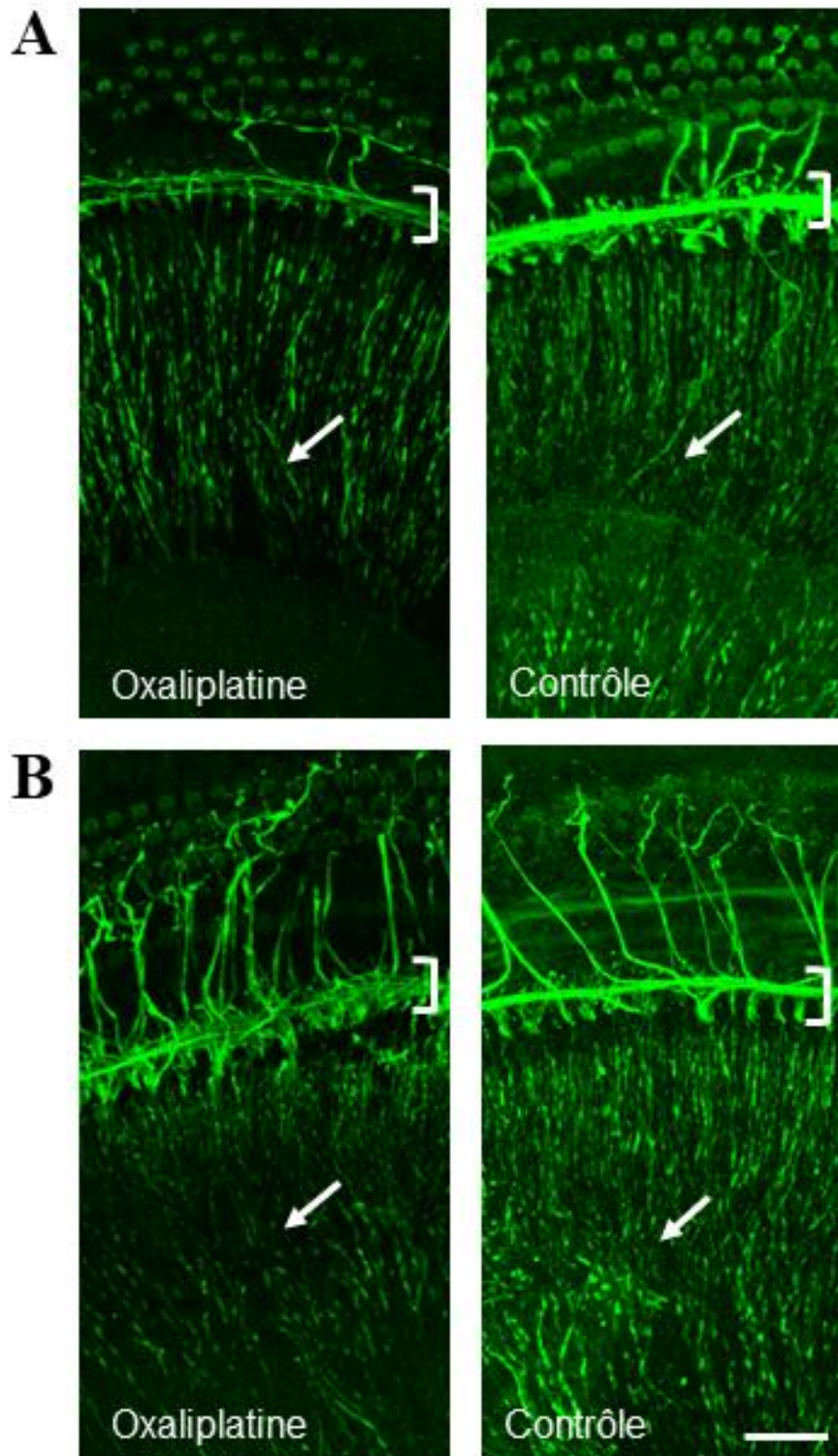
Image de coupes de cochlées visualisées au microscope optique (A, B). Ganglion spiral du tour basal de la cochlée d'une souris contrôle (A) et d'une souris traitée (B). Un comptage des cellules des ganglions spiraux ( $\pm$ SEM) des tours apicaux, intermédiaires et basaux a été réalisé chez des souris contrôles (n=4) et chez des souris ayant reçu des injections d'oxaliplatine (n=4) (C). (\* p<0,05)

Au niveau des ganglions spiraux de l'apex et du tour intermédiaire de la cochlée, il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes de souris : la densité moyenne des cellules est de 42 cellules/10000  $\mu\text{m}^2$  à l'apex et de 44 cellules/10000  $\mu\text{m}^2$  au niveau du tour intermédiaire (Figure 3.8, A, B, D).

Au niveau du ganglion spiral du tour basal de la cochlée, la densité moyenne des cellules est de  $44,3 \pm 0,2$  cellules/10000  $\mu\text{m}^2$  chez les souris contrôle. Chez les souris ayant reçu des injections d'oxaliplatine, la densité moyenne des cellules est de  $35,1 \pm 0,5$  cellules/10000  $\mu\text{m}^2$  ce qui correspond à une diminution significative de 21 % (Figure 3.8, C, D). De plus, une diminution de la densité des fibres auditives était également visible chez les souris oxaliplatine par comparaison avec les souris contrôle (Figure 3.8, C).

### *c. Effet de l'oxaliplatine sur les fibres du nerf auditif*

Pour mieux évaluer la perte des fibres auditives observée précédemment au niveau du ganglion spiral, nous avons réalisé des marquages avec un anticorps anti-neurofilament sur des sections de tours de cochlées de souris contrôles et de souris ayant reçu des injections d'oxaliplatine. Les images obtenues sont présentées en figure 3.9.



**Figure 3.9 :** Le traitement avec l'oxaliplatine entraîne une diminution de la densité des fibres auditives au niveau des tours intermédiaire et basal de la cochlée.

Portions des tours intermédiaires (A) et basaux (B) de cochlées de souris contrôles et traitées avec de l'oxaliplatine, immunomarquées avec un anticorps anti-neurofilament et visualisées au microscope confocal.

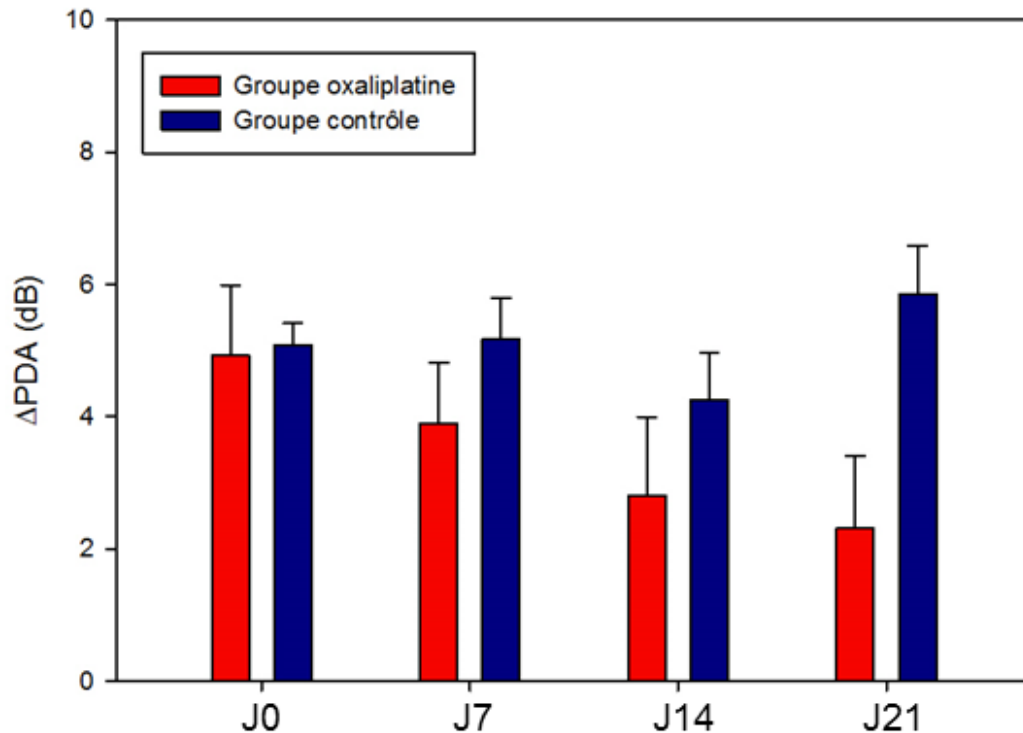
Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. Crochet : faisceau spiral interne. Flèche : axones des neurones auditifs.

Chez les souris contrôles, les axones des neurones auditifs forment des faisceaux de fibres (Figure 3.9, A-B, flèches blanches) au niveau des tours intermédiaire (Figure 3.9, A) et basal (Figure 3.9, B) dont la densité est diminuée chez les souris traitées avec l'oxaliplatine. De plus, le faisceau spiral interne (Figure 3.9, A-B, crochets) semble réduit (Figure 3.9, A) ou désorganisé (Figure 3.9, B) chez ces souris par rapport aux souris contrôles.

#### *d. Effet de l'oxaliplatine sur le système efférent*

- Évolution du réflexe du système efférent olivocochléaire médian

Pour évaluer l'effet de l'oxaliplatine sur le système efférent, nous avons dans un premier temps mesuré le réflexe du système efférent olivocochléaire médian (SEOCM) des souris traitées avec l'oxaliplatine et contrôles, sous anesthésie, avec le test de suppression controlatérale des otoémissions. Nous avons quantifié l'effet supprimeur d'un bruit blanc, envoyé dans l'oreille controlatérale, sur les PDA ( $\Delta$ PDA). Cette variation, entraînée par l'activation du SEOCM, a été mesurée chaque semaine pendant le cycle d'injection d'oxaliplatine. Elle a été mesurée en parallèle sur un groupe de souris contrôle (Figure 3.10).



**Figure 3.10 :** Le traitement avec l'oxaliplatine semble entraîner une diminution du réflexe du SEOCM.

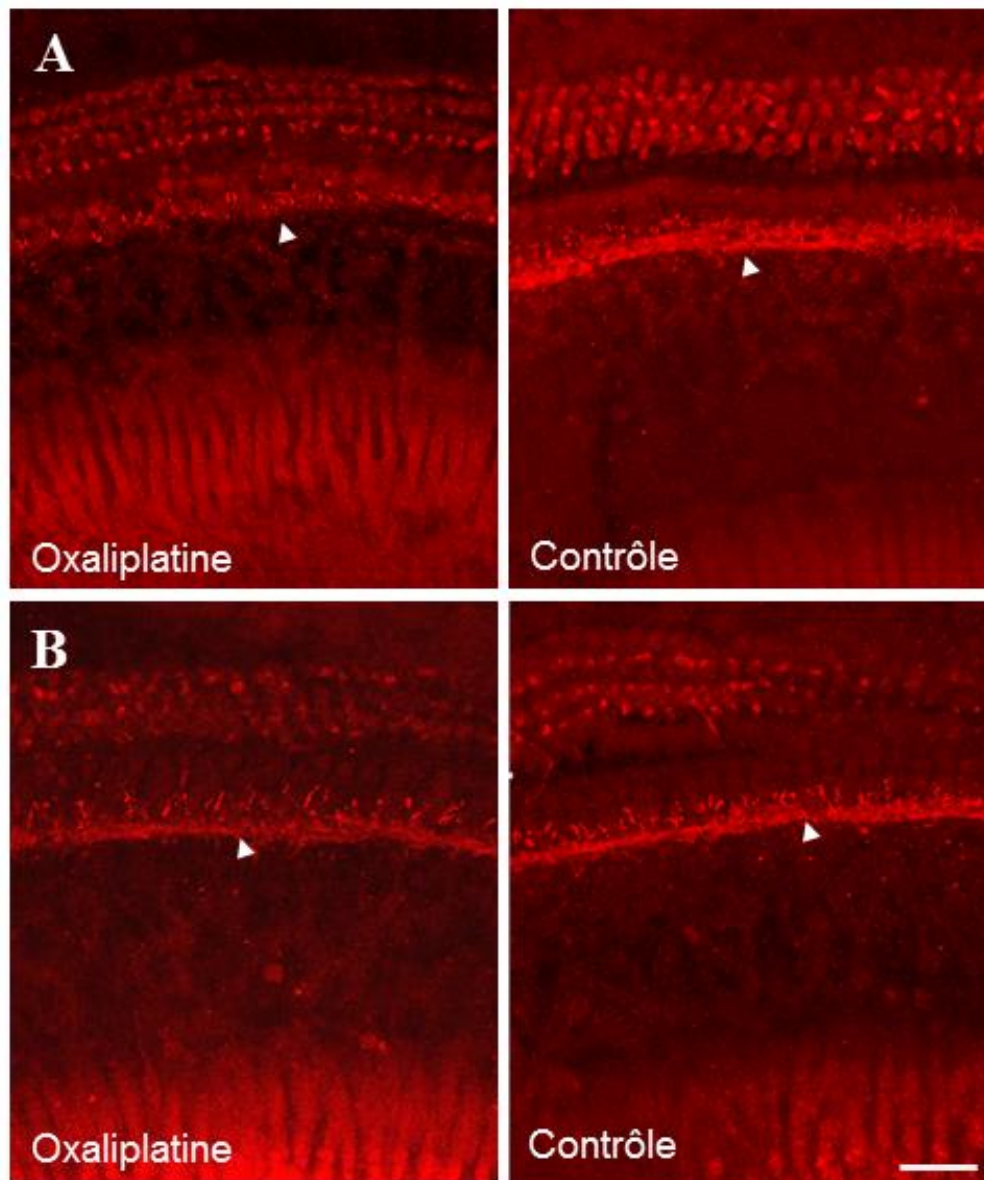
Variation de l'amplitude des PDA ( $\Delta$ PDA) ( $\pm$ SEM) suite à l'envoi d'un bruit blanc dans l'oreille controlatérale en fonction du temps pour les groupes de souris contrôle (n=4) et oxaliplatine (n=4).

La variation de l'amplitude des PDA ( $\Delta$ PDA) provoquée par l'envoi d'un bruit blanc controlatéral est comprise entre 4,2 et 5,8 dB sur les 4 semaines de mesure chez les souris du groupe contrôle (Figure 3.10). Elle reste donc relativement stable chez ce groupe souris. La  $\Delta$ PDA des souris traitées avec l'oxaliplatine diminue au cours du temps, elle est de 4,9 dB au début du traitement et atteint 2,3 dB en fin de traitement. Cette diminution n'est pas significative statistiquement, mais elle semble indiquer une tendance.



- Effet de l'oxaliplatine sur les fibres du système efférent

Pour évaluer la densité des fibres du système efférent latéral et olivocochléaire médian, nous avons réalisé un marquage de sections de cochlées avec un anticorps anti-choline acétyl transférase (ChAT). Les images obtenues sont présentées en figure 3.11.



**Figure 3.11 :** Le traitement avec l'oxaliplatine semble entraîner une diminution de la densité des fibres efférentes auditives au niveau des tours intermédiaire et basale de la cochlée.

Portions des tours intermédiaires (A) et basales (B) de cochlées de souris contrôles et traitées avec de l'oxaliplatine, immunomarquées avec un anticorps anti-choline acétyl transférase et visualisées au microscope confocal. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. Tête de flèche : faisceau spiral interne.

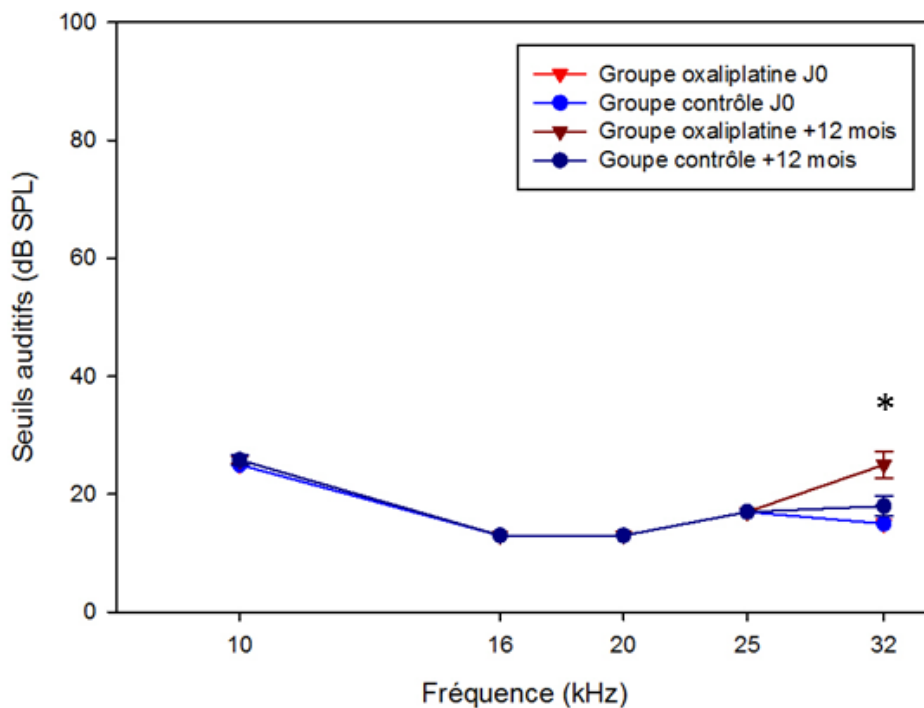
Chez les souris contrôles, le faisceau spiral interne est dense (Figure 3.11, A-B, têtes de flèche) et les boutons efférents des CCE sont visibles au niveau du tour intermédiaire (Figure 3.11, A) et du tour basal (Figure 3.11, B), il manque cependant les faisceaux d'axones se projetant en direction du modiulus. Chez les souris ayant reçu des injections d'oxaliplatine, la densité des fibres du faisceau spiral interne semble diminuée. Ces données, bien que préliminaires, semblent indiquer une atteinte du système efférent par l'oxaliplatine.

**Ces résultats indiquent que l'oxaliplatine n'a pas d'effet ototoxique. En effet, le traitement avec cette drogue ne provoque pas de modification des seuils auditifs mesurés avec les PEAp et des seuils des PDA, il n'y a donc pas d'atteinte des CCE. L'oxaliplatine semble néanmoins avoir un effet neurotoxique car une diminution de la densité des fibres, et des neurones auditifs de la base de la cochlée a été mise en évidence. Cette constatation histologique est appuyée par une diminution de l'amplitude du PAC à haute fréquence. L'oxaliplatine pourrait également avoir un effet délétère sur le système efférent, car elle semble entraîner une diminution du réflexe du SEOCM, et une diminution de la densité des fibres efférentes (données préliminaires).**

### 3.2. Effet d'un cycle de traitement avec l'oxaliplatine sur le système auditif à long terme

#### 3.2.1. Évolution des seuils auditifs mesurés avec les PEAp à long terme

Afin d'étudier l'effet à long terme d'un cycle de traitement d'oxaliplatine sur l'audition, nous avons réalisé un suivi sur 12 mois des souris ayant subi un cycle d'injections d'oxaliplatine en évaluant leur audition chaque mois. Un groupe de souris contrôle a également été suivi pendant cette période. Les seuils auditifs moyens mesurés avec les PEAp avant la cure d'oxaliplatine et 12 mois plus tard sont présentés en figure 3.12.



**Figure 3.12 :** Les seuils auditifs sont peu affectés, un an après le traitement avec l'oxaliplatine.

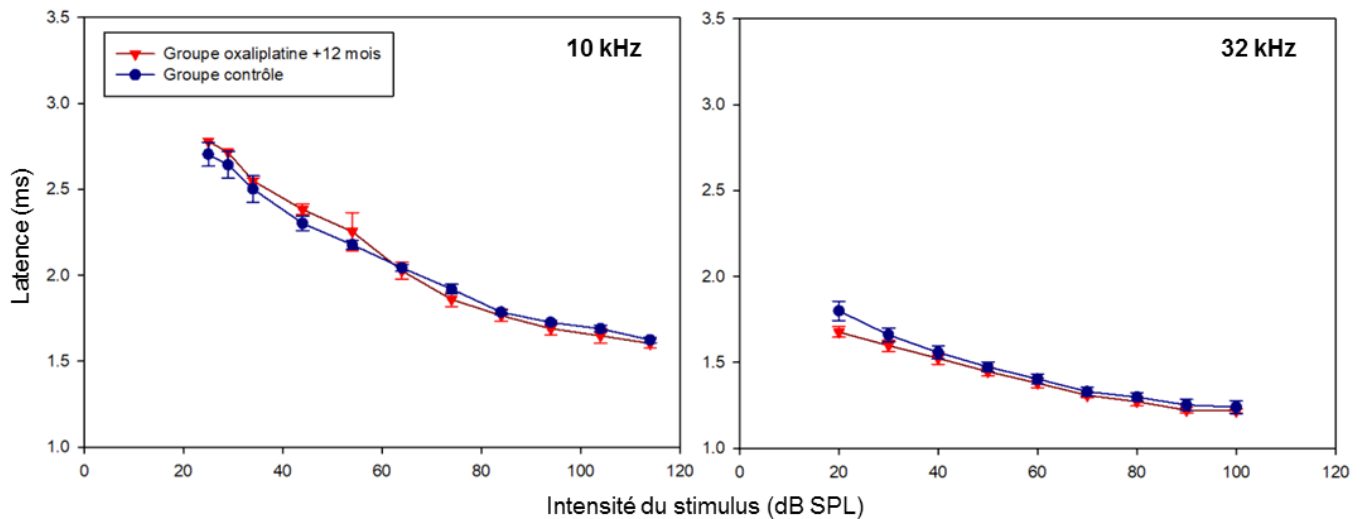
Seuils auditifs moyens ( $\pm$ SEM) mesurés à l'aide des PEAp aux fréquences de 10, 16, 20, 25 et 32 kHz pour le groupe de souris ayant subi une cure d'oxaliplatine (n=5) et le groupe de souris contrôles (n=5).



Les seuils auditifs moyens mesurés avec les PEAp sont restés stables, pendant 12 mois, aux fréquences de 10 à 25 kHz pour les souris contrôles et pour les souris ayant reçu des injections d'oxaliplatine (Figure 3.12). Une élévation significative du seuil auditif à 32 kHz n'a été constatée qu'après 12 mois chez les souris du groupe oxaliplatine. Cependant, la différence entre les deux groupes n'est que de  $7 \pm 2$  dB et les seuils auditifs restent situés en dessous de 35 dB SPL. L'oxaliplatine a donc peu d'effet sur les seuils auditifs mesurés avec les PEAp.

### 3.2.2. Évolution de la latence de l'onde I des PEAp à long terme

La latence de l'onde I des PEAp a également été mesurée chez les souris pendant 12 mois à la suite du traitement avec l'oxaliplatine. Les résultats sont présentés comparativement au groupe contrôle, évalué en même temps, sur la figure 3.13.



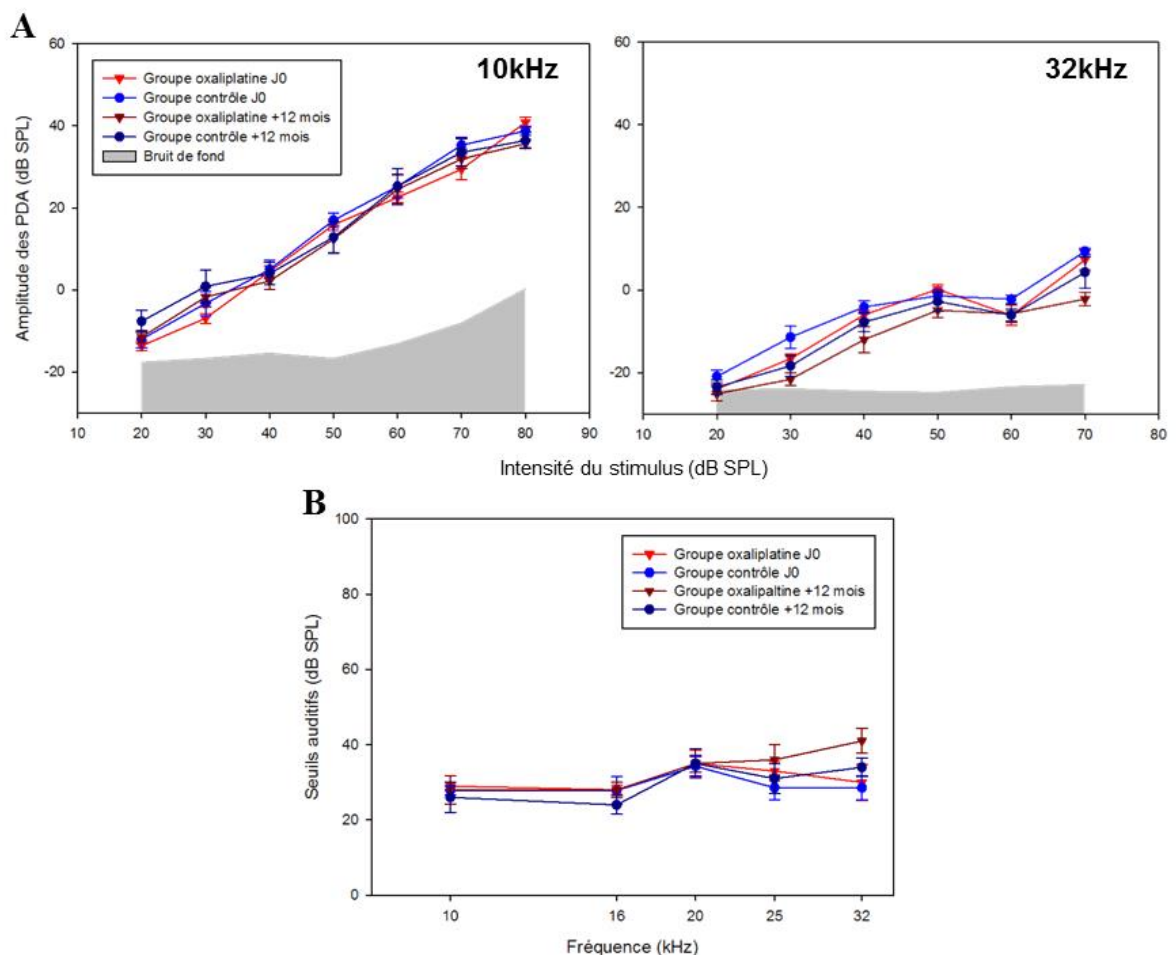
**Figure 3.13 :** Aucune modification de la latence de la première onde des PEAp n'est constatée un an après le traitement avec l'oxaliplatine.

Latence de l'onde I des PEAp ( $\pm$ SEM) en fonction de l'intensité du stimulus à 10 et 32 kHz pour les groupes contrôle (n=5) et ayant reçu les injections d'oxaliplatine (n=5).

Un an après le cycle de traitement avec l'oxaliplatine, la latence de l'onde I des PEAp n'est pas modifiée, elle reste située entre 1,6 et 2,6 ms à 10 kHz et entre 1,2 et 1,8 ms à 32 kHz pour les groupes contrôle et oxaliplatine (Figure 3.13).

### 3.2.3. Évolution des PDA à long terme

En parallèle, nous avons réalisé un suivi de l'amplitude des PDA et des seuils des PDA chez ces mêmes souris. Les résultats sont présentés en figure 3.14.



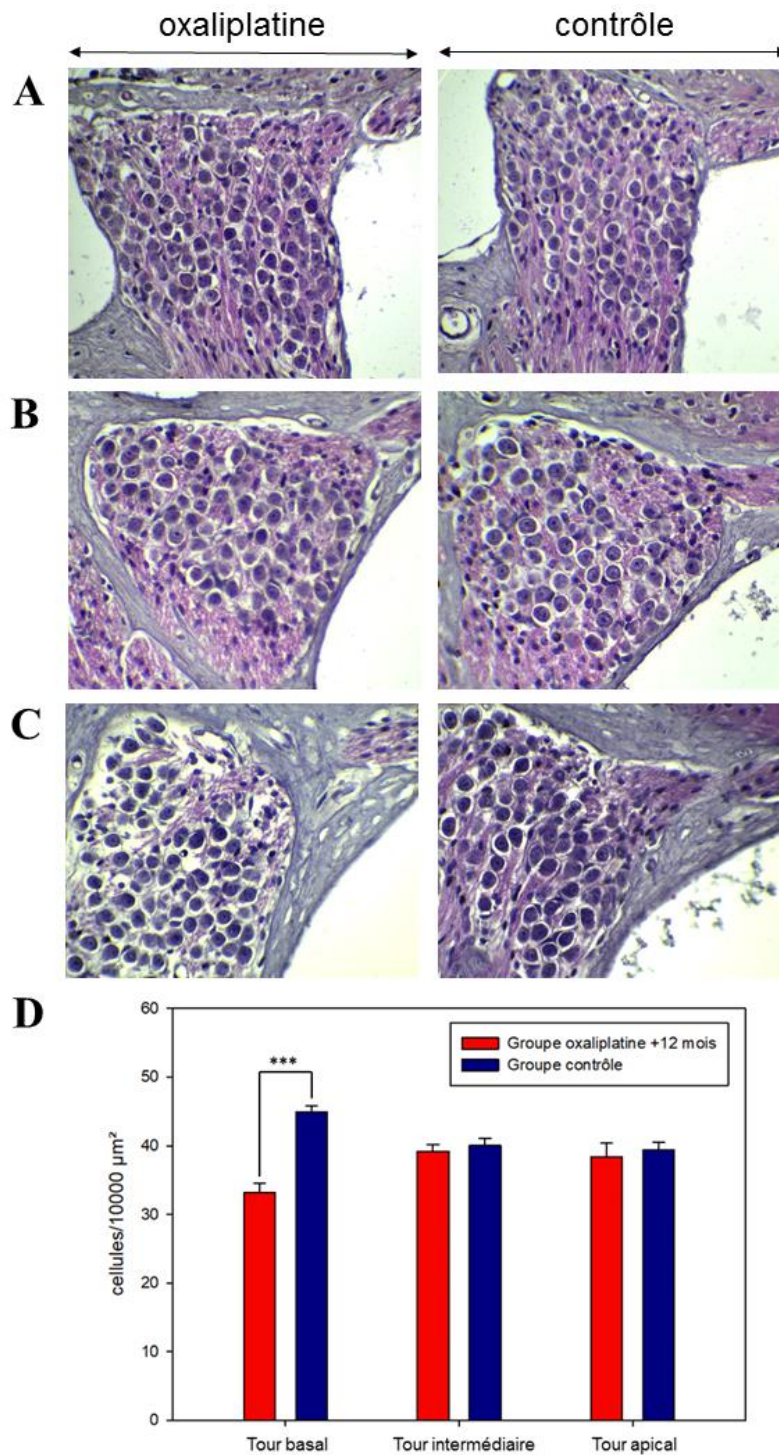
**Figure 3.14 :** Les PDA ne sont pas altérés un an après le traitement avec l'oxaliplatine.

Amplitude des PDA ( $\pm$ SEM) en fonction de l'intensité du stimulus envoyé (L1=L2) aux fréquences de 10 et 32 kHz pour le groupe contrôle (n=5) et le groupe oxaliplatine (n=5) à J0 et 12 mois après la cure d'oxaliplatine (A). Seuils moyens ( $\pm$ SEM) mesurés à l'aide des PDA aux fréquences de 10, 16, 20, 25 et 32 kHz pour les deux groupes de souris (B).

Chez les souris traitées avec l'oxaliplatine, l'amplitude des PDA est restée stable pendant les 12 mois qui ont suivi le traitement, en comparaison avec le groupe contrôle (Figure 3.14, A). Les seuils des PDA ne sont pas non plus significativement différents entre les deux groupes, malgré une légère élévation à 32 kHz au douzième mois, où ils étaient de 41 dB SPL pour le groupe oxaliplatine et de 34 dB SPL pour le groupe contrôle (Figure 3.14, B).

#### **3.2.4. Observation des cellules du ganglion spiral un an après le traitement avec l'oxaliplatine**

Les ganglions spiraux de la cochlée des souris des deux groupes ont été visualisés, au microscope optique, un an après le traitement avec de l'oxaliplatine, après coupe et coloration des cochlées (Figure 3.15).



**Figure 3.15 :** Une diminution de la densité des cellules du ganglion spiral de la base de la cochlée est observée, un an après le traitement avec l'oxaliplatine.

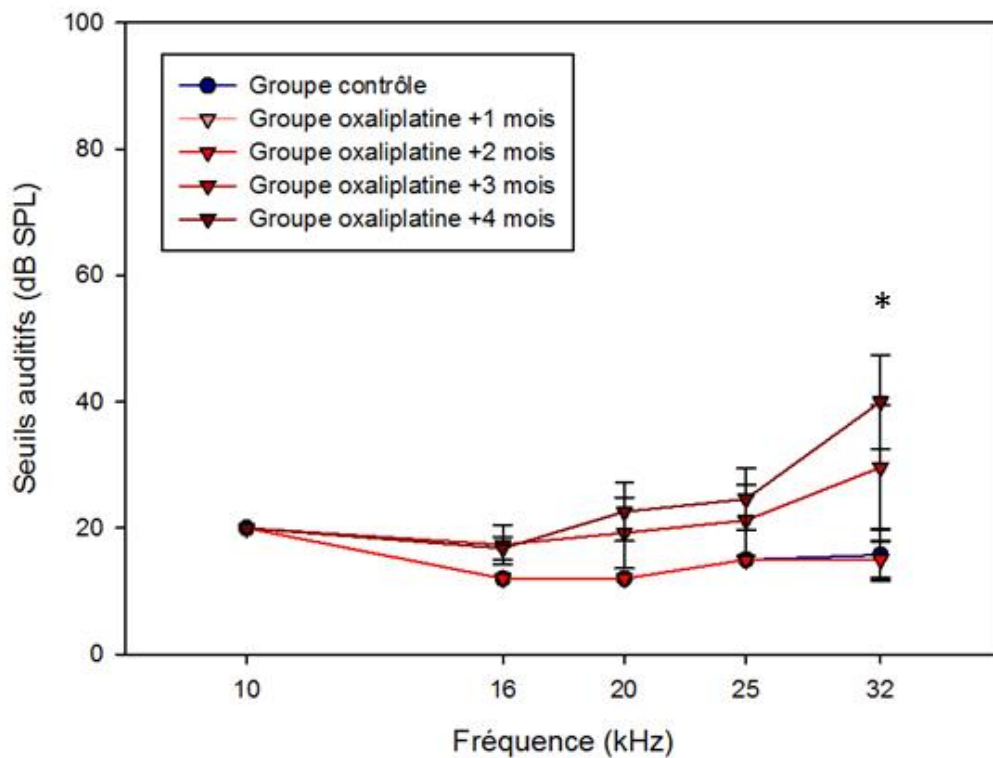
Image de coupes transversales de cochlées visualisées au microscope optique (A, B, C). Ganglions spiraux du tour apical (A), du tour intermédiaire (B) et du tour basal (C) des cochlées d'une souris contrôle et d'une souris traitée. Un comptage des cellules des ganglions spiraux ( $\pm$ SEM) des tours apicaux, intermédiaires et basaux a été réalisé chez des souris contrôles (n=4) et chez des souris ayant reçu des injections d'oxaliplatine (n=5) un an après le traitement (D). (\*\*\*) p<0,001)

Les ganglions spiraux des tours apicaux (Figure 3.15, A) et intermédiaires (Figure 3.15, B) ne présentent pas d'atteinte chez le groupe oxaliplatine par rapport au groupe contrôle. Le nombre de corps cellulaires des neurones auditifs de ces ganglions spiraux est similaire chez les deux groupes de souris (Figure 3.15, D). Cependant, au niveau du tour basal de la cochlée, la densité des fibres auditives est plus faible (Figure 3.15, C) et la densité des cellules du ganglion spiral est diminué de 26 % chez les souris du groupe oxaliplatine avec  $33,2 \pm 1$  cellules/10000  $\mu\text{m}^2$  contre  $44,9 \pm 0,8$  cellules/10000  $\mu\text{m}^2$  chez les souris contrôles (Figure 3.15, D).

### 3.3. Effet de plusieurs cycles de traitement d'oxaliplatine sur le système auditif

#### 3.3.1. **Évolution des seuils auditifs mesurés avec les PEAp après plusieurs cycles de traitement**

Pour étudier l'effet de traitements répétés d'oxaliplatine, nous avons poursuivi les cycles d'injections chez un groupe de souris durant 4 mois. Un groupe contrôle a été utilisé pour comparaison. Nous avons effectué un suivi des seuils auditifs mesurés avec les PEAp chaque mois pendant toute cette période, les résultats sont présentés en Figure 3.16.



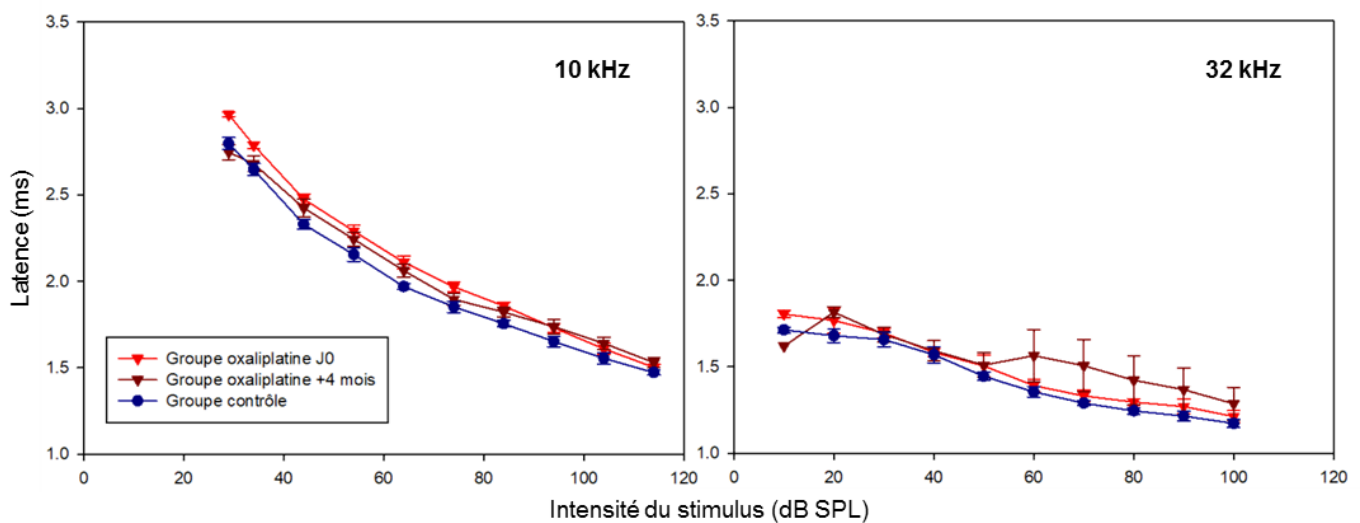
**Figure 3.16 :** Après 5 cycles d'injection d'oxaliplatine, les seuils auditifs sont affectés à haute fréquence.

Seuils auditifs moyens ( $\pm$ SEM) mesurés à l'aide des PEA aux fréquences de 10, 16, 20, 25 et 32 kHz pour le groupe de souris traitées (n=5) et le groupe de souris contrôles (n=4). (\*p<0,05)

Après 4 mois de traitement avec l'oxaliplatine, les seuils auditifs des souris sont restés stables aux fréquences de 10 et 16 kHz, où ils étaient respectivement situés autour de 20 et de 15 dB SPL (Figure 3.16). Aux fréquences de 20 et 25 kHz, une variabilité s'est installée à 3 et 4 mois de traitement, sans pour autant que l'élévation des seuils (environ 10 dB) ne soit significative comparativement au groupe contrôle. À 32 kHz, une perte auditive minimale de 25 dB était mesurable à la fin des quatre mois d'injection.

### 3.3.2. Évolution de la latence de l'onde I des PEAp après plusieurs cycles de traitement

Nous avons également réalisé un suivi de la latence de l'onde I des souris des groupes contrôle et oxaliplatine pendant la même période (Figure 3.17).



**Figure 3.17 : La latence de la première onde des PEAp n'est pas modifiée après 5 cycles de traitement avec l'oxaliplatine.**

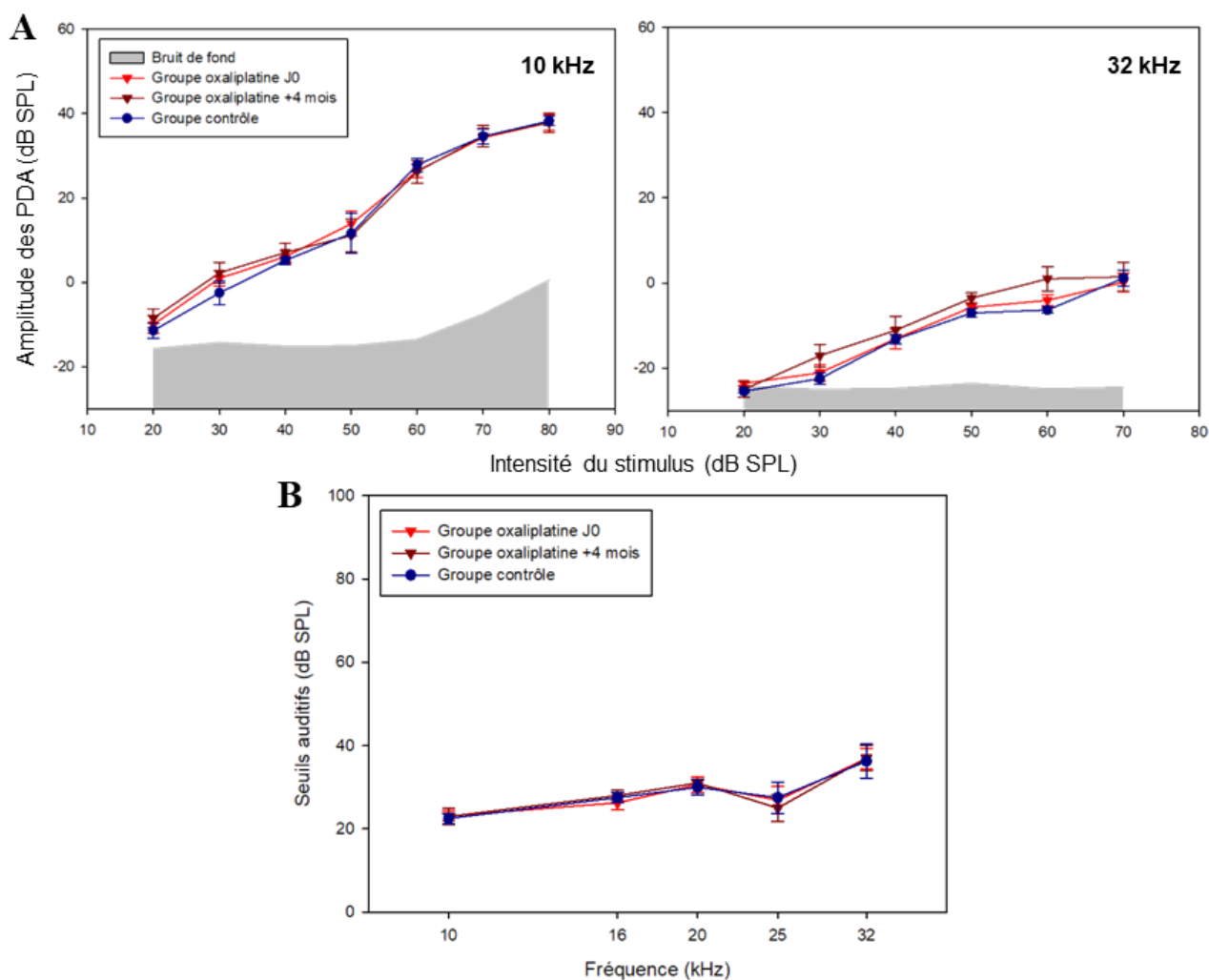
Latence de l'onde I des PEAp ( $\pm$ SEM) en fonction de l'intensité du stimulus à 10 et 32 kHz pour les groupes contrôle (n=4) et ayant reçu les injections d'oxaliplatine (n=5).

Aux fréquences de 10 et 32 kHz, les cycles répétés de traitement avec l'oxaliplatine n'ont eu aucune incidence sur la latence de l'onde I des PEAp (Figure 3.17). Elle était comprise entre 1,5 et 3 ms à 10 kHz et entre 1,1 et 1,8 ms à 32 kHz, en accord avec la représentation fréquentielle de la cochlée, chez les souris contrôles et les souris ayant reçu des injections d'oxaliplatine.

### **3.3.3. Évolution des PDA après plusieurs cycles de traitement avec de l'oxaliplatine**

L'évaluation de la fonctionnalité des CCE, par la mesure de l'amplitude des PDA et des seuils des PDA a été réalisée au cours des différents cycles de traitement (Figure 3.18).





**Figure 3.18 :** La fonctionnalité des CCE n'est pas affectée après 5 cycles de traitement avec de l'oxaliplatine.

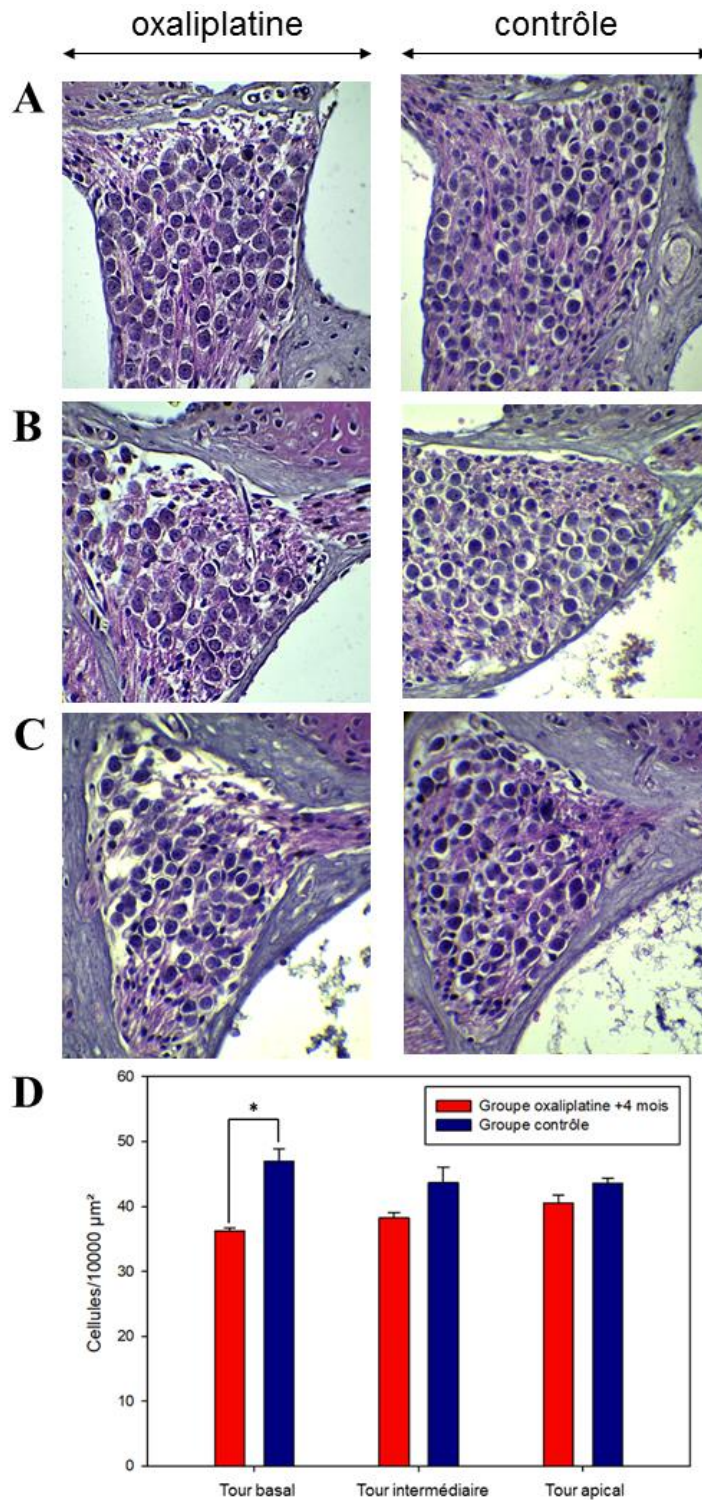
Amplitude des PDA en fonction de l'intensité du stimulus envoyé pour les fréquences de 10 et 32 kHz pour le groupe de souris traitées (n=5) et pour le groupe de souris contrôles (n=4). Seuils auditifs moyens ( $\pm$ SEM) mesurés à l'aide des produits de distorsion acoustiques aux fréquences de 10, 16, 20, 25 et 32 kHz

Les amplitudes des PDA à 10 et 32 kHz n'ont pas été affectées par les cycles répétés d'injection d'oxaliplatine lorsqu'on les compare à celles des contrôles (Figure 3.18, A). De la même façon, les seuils auditifs mesurés avec cette technique ne sont pas modifiés au quatrième mois (Figure 3.18, B).

### **3.3.4. Observation du ganglion spiral après plusieurs cycles de traitement**

Après quatre mois de traitement avec l'oxaliplatine, la densité des fibres auditives et des corps cellulaires des neurones des ganglions spiraux des tours apicaux (Figure 3.19, A, D) et intermédiaires (Figure 3.19, B, D) est identique chez le groupe de souris traitées et chez le groupe de souris contrôles. À la base de la cochlée, une diminution de 23 % de cette densité est visible chez les souris ayant reçu les injections d'oxaliplatine avec 36,1 cellules/10000  $\mu\text{m}^2$  contre 46,9 cellules/10000  $\mu\text{m}^2$  chez les souris contrôles (Figure 3.19, C, D).

**Les traitements répétés d'oxaliplatine semblent augmenter l'effet neurotoxique de l'oxaliplatine. En effet, l'élévation des seuils auditifs mesurés avec les PEAp est plus rapide et plus importante que pour un seul traitement. Au contraire, la perte de neurones auditifs n'est pas plus marquée, mais cela peut être expliqué par la lenteur de leur dégénérescence (voir paragraphe I.1.). L'augmentation des cycles d'injection d'oxaliplatine n'a pas eu d'incidence sur la fonctionnalité des CCE, évaluée par la mesure des PDA.**



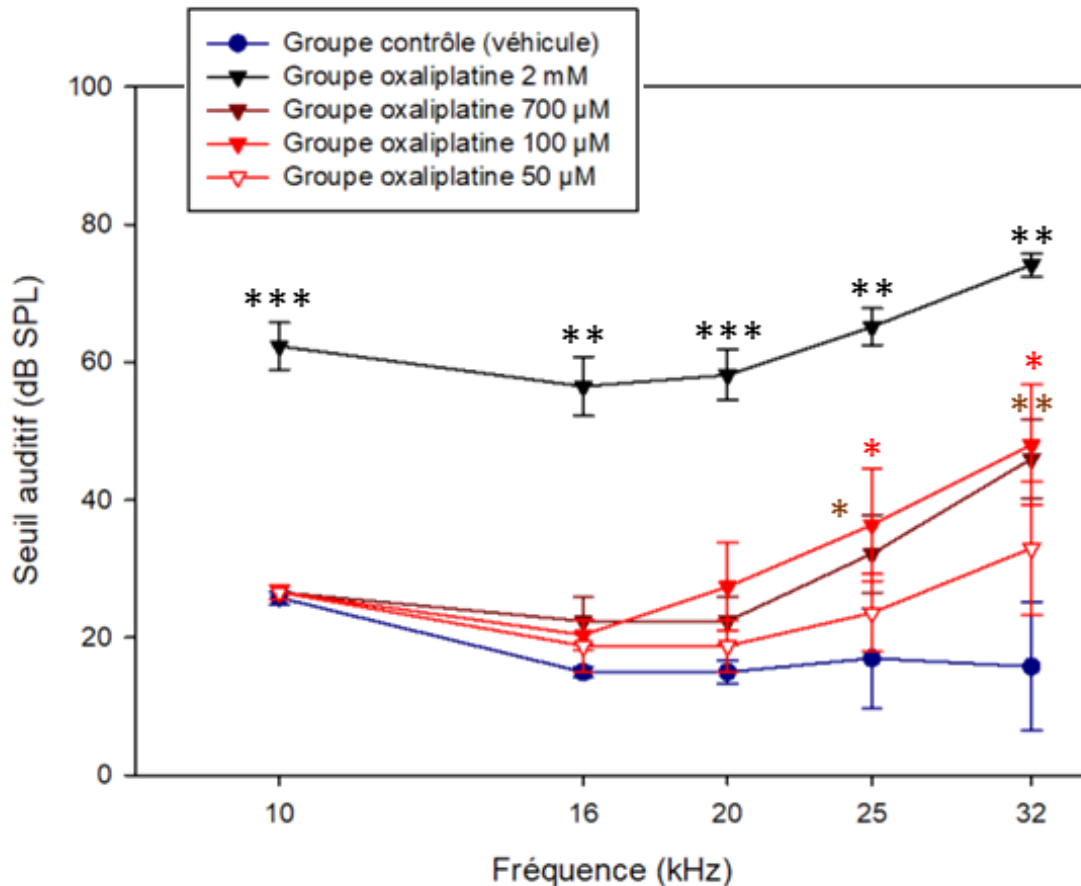
**Figure 3.19 :** L'oxaliplatine diminue la densité des cellules du ganglion spiral à la base de la cochlée après 5 cycles de traitement avec de l'oxaliplatine. Image de coupes transversales de cochlées visualisées au microscope optique (A, B, C). Ganglions spiraux du tour apical (A), du tour intermédiaire (B) et du tour basal (C) des cochlées d'une souris contrôle et d'une souris traitée. Un comptage des cellules des ganglions spiraux ( $\pm$ SEM) des tours apicaux, intermédiaires et basaux a été réalisé chez des souris contrôles (n=3) et chez des souris ayant reçu des injections d'oxaliplatine (n=3) après quatre mois d'injection chroniques d'oxaliplatine (D). (\* p<0,05)

### **3.4. Effet de différentes doses d'oxaliplatine injectées par voie transtympanique**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'effet de l'oxaliplatine sur l'oreille interne dépend de l'absorption de cette molécule par la cochlée (Hellberg et al., 2009). En augmentant la concentration de la dose injectée en intrapéritonéale à 6 mg/kg, une mortalité importante était observée chez les souris, notamment à cause d'une forte toxicité rénale. Nous avons donc choisi d'augmenter la dose d'oxaliplatine en réalisant des injections transtympaniques. Afin de préciser la toxicité de l'oxaliplatine dans la cochlée en fonction de sa concentration, à la fois sur les cellules sensorielles et sur le nerf auditif, quatre doses différentes ont été administrées (2 mM, 700  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) et un groupe de souris a été injecté avec le véhicule pour comparaison.

#### **3.4.1. Évolution des seuils auditifs mesurés avec les PEAp après injection transtympanique d'oxaliplatine**

Les seuils auditifs ont été mesurés avec les PEAp un mois après les injections chez tous les groupes de souris (Figure 3.20). Les groupes de souris injectés avec le véhicule et l'oxaliplatine à 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M et 700  $\mu$ M présentent des seuils auditifs moyens situés autour de 26 dB SPL à 10 kHz et entre 15 et 22 dB SPL à 16 kHz. À 20 kHz, ces mêmes groupes sont toujours relativement groupés avec des seuils auditifs entre 15 et 27 dB SPL. À 25 et 32 kHz, seul le groupe injecté avec 50  $\mu$ M d'oxaliplatine présente des seuils auditifs proches du groupe contrôle, avec une différence maximale non significative de 17 dB.



**Figure 3.20 :** Les seuils auditifs mesurés avec les PEAp sont atteints de façon dose-dépendante par l'oxaliplatine injectée en transtympanique.

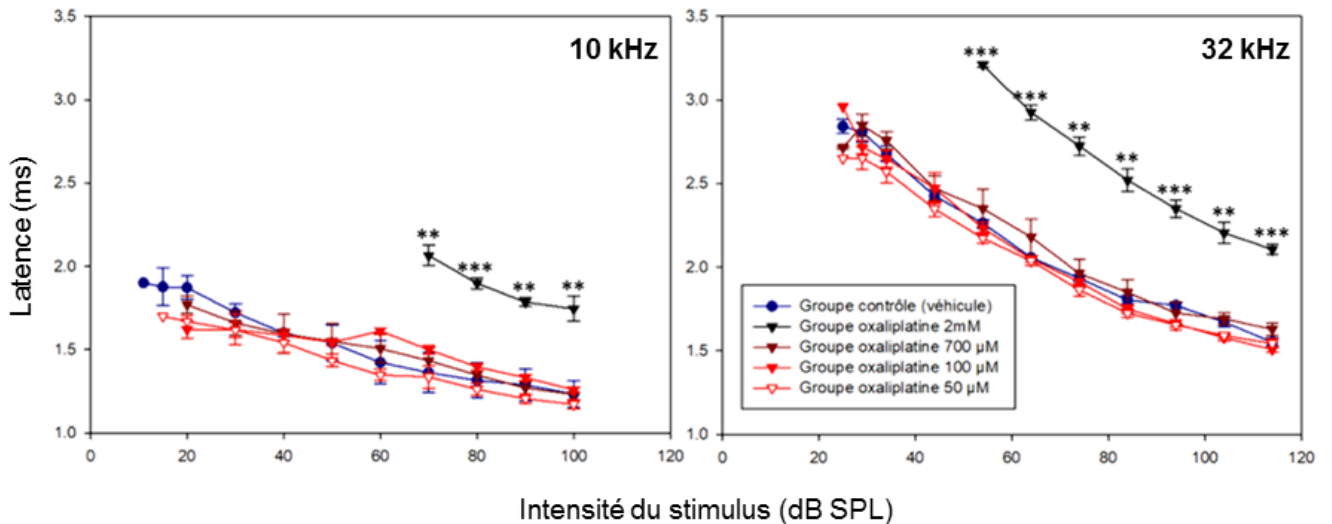
Seuils auditifs moyens ( $\pm$ SEM) mesurés à l'aide des potentiels évoqués auditifs aux fréquences de 10, 16, 20, 25 et 32 kHz pour le groupe de souris injectées avec le véhicule (n=5) et les groupes de souris injectées avec de l'oxaliplatine à différentes doses : 2 mM (n=6), 700  $\mu$ M (n=5), 100  $\mu$ M (n=5), 50  $\mu$ M (n=5). \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001

Les groupes injectés avec 100 et 700  $\mu$ M d'oxaliplatine ont des seuils auditifs élevés, situés autour de 34 dB SPL à 25 kHz et de 47 dB SPL à 32 kHz.

Le groupe de souris injecté avec 2 mM d'oxaliplatine montre une atteinte plus importante de la fonction auditive avec des seuils auditifs moyens situés entre 56,5 et 74 dB SPL.

### 3.4.2. Évolution de la latence de l'onde I des PEAp après injection transtympanique d'oxaliplatine

La latence de l'onde I des PEAp pour tous les groupes de souris, un mois après les injections transtympaniques d'oxaliplatine, est présentée en figure 3.21.



**Figure 3.21 : À haute dose, l'injection transtympanique d'oxaliplatine modifie la latence de l'onde I des PEAp.**

Latence de l'onde I des PEAp en fonction de l'intensité du stimulus à 10 et 32 kHz pour les groupes véhicule (n=5) et ayant reçu les injections transtympaniques d'oxaliplatine aux doses de 2 mM (n=6), 700 μM (n=5), 100 μM (n=5) et 50 μM (n=5). \*p<0,05\*\*p<0,01\*\*\*p<0,001

Les groupes de souris injectées avec le véhicule et l'oxaliplatine à 50 μM, 100 μM et 700 μM présentent des latences similaires comprises entre 1,50 et 2,96 ms à 10 kHz et entre 1,17 et 1,90 ms à 32 kHz.

Seul le groupe de souris injecté avec 2 mM d'oxaliplatine montre une augmentation importante de ces latences qui sont comprises entre 2,1 et 3,2 ms à 10 kHz et entre 1,7 et 2,06 ms à 32 kHz.

### 3.4.3. Évolution des PDA après injection transtympanique d'oxaliplatine

La fonctionnalité des CCE a été évaluée, dans un premier temps par la mesure de l'amplitude des PDA, entre 10 et 32 kHz chez les différents groupes de souris, un mois après l'injection transtympanique (Figure 3.22).

À toutes les fréquences testées, les groupes de souris injectés avec le véhicule et l'oxaliplatine à 50  $\mu\text{M}$  présentent des PDA d'amplitudes similaires.

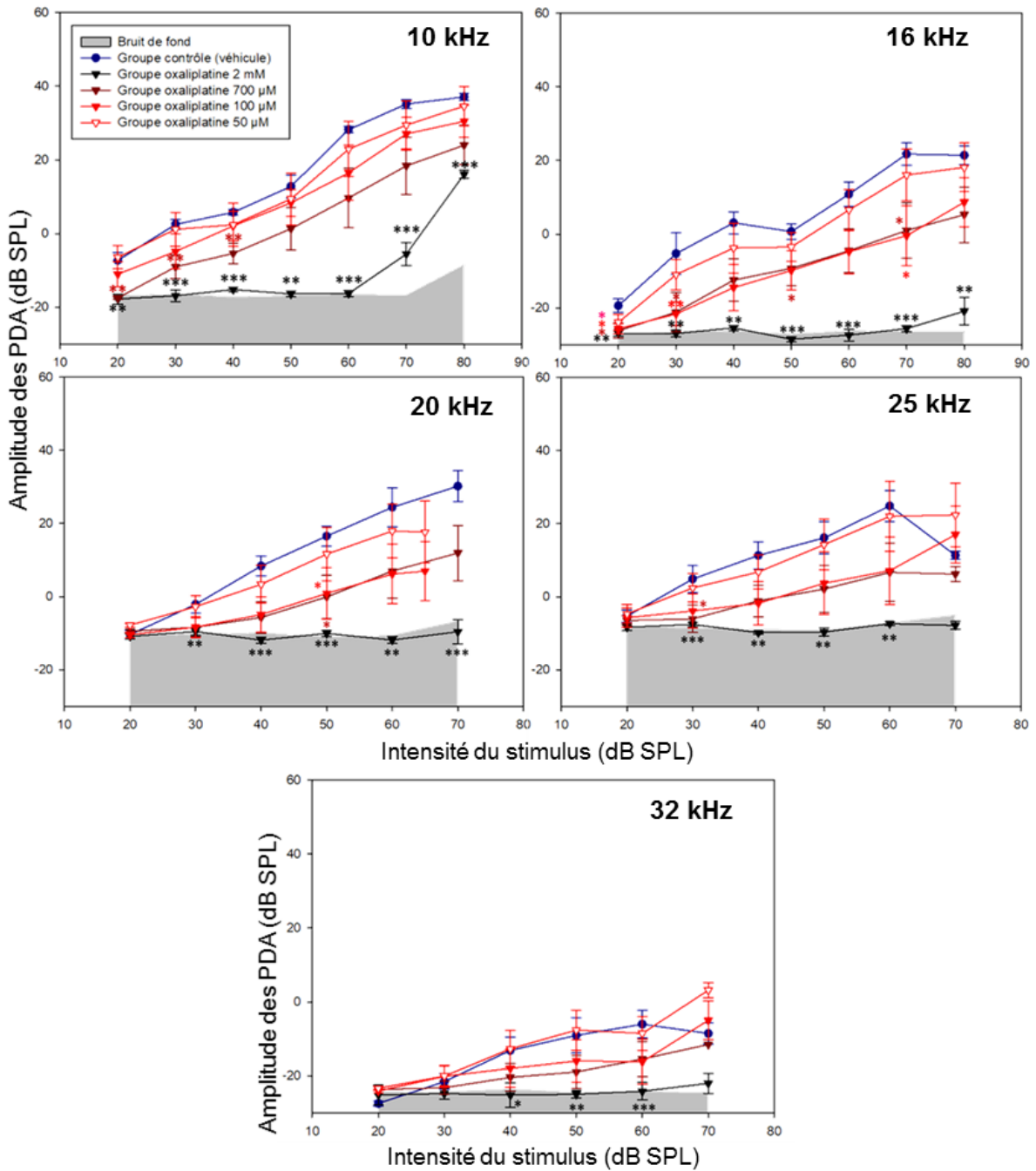
À 10 kHz, l'amplitude des PDA du groupe de souris injecté avec 100  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine ne diffère pas de celle du groupe contrôle. Les souris injectées avec 700  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine ont des PDA d'amplitudes diminuées pour des stimulations inférieures à 40 dB, au-dessus de cette intensité, la différence n'est pas significative.

À 16 kHz, les groupes injectés avec 100 et 700  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine ont des PDA d'amplitude significativement plus faible que le groupe contrôle pour des stimulations à 20, 30 et 70 dB SPL. C'était également le cas à 50 dB SPL pour le groupe oxaliplatine 700  $\mu\text{M}$ .

À 20 kHz, ces deux groupes présentent des PDA d'amplitudes diminuées uniquement à 50 dB SPL de stimulation. Le groupe injecté avec 700  $\mu\text{M}$  montre des PDA d'amplitudes plus faibles également à 25 kHz pour une stimulation de 30 dB.

Pour la fréquence de 32 kHz, la diminution d'amplitude des PDA chez les souris injectées avec 100 et 700  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine n'est pas significative par rapport au groupe contrôle.

Le groupe injecté avec 2 mM d'oxaliplatine montre des PDA d'amplitudes très faibles ou absents à toutes les fréquences testées.

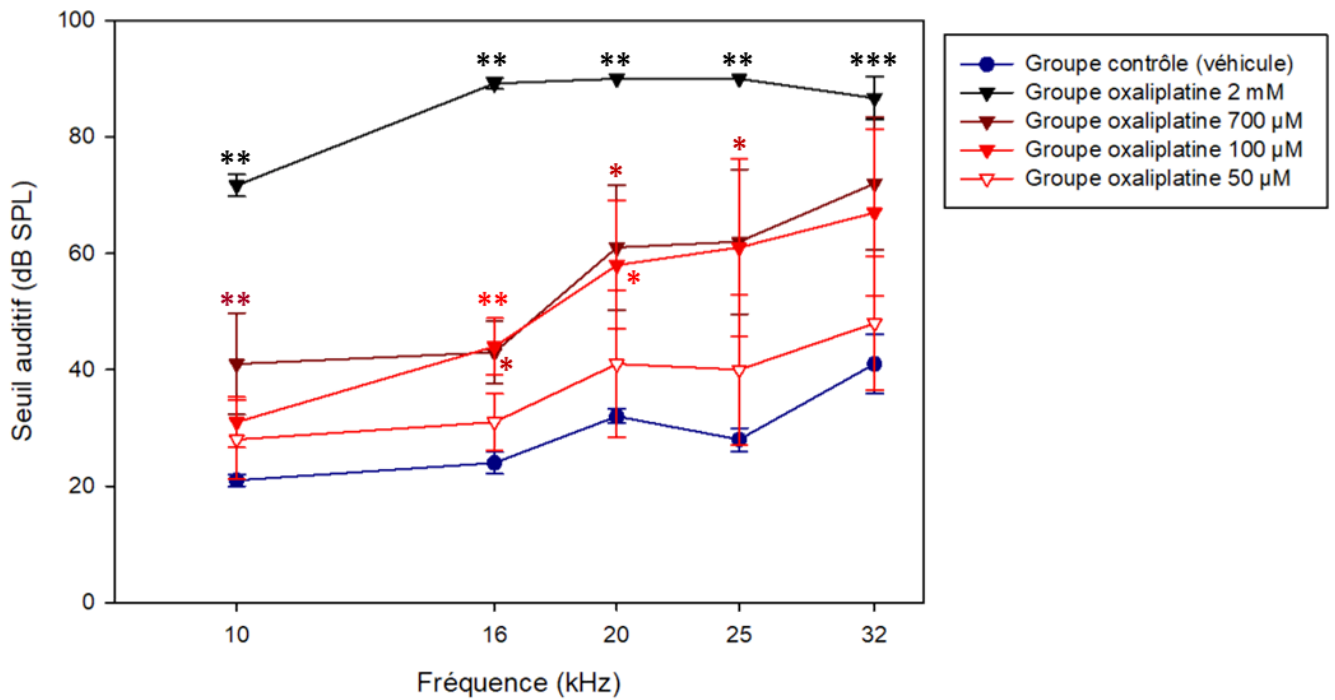


**Figure 3.22 :** L'amplitude des PDA est diminuée par l'oxaliplatine injectée en transtympanique à haute dose.

Amplitude des PDA en fonction de l'intensité du stimulus envoyé pour les fréquences de 10, 16, 20, 25 et 32 kHz pour le groupe de souris injectées avec le véhicule (n=5) et les groupes de souris injectées avec de l'oxaliplatine à différentes doses : 2 mM (n=6), 700 μM (n=5), 100 μM (n=5), 50 μM (n=5). \*p<0,05\*\*p<0,01\*\*\*p<0,001



Nous avons également déterminé les seuils des PDA pour tous les groupes injectés en transtympanique (Figure 3.23). Lorsque les PDA n'étaient pas détectables, même à la plus forte intensité testée (80 dB), nous avons arbitrairement placé les seuils à 90 dB SPL.



**Figure 3.23 :** Les seuils auditifs évalués à l'aide des PDA sont affectés de façon dose-dépendante par l'oxaliplatine injectée en transtympanique.

Seuils auditifs moyens ( $\pm$ SEM) mesurés à l'aide des PDA aux fréquences de 10, 16, 20, 25 et 32 kHz pour les groupes de souris injectés avec le véhicule (n=5) ou injectés avec de l'oxaliplatine à 50  $\mu$ M (n=5), 100  $\mu$ M (n=5), 700  $\mu$ M (n=5) et 2 mM (n=6). \*p<0,05\*\*p<0,01\*\*\*p<0,001

À toutes les fréquences testées, les groupes de souris injectés avec le véhicule ou avec de l'oxaliplatine à 50  $\mu$ M présentent des seuils de PDA similaires, situés entre 20 et 30 dB SPL à basse fréquence, et atteignant pour le groupe traité un maximum de 48 ( $\pm$ 11) dB SPL à 32 kHz.

Le groupe oxaliplatine 100  $\mu$ M ne présente des seuils significativement plus élevés qu'aux fréquences de 16 et 20 kHz, où ils sont respectivement de 44 ( $\pm$ 5) et 58 ( $\pm$ 11) dB SPL. Malgré cela, une élévation d'environ 30 dB, bien que non significative, est visible à 25 et 32 kHz.

De la même façon, le groupe injecté avec 700  $\mu$ M d'oxaliplatine présente des seuils plus élevés que le groupe contrôle entre 10 et 25 kHz, situés entre 41 et 62 dB SPL. À 32 kHz, la perte auditive moyenne de 31 ( $\pm$ 11) dB par rapport aux souris injectées avec le véhicule, n'est pas significative.

Le groupe injecté avec 2 mM d'oxaliplatine présente, quant à lui, des seuils significativement plus élevés que le groupe contrôle, situés entre 70 et 90 dB, à toutes les fréquences testées. Un seuil à 90 dB, correspondant en fait, à une absence de PDA.

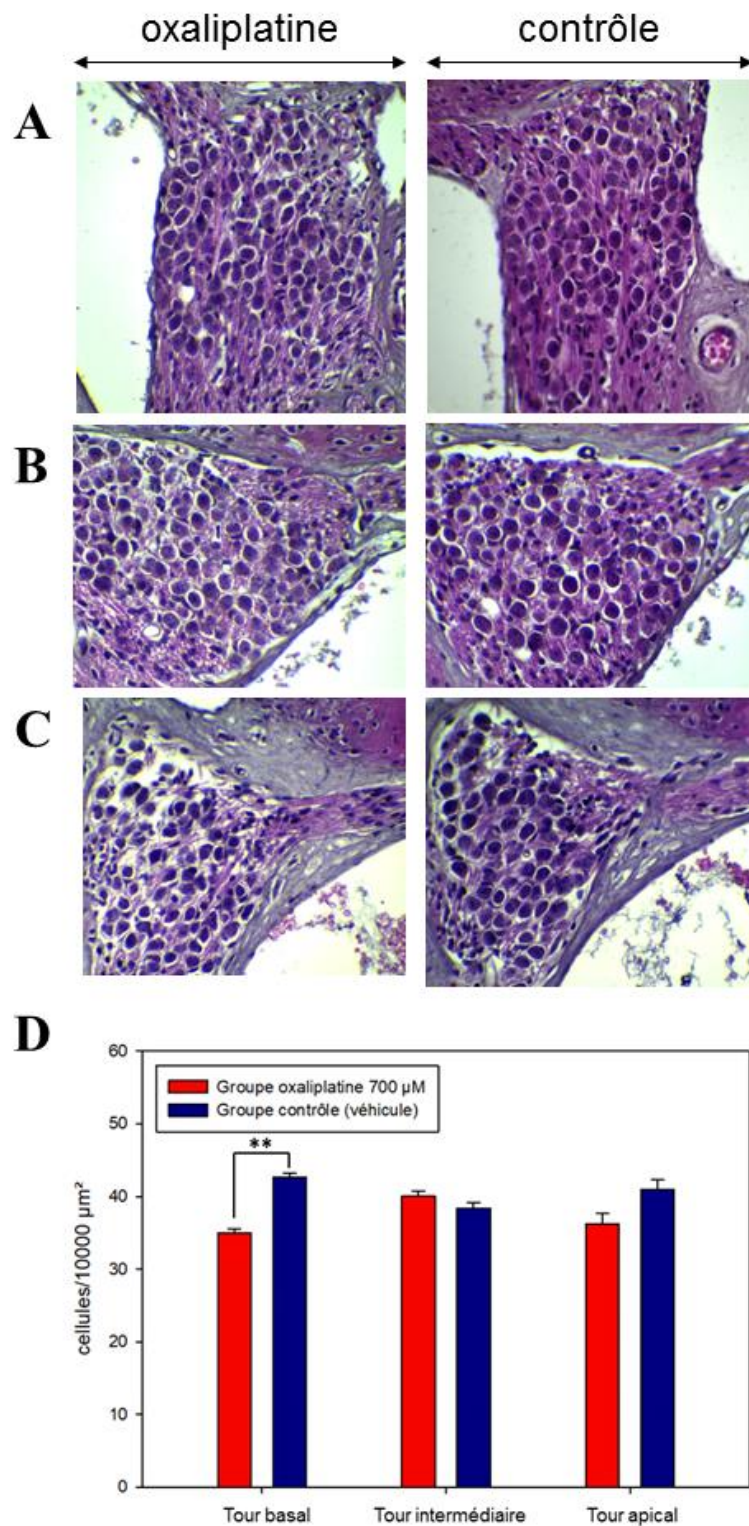
#### **3.4.4. Observation des cellules du ganglion spiral après injection transtympanique d'oxaliplatine**

À la fin des évaluations fonctionnelles, nous avons prélevé les cochlées des souris du groupe injecté avec 700  $\mu$ M d'oxaliplatine et des souris contrôles (véhicule), afin de visualiser les cellules du ganglion spiral au microscope optique. Les images obtenues sont présentées en figure 3.24.

Au niveau de l'apex et du tour intermédiaire de la cochlée, il n'y a pas de différence significative de densité des corps cellulaires des neurones auditifs entre les souris contrôles et les souris injectées avec l'oxaliplatine (Figure 3.24, A-B, D).

Au niveau de la base de la cochlée, une baisse de la densité des fibres auditives est visible chez les souris du groupe oxaliplatine (Figure 3.24, C-D). La densité des cellules du ganglion spiral est de  $35 \pm 0,6$  cellules/10000  $\mu\text{m}^2$  chez ces souris contre  $42,6 \pm 0,5$  cellules/10000  $\mu\text{m}^2$  chez les souris contrôles, ce qui équivaut à une diminution de 18 %.

**Lorsqu'elle est injectée aux souris par voie transtympanique, l'oxaliplatine a un effet neurotoxique, entraînant une élévation des seuils auditifs à haute fréquence et une baisse de la densité des neurones auditifs au niveau de la base du ganglion spiral. Contrairement à ce que nous avons constaté pour les injections en intrapéritonéale, elle a ici également un effet ototoxique, en provoquant une atteinte des CCE pour des doses de 100  $\mu\text{M}$  à 2 mM.**



**Figure 3.24 :** La densité des cellules du ganglion spiral est diminuée à la base de la cochlée après injection transtympanique d'oxaliplatine. Image de coupes transversales de cochlées visualisées au microscope optique (A, B, C). Ganglions spiraux du tour apical (A), du tour intermédiaire (B) et du tour basal (C) des cochlées d'une souris contrôlée injectée avec le véhicule (n=3) et d'une souris injectée avec de l'oxaliplatine à 700  $\mu\text{M}$  (n=3). Un comptage des cellules des ganglions spiraux ( $\pm\text{SEM}$ ) des tours apicaux, intermédiaires et basaux a été réalisé un mois après les injections (D). (\*\*  $p < 0,01$ )

#### **4. Discussion**

Pendant longtemps, les cellules sensorielles de la cochlée ont été considérées comme étant les plus sensibles au vieillissement, aux surexpositions acoustiques et à certains toxiques. Récemment, des travaux portant sur les effets de l'exposition au bruit ont montré qu'en réalité les synapses des CCI et les fibres auditives disparaissaient bien avant les cellules ciliées (Kujawa and Liberman, 2009). C'est le cas aussi lors du vieillissement, une dégénérescence des synapses se fait progressivement depuis la base vers l'apex, avant celle des cellules sensorielles (Sergeyenko et al., 2013).

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle de souris traitées avec de l'oxaliplatine. Dans la première partie, nous avons réalisé un cycle de traitement, avec une dose similaire à celle utilisée en clinique (3 mg/kg). Nous avons montré que cette dose n'induit pas d'élévation des seuils auditifs mesurés avec les PEAp, ni de modification des PDA indiquant une absence d'atteinte des CCE. Les observations histologiques de l'organe de Corti, en microscopie optique, et des touffes stéréociliaires, en microscopie confocale, ont confirmé cette hypothèse.

La mesure des seuils auditifs via les PEAp et l'évaluation de la fonctionnalité des CCE par les PDA sont des données importantes à prendre en compte dans l'évaluation des troubles auditifs, cependant, ils deviennent moins informatifs lorsque la pathologie n'est pas d'origine sensorielle (Liberman and Kujawa, 2017).

Dans notre étude, la mesure du PAC a révélé une diminution de l'amplitude des ondes N1-P1, à la suite du traitement avec l'oxaliplatine. Cette diminution d'amplitude est imputable à une atteinte des fibres afférentes auditives, au vu du maintien de l'intégrité de l'amplificateur cochléaire. Elle peut s'expliquer par une baisse de la synchronisation des fibres du nerf auditif, par une baisse du taux de décharge de ces fibres ou encore par une disparition d'une partie de ces fibres.

Une baisse de la densité des fibres auditives a été mise en évidence, par une étude histologique, au niveau du ganglion spiral de la base de la cochlée (microscopie optique) et au niveau des faisceaux de fibres joignant le nerf cochléaire (microscopie confocale). Cette perte de fibres peut être compensée soit par l'augmentation du taux de décharge des fibres restantes soit en augmentant le nombre de fibres répondantes. Ce système de compensation pourrait expliquer l'absence de modification dans les seuils auditifs évalués par les PEAp (Furman et al., 2013). L'audiogramme n'est pas sensible à cette neurodégénérescence « primaire », et ne permet pas de détecter cette atteinte, par conséquent « cachée », du système auditif, comme cela avait été observé après des sections sélectives de nerf auditif (Schuknecht and Woellner, 1953) ou des surexpositions acoustiques (Kujawa and Liberman, 2009) chez l'animal.

Il est connu depuis longtemps que les difficultés de compréhension de la parole dans le bruit sont des plaintes souvent retrouvées chez les sujets âgés (Rajan and Cainer, 2008). Récemment, des analyses histologiques d'os temporaux humains ont révélé la présence de synaptopathies cochléaires et de dégénérescences des cellules du ganglion spiral, en l'absence de perte de cellules sensorielles (Viana et al., 2015 ; Makary et al., 2011). Il a également été mis en évidence que ces atteintes étaient liées à l'âge. Ceci est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle des atteintes du nerf auditif périphérique, associées à des seuils auditifs normaux, pourraient contribuer à des troubles de perception supraliminaires (Plack et al., 2014).

Notre étude préliminaire sur le système efférent semble aller dans le sens d'une diminution du réflexe du SEOCM, associée à une baisse de la densité des fibres efférentes, au niveau du faisceau spiral interne, suite au traitement avec l'oxaliplatine. Cette possible atteinte doit être mieux caractérisée. Il a été rapporté qu'au cours du vieillissement, une diminution du réflexe du SEOCM pouvait précéder l'installation de la surdité et elle peut être associée à des seuils auditifs normaux (Jacobson et al., 2003 ; Zhu et al., 2007). De plus, si le SEOCM a un rôle de protection de la fonction auditive périphérique, son déclin pourrait entraîner une

dégradation plus rapide des CCE et des synapses situées entre les CCI et les fibres auditives (Liberman et al., 2014). D'autre part, le SEOCM aurait également un rôle dans l'attention auditive, autrement dit, la réduction de l'effet masquant d'un bruit de fond en faveur de la parole ou d'autres sons pertinents pour le sujet. L'altération des fibres efférentes pourrait donc avoir pour conséquence une diminution de l'intelligibilité dans le bruit.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons caractérisé l'audition des souris un an après le traitement d'oxaliplatine. Nous avons montré que les seuils auditifs restent pratiquement inchangés, seule une légère élévation est mesurable à haute fréquence. L'audiogramme reste tout de même sub-normal. L'évaluation de la fonctionnalité des CCE par la mesure des PDA ne montre toujours pas d'atteinte de ces cellules. L'observation des ganglions spiraux des cochlées de souris a révélé une perte de fibres auditives et de corps cellulaires neuronaux au niveau de la base de la cochlée. Cette constatation confirme l'effet neurotoxique de l'oxaliplatine au niveau de l'appareil auditif de la souris. De façon surprenante, la perte de neurones auditifs au niveau du ganglion spiral n'est pas plus beaucoup plus importante à 12 mois (26 %) que juste après le traitement (20 %). Il a donc peu de progressivité de l'atteinte causée par un cycle d'injection d'oxaliplatine.

La troisième partie de l'étude a porté sur l'effet de traitements répétés d'oxaliplatine sur le système auditif des souris. Une élévation progressive des seuils auditifs en PEAp a été mise en évidence au niveau des hautes fréquences, sans modification des PDA. La dégénérescence des fibres du nerf auditif est donc suffisamment importante pour induire un changement dans les seuils auditifs sans qu'il n'y ait d'atteinte des CCE. La diminution du nombre de corps cellulaires neuronaux reste pourtant modérée, proche de 23 %, elle ne reflète pas l'atteinte réelle du nerf. Dans le cas d'un traumatisme auditif avec élévation temporaire des seuils auditifs, la dégénérescence des cellules du ganglion spiral a lieu plusieurs mois après la surexposition (Kujawa and Liberman, 2009). Ce délai pourrait expliquer la discordance que nous observons

ici, les corps cellulaires, bien que non fonctionnels, sont toujours présents et disparaissent plus lentement que leurs axones.

La dernière partie de l'étude a porté sur l'effet d'injections transtympaniques de différentes doses d'oxaliplatine sur la fonction auditive. L'effet de l'oxaliplatine sur l'appareil auditif étant limité par l'absorption de cette molécule par la cochlée (Hellberg et al., 2009), l'injection transtympanique est un moyen d'augmenter la dose de sel de platine qui passerait au niveau du tube cochléaire. La plus haute dose que nous avons injectée (2 mM) a entraîné une élévation importante des seuils auditifs à toutes les fréquences testées, de l'ordre de 50 dB, associée à une augmentation de la latence de l'onde I. De plus, aux fréquences testées, les PDA étaient absents ou de très faible amplitude. Ces données suggèrent que les CCE ainsi que le nerf auditif ont été fortement endommagés par l'oxaliplatine. Ces dommages s'étendraient également au vestibule puisque des tests comportementaux ont mis en évidence des troubles vestibulaires chez certaines souris (tête inclinée, dystonie musculaire, perte d'équilibre, incapacité à nager...) (voir Annexe).

De façon surprenante, les injections transtympaniques de 100 et 700  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine chez les souris ont entraîné des dommages similaires au niveau de la cochlée. Les seuils auditifs évalués avec les PEAp ont révélé une perte auditive de l'ordre de 15 à 32 dB seulement à haute fréquence (25 et 32 kHz). La mesure de l'amplitude des PDA et des seuils auditifs avec les PDA a mis en évidence une atteinte des CCE à toutes les fréquences. A 32 kHz, la différence n'était pas significative avec le groupe contrôle, cela est probablement dû à la variabilité des résultats obtenus chez les différentes souris. Certaines souris semblaient effectivement plus atteintes que d'autres, ce qui pourrait être lié à la diffusion plus ou moins importante de la solution d'oxaliplatine dans la cochlée. Chez les souris injectées avec 700  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine, nous avons également réalisé une observation des ganglions spiraux au microscope optique. L'analyse des images obtenues a montré une dégénérescence des fibres et des corps cellulaires



des neurones auditifs d'environ 18 %. L'atteinte causée par l'oxaliplatine est donc ici à la fois sensorielle et neurale.

Les tests effectués sur les souris injectées avec la dose la plus faible (50  $\mu$ M) n'ont pas révélé de différence significative avec le groupe véhicule, à la fois dans les seuils auditifs évalués avec les PEAp et avec les PDA, malgré une légère élévation. D'après ces tests, cette dose d'oxaliplatine ne semble donc pas induire de dommage sur la cochlée. Une atteinte cachée du nerf auditif n'est cependant pas à exclure, puisque les neurones auditifs de la cochlée n'ont pas été observés au microscope pour ces souris.

L'effet de l'oxaliplatine injectée par voie transtympanique sur l'organe de Corti et sur le nerf auditif est donc dose-dépendant. Cette constatation est en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'effet ototoxique de l'oxaliplatine dépendrait de son absorption par la cochlée (Hellberg et al., 2009).

Lors des injections en intrapéritonéale, aucune atteinte des cellules sensorielles de l'organe de Corti n'a pu être mise en évidence. Les dommages étaient localisés uniquement au niveau des neurones auditifs. Au contraire, lors des injections transtympaniques, l'atteinte concernait également les cellules sensorielles cochléaires. Ceci suggérerait que lors des injections en intrapéritonéale, l'oxaliplatine n'atteindrait pas l'endolymphe ou bien en trop faible quantité pour entraîner des altérations de l'organe de Corti. Cependant, dans ce cas de figure, l'augmentation de la mortalité chez les souris nous a empêchés de tester de plus fortes concentrations qui auraient pu augmenter l'absorption de l'oxaliplatine par la cochlée.

Cette étude a donc permis de caractériser deux modèles différents : l'un, où l'atteinte était restreinte au nerf auditif, lorsque l'oxaliplatine était injectée en intrapéritonéale à 3 mg/kg et l'autre, où l'atteinte concernait à la fois les cellules sensorielles et le nerf auditif, lorsque l'oxaliplatine était injectée en transtympanique.

Des études portant sur la neuropathie périphérique engendrée par le traitement avec de l'oxaliplatine ont révélé l'implication de plusieurs canaux ioniques. Parmi eux, les canaux HCN (hyperpolarisation-activated cyclic nucleotides-gated cation channel), non sélectifs, perméables au sodium et au potassium, ont un rôle dans la stabilisation du potentiel membranaire de repos. Il a été mis en évidence que l'oxaliplatine augmenterait l'expression de HCN-1 dans les neurones sensoriels afférents, entraînant une hypersensibilité au froid (Descoeur et al., 2011).

Dans la cochlée, il a été montré que HCN-1 était exprimé au niveau des stéréocils des CCE (Ramakrishnan et al., 2012) et également dans les cellules du ganglion spiral chez la souris adulte (Kim et al., 2013).

Un autre canal ionique, le canal TREK-1 (TWIK1-related K<sup>+</sup> channels-1), sélectif du potassium, a un rôle dans l'établissement et le maintien du potentiel de repos cellulaire. Il a été montré que TREK-1 était sous-exprimé au niveau des ganglions de la racine dorsale chez des souris traitées avec de l'oxaliplatine (Descoeur et al., 2011). Ce canal a été mis en évidence dans la cochlée, au niveau des cellules sensorielles, des cellules du ganglion spiral et de la strie vasculaire chez le rat (Kanjhan et al., 2004).

La toxicité de l'oxaliplatine au niveau de la cochlée et du nerf auditif pourrait passer par des modifications de régulation de certains canaux ioniques. Si tel était le cas, des modifications importantes de la circulation du potassium dans la cochlée pourraient être à l'origine des dommages causés par l'oxaliplatine, notamment dans le cas des injections transtympaniques. La strie vasculaire, composée de nombreux canaux ioniques, et responsable des transferts ioniques entre le canal cochléaire et les vaisseaux sanguins, pourrait ne plus assurer son rôle dans le maintien du potentiel endocochléaire. Cependant, aucune étude n'a encore été réalisée sur le sujet.

## 5. Perspectives

Le cancer colorectal touche 43 068 nouveaux patients par an, il représente le 3<sup>ème</sup> cancer le plus fréquent chez l'homme et le 2<sup>ème</sup> chez la femme (données : Institut National du Cancer). L'oxaliplatine est un anti-cancéreux utilisé dans le traitement contre ce type de cancer. Nous avons montré que ce sel de platine entraîne, chez la souris, une atteinte du nerf auditif. Le système auditif de la souris étant proche de celui de l'homme, il est probable que ces dommages soient retrouvés chez l'homme. Le taux de survie à 10 ans après un traitement du cancer colorectal étant de 52 % (homme et femme confondus), les patients sont donc nombreux à guérir. Il apparaît primordial de limiter les effets indésirables causés par le traitement pour éviter une diminution importante de la qualité de vie après la guérison du cancer.

Des progrès ont été faits dans la recherche de molécules pouvant atténuer la neuropathie périphérique, associée à une hypersensibilité au froid, causée par l'oxaliplatine. En effet, il avait été montré que cette hypersensibilité était en partie médiée par le canal TREK-1. Une molécule neuroprotectrice, le riluzole, a entraîné une amélioration des symptômes de douleur chez un modèle de souris TREK-1<sup>-/-</sup> (Poupon L., 2015 ; Duprat et al., 2000).

Le canal TREK-1 étant présent au niveau des cellules sensorielles, de la strie vasculaire et du ganglion spiral la cochlée, il est possible qu'il soit impliqué dans la toxicité cochléaire de l'oxaliplatine. Si cette hypothèse était vérifiée, le riluzole pourrait diminuer les atteintes de l'oxaliplatine sur le système auditif. Il a été démontré, par ailleurs, que cette molécule avait un effet protecteur au niveau cochléaire contre les traumatismes acoustiques chez l'animal, et cette protection passerait par la modification de la neurotransmission synaptique au niveau de la CCI (Ruel et al., 2005). Le riluzole améliorerait également la récupération fonctionnelle des cellules sensorielles cochléaires après le traumatisme acoustique (Wang et al., 2002).

Comme nous l'avons vu précédemment, une surexposition acoustique peut entraîner une synaptopathie et une dégénérescence des fibres auditives afférentes de haut seuil chez les souris. Ce profil est accompagné d'une diminution de l'amplitude de l'onde I. Dans notre étude, nous avons enregistré une diminution de l'amplitude du PAC suite au traitement avec l'oxaliplatine. Il apparaît nécessaire de poursuivre les investigations afin de déterminer quels types de fibres sont atteintes dans ce contexte. De plus, un marquage des synapses situées entre les CCI et les fibres auditives afférentes, effectué à différentes étapes du traitement pourrait nous permettre de quantifier plus précisément la neurotoxicité auditive de l'oxaliplatine.

Chez l'homme, la synaptopathie cochléaire, observée dans le cas d'une surdité cachée, pourrait être liée à une augmentation du rapport SP/AP, mesuré par électrocochléographie (Lieberman et al., 2016). Cette atteinte pourrait également être associée à un décalage de la latence de l'onde V dans un contexte de bruit (Mehraei et al., 2016). Ces tests sont applicables en clinique et pourraient être utiles dans la recherche d'une atteinte du nerf auditif périphérique chez les patients traités avec de l'oxaliplatine.

En outre, il a été montré chez l'animal, que le dépôt de neurotrophine-3 au niveau de la fenêtre ronde, entraînait une régénération des synapses des cellules sensorielles cochléaires (Suzuki et al., 2016). Cette drogue pourrait être utilisée chez l'homme, en injection transtympanique, pour traiter la synaptopathie cochléaire. Elle pourrait être également administrée préventivement, pour protéger les cellules du ganglion spiral (Miller et al., 1997).

Une autre étude a montré que des souris ayant été surexposées acoustiquement et présentant une dégénérescence primaire neuronale, sans modification des seuils auditifs, présentaient une augmentation de l'amplitude de leurs réponses au test comportemental ASR (Acoustic Startle Reflex) (Hickox and Liberman, 2014). Cette augmentation pourrait être interprétée comme un signe d'hyperacousie. Le profil que nous obtenons chez les souris traitées

avec l'oxaliplatine présente de nombreuses similitudes avec le profil présenté par les souris surexposées acoustiquement. Il est donc possible que l'oxaliplatine entraîne également une hyperacousie. Le test comportemental ASR pourrait nous permettre de valider cette hypothèse chez l'animal. Chez les patients traités avec l'oxaliplatine, la recherche d'un niveau d'inconfort en plus de la mesure de l'audiogramme permettrait de détecter ce trouble.

De plus, il a été rapporté que des sujets souffrant d'acouphènes pouvaient présenter des seuils auditifs normaux associés à une atteinte des fibres afférentes auditives de haut seuil (Schaette and McAlpine, 2011). La présence d'acouphènes, chez les souris traitées avec l'oxaliplatine, pourrait être testée par des tests comportementaux (Berger et al., 2013 ; Turner et al., 2006 ; Heffner and Harrington, 2002). Ce trouble pourrait également être évalué chez des patients ayant été traités avec de l'oxaliplatine.

Enfin, il est nécessaire de clarifier l'effet de l'oxaliplatine sur le système efférent. Si la tendance que nous avons observée se confirme, à savoir une atteinte des fibres efférentes par cette drogue, les patients traités avec l'oxaliplatine pourraient présenter une sensibilité au traumatisme acoustique, un vieillissement cochléaire accéléré et des troubles d'intelligibilité dans le bruit. Des consignes de préventions pourraient être données à ces patients comme éviter l'exposition à des sons forts ou porter des bouchons d'oreille protecteurs. La caractérisation de cette possible atteinte du système efférent, chez l'animal traité avec de l'oxaliplatine, pourrait être complétée par l'évaluation de l'effet d'une surexposition acoustique chez ces animaux.

## Conclusion générale

Les scientifiques et les cliniciens ont longtemps pensé que, des seuils d'audition normaux étaient associés à une audition fonctionnelle. Toutefois, l'augmentation des connaissances sur l'anatomie et la physiologie de l'oreille a conduit les chercheurs à s'interroger sur l'impact réel de traitements médicamenteux, de surexpositions sonores ou simplement du vieillissement sur le système auditif. Ainsi, les capacités auditives supraliminaires ont commencé à être évaluées avec la mise en place de tests auditifs raffinés. Ces études, notamment menées sur des modèles animaux, ont conduit à la découverte de « surdités cachées » caractérisées par des seuils auditifs normaux associés à des atteintes auditives périphériques. Ces atteintes peuvent toucher les cellules ciliées internes, les synapses ou certaines fibres afférentes.

Ce travail de thèse a contribué à mieux caractériser, chez des modèles animaux, ces déficiences supraliminaires cachées, liées d'une part, à des altérations des cellules ciliées externes, et d'autre part, à la dégénérescence de certaines fibres nerveuses auditives. Dans la première étude, nous avons montré que lors du vieillissement auditif accéléré des souris de souche CD1, un « profil discordant » temporaire pouvait être observé chez certains animaux, associé à des seuils auditifs corrects, mais des cellules ciliées externes basales non fonctionnelles. Ce profil était accompagné d'un trouble tonotopique, avec un traitement des hautes fréquences effectué dans une zone cochléaire normalement dévolue aux basses fréquences. A la suite de l'observation de cellules ciliées externes basales présentant des touffes stéréociliaires désorganisées, chez les jeunes souris de souche CD1, nous avons émis l'hypothèse que la propagation des ondes le long de la membrane tectoriale était modifiée par le couplage particulier des cellules ciliées externes anormales avec cette membrane. Ce « profil discordant » pourrait être retrouvé chez certains patients présentant des déficiences

supraliminaire, telles que des problèmes de compréhension de la parole dans le bruit, en dehors de toute atteinte centrale ou neurale. Dans le cas des souris CD1, ce profil est lié au vieillissement, mais il est possible que de telles altérations de la touffe stéréociliaire des cellules ciliées externes puissent être provoquées par des expositions sonores à des bruits continus ou impulsionnels, actuellement considérés comme « non lésants ». Des modifications de conformations des touffes stéréociliaires pourraient également être induites par certaines drogues ototoxiques à faible dose. En effet, les profils auditifs retrouvés chez l'homme résultent de nombreux facteurs : prédispositions génétiques, expositions au bruit, traitements médicamenteux, expositions à des pressions variables (par exemple dans le cas de la plongée sous-marine). Tous ces facteurs peuvent provoquer des altérations minimales des cellules ciliées externes, qui n'auront pas d'impact sur l'audiogramme, mais qui peuvent induire des déficiences supraliminaires.

La deuxième étude, portant sur l'effet de l'oxaliplatine sur la fonction auditive de souris CBA/J, a mis en évidence une atteinte du nerf auditif périphérique. Les souris traitées avec cette drogue ne présentaient, à la suite d'un unique traitement, aucune élévation des seuils auditifs et pas d'altération de la fonction des cellules ciliées externes. Néanmoins, une perte de cellules au niveau du ganglion spiral a été mise en évidence. L'oxaliplatine semble également avoir un effet délétère sur le système efférent, mais cela reste à mieux caractériser. A plus long terme, une petite élévation des seuils auditifs était visible à haute fréquence. Cette élévation était accélérée et augmentée lorsque les cycles de traitements étaient répétés chez les souris, sans pour autant entraîner d'altération des cellules ciliées externes. Cette constatation témoignait d'une atteinte importante du nerf auditif. Enfin, des injections transtympaniques d'oxaliplatine à différentes doses ont cette fois provoqué des altérations à la fois neurales et des cellules ciliées externes. Selon la dose retrouvée au niveau cochléaire ou neural, l'oxaliplatine peut donc provoquer des dommages variables qui auront plus ou moins d'incidence sur la fonction

auditive. Un meilleur suivi auditif, à long terme, des patients traités avec cette drogue apparaît nécessaire. En effet, la perte auditive peut intervenir tardivement, à la suite du long processus de dégénérescence des neurones auditifs. La recherche de stratégies thérapeutiques pour prévenir ou traiter les altérations du nerf auditif, causée par des traumatismes acoustiques ou par certaines drogues, représente aujourd'hui un nouveau challenge. La prévention de telles atteintes, par des molécules neuroprotectrices comme le riluzole, ou le traitement de ces atteintes, par des molécules neurotrophiques, comme la neurotrophine-3, constituent des approches pharmacologiques prometteuses.

Les résultats de ces deux études confirment l'insensibilité de l'audiogramme à des altérations subtiles de la cochlée. Bien que ces travaux aient été effectués chez l'animal, il est tout à fait possible d'imaginer que de telles altérations soient retrouvées chez l'homme, diminuant ainsi la qualité de vie des sujets concernés. Comme nous l'avons vu précédemment, les atteintes cachées des cellules ciliées externes peuvent être détectées par l'absence de produit de distorsion acoustique associée à des potentiels évoqués auditifs normaux et les neuropathies par des produits de distorsion acoustiques présents associés à des potentiels évoqués auditifs anormaux. Il apparaît donc primordial d'améliorer le diagnostic de ces déficiences supraliminaires, en combinant différents tests fonctionnels et électrophysiologiques, pour une meilleure prise en charge des patients.





## Références bibliographiques

Amieva, H., Ouvrard, C., Giulioli, C., Meillon, C., Rullier, L., and Dartigues, J.-F. (2015). Self-Reported Hearing Loss, Hearing Aids, and Cognitive Decline in Elderly Adults: A 25-Year Study. *J Am Geriatr Soc* 63, 2099–2104.

Andersson, A., Fagerberg, J., Lewensohn, R., and Ehrsson, H. (1996). Pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in humans. *J Pharm Sci* 85, 824–827.

Ashmore, J. (2008). Cochlear outer hair cell motility. *Physiol. Rev.* 88, 173–210.

Avan, P., Büki, B., and Petit, C. (2013). Auditory distortions: origins and functions. *Physiol. Rev.* 93, 1563–1619.

Avan, P., and Bonfils, P. (1991). [Anatomy and physiology of the cochlea]. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 45, 115–154.

Bassim, M.K., Miller, R.L., Buss, E., and Smith, D.W. (2003). Rapid adaptation of the 2f1-f2 DPOAE in humans: binaural and contralateral stimulation effects. *Hear. Res.* 182, 140–152.

Bharadwaj, H.M., Verhulst, S., Shaheen, L., Liberman, M.C., and Shinn-Cunningham, B.G. (2014). Cochlear neuropathy and the coding of supra-threshold sound. *Front Syst Neurosci* 8, 26.

Berger, J.I., Coomber, B., Shackleton, T.M., Palmer, A.R., and Wallace, M.N. (2013). A novel behavioural approach to detecting tinnitus in the guinea pig. *J. Neurosci. Methods* 213, 188–195.

Beurg, M., Safieddine, S., Roux, I., Bouleau, Y., Petit, C., and Dulon, D. (2008). Calcium- and otoferlin-dependent exocytosis by immature outer hair cells. *J. Neurosci.* 28, 1798–1803.

Beutner, D., Voets, T., Neher, E., and Moser, T. (2001). Calcium dependence of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse. *Neuron* 29, 681–690.

Biacabe, B., Mom, T., Avan, P., and Bonfils, P. (1999) [Anatomie fonctionnelle des voies auditives] *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Oto-rhinolaryngologie*, 20-022-A-10, 1999, 7 p.

Bohne, B.A., and Harding, G.W. (2000). Degeneration in the cochlea after noise damage: primary versus secondary events. *Am J Otol* 21, 505–509.

Bourien, J., Tang, Y., Batrel, C., Huet, A., Lenoir, M., Ladrech, S., Desmadryl, G., Nouvian, R., Puel, J.-L., and Wang, J. (2014). Contribution of auditory nerve fibers to compound action potential of the auditory nerve. *J. Neurophysiol.* 112, 1025–1039.

Bowl, M.R., and Dawson, S.J. (2015). The mouse as a model for age-related hearing loss - a mini-review. *Gerontology* 61, 149–157.

Brandt, A., Striessnig, J., and Moser, T. (2003). CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J. Neurosci.* 23, 10832–10840.

Brownell, W.E., Bader, C.R., Bertrand, D., and de Ribaupierre, Y. (1985). Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227, 194–196.

Brownell, W.E. (1990). Outer hair cell electromotility and otoacoustic emissions. *Ear Hear* 11, 82–92.

Cersosimo, R.J. (2005). Oxaliplatin-Associated Neuropathy: A Review. *Annals of Pharmacotherapy* 39, 128–135.

Chambers, A.R., Hancock, K.E., Maison, S.F., Liberman, M.C., and Polley, D.B. (2012). Sound-evoked olivocochlear activation in unanesthetized mice. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 13, 209–217.

Culy, C.R., Clemett, D., and Wiseman, L.R. (2000). Oxaliplatin. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in metastatic colorectal cancer and its potential in other malignancies. *Drugs* 60, 895–924.

Dalian, D., Haiyan, J., Yong, F., Yongqi, L., Salvi, R., Someya, S., and Tanokura, M. (2013). Ototoxic Model of Oxaliplatin and Protection from Nicotinamide Adenine Dinucleotide. *J Otol* 8, 63–71.

Dallos, P. (2008). Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 370–376.

Dammeyer, P., Hellberg, V., Wallin, I., Laurell, G., Shoshan, M., Ehrsson, H., Arnér, E.S.J., and Kirkegaard, M. (2014). Cisplatin and oxaliplatin are toxic to cochlear outer hair cells and both target thioredoxin reductase in organ of Corti cultures. *Acta Otolaryngol.* 134, 448–454.

Dandy, W., E. (1934) Effects on hearing after subtotal section of the cochlear branch of the auditory nerve. *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 55, 240-243

Darrow, K.N., Maison, S.F., and Liberman, M.C. (2006). Cochlear efferent feedback balances interaural sensitivity. *Nat. Neurosci.* 9, 1474–1476.

Descoeur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., Couette, B., Busserolles, J., Courteix, C., Noel, J., et al. (2011). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol Med* 3, 266–278.

Ding, D.L., Wang, J., Salvi, R., Henderson, D., Hu, B.H., McFadden, S.L., and Mueller, M. (1999). Selective loss of inner hair cells and type-I ganglion neurons in carboplatin-treated chinchillas. Mechanisms of damage and protection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 884, 152–170.

Ding, D., Allman, B.L., and Salvi, R. (2012). Review: ototoxic characteristics of platinum antitumor drugs. *Anat Rec (Hoboken)* 295, 1851–1867.

Dror, A.A., and Avraham, K.B. (2010). Hearing impairment: a panoply of genes and functions. *Neuron* 68, 293–308.

Dulon, D., Aran, J.M., and Schacht, J. (1988). Potassium-depolarization induces motility in isolated outer hair cells by an osmotic mechanism. *Hear. Res.* 32, 123–129.

Duprat, F., Lesage, F., Patel, A.J., Fink, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol. Pharmacol.* 57, 906–912.

Ehrsson, H., Wallin, I., and Yachnin, J. (2002). Pharmacokinetics of oxaliplatin in humans. *Med. Oncol.* 19, 261–265.

Fuente, A. (2015). The olivocochlear system and protection from acoustic trauma: a mini literature review. *Front Syst Neurosci* 9, 94.

Fernandez, K.A., Jeffers, P.W.C., Lall, K., Liberman, M.C., and Kujawa, S.G. (2015). Aging after noise exposure: acceleration of cochlear synaptopathy in “recovered” ears. *J. Neurosci.* 35, 7509–7520.

Furman, A.C., Kujawa, S.G., and Liberman, M.C. (2013). Noise-induced cochlear neuropathy is selective for fibers with low spontaneous rates. *J. Neurophysiol.* 110, 577–586.

Glowatzki, E., and Fuchs, P.A. (2002). Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat. Neurosci.* 5, 147–154.

Goodman, S.S., and Keefe, D.H. (2006). Simultaneous measurement of noise-activated middle-ear muscle reflex and stimulus frequency otoacoustic emissions. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 7, 125–139.

Goutman, J.D. (2012). Transmitter release from cochlear hair cells is phase locked to cyclic stimuli of different intensities and frequencies. *J. Neurosci.* 32, 17025–17035a.

Grisold, W., Cavaletti, G., and Windebank, A.J. (2012). Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: diagnosis, treatment, and prevention. *Neuro-Oncology* 14 Suppl 4, iv45-54.

Grothey, A. (2003). Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. *Semin. Oncol.* 30, 5–13.

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

Guinan, J.J. (2012). How are inner hair cells stimulated? Evidence for multiple mechanical drives. *Hear. Res.* 292, 35–50.

Guinan, J.J. (2014). Olivocochlear efferent function: issues regarding methods and the interpretation of results. *Front Syst Neurosci* 8, 142.

Güvenç, M.G., Dizdar, D., Dizdar, S.K., Okutur, S.K., and Demir, G. (2016). Sudden hearing loss due to oxaliplatin use in a patient with colon cancer. *J Chemother* 28, 341–342.

Heffner, H.E., and Harrington, I.A. (2002). Tinnitus in hamsters following exposure to intense sound. *Hear. Res.* 170, 83–95.

Hellberg, V., Wallin, I., Eriksson, S., Hernlund, E., Jerremalm, E., Berndtsson, M., Eksborg, S., Arnér, E.S.J., Shoshan, M., Ehrsson, H., et al. (2009). Cisplatin and oxaliplatin toxicity: importance of cochlear kinetics as a determinant for ototoxicity. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 37–47.

Hibino, H., and Kurachi, Y. (2006). Molecular and physiological bases of the K<sup>+</sup> circulation in the mammalian inner ear. *Physiology (Bethesda)* 21, 336–345

Hickox, A.E., and Liberman, M.C. (2014). Is noise-induced cochlear neuropathy key to the generation of hyperacusis or tinnitus? *J. Neurophysiol.* 111, 552–564.

Hijri, F.Z., Arifi, S., Ouattassi, N., Mellas, N., and El Mesbahi, O. (2014). Oxaliplatin-induced ototoxicity in adjuvant setting for colorectal cancer: unusual side effect. *J Gastrointest Cancer* 45, 106–108.

Hinojosa, R., and Rodriguez-Echandia, E.L. (1966). The fine structure of the stria vascularis of the cat inner ear. *Am. J. Anat.* 118, 631–663.

Hoben, R., Easow, G., Pevzner, S., and Parker, M.A. (2017). Outer Hair Cell and Auditory Nerve Function in Speech Recognition in Quiet and in Background Noise. *Front Neurosci* 11, 157.

Hudspeth, A.J. (1985). The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells. *Science* 230, 745–752.

Irving, S., Moore, D.R., Liberman, M.C., and Sumner, C.J. (2011). Olivocochlear efferent control in sound localization and experience-dependent learning. *J. Neurosci.* 31, 2493–2501.

Jacobson, M., Kim, S., Romney, J., Zhu, X., and Frisina, R.D. (2003). Contralateral suppression of distortion-product otoacoustic emissions declines with age: a comparison of findings in CBA mice with human listeners. *Laryngoscope* 113, 1707–1713.

Jensen, J.B., Lysaght, A.C., Liberman, M.C., Qvortrup, K., and Stankovic, K.M. (2015). Immediate and delayed cochlear neuropathy after noise exposure in pubescent mice. *PLoS ONE* 10, e0125160.

Jewett, D.L., Romano, M.N., and Williston, J.S. (1970). Human auditory evoked potentials: possible brain stem components detected on the scalp. *Science* 167, 1517–1518.



Kamiya, K., Michel, V., Giraudet, F., Riederer, B., Foucher, I., Papal, S., Perfettini, I., Le Gal, S., Verpy, E., Xia, W., et al. (2014). An unusually powerful mode of low-frequency sound interference due to defective hair bundles of the auditory outer hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 9307–9312.

Kanjhan, R., Balke, C.L., Housley, G.D., Bellingham, M.C., and Noakes, P.G. (2004). Developmental expression of two-pore domain K<sup>+</sup> channels, TASK-1 and TREK-1, in the rat cochlea. *Neuroreport* *15*, 437–441.

Kazmierczak, P., Sakaguchi, H., Tokita, J., Wilson-Kubalek, E.M., Milligan, R.A., Müller, U., and Kachar, B. (2007). Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature* *449*, 87–91.

Kemp, D.T. (1978). Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J. Acoust. Soc. Am.* *64*, 1386–1391.

Kemp, D.T., and Brown, A.M. (1984). Ear canal acoustic and round window electrical correlates of 2f<sub>1</sub>-f<sub>2</sub> distortion generated in the cochlea. *Hear. Res.* *13*, 39–46.

Kikkawa, Y., Seki, Y., Okumura, K., Ohshiba, Y., Miyasaka, Y., Suzuki, S., Ozaki, M., Matsuoka, K., Noguchi, Y., and Yonekawa, H. (2012). Advantages of a mouse model for human hearing impairment. *Exp. Anim.* *61*, 85–98.

Kikuchi, T., Kimura, R.S., Paul, D.L., Takasaka, T., and Adams, J.C. (2000). Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *32*, 163–166.

Kim, Y.-H., and Holt, J.R. (2013). Functional contributions of HCN channels in the primary auditory neurons of the mouse inner ear. *J. Gen. Physiol.* 142, 207–223.

Kimura, R.S. (1975). The ultrastructure of the organ of Corti. *Int. Rev. Cytol.* 42, 173–222.

Kobel, M., Le Prell, C.G., Liu, J., Hawks, J.W., and Bao, J. (2017). Noise-induced cochlear synaptopathy: Past findings and future studies. *Hear. Res.* 349, 148–154.

Kujawa, S.G., and Liberman, M.C. (2001). Effects of olivocochlear feedback on distortion product otoacoustic emissions in guinea pig. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 2, 268–278.

Kujawa, S.G., and Liberman, M.C. (2009). Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. *J. Neurosci.* 29, 14077–14085.

Kujawa, S.G., and Liberman, M.C. (2015). Synaptopathy in the noise-exposed and aging cochlea: Primary neural degeneration in acquired sensorineural hearing loss. *Hear. Res.* 330, 191–199.

Le Calvez, S., Avan, P., Gilain, L., and Romand, R. (1998). CD1 hearing-impaired mice. I: Distortion product otoacoustic emission levels, cochlear function and morphology. *Hear. Res.* 120, 37–50.

Le Calvez, S., Guilhaume, A., Romand, R., Aran, J.M., and Avan, P. (1998). CD1 hearing-impaired mice. II. Group latencies and optimal f2/f1 ratios of distortion product otoacoustic emissions, and scanning electron microscopy. *Hear. Res.* 120, 51–61.

Léger, A.C., Moore, B.C.J., and Lorenzi, C. (2012). Abnormal speech processing in frequency regions where absolute thresholds are normal for listeners with high-frequency hearing loss. *Hear. Res.* 294, 95–103.

Liberman, M.C. (1980). Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: an electron-microscopic study of serial sections. *Hear. Res.* 3, 45–63.

Liberman, M.C. (1982). Single-neuron labeling in the cat auditory nerve. *Science* 216, 1239–1241.

Liberman, M.C., and Dodds, L.W. (1984). Single-neuron labeling and chronic cochlear pathology. III. Stereocilia damage and alterations of threshold tuning curves. *Hear. Res.* 16, 55–74.

Liberman, M.C., Liberman, L.D., and Maison, S.F. (2014). Efferent feedback slows cochlear aging. *J. Neurosci.* 34, 4599–4607.

Liberman, M.C., Epstein, M.J., Cleveland, S.S., Wang, H., and Maison, S.F. (2016). Toward a Differential Diagnosis of Hidden Hearing Loss in Humans. *PLoS ONE* 11, e0162726.

Liberman, M.C., and Kujawa, S.G. (2017). Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. *Hear. Res.* 349, 138–147.

Lobarinas, E., Salvi, R., and Ding, D. (2013). Insensitivity of the audiogram to carboplatin induced inner hair cell loss in chinchillas. *Hear. Res.* 302, 113–120.

Maison, S.F., Adams, J.C., and Liberman, M.C. (2003). Olivocochlear innervation in the mouse: immunocytochemical maps, crossed versus uncrossed contributions, and transmitter colocalization. *J. Comp. Neurol.* *455*, 406–416.

Maison, S.F., Usubuchi, H., Vetter, D.E., Elgoyhen, A.B., Thomas, S.A., and Liberman, M.C. (2012). Contralateral-noise effects on cochlear responses in anesthetized mice are dominated by feedback from an unknown pathway. *J. Neurophysiol.* *108*, 491–500.

Makary, C.A., Shin, J., Kujawa, S.G., Liberman, M.C., and Merchant, S.N. (2011). Age-related primary cochlear neuronal degeneration in human temporal bones. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* *12*, 711–717.

Malhotra, N.K., Aslam, R., Lipman, S.P., and Bilski, V.J. (2010). Acute ototoxicity from a single infusion of oxaliplatin. *Ear Nose Throat J* *89*, 258–261.

McFadden, S.L., Ding, D., Jiang, H., and Salvi, R.J. (2004). Time course of efferent fiber and spiral ganglion cell degeneration following complete hair cell loss in the chinchilla. *Brain Res.* *997*, 40–51.

Mehraei, G., Hickox, A.E., Bharadwaj, H.M., Goldberg, H., Verhulst, S., Liberman, M.C., and Shinn-Cunningham, B.G. (2016). Auditory Brainstem Response Latency in Noise as a Marker of Cochlear Synaptopathy. *J. Neurosci.* *36*, 3755–3764.

Merchan-Perez, A., and Liberman, M.C. (1996). Ultrastructural differences among afferent synapses on cochlear hair cells: correlations with spontaneous discharge rate. *J. Comp. Neurol.* *371*, 208–221.

Miller, J.M., Chi, D.H., O'Keeffe, L.J., Kruszka, P., Raphael, Y., and Altschuler, R.A. (1997). Neurotrophins can enhance spiral ganglion cell survival after inner hair cell loss. *Int. J. Dev. Neurosci.* *15*, 631–643.

Moore, B.C., and Alcántara, J.I. (2001). The use of psychophysical tuning curves to explore dead regions in the cochlea. *Ear Hear* *22*, 268–278.

Moore, B.C.J. (2008). Basic auditory processes involved in the analysis of speech sounds. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* *363*, 947–963.

Moser, T., and Starr, A. (2016). Auditory neuropathy--neural and synaptic mechanisms. *Nat Rev Neurol* *12*, 135–149.

Ohlemiller, K.K. (2006). Contributions of mouse models to understanding of age- and noise-related hearing loss. *Brain Res.* *1091*, 89–102.

Ohlemiller, K.K., Dahl, A.R., and Gagnon, P.M. (2010). Divergent aging characteristics in CBA/J and CBA/CaJ mouse cochleae. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* *11*, 605–623.

Ohlemiller, K.K., Jones, S.M., and Johnson, K.R. (2016). Application of Mouse Models to Research in Hearing and Balance. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* *17*, 493–523.

Ou, H.C., Harding, G.W., and Bohne, B.A. (2000). An anatomically based frequency-place map for the mouse cochlea. *Hear. Res.* *145*, 123–129.

Oxenham, A.J. (2016). Predicting the Perceptual Consequences of Hidden Hearing Loss. *Trends Hear* 20, 2331216516686768.

Pickles, J.O., and Corey, D.P. (1992). Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Trends Neurosci.* 15, 254–259.

Plack, C.J., Barker, D., and Prendergast, G. (2014). Perceptual consequences of “hidden” hearing loss. *Trends Hear* 18.

Poupon, L., (Thèse soutenue en 2015). Etude de l’implication de canaux ioniques, cibles moléculaires pour le développement de nouveaux antalgiques dans le traitement de la neuropathie chimio-induite à l’oxaliplatine

Puel, J.L. (1995). Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog. Neurobiol.* 47, 449–476.

Pujol, R., and Puel, J.L. (1999). Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 884, 249–254.

Rabbitt, R.D., and Brownell, W.E. (2011). Efferent modulation of hair cell function. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 19, 376–381.

Rajan, R., and Cainer, K.E. (2008). Ageing without hearing loss or cognitive impairment causes a decrease in speech intelligibility only in informational maskers. *Neuroscience* 154, 784–795.

Ramakrishnan, N.A., Drescher, M.J., Khan, K.M., Hatfield, J.S., and Drescher, D.G. (2012). HCN1 and HCN2 proteins are expressed in cochlear hair cells: HCN1 can form a ternary complex with protocadherin 15 CD3 and F-actin-binding filamin A or can interact with HCN2. *J. Biol. Chem.* 287, 37628–37646.

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

Richardson, G.P., de Monvel, J.B., and Petit, C. (2011). How the genetics of deafness illuminates auditory physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 311–334.

Riva, C., Donadieu, E., Magnan, J., and Lavieille, J.-P. (2007). Age-related hearing loss in CD/1 mice is associated to ROS formation and HIF target proteins up-regulation in the cochlea. *Exp. Gerontol.* 42, 327–336.

Robertson, D. (1983). Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 9, 263–278.

Ross, M.D. (1974). The tectorial membrane of the rat. *Am. J. Anat.* 139, 449–481.

Roux, I., Safieddine, S., Nouvian, R., Grati, M. 'hamed, Simmler, M.-C., Bahloul, A., Perfettini, I., Le Gall, M., Rostaing, P., Hamard, G., et al. (2006). Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell* 127, 277–289.

Ruel, J., Wang, J., Rebillard, G., Eybalin, M., Lloyd, R., Pujol, R., and Puel, J.-L. (2007). Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear. Res.* 227, 19–27.

Ruel, J., Wang, J., Pujol, R., Hameg, A., Dib, M., and Puel, J.L. (2005). Neuroprotective effect of riluzole in acute noise-induced hearing loss. *Neuroreport* 16, 1087–1090.

Ruggero, M.A. (1992). Responses to sound of the basilar membrane of the mammalian cochlea. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2, 449–456.

Russell, I.J., and Sellick, P.M. (1983). Low-frequency characteristics of intracellularly recorded receptor potentials in guinea-pig cochlear hair cells. *J. Physiol. (Lond.)* 338, 179–206.

Rutherford, M.A., and Pangršič, T. (2012). Molecular anatomy and physiology of exocytosis in sensory hair cells. *Cell Calcium* 52, 327–337.

Rybak, L.P. (2007). Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 15, 364–369.

Saroul N., Giraudet F., Gilain L., Mom T., Avan P. (2015) Physiologie cochléaire : bases anatomiques, cellulaires et électrophysiologiques. EMC. 20 (4)

Schaette, R., and McAlpine, D. (2011). Tinnitus with a normal audiogram: physiological evidence for hidden hearing loss and computational model. *J. Neurosci.* 31, 13452–13457.

Schuknecht, H.F., and Woellner, R.C. (1953). Hearing losses following partial section of the cochlear nerve. *Laryngoscope* 63, 441–465.



Sergeyenko, Y., Lall, K., Liberman, M.C., and Kujawa, S.G. (2013). Age-related cochlear synaptopathy: an early-onset contributor to auditory functional decline. *J. Neurosci.* 33, 13686–13694.

Shone, G., Raphael, Y., and Miller, J.M. (1991). Hereditary deafness occurring in *cd/1* mice. *Hear. Res.* 57, 153–156.

Simon, E., Perrot, X., and Mertens, P. (2009). [Functional anatomy of the cochlear nerve and the central auditory system]. *Neurochirurgie* 55, 120–126.

Sohmer, H., and Feinmesser, M. (1967). Cochlear action potentials recorded from the external ear in man. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 76, 427–435.

Spoendlin, H. (1972). Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol.* 73, 235–248.

Spoendlin, H. (1975). Retrograde degeneration of the cochlear nerve. *Acta Otolaryngol.* 79, 266–275.

Spoendlin, H. (1984). Factors inducing retrograde degeneration of the cochlear nerve. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 112, 76–82.

Starr, A., Picton, T.W., Sininger, Y., Hood, L.J., and Berlin, C.I. (1996). Auditory neuropathy. *Brain* 119 ( Pt 3), 741–753.

Stöver, T., and Diensthuber, M. (2011). Molecular biology of hearing. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 10, Doc06.

Suzuki, J., Corfas, G., and Liberman, M.C. (2016). Round-window delivery of neurotrophin 3 regenerates cochlear synapses after acoustic overexposure. *Sci Rep* 6, 24907.

Takeuchi, S., Ando, M., and Kakigi, A. (2000). Mechanism generating endocochlear potential: role played by intermediate cells in stria vascularis. *Biophys. J.* 79, 2572–2582.

Tsuprun, V., and Santi, P. (2002). Structure of outer hair cell stereocilia side and attachment links in the chinchilla cochlea. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 493–502.

Turner, J.G., Brozoski, T.J., Bauer, C.A., Parrish, J.L., Myers, K., Hughes, L.F., and Caspary, D.M. (2006). Gap detection deficits in rats with tinnitus: a potential novel screening tool. *Behav. Neurosci.* 120, 188–195.

van Ruijven, M.W.M., de Groot, J.C.M.J., Klis, S.F.L., and Smoorenburg, G.F. (2005). The cochlear targets of cisplatin: an electrophysiological and morphological time-sequence study. *Hear. Res.* 205, 241–248.

Verpy, E., Leibovici, M., Michalski, N., Goodyear, R.J., Houdon, C., Weil, D., Richardson, G.P., and Petit, C. (2011). Stereocilin connects outer hair cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane. *J. Comp. Neurol.* 519, 194–210.

Verpy, E., Weil, D., Leibovici, M., Goodyear, R.J., Hamard, G., Houdon, C., Lefèvre, G.M., Hardelin, J.-P., Richardson, G.P., Avan, P., et al. (2008). Stereocilin-deficient mice reveal the origin of cochlear waveform distortions. *Nature* 456, 255–258.

Versnel, H., Prijs, V.F., and Schoonhoven, R. (1997). Auditory-nerve fiber responses to clicks in guinea pigs with a damaged cochlea. *J. Acoust. Soc. Am.* 101, 993–1009.

Viana, L.M., O'Malley, J.T., Burgess, B.J., Jones, D.D., Oliveira, C.A.C.P., Santos, F., Merchant, S.N., Liberman, L.D., and Liberman, M.C. (2015). Cochlear neuropathy in human presbycusis: Confocal analysis of hidden hearing loss in post-mortem tissue. *Hear. Res.* 327, 78–88.

Von Bekesy, G. (1955). [Contribution on the question of frequency analysis in the cochlea]. *Arch Ohren Nasen Kehlkopfheilkd* 167, 238–255.

Wang, J., Dib, M., Lenoir, M., Vago, P., Eybalin, M., Hameg, A., Pujol, R., and Puel, J.-L. (2002). Riluzole rescues cochlear sensory cells from acoustic trauma in the guinea-pig. *Neuroscience* 111, 635–648.

Wong, A.C.Y., and Ryan, A.F. (2015). Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea. *Front Aging Neurosci* 7, 58.

Yamasoba, T., Lin, F.R., Someya, S., Kashio, A., Sakamoto, T., and Kondo, K. (2013). Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. *Hear. Res.* 303, 30–38.

Yüce, S., Seker, M.M., Koç, S., Uysal, I.O., Kaçan, T., Doğan, M., Doğan, M., Babacan, N.A., and Kiliçkap, S. (2014). Oxaliplatin and ototoxicity: is it really safe for hearing? *Turk J Med Sci* 44, 586–589.

Zeng, F.-G., Kong, Y.-Y., Michalewski, H.J., and Starr, A. (2005). Perceptual consequences of disrupted auditory nerve activity. *J. Neurophysiol.* 93, 3050–3063.

Zhang, S., Lovejoy, K.S., Shima, J.E., Lagpacan, L.L., Shu, Y., Lapuk, A., Chen, Y., Komori, T., Gray, J.W., Chen, X., et al. (2006). Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res.* *66*, 8847–8857.

Zheng, J., Shen, W., He, D.Z., Long, K.B., Madison, L.D., and Dallos, P. (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* *405*, 149–155.

Zhu, X., Vasilyeva, O.N., Kim, S., Jacobson, M., Romney, J., Waterman, M.S., Tuttle, D., and Frisina, R.D. (2007). Auditory efferent feedback system deficits precede age-related hearing loss: contralateral suppression of otoacoustic emissions in mice. *J. Comp. Neurol.* *503*, 593–604.



## **Annexe**

### **Etude préliminaire de l'impact de l'oxaliplatine sur le vestibule : approches comportementales**

Nous avons réalisé une étude préliminaire sur les effets de l'injection transtympanique d'une dose importante d'oxaliplatine (2 mM) sur le vestibule. Pour cela, nous avons utilisé 3 tests comportementaux : l'Open Field, le Tail Hanging Landing et la nage forcée.

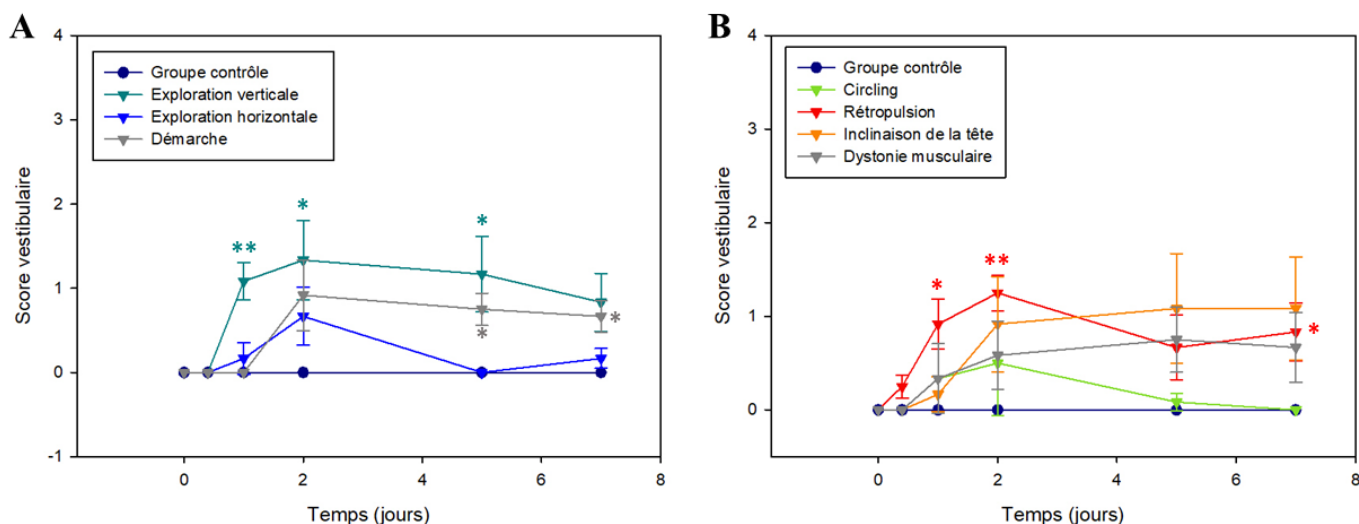
Pour les tests comportementaux, nous avons utilisé les souris ayant reçu une injection transtympanique de véhicule (n=5) et les souris ayant reçu une injection transtympanique d'oxaliplatine à 2 mM (n=6). Les animaux ont tous été habitués à la manipulation avant l'expérience. Cependant, ils n'ont pas été habitués à l'Open Field afin de conserver leur comportement spontané, notamment d'exploration. Nous avons réalisé les tests comportementaux avec toutes les souris une fois, avant les injections transtympanique, pour avoir une « ligne de base », ce qui correspond à J0. Les tests comportementaux ont ensuite été réitérés 4 heures après l'injection, 1 jour après, 2 jours après, 5 jours après et 7 jours après. Un score vestibulaire sur 3 a été attribué à une souris lorsqu'elle montrait un comportement symptôme d'un trouble vestibulaire.

## **Open Field**

Dans un premier temps, nous avons évalué le comportement général (Figure 1, A) et le comportement spontané (Figure 1, B) des animaux en Open Field suite aux injections transtympaniques. Le test de l'Open Field consiste à placer l'animal dans un espace délimité par des parois infranchissables pendant 2 minutes.

<b>Comportement spontané</b>	Description du comportement
Circling	L'animal tourne en rond
Rétropulsion	L'animal recule
Dystonie musculaire	L'animal reporte l'essentiel de son poids du corps sur un côté
Inclinaison de la tête	L'animal à la tête penchée du côté du vestibule atteint
Redressement	L'animal est redressé sur ses deux pattes postérieures
<b>Comportement général</b>	Description du comportement
Exploration verticale	L'animal se redresse pour explorer
Exploration horizontale	L'animal se déplace pour explorer
Démarche	Evaluation de la qualité de la marche

**Tableau 1** : Description des comportements évalués lors du test de l'Open Field



### **Figure 1 : Evolution du comportement en Open Field.**

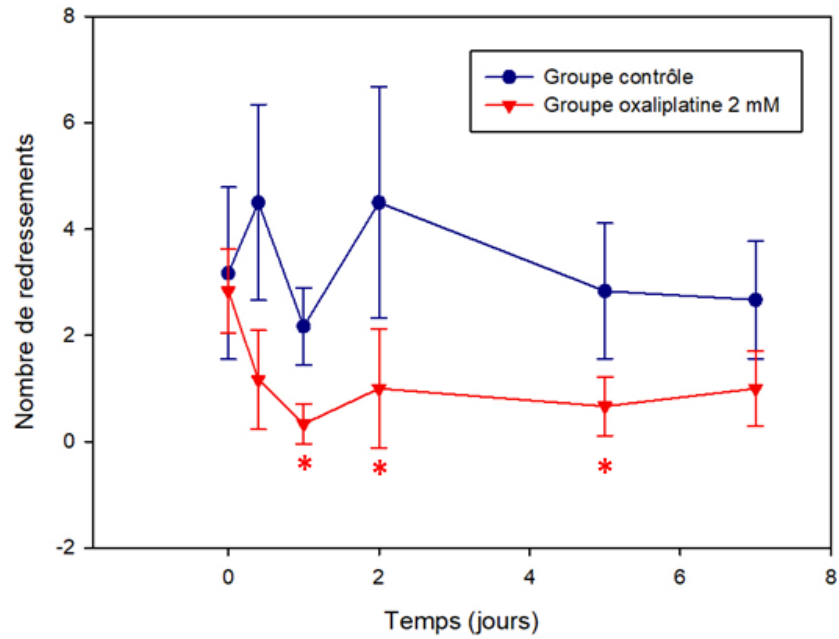
Scores vestibulaires moyens ( $\pm$ SEM) en fonction du temps pour le groupe de souris contrôle injecté en trans-tympanique avec le véhicule (n=5) et pour le groupe de souris injecté avec 2mM d'oxaliplatine (n=6). Evaluation du comportement général (A) et spontané (B). (\*p<0,05 ; \*\*p<0,01)

L'évaluation du comportement général a révélé une diminution de l'exploration verticale à partir de 24 h et de la qualité de la marche à partir de 2 jours chez les souris injectées avec l'oxaliplatine à 2 mM. Ces comportements ne mettent pas directement en évidence un trouble vestibulaire, mais ils sont à mettre en relation avec les comportements spontanés.

L'évaluation du comportement spontané a montré une augmentation de la rétropulsion dès 24 h. Pour les autres comportements, la différence n'était pas significative, car seulement quelques souris les ont présentés. Une seule souris a fait du circling, 4 souris avaient leur tête inclinée de façon marquée et présentaient une dystonie musculaire.

Le nombre de redressements a également été compté pour toutes les souris, les résultats sont présentés en figure 2.





**Figure 2 : Evolution du nombre de redressements en Open Field.**

Nombre de redressements moyens ( $\pm$ SEM) en fonction du temps pour le groupe de souris contrôles injectées en transtympanique avec le véhicule (n=5) et pour le groupe de souris injecté avec 2mM d'oxaliplatine (n=6). (\*p<0,05)

Les souris injectées avec l'oxaliplatine ont montré une diminution significative du nombre de leurs redressements dès 24 h en comparaison des souris contrôles. Les variations chez les souris contrôles sont probablement dues au fait que les souris finissent par s'habituer à l'environnement et cessent de l'explorer.

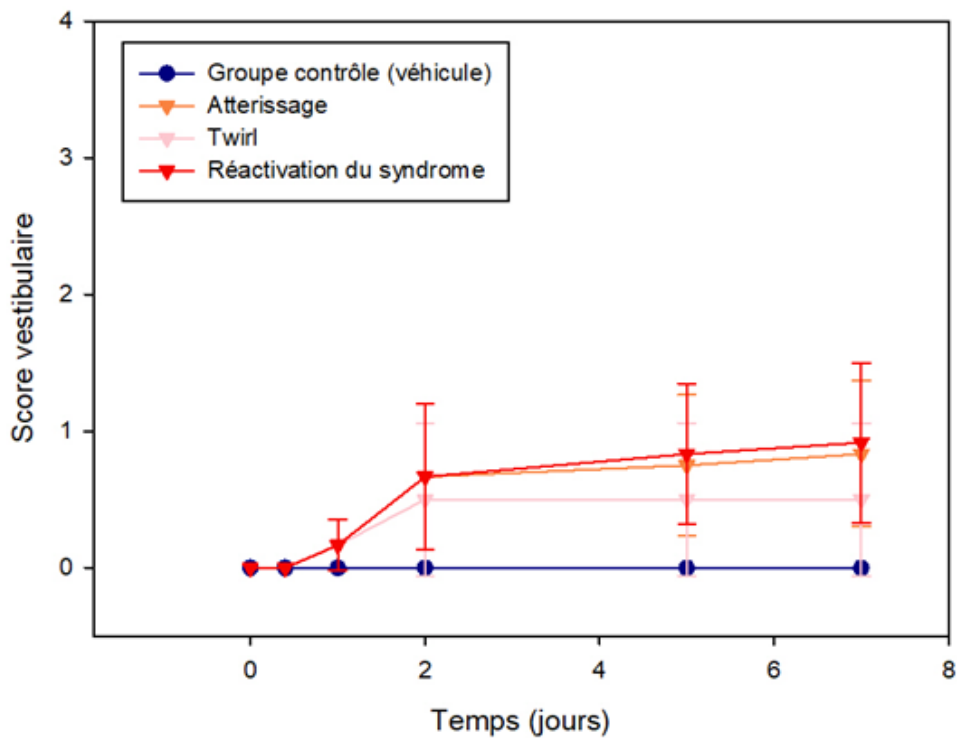
## **Tail Hanging Landing**

Nous avons également évalué le comportement des souris au test du Tail Hanging Landing. Lors de ce test, l'animal est soulevé par la queue vers le haut puis il est reposé sur le sol rapidement, cette manipulation est répétée 2 fois.

<b>Tail Hanging Landing</b>	Description du comportement
Atterrissage	Evaluation de la qualité de l'atterrissage
Twist	L'animal tourne sur lui-même
Réactivation du syndrome	L'animal perd l'équilibre lorsqu'il revient au sol

**Tableau 2 :** Description des comportements évalués lors du test du Tail Hanging Landing

Le Tail Hanging Landing évalue la capacité de l'animal à garder ses repères dans l'espace lorsqu'il est soulevé par la queue. Il a été pratiqué chez le groupe de souris injecté avec le véhicule et le groupe de souris injecté avec 2 mM d'oxaliplatine (Figure 3).



**Figure 3 : Evolution du comportement pendant le test Tail Hanging Landing.**

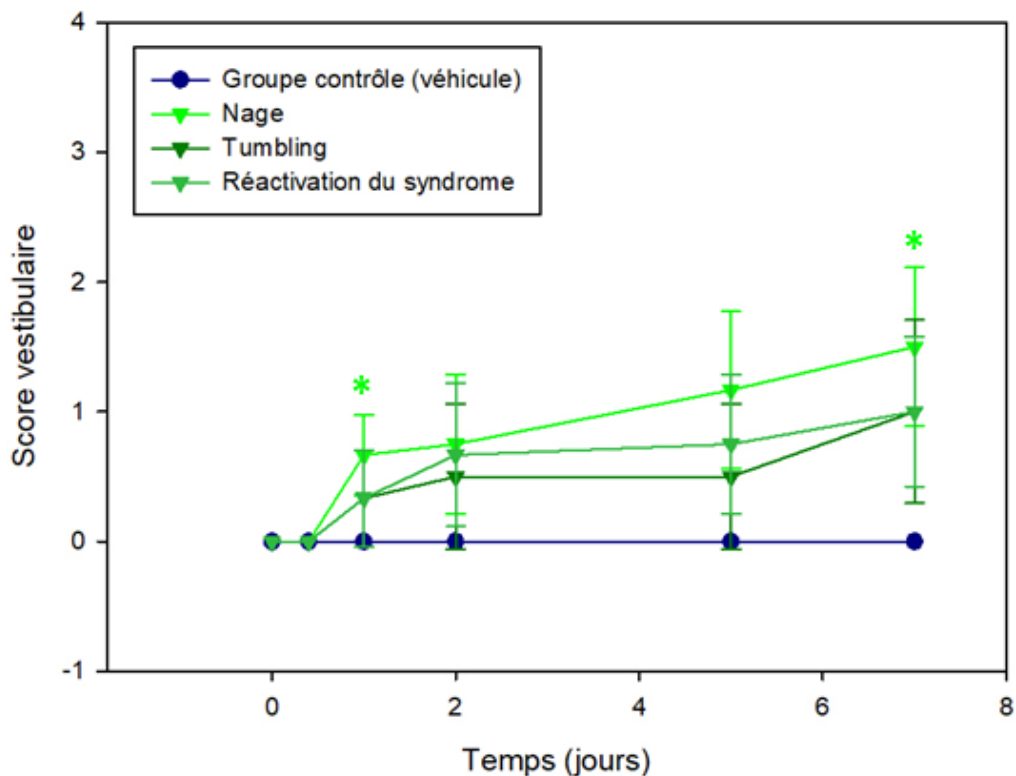
Scores vestibulaires moyens ( $\pm$ SEM) en fonction du temps pour le groupe de souris contrôle injecté en trans-tympanique avec le véhicule (n=5) et pour le groupe de souris injecté avec 2mM d'oxaliplatine (n=6). (\*p<0,05)

Le test du Tail Hanging Landing n'a pas révélé de différences significatives entre les comportements des deux groupes de souris. En effet, une seule souris tournait sur elle-même (twirl), 4 souris ont fait des atterrissages « ratés » et montraient une réactivation du syndrome après le test.

## Test de la nage forcée

Nous avons évalué la nage des souris, dans un bac d'eau délimité par des parois infranchissables par l'animal, pendant 30 secondes.

Comportement lié à la nage	Description du comportement
Nage	Evalue la qualité de la nage
Tumbling	L'animal ne nage pas et tourne sur lui-même
Réactivation du syndrome	L'animal perd l'équilibre lorsqu'il est replacé sur le sol



**Figure 4 : Evolution de la capacité à nager.**

Scores vestibulaires moyens ( $\pm$ SEM) en fonction du temps pour le groupe de souris contrôlé injecté en trans-tympanique avec le véhicule (n=5) et pour le groupe de souris injecté avec 2mM d'oxaliplatine (n=6). (\*p<0,05)

La qualité de la nage était diminuée chez le groupe de souris injecté avec l'oxaliplatine à 1 et 7 jours en comparaison du groupe contrôle (Figure 4). Ces souris nageaient de travers et montraient des difficultés à maintenir leur tête hors de l'eau. Seules deux souris ont présenté un comportement de tumbling et ne pouvaient pas nager.

**En conclusion, ces différents tests ont révélé des troubles vestibulaires évidents chez 4 des 6 souris injectées avec 2mM d'oxaliplatine. Ces 4 souris présentaient des comportements caractéristiques tels qu'une dystonie musculaire, une inclinaison de la tête et une tendance à la rétropulsion. Elles perdaient leurs repères dans l'espace lors du test du Tail Hanging Landing, et n'anticipaient plus correctement l'atterrissage. De plus, une incapacité à rétablir leur équilibre a été mise en évidence lors du test de nage forcée, où certaines souris tournaient sur elles-mêmes et d'autres nageaient asymétriquement. Les 2 souris restantes semblaient moins affectées ce qui pourrait être expliqué par le fait qu'une quantité d'oxaliplatine plus faible a atteint le vestibule lors de l'injection transtympanique. Globalement, toutes les souris du groupe oxaliplatine présentaient une diminution de l'exploration verticale.**





## Résumé

Les surdités neurosensorielles sont classiquement décrites par une élévation des seuils auditifs généralement corrélée à une dégénérescence des cellules ciliées externes (CCE). Toutefois, des travaux récents sur des modèles animaux ont montré qu'un audiogramme normal pouvait être associé à des atteintes auditives périphériques. Ce travail de thèse a contribué à mieux caractériser chez des modèles murins, ces déficiences supraliminales cachées liées d'une part, à des altérations des CCE et d'autre part, à la dégénérescence de certaines fibres nerveuses auditives. Dans la première partie de cette thèse, l'évolution des profils auditifs de souris présentant une dégénérescence accélérée des CCE, les souris de souche CD1-RjOrl : SWISS, a été caractérisée. Dans cette étude longitudinale, menée au cours du premier mois postnatal, une progressivité de la déficience auditive a été montrée. Toutefois, une discordance surprenante a été mise en évidence entre des seuils auditifs proches des valeurs normales à haute fréquence combinés à des produits de distorsions acoustiques (PDA) absents. Les courbes d'accord de masquage montrent un décalage des pointes vers les basses fréquences. Ces données indiquent que les CCE de la base ne sont plus fonctionnelles et que la perception des hautes fréquences est perturbée. Les observations en microscopie électronique à balayage ont révélé une conformation anormale de la touffe stéréociliaire des CCE au niveau de la base de la cochlée. Ces données témoignent d'une désorganisation de la tonotopie cochléaire. Dans la deuxième partie de cette thèse, l'effet de l'oxaliplatine sur la fonction auditive et sur la morphologie cochléaire a été décrit chez des souris adultes de souche CBA/J. L'oxaliplatine, un sel de platine utilisé en chimiothérapie, a de nombreux effets secondaires parmi lesquels l'apparition d'une neuropathie périphérique. À la suite d'un traitement avec cette drogue, les souris ne présentent pas d'élévation des seuils auditifs et pas d'altération de la fonction des CCE. Cependant, l'étude histologique révèle une dégénérescence surprenante des fibres auditives du ganglion spiral. Avec des tests électrophysiologiques supplémentaires, une diminution de l'amplitude du potentiel d'action composite a été mise en évidence. Le réflexe du système éfferent olivocochléaire médian, évalué par un test de suppression contralatéral, semble également être diminué par le traitement. Les souris traitées avec de l'oxaliplatine constituent donc un modèle animal précieux de surdité cachée, qui demande à être mieux caractérisé. Les résultats de ces études confirment l'insuffisance de l'audiogramme pour détecter des altérations subtiles de la cochlée et montrent la nécessité d'améliorer le diagnostic de ces déficiences supraliminales. Ainsi, les atteintes cachées des CCE peuvent être détectées par l'absence de PDA associée à des potentiels évoqués auditifs normaux et les neuropathies par des PDA présents associés à des potentiels évoqués auditifs anormaux. La combinaison de ces différents tests fonctionnels et électrophysiologiques permettrait une meilleure prise en charge des patients et une amélioration de leur qualité de vie.

**Mots clés :** surdité cachée, souris CD1, cellules ciliées externes, courbe d'accord de masquage, tonotopie, oxaliplatine, ganglion spiral, neuropathie.

## Abstract

Sensorineural hearing loss are classically described by auditory thresholds elevation usually correlated with outer hair cells (OHC) degeneration. However, recent work on animal models has shown that normal audiogram can be associated with peripheral hearing impairments. This thesis contributed to better characterize, in mouse models, these hidden supraliminal deficiencies related on the one hand, with OHC alterations and on the other, to auditory nerve fibers degeneration. In the first part of this thesis, the auditory profiles evolution of mice exhibiting an OHC accelerated degeneration, the CD1-RjOrl : SWISS strain mice, was characterized. In this longitudinal study, conducted in the first postnatal month, a progressivity of the hearing impairment has been observed. However, a surprising discrepancy was found between high frequency hearing thresholds close to normal values associated with missing distortion product otoacoustic emission (DPOAE). The masking tuning curves dips are shifted toward low frequencies. Those data indicate that basal OHC are no longer functional and the perception of high frequencies is disrupted. Observations in scanning electron microscopy revealed an abnormal conformation of the OHC stereocilia bundles at the cochlea base. These results represent an evidence of a disorganized cochlear tonotopy. In the second part of this thesis, the effect of oxaliplatin on the auditory function and on the cochlear morphology was described in adult CBA/J strain mice. Oxaliplatin, a platinum salt used in chemotherapy, has many side effects including development of peripheral neuropathy. Following one treatment with this drug, mice did not present any hearing threshold elevation or OHC function impairment. However, the histological study reveals a surprising degeneration of the spiral ganglion cells. With additional electrophysiological tests, a decrease in the compound action potential amplitude has been demonstrated. The median olivocochlear efferent system reflex, evaluated by a contralateral suppression test, also seems to be diminished by the treatment. The mice treated with oxaliplatin, therefore constitute a precious animal model of hidden deafness, which needs to be better characterized. The results of these studies confirm the audiogram insufficiency to detect subtle cochlea alterations and reveal the need to improve supraliminal deficiencies diagnosis. Thus, hidden OHC impairments can be detected by the absence of DPOAE associated with normal auditory evoked potentials and neuropathies by the presence of DPOAE associated with abnormal auditory evoked potentials. The combination of these functional and electrophysiological tests would allow better management of patients and an improvement in their quality of life.

**Keywords:** hidden hearing loss, CD1 mice, outer hair cells, masking tuning curves, tonotopy, oxaliplatine, spiral ganglion, neuropathy