



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

par Ludivine Wathier

**Modifications de l'amplitude du réflexe de l'oreille moyenne
après inhalation de solvant.**

Conséquences physiologiques pour les expositions au bruit

Le 16 décembre 2016

Membres du jury :

Rapporteurs : Robert GARNIER, Professeur, Université de Paris-Diderot

Jordi LLORENS, Professeur, Université de Barcelone

Examineurs : Paul AVAN, Professeur, Université de Clermont-Ferrand

Monique CHALANSONNET, Chargé de recherche, INRS

Directeur de thèse : Pierre CAMPO, Directeur de recherche, INRS

Co-directrice de thèse : Cécile PARIETTI-WINKLER, Professeur, Université de Lorraine

Invités : Philippe PERRIN, Professeur, Université de Lorraine

Joël DUCOURNEAU, Professeur, Université de Lorraine

Institut National de Recherche et de Sécurité
Département Toxicologie et Biométrie
Rue du Morvan, CS 60027, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy



DevAH EA 3450 – Développement, Adaptation et Handicap
Régulations cardio-respiratoires et de la motricité-Université de Lorraine

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les Prs Robert Garnier et Jordi Llorens, rapporteurs, le Pr Paul Avan et le Dr Monique Chalansonnet, examinateurs, qui me font l'honneur de juger mon travail. Merci également, aux Prs Philippe Perrin et Joël Ducourneau pour leur participation à mon jury de thèse.

Je souhaite ensuite remercier sincèrement mon directeur de thèse, le Dr Pierre Campo qui a su me convaincre qu'il n'était pas trop tard pour me lancer dans un doctorat malgré mes connaissances limitées sur les « performances auditives ». Ses conseils avisés ont été d'une aide précieuse dans ma formation d'apprenti responsable d'études.

J'aimerais remercier le Pr Cécile Parietti-Winkler d'avoir accepté de co-encadrer cette thèse.

Je voudrais également remercier chaleureusement toutes les personnes du département Toxicologie et Biométrie qui ont participées de près comme de loin à ce travail et qui ont contribué à la réalisation de ces travaux dans une ambiance studieuse et sereine. Je remercie également Axel Gansmüller pour sa patience et sa pédagogie dont il a fait preuve pendant notre collaboration.

Je remercie la Direction de l'Institut National de Recherche et de Sécurité de m'avoir autorisée à consacrer tout mon temps à ma thèse et ainsi, d'avoir pu mener à bien ces travaux de bonnes conditions.

*La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.
La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pas pourquoi.*
Albert Einstein

Sommaire

<i>Liste des abréviations</i>	i
<i>Liste des unités.....</i>	ii
<i>Liste des figures</i>	iii
<i>Liste des tableaux</i>	vi
Introduction générale.....	1
Rappels de physiologie de l'audition	5
I. Physiologie du récepteur auditif	6
A. Oreilles externe et moyenne : les transductions	6
B. L'oreille interne	7
C. L'organe de Corti.....	8
D. Physiologie cochléaire.....	10
E. Produits de distorsion acoustique cubique	12
II. Les réflexes de l'audition	13
A. Le réflexe de l'oreille interne	13
B. Le réflexe de l'oreille moyenne.....	14
Première partie : le réflexe de l'oreille moyenne comme outil de criblage	18
I. Introduction	19
II. Matériels et méthodes	21
A. Animaux	21

B.	Solvants	22
C.	Exposition aux solvants par inhalation.....	23
a.	Aptitude des solvants à se vaporiser.....	24
b.	Inhalation par voie intra-trachéale.....	24
c.	Inhalation en chambre à atmosphère contrôlée	29
D.	Mesure du réflexe acoustique	31
a.	Enregistrement des produits de distorsion acoustique.....	31
b.	Stimulation acoustique controlatérale	32
E.	Analyse des prélèvements atmosphériques et des échantillons biologiques	34
a.	Dosage des solvants dans le charbon actif.....	34
b.	Dosage des solvants dans le sang et le cerveau	35
F.	Histologie cochléaire	36
G.	Analyses statistiques.....	36
III.	Résultats	38
A.	Test de criblage.....	38
a.	Contrôles de la génération d'atmosphère	38
b.	Dosages des solvants dans les tissus	39
c.	Variation de l'amplitude du ROM	42
B.	Absorption	46
C.	Histologie de la cochlée.....	49
Seconde partie : étude de la fluidité membranaire après exposition au toluène		51
I.	Introduction	52
A.	Composition lipidique de la membrane.....	52
B.	Mouvements des phospholipides membranaires	54
C.	Principe de la Résonance Magnétique Nucléaire	56
D.	Etude de la fluidité des membranes de microsomes	58

II. Matériels et Méthodes	62
A. Exposition des animaux.....	62
B. Préparation des microsomes	62
C. Spectroscopie RMN	64
a. Température de transition de phase	64
b. Anisotropie du déplacement chimique	65
III. Résultats	66
A. Composition des microsomes de cerveau de rat.....	66
B. Mobilité des têtes polaires	67
C. Mouvements des chaînes hydrophobes	69
Discussion	72
Conclusion générale	79
Bibliographie	81

Liste des abréviations

Ach	Acétylcholine
ATPase	Acétyl-tri-phosphatase
C	Carbone
Ca ²⁺	Ion calcium
CCE	Cellules Ciliées Externes
CCI	Cellules Ciliées Internes
CSA	Chemical Shift Anisotropy (anisotropie du déplacement chimique)
EDTA	Acide diéthylène-amino-tétra-acétique
FC	Fréquence caractéristique
FFT	Transformée de Fourier
FID	Free Induction Decay
<i>ip</i>	intrapéritonéale
K ⁺	Ion potassium
Kow	Coefficient de partage octanol/eau
MAS	Magic Angle Speed (rotation à l'angle magique)
NMDA	Acide N-Méthyl-D-Aspartique
Na ⁺	Ion sodium
PC	Phosphatidylcholine
PDA	Produit de Distorsion Acoustique
PE	Phosphatidyléthanolamine
Pi	Phosphate inorganique
PMC	Potentiel microphonique cochléaire
PME	Phosphomonoesters
rf	Champ radiofréquence
ROI	Réflexe de l'oreille interne
ROM	Réflexe de l'oreille moyenne
SC	Stimulation controlatérale
SNC	Système Nerveux Central
SOC	Complexe Olivo-Cochléaire
Tm	Température de transition de phase
vs.	versus

Liste des unités

atm	Atmosphère
°C	Degré Celsius
dB	Décibel
dB SPL	Décibel Sound Pressure Level
g	Gramme
h	Heure
Hz	Hertz
kg	Kilogramme
kHz	Kilohertz
m	Mètre
M	Molaire
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mm	Millimètre
μL	Microlitre
mM	Millimolaire
min	Minutes
μm	Micromètre
μmol	Micromole
mV	Millivolt
nm	Nanomètre
s	Seconde
ppm	Partie par million
μs	Microseconde

Liste des figures

- Figure 1 :** schéma représentant l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne. 7
- Figure 2 :** coupe axiale de cochlée montrant la position de l'organe de Corti entre les trois rampes cochléaires. CCI : cellules ciliées internes. CCE : cellules ciliées externes. (G x 200). 9
- Figure 3 :** photographie des cellules sensorielles de l'organe de Corti obtenue au microscope électronique à balayage montrant la rangée de stéréocils en palissade des cellules ciliées internes (CCI) et les trois rangées de cellules ciliées externes (CCE) avec leurs stéréocils en forme de V. 9
- Figure 4 :** amplificateur cochléaire : sélectivité en fréquences de l'organe de Corti. 11
- Figure 5 :** voies nerveuses du réflexe olivo-cochléaire. Les voies afférentes sont les lignes rouges, les voies efférentes sont les lignes bleues. NC_D : noyau cochléaire dorsal ; NC_V : noyau cochléaire ventral ; SOC : complexe olivaire supérieur ; VII : noyau du nerf facial ; FOCC : fibres olivo-cochléaires croisées ; FOCD : fibres olivo-cochléaires directes. 14
- Figure 6 :** schéma représentant l'insertion des muscles de l'oreille moyenne : le muscle stapédien inséré à l'arrière du col de l'étrier et le muscle *tensor tympani*, fiché dans la partie antéropostérieure du manche du marteau. 15
- Figure 7 :** schéma des voies nerveuses du réflexe de l'oreille moyenne. Les voies afférentes sont en rouge, les voies efférentes innervant le muscle stapédien sont bleues et les voies efférentes spécifiques au *tensor tympani* sont en lignes pleines vertes. La ligne pointillée verte schématise les connexions nerveuses entre les voies afférentes et efférentes du *tensor tympani* mais celles-ci ne sont encore pas identifiées. NC_D : noyau cochléaire dorsal, NC_V : noyau cochléaire ventral, SOC : complexe olivaire supérieur, V : noyau moteur du nerf trijumeau, VII : noyau moteur du nerf facial. 17
- Figure 8 :** schéma du système de génération d'atmosphère utilisé pour les expositions par voie intra-trachéale. La génération des solvants était réalisée sous hotte et l'animal était dans une cabine insonorisée. 26
- Figure 9 :** photographie de la sonde regroupant les 2 émetteurs, pour l'émission des primaires f_1 et f_2 , et le microphone pour la mesure des produits de distorsion acoustique cubique. 31

Figure 10 : mesure de l'amplitude du réflexe de l'oreille moyenne (ROM) par la méthode de suppression des produits de distorsion acoustique (PDA). Le ROM est déclenché par une stimulation contralatérale (SC) de 3 s ce qui provoque la diminution du niveau du PDA (ordonnée noire en gras). Les cercles blancs correspondent aux mesures de PDA sans SC, les triangles blancs correspondent au PDA avec SC. Les cercles noirs sont la moyenne de 18 valeurs de PDA et les triangles noirs représentent la moyenne des PDA avec SC. L'amplitude du ROM (carrés gris) est calculée en faisant la différence de la moyenne des valeurs des deux cercles noirs (pré et post stimulation) et du triangle gris. Les croix noires représentent les valeurs de PDA exclues pour le calcul. 34

Figure 11 : concentrations sanguines (A) et cérébrales (B) en solvant après une exposition par voie intra-trachéale à 3000 ppm pendant 2 x 15 min chez le rat anesthésié. Les histogrammes représentent la moyenne obtenue avec cinq animaux $\pm$ déviation standard (barres d'erreur). 41

Figure 12 : décours temporel d'une expérimentation réalisée avec une exposition par voie intra-trachéale de benzène. La stimulation acoustique contralatérale est de 95 dB à 4400 Hz, $f_1 = 62$ dB à 8000 Hz, $f_1 - f_2 = 9$ dB, $f_1/f_2 = 1,2$. La courbe verte représente l'intensité du PDA $2f_1 - f_2$ avec l'ordonnée correspondante à gauche. La courbe rouge représente l'amplitude du ROM avec l'ordonnée correspondante à droite. Avant l'exposition, le ROM est inhibé après l'administration en ip d'un mélange de kétamine et de xylazine. Après stabilisation de l'amplitude du ROM autour de 0,8 dB, au temps zéro, l'animal inhale du benzène à 3000 ppm pendant 15 minutes. Après l'arrêt de l'exposition, l'amplitude du ROM diminue jusqu'à environ 1 dB. Une seconde exposition identique à la première est réalisée après 20 minutes de repos, au temps 35 minutes, avec de nouveau une augmentation de l'amplitude du ROM..... 43

Figure 13 : variation de l'amplitude du réflexe de l'oreille moyenne après 15 min d'inhalation intra-trachéale de 3000 ppm de solvants chez le rat anesthésié. Les barres d'histogramme représentent la moyenne ($n=5$) $\pm$ déviation standard (barres d'erreur). (A) Variation d'amplitude du ROM en fonction du log Kow des solvants, (B) de la position des groupements méthyles autour du noyau benzénique avec les isomères du xylène et (C) du volume du nuage électronique..... 46

Figure 14 : courbes représentant la relation entre les concentrations sanguines en solvant chez l'animal anesthésié et non trachéotomisé par rapport aux concentrations atmosphériques d'exposition (100, 500 et 1000 ppm). En A, la moyenne de la concentration sanguine en toluène pour un groupe de 5 animaux exposés par voie intra-trachéale a été reportée sur la courbe pour déterminer la concentration atmosphérique dite équivalente. Ainsi, l'exposition à 3000 ppm de toluène pendant 2 x 15 min par voie intra-trachéale équivaut à une exposition à 790 ppm pendant 2h en chambre d'inhalation. 48

Figure 15 : coupes histologiques de cochlées en microscopie optique. 50

Figure 16 : schéma de la bicouche phospholipidique avec, en encadré bleu, un exemple de structure de glycérophospholipide : la phosphatidylcholine. 53

Figure 17 : schéma de la composition asymétrique en lipides entre les deux feuillets d'une membrane plasmique. Le cholestérol et la sphingomyéline (SM) se réunissent en radeau du côté externe de la membrane plasmique. GS : glycosphingolipides ; PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PS : phosphatidylsérine. 54

Figure 18: principe de résonance de l'excitation d'un spin nucléaire. L'excitation des noyaux est possible lorsque l'énergie apportée au système par le champ radiofréquence est égale à la différence d'énergie entre les niveaux E_1 et E_2 . Cette différence d'énergie se calcule en multipliant la fréquence de résonance du noyau ν par la constante de Planck ($h = 6,62607004 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg} / \text{s}$). 57

Figure 19 : représentation schématique des orientations de membranes sur un spectre RMN. La courbe grise est un exemple de pic large et asymétrique obtenu dans un solide et les pics verts montrent la décomposition du signal obtenue selon les signaux correspondants à chacune des orientations membranaires. Les flèches vertes représentent l'orientation des spins alignés avec le champ B_0 et les ellipsoïdes rouges représentent les écrans formés par les électrons circulant autour du noyau. 59

Figure 20 : effets de la vitesse de rotation de l'échantillon sur le spectre RMN du phosphore. Dans cet échantillon solide, l'augmentation de la vitesse permet de moyenniser les différentes orientations des noyaux et ainsi d'affiner le signal en augmentant son intensité. Pour des raisons de clarté, les différents spectres n'ont pas les mêmes échelles d'intensité. 60

Figure 21 : schéma récapitulant les différentes étapes de préparation des microsomes de cerveau. © : centrifugation. 63

Figure 22 : spectre RMN MAS ^{31}P (vitesse de rotation de l'échantillon = 12,5 kHz) de microsomes de cerveau de rat témoin. $T = 25^\circ\text{C}$. PME : phosphomonoesters ; P_i : phosphate inorganique ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PC : phosphatidylcholine. 66

Figure 23 : effet de la température et de la concentration en toluène sur l'anisotropie du déplacement chimique du noyau phosphore ($\sigma_{\text{CSA}}^{31}\text{P}$). La courbe rouge montre l'évolution du $\sigma_{\text{CSA}}^{31}\text{P}$ pour un échantillon composé de microsomes de cerveau de rat témoin. Les microsomes de rats exposés *in vivo* sont représentés avec le losange vert ; les microsomes exposés au toluène *in vitro* sont représentés par les symboles bleus ouverts. 68

Figure 24 : spectre RMN MAS ^1H (vitesse de rotation de l'échantillon = 10 kHz) de microsomes de cerveau de rat témoin à $-24,5^\circ\text{C}$ (en bleu) et à $35,5^\circ\text{C}$ (en rouge). Les pointillés à 1,3 ppm marquent le site méthylène utilisé pour mesurer la température de transition de phase de l'état de gel à l'état cristallin. 69

Figure 25 : (A) Evolution de l'intensité du signal ^1H méthylène à 1,3 ppm en fonction de la température. Les résultats ont été lissés et normalisés avec l'équation de Boltzmann. 71

Liste des tableaux

Tableau 1 : références et caractéristiques des solvants utilisés pour les expérimentations.....	23
Tableau 2 : valeurs de pression de vapeur saturante (p^*) selon les constantes d'Antoine A, B et C.	24
Tableau 3 : valeurs de débit du pousse-seringue pour obtenir une concentration atmosphérique en solvant proche de 3000 ppm.	28
Tableau 4 : concentrations atmosphériques obtenues par le système de génération.	39
Tableau 5 : concentrations atmosphériques équivalentes aux 3000 ppm de solvants inhalés par voie intra-trachéale pendant 2 x 15 min.	49

Introduction générale

Les solvants aromatiques sont très répandus dans le milieu industriel. Ils sont utilisés comme matières premières dans la fabrication de résines, comme intermédiaires de synthèse, et on les retrouve dans les colles, peintures ou dégraissants. Ces substances, en particulier le toluène et le benzène, sont présentes dans les dissolvants et les peintures en aérosols. Ces solvants aromatiques sont volatils et pénètrent dans l'organisme principalement par voie pulmonaire et, dans une moindre mesure, par voie percutanée. Certains solvants aromatiques sont même inhalés au même titre qu'une drogue en raison de leur grande volatilité à température ambiante.

Les premiers signes d'une exposition aux solvants aromatiques sont des maux de tête, des nausées, des vertiges et une perturbation des mouvements (Checkoway *et al.*, 1992). Chez des volontaires sains, des diminutions des performances en réponse aux tests psychométriques telles que l'allongement du temps de réaction ainsi que des troubles de la dextérité, de la coordination et de la mémoire immédiate, ont été observées (Kobald *et al.*, 2015). Ces manifestations, lorsqu'elles résultent d'une exposition professionnelle, peuvent être à l'origine d'accidents du travail. Dans le cas d'expositions aiguës à de fortes concentrations, comme lors d'une consommation abusive, une levée d'inhibition, une agitation, une sensation d'ébriété, sont d'abord observées avant de laisser place à un état de dépression du système nerveux central (SNC). Ces effets sont réversibles après l'arrêt de l'exposition mais chez les sniffeurs ayant une consommation chronique à fortes doses, des encéphalopathies ont été observées (troubles cognitifs, ataxie cérébelleuse, tremblements, troubles de l'odorat) ainsi qu'une surdité (Greenberg, 1997; Hormes *et al.*, 1986; Rosenberg *et al.*, 1988).

Les effets ototoxiques des solvants aromatiques sont bien documentés par des enquêtes épidémiologiques réalisées en milieu professionnel et par des études expérimentales chez l'animal. Chez le rat, les solvants aromatiques tels que le toluène, le styrène, les xylènes et l'éthylbenzène, sont toxiques pour l'audition (Cappaert *et al.*, 1999; Lataye *et al.*, 1999; Maguin *et al.*, 2006) et ils potentialisent les dommages causés par le bruit lors de co-expositions (Cappaert *et al.*, 2001; Lataye *et al.*, 2000). À ce propos, les études réalisées en milieu professionnel ont montré que des ouvriers travaillant dans des environnements bruyants et pollués en solvants ont plus de risques de présenter des pertes auditives que des ouvriers exposés au bruit seul : jusqu'à 5 fois lors d'une exposition à un mélange de solvants et jusqu'à 11 fois pour une co-exposition bruit et styrène (Morata *et al.*, 1993; Sliwinska-Kowalska *et al.*, 2005).

Le caractère lipophile des solvants aromatiques leur confère une affinité pour le SNC et une capacité à s'y stocker. Leur toxicité neuronale a été documentée dès 1983 par l'observation des effets délétères chez les toxicomanes provoqués par de fortes doses (Ehyai et Freemon, 1983; Lazar *et al.*, 1983). Depuis lors, les cibles cellulaires capables d'expliquer les manifestations physiques et mentales caractéristiques d'intoxication aux solvants ont fait l'objet de nombreuses recherches.

Le toluène est le solvant le plus étudié dans la littérature scientifique et médicale parce qu'il est largement répandu en milieu industriel, et consommé abusivement par les toxicomanes. Tout d'abord, les investigations se sont inspirées des travaux de Meyer (1899) et Overton (1901) qui ont établi une relation entre la puissance d'action des narcotiques gazeux et leur lipophilie. Cette relation a conduit à l'hypothèse d'une action non spécifique sur le compartiment lipidique des neurones par les narcotiques gazeux dont font partie les solvants aromatiques (Molnár *et al.*, 1985).

Aujourd'hui, des études récentes tendent à montrer que les solvants agiraient plutôt sur les canaux ioniques liant un ligand tels que les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (Bale *et al.*, 2002), les récepteurs GABA_A et les récepteurs à la glycine (Beckstead *et al.*, 2000), les récepteurs à NMDA (Cruz *et al.*, 1998, 2000), et les récepteurs à la sérotonine (Lopreato *et al.*, 2003). Les canaux ioniques sensibles aux variations de différence de potentiel sont aussi des cibles du toluène, qui inhibe les canaux calciques (Maguin *et al.*, 2008) et potassiques (Del Re *et al.*, 2006). Des études menées sur la perturbation de la bicouche lipidique au niveau des synapses ont montré une augmentation de la fluidité du feuillet externe de la membrane des synaptosomes par le toluène (Engelke *et al.*, 1992; LeBel et Schatz, 1989, 1990) mais, selon le mode d'exposition et les techniques utilisées les résultats peuvent être contradictoires (Edelfors et Ravn-Jonsen, 1989; Lebel et Schatz, 1990; Ueda *et al.*, 1986).

Quel que soit le mécanisme d'action exercé par les narcotiques au niveau du SNC, les études montrent que le réflexe de l'oreille moyenne (ROM) est sensible aux anesthésiques. En effet, la kétamine, le pentobarbital et l'isoflurane diminuent son amplitude de contraction. Néanmoins, le réflexe ainsi anesthésié peut être perturbé par le toluène. En effet, le solvant peut augmenter l'amplitude du ROM « anesthésié » (Campo *et al.*, 2013) ce qui permet de penser que les anesthésiques, comme les solvants, agiraient sur des récepteurs impliqués dans le ROM. Mais il a été montré *in vivo* que bien que le toluène partage des sites d'action avec les anesthésiques (Ogata, 2006; Yamashita *et al.*, 2005), il n'agirait pas de la même façon. En fait, le toluène pourrait contrebalancer les effets des anesthésiques sur le ROM en perturbant la membrane plasmique neuronale, ce qui perturberait l'interaction entre les anesthésiques et leurs récepteurs (levée d'inhibition). Par conséquent, l'étude des effets pharmacologiques des solvants aromatiques sur le ROM en fonction de leur lipophilie nous a semblé pertinente. Par ailleurs, la sensibilité du ROM aux anesthésiques permet de stabiliser l'amplitude du réflexe « anesthésié » avant de le réveiller avec le toluène, par exemple. Cela laisse apparaître le

ROM comme un outil idéal pour observer l'effet pharmacologique d'une substance volatile sur le SNC. Un tel outil sera utile pour caractériser l'impact des substances volatiles sur le ROM lorsqu'elles sont associées à du bruit.

Ce travail de thèse regroupe et analyse des expérimentations qui permettent la mesure du ROM. Les premières investigations ont pour objectif principal de mettre au point un test de criblage basé sur la mesure des effets neuropharmacologiques des solvants aromatiques sur le ROM. Ce test aura une application dans le domaine de la prévention des salariés exposés à des atmosphères polluées et bruyantes dans la mesure où il permettra d'identifier les solvants capables d'impacter l'audition de sujets co-exposés. L'objectif secondaire de cette première partie a été de vérifier, avec des expérimentations *in vivo*, l'hypothèse selon laquelle les solvants aromatiques peuvent perturber les centres nerveux impliqués dans le ROM par une action non spécifique.

La deuxième partie du travail de cette thèse a été de vérifier l'hypothèse d'une action non spécifique du toluène sur les membranes plasmiques des neurones du système nerveux central. Pour cela, des investigations *ex vivo* et *in vitro* ont été menées avec des techniques de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) réalisées en collaboration avec le laboratoire Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations de l'Université de Lorraine (UMR CNRS 7036).

Après des rappels de physiologie cochléaire, indispensables à la compréhension des expérimentations menées dans ce travail de thèse, chacune des parties sera présentée de façon autonome, tandis que les résultats seront discutés dans leur ensemble, puis suivis par une conclusion générale.

Rappels de physiologie de l'audition

I. Physiologie du récepteur auditif

A. Oreilles externe et moyenne : les transductions

L'oreille est composée de 3 parties distinctes : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne (figure 1). L'oreille externe est composée d'un pavillon et d'un conduit auditif externe, dont le rôle est de canaliser et d'amplifier les sons qui vont frapper le tympan. Le conduit auditif est limité par le tympan qui transforme les vibrations sonores en vibrations mécaniques. Derrière le tympan se situe la caisse du tympan, aussi appelée oreille moyenne, qui communique avec le pharynx via la trompe d'Eustache. Cette cavité renferme la chaîne tympano-ossiculaire constituée du marteau (*malleus*), de l'enclume (*incus*) et de l'étrier (*stapes*). Cette chaîne transmet et amplifie les vibrations depuis le tympan jusqu'à la platine de l'étrier fichée dans la fenêtre ovale. Pour cela, l'efficacité de la transduction acoustico-mécanique est augmentée d'une part, grâce à l'effet de levier exercé par les trois osselets, et d'autre part, grâce au rapport des surfaces entre le tympan et la platine de l'étrier qui permet d'augmenter de 15 fois les variations de pression au niveau de la fenêtre ovale.

L'oreille externe et l'oreille moyenne ont pour vocation de filtrer et d'amplifier certaines fréquences, notamment celles autour de 4 kHz, contenues dans le spectre de la stimulation acoustique. L'adaptation d'impédance entre le milieu aérien et les liquides contenus dans la cochlée est donc assurée par l'oreille moyenne.

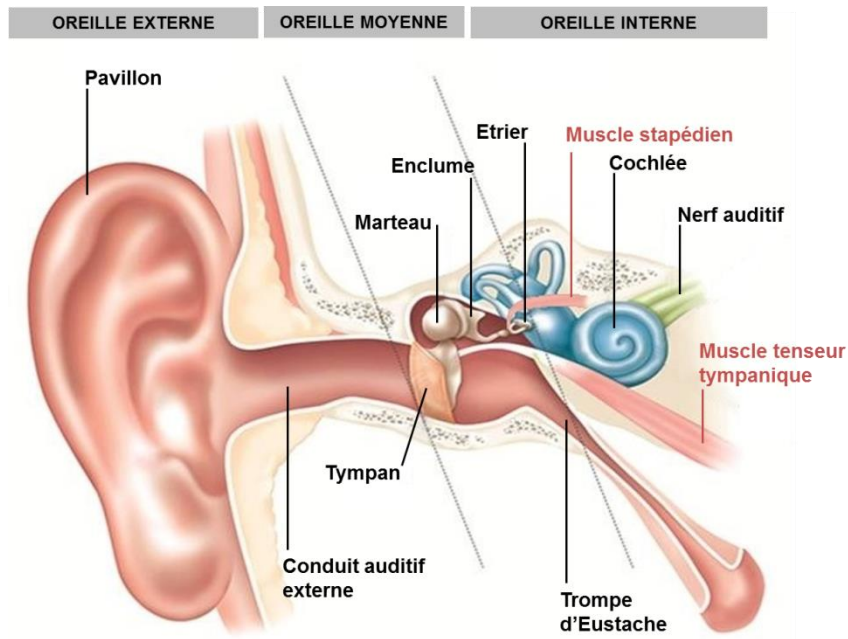


Figure 1 : schéma représentant l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne.

Document INRS

B. L'oreille interne

L'oreille interne permet la transduction mécano-sensorielle des messages auditifs au niveau de l'organe de Corti. La cochlée, en forme de colimaçon, est divisée en deux rampes : vestibulaire et tympanique séparées par le canal cochléaire. Si les rampes vestibulaire et tympanique sont remplies de périlymphe, liquide riche en sodium, le canal cochléaire contient, quant à lui, de l'endolymphe, un liquide riche en potassium. Le canal cochléaire est isolé de la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner et de la rampe tympanique par la membrane basilaire sur laquelle repose l'organe de Corti. Le côté externe du canal cochléaire est limité par la strie vasculaire qui est une région riche en vaisseaux sanguins ; elle est indispensable au maintien de l'hyper-concentration en potassium du compartiment endolympatique. L'excrétion de potassium dans l'endolymphe est possible grâce à des pompes Na^+/K^+ ATPases présentes au niveau des cellules du ligament spiral et des cellules marginales

(Hibino, 2006; Sagara *et al.*, 1995). Ces pompes permettent l'excrétion de Na^+ dans le milieu extracellulaire et la concentration de K^+ dans l'endolymph, ce qui conduit à un gradient électrique entre l'endolymph et le milieu intracellulaire de l'Organe de Corti de +140 mV. Ce gradient est le support électrique du phénomène actif rapide, dont les tenants et aboutissants sont expliqués dans le paragraphe « Physiologie cochléaire ».

C. L'organe de Corti

L'organe de Corti (figure 2) repose sur la membrane basilaire qui s'enroule autour du modiolus de la cochlée. Cet endothélium, spécialisé dans la transduction mécano-sensorielle, regroupe des cellules de soutien (cellules de Deiters, cellules de Hensen, piliers de Corti...) et les cellules sensorielles. Deux types de cellules sensorielles existent (figure 3) :

- les cellules ciliées internes (CCI) sont les véritables transducteurs neurosensoriels. Elles sont connectées aux fibres de type I du système afférent radial ; elles représentent 95% des fibres afférentes du nerf auditif dont le neurotransmetteur est le glutamate. Le message auditif est véhiculé par ces fibres myélinisées jusqu'aux noyaux cochléaires ;
- les cellules ciliées externes (CCE), disposées sur trois rangées (CCE1, CCE2 et CCE3), conditionnent le signal qui déclenchera la stimulation des CCI. Elles reçoivent une innervation efférente du système médian, dont le neurotransmetteur est l'acétylcholine.

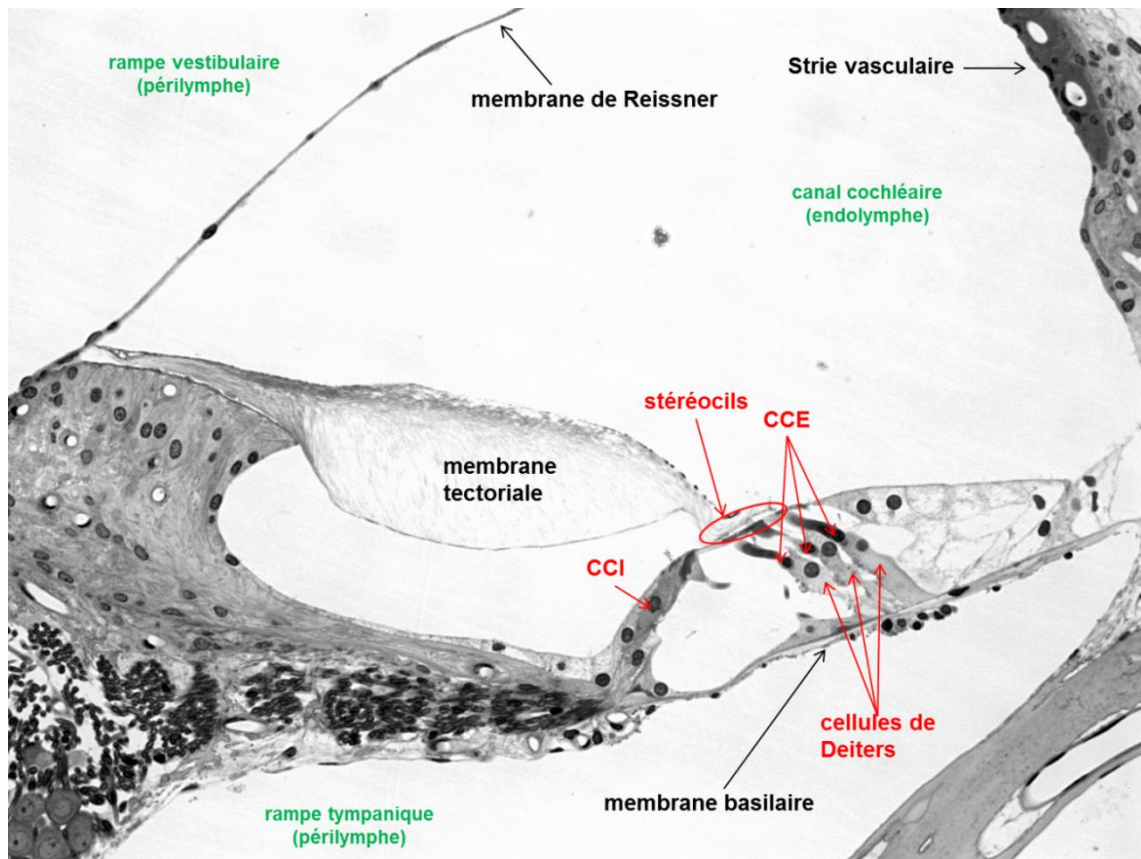


Figure 2 : coupe axiale de cochlée montrant la position de l'organe de Corti entre les trois rampes cochléaires. CCI : cellules ciliées internes. CCE : cellules ciliées externes. (G x 200).

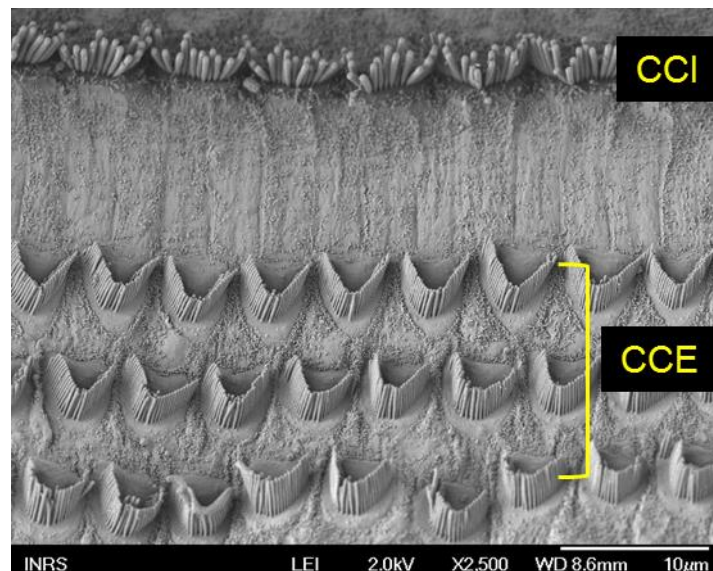


Figure 3 : photographie des cellules sensorielles de l'organe de Corti obtenue au microscope électronique à balayage montrant la rangée de stéréocils en palissade des cellules ciliées internes (CCI) et les trois rangées de cellules ciliées externes (CCE) avec leurs stéréocils en forme de V.

D. Physiologie cochléaire

Les mouvements de la platine de l'étrier dans la fenêtre ovale entraînent une différence de pression entre les rampes vestibulaire et tympanique qui met en mouvement le canal cochléaire contenant la membrane basilaire. L'onde générée à la base de la cochlée se propage de façon passive vers l'apex de la cochlée. L'emplacement du pic d'amplitude maximale des vibrations de la membrane basilaire dépend de la fréquence caractéristique de la stimulation acoustique : les hautes fréquences vont résonner à la base de la cochlée tandis que les basses fréquences résonnent à l'apex. Ce phénomène de résonance passive, appelé onde de Békésy, ne suffit pas à expliquer la finesse de l'analyse fréquentielle du signal acoustique. D'autres mécanismes impliquant les CCE interviennent dans le phénomène de tonotopie.

Les CCE sont solidaires des mouvements de la membrane basilaire par l'intermédiaire des cellules de soutien appelées cellules de Deiters ; ces dernières sont fixées à la membrane tectoriale par leurs plus longs stéréocils. Par conséquent, le déplacement de la membrane basilaire par rapport à la membrane tectoriale entraîne un mouvement de cisaillement des stéréocils plantés au sommet des CCE. L'inclinaison des stéréocils dans un sens ou dans l'autre provoque, soit l'ouverture de canaux potassiques (excitation), soit leur fermeture (inhibition). Quand les canaux potassiques sont ouverts un afflux massif de potassium pénètre dans la CCE poussé par le gradient électrique de +140 mV entre le canal cochléaire (+ 80 mV) et le milieu intracellulaire (-60 mV). En réponse à ce cycle entrée/sortie du potassium, la CCE va se dépolariser au rythme des phases d'excitation et d'inhibition (Lim, 1986).

Les variations de potentiel entraînent la contraction de protéines spécialisées (prestin) situées le long de la membrane plasmique de la CCE qui va alors vibrer en phase avec la stimulation acoustique. Les variations électriques qui accompagnent les vibrations des CCEs

sont appelées potentiel microphonique cochléaire (PMC), il est le support électrique du phénomène actif rapide (Hackney et Furness, 1995). Le phénomène actif rapide est secondé par un phénomène actif lent impliquant les voies nerveuses du système cholinergique médian. Le rétrocontrôle peut modifier la longueur des CCE et par conséquent la compliance de l'Organe de Corti qui va se mettre à résonner à la fréquence caractéristique (figure 4). Ce sont ces deux phénomènes qui rendent la cochlée capable d'une discrimination en fréquences performante.

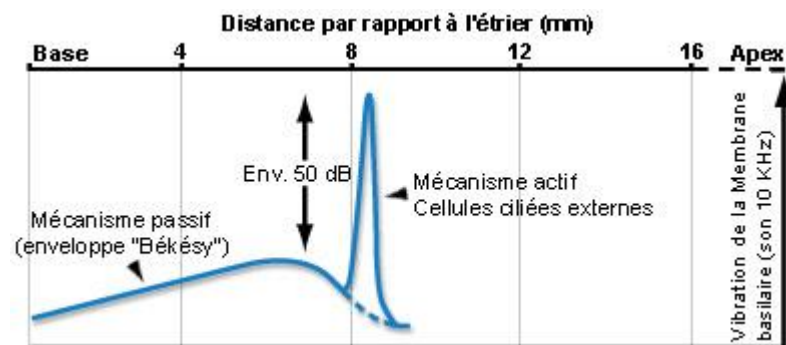


Figure 4 : amplificateur cochléaire : sélectivité en fréquences de l'organe de Corti.
www.cochlea.eu

E. Produits de distorsion acoustique cubique

Les produits de distorsion acoustiques (PDAs) sont des manifestations acoustiques qui appartiennent à la famille des otoémissions provoquées. Ils sont obtenus après une stimulation sonore de deux sons purs, appelés primaires, de fréquences f_1 et f_2 tel que $f_2/f_1 = 1,2$. Plusieurs PDAs sont provoqués simultanément, mais le produit cubique $2f_1 - f_2$ a été retenu dans nos investigations car il persiste pour des intensités de primaires faibles.

Les PDAs seraient produits par deux mécanismes :

- la distorsion linéaire qui provient du chevauchement entre l'onde de Békésy et les phénomènes actifs locaux provoqués par l'amplificateur cochléaire ;
- le mécanisme de réflexion de l'énergie acoustique absorbée par la cochlée provenant de la vibration des CCE à la fréquence caractéristique (Brown *et al.*, 1996). Quel que soit le mécanisme à l'origine du PDA cubique, il est un indicateur spécifique du fonctionnement et des dysfonctions des CCE (Avan *et al.*, 2001).

II. Les réflexes de l'audition

Il existe deux réflexes bien identifiés : le réflexe de l'oreille moyenne (ROM) et le réflexe de l'oreille interne (ROI) ou réflexe olivo-cochléaire. Ces deux réflexes sont bilatéraux et déclenchés par une stimulation sonore ipsi et/ou controlatérale. Si le ROM a pour effet, en autres, de protéger la cochlée des bruits de fortes intensités, le ROI, quant à lui, améliore le traitement du signal acoustique en permettant de lutter contre le masquage sonore dans les ambiances bruyantes (Liberman et Guinan Jr, 1998).

A. Le réflexe de l'oreille interne

Le système olivo-cochléaire est composé de deux populations de neurones (figure 5) :

- les neurones du système olivo-cochléaire latéral proviennent de l'olive supérieure latérale et se projettent sur les fibres de type I situées sous les CCI. Cette projection est uniquement ipsilatérale ;
- les neurones du système olivo-cochléaire médian proviennent majoritairement du noyau central du corps trapézoïde et se connectent directement sous les CCEs. Leur projection est bilatérale.

En modifiant la forme des CCEs (allongement ou raccourcissement), l'activation du ROI provoque des modifications de compliance de l'organe de Corti de la base jusqu'au milieu de la cochlée. Les modifications permettent l'ajustement du gain de l'amplificateur cochléaire à la fréquence caractéristique. De ce fait, la résonance des CCEs est augmentée par l'action du ROI, le seuil de stimulation de la fibre afférente de type I est donc diminué d'autant.

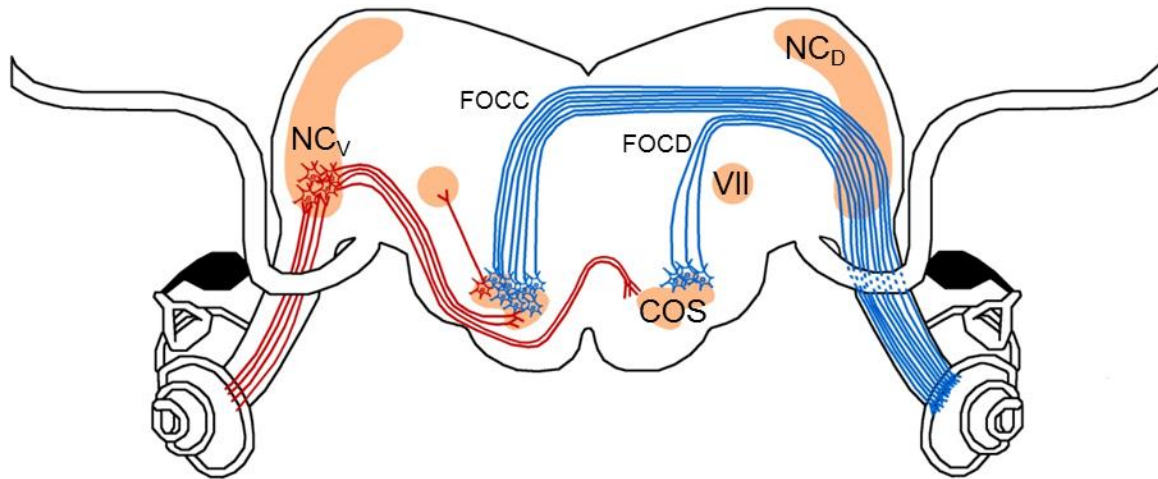


Figure 5 : voies nerveuses du réflexe olivo-cochléaire. Les voies afférentes sont les lignes rouges, les voies efférentes sont les lignes bleues. NC_D : noyau cochléaire dorsal ; NC_V : noyau cochléaire ventral ; COS : complexe olivaire supérieur ; VII : noyau du nerf facial ; FOCC : fibres olivo-cochléaires croisées ; FOCD : fibres olivo-cochléaires directes. Schéma réalisé par A. Thomas (INRS)

B. Le réflexe de l'oreille moyenne

Le réflexe de l'oreille moyenne (ROM) se manifeste par la contraction de deux muscles situés dans la cavité de l'oreille moyenne : le muscle stapédien, inséré à l'arrière du col de l'étrier et le muscle *tensor tympani*, inséré à la partie antérieure et supérieure du manche du marteau (figure 6). Chez l'Homme, le muscle stapédien est le seul impliqué dans le ROM, alors que chez le rat, les deux muscles participent au ROM de manière équivalente (van den Berge *et al.*, 1990). La contraction du *tensor tympani* permet de tendre la membrane tympanique alors que la contraction du muscle stapédien s'oppose au mouvement de piston de l'étrier ce qui limite l'enfoncement de la platine de l'étrier dans la fenêtre ovale. Ces deux

contractions permettent de diminuer l'énergie vibratoire transmise à la cochlée. L'atténuation est dépendante de la fréquence ; en effet, chez le rat, le ROM se déclenche pour des fréquences inférieures à 10 kHz avec une efficacité maximale à 1000 Hz (Liberman et Guinan Jr, 1998; Pilz *et al.*, 1997). Il permet ainsi d'optimiser le décodage du signal dans le bruit de fond aussi appelé démasquage (Pang et Guinan Jr, 1997)

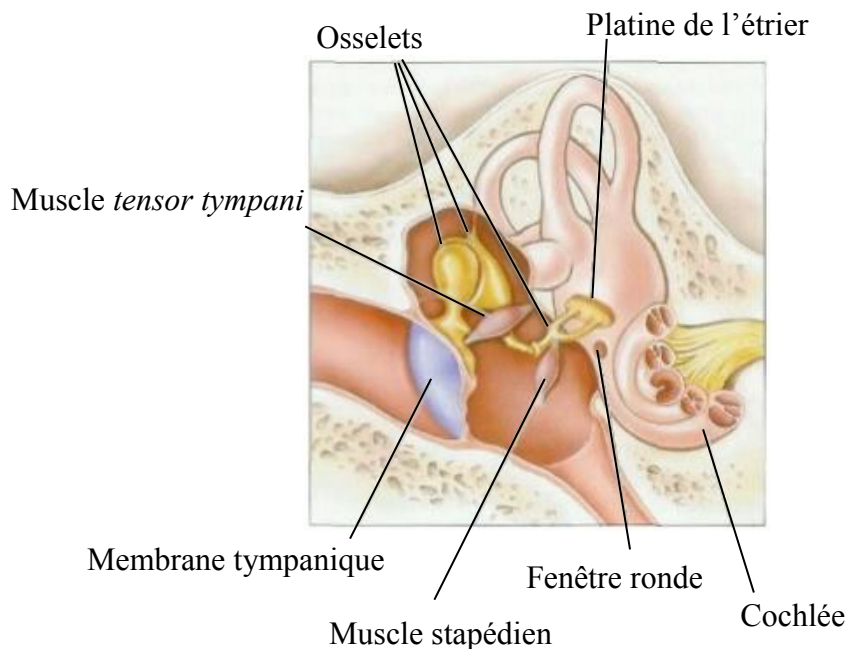


Figure 6 : schéma représentant l'insertion des muscles de l'oreille moyenne : le muscle stapédien inséré à l'arrière du col de l'étrier et le muscle *tensor tympani*, fiché dans la partie antéropostérieure du manche du marteau.

<http://muscular-system.blogspot.fr>

La voie neuronale afférente de l'arc réflexe impliqué dans le ROM emprunte les neurones auditifs primaires jusqu'aux noyaux cochléaires ventraux (figure 7). Les voies motrices connectées au *tensor tympani* prennent naissance au niveau du noyau moteur du nerf trijumeau, les connexions entre voie afférente et voie efférente sont encore mal identifiées mais il semblerait que les connexions soient directes et croisées (Billig *et al.*, 2007). La voie efférente du réflexe stapédien emprunte les motoneurones qui prennent leur origine autour du noyau du nerf VII. Les connexions entre voies afférente et efférente s'effectuent de manière directe mais également croisée, via des inter-neurones connectant le complexe olivaire supérieur (Borg, 1973; Venet *et al.*, 2011). Les projections croisées de ces deux voies efférentes permettent un déclenchement bilatéral du ROM en réponse à une stimulation ipsi et/ou controlatérale de forte intensité (environ 80 dB chez l'Homme).

Quelle que soit la méthode de mesure utilisée, il est difficile de distinguer les effets du muscle stapédien de ceux du muscle *tensor tympani* impliqué dans le ROM ; en effet, leurs temps de latence sont rapides et très proches, à savoir de 10 à 20 ms pour des intensités moyennes et de 6 à 10 ms pour des intensités de 110 à 120 dB chez le rat (Pilz *et al.*, 1997; van den Berge *et al.*, 1990). De plus, ces muscles ont une forte résistance à la fatigue et ils sont principalement innervés par des fibres rapides (van den Berge et Van der Wal, 1990; Van den Berge et Wirtz, 1989a, 1989b). Ces particularités assignent au ROM un rôle dans la protection de la cochlée particulièrement efficace contre les dommages causés par le bruit de forte intensité.

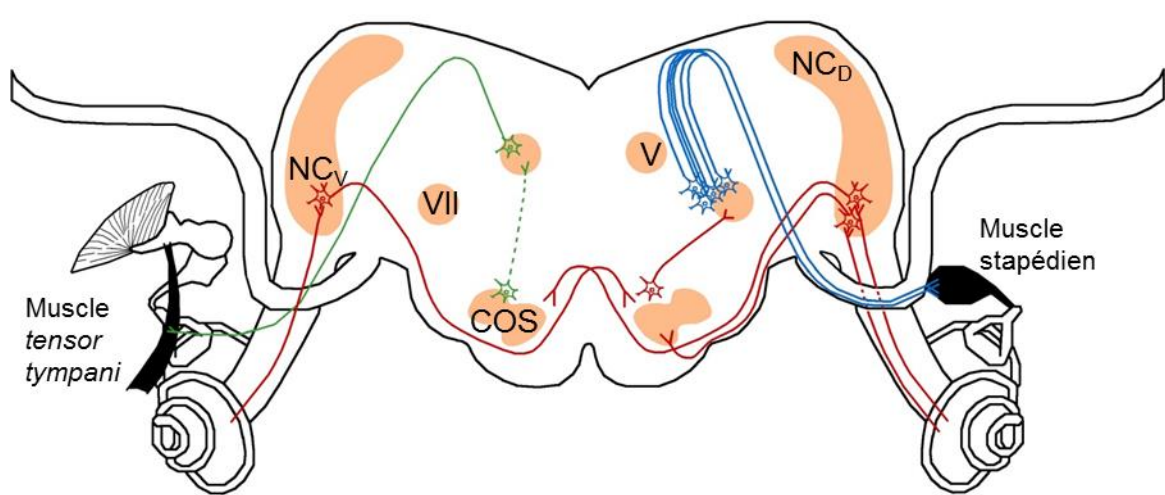


Figure 7 : schéma des voies nerveuses du réflexe de l'oreille moyenne. Les voies afférentes sont en rouge, les voies efférentes innervant le muscle stapédien sont bleues et les voies efférentes spécifiques au *tensor tympani* sont en lignes pleines vertes. La ligne pointillée verte schématise les connexions nerveuses entre les voies afférentes et efférentes du tensor tympani mais celles-ci ne sont encore pas identifiées. NC_D : noyau cochléaire dorsal, NC_V : noyau cochléaire ventral, COS : complexe olivaire supérieur, V : noyau moteur du nerf trijumeau, VII : noyau moteur du nerf facial.

Schéma réalisé par A. Thomas (INRS)

Première partie :

Le réflexe de l'oreille moyenne

comme outil de criblage

I. Introduction

L'ototoxicité des solvants se résume la plupart du temps par l'étude de leurs effets sur les CCEs. Mais si un solvant peut être ototoxique en agissant directement au niveau des cellules sensorielles de l'organe de Corti, il peut également perturber le fonctionnement des réflexes de protection de l'oreille. En effet, si le fonctionnement de ces réflexes est perturbé, l'énergie acoustique pénétrant dans la cochlée peut induire des traumatismes des structures fragiles de l'organe de Corti.

Dans notre protocole expérimental, nous mesurons l'influence du réflexe de l'oreille interne (ROI) et du réflexe de l'oreille moyenne (ROM) sur l'amplitude du PDA $2f_1$ - f_2 . Néanmoins, il a été démontré que l'impact du ROI sur les variations d'amplitude du PDA mesurées est faible : 2 dB maximum sur les 12 dB imputés au ROM avec une stimulation sonore contralatérale de 110 dB (Rumeau *et al.*, 2011). Le ROI a donc un rôle négligeable dans notre contexte expérimental. En conséquence, dans la suite du manuscrit, nous assimilerons les effets d'une stimulation acoustique contralatérale aux seuls impacts sur le ROM.

Les perturbations induites par les solvants aromatiques au niveau des voies nerveuses impliquées dans les deux arcs réflexes peuvent se faire, soit par une action non spécifique sur le compartiment lipidique de la membrane plasmique, soit par une action spécifique sur des cibles protéiques. La relation établie par Meyer et Overton selon laquelle les narcotiques gazeux ont une puissance d'action corrélée avec leur hydrophobie ($\log K_{ow}$) est la seule qui soit établie grâce à des observations sur l'animal entier. Pour cette raison, nous avons choisi d'évaluer l'action non spécifique des solvants sur le ROM. Les solvants ont donc été choisis en fonction de leur $\log K_{ow}$, paramètre qui caractérise leur lipophilie. En effet, il est bien

connu que les solvants aromatiques peuvent provoquer un effet d'ébriété sur des sujets qui en abusent («sniffing»). À l'instar des anesthésiques, les solvants peuvent même engendrer une narcose. La kétamine provoque des états altérés de conscience et peut réduire l'amplitude du ROM (Campo *et al.*, 2013) ; c'est un antagoniste non compétitif des récepteurs à N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) qui bloque le canal ionique, perméable aux cations Na^+ , K^+ avec une forte affinité pour le Ca^{2+} . L'action de la kétamine est dépendante de l'ouverture du canal : plus les récepteurs à NMDA sont activés plus elle est efficace (Orser *et al.*, 1997). La kétamine est également un puissant inhibiteur des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine neuronaux (Flood et Krasowski, 2000). Ces récepteurs présents dans le SNC, du côté pré-synaptique, permettent de moduler la migration des vésicules contenant le neurotransmetteur (Frazier *et al.*, 1998), aussi bien dans des synapses inhibitrices qu'excitatrices. Il est donc raisonnable de penser que la kétamine perturbe aussi bien la voie afférente (glutamate) que la voie efférente (Ach) de l'arc réflexe du ROM. En conséquence, nos investigations permettent d'étudier l'action conjointe des solvants et de la kétamine sur l'amplitude du ROM.

L'objectif principal de cette première phase expérimentale était d'élaborer un modèle permettant de mesurer les variations d'amplitude du ROM pour mettre en évidence l'effet neuropharmacologique des solvants sur les centres nerveux impliqués dans le réflexe et plus généralement dans le SNC.

II. Matériels et méthodes

A. Animaux

Les expérimentations ont été réalisées avec des rats Brown Norway adultes mâles, âgés de 3 à 6 mois, fournis par les Laboratoires Janvier (Le Genest St Isle, St Berthevin, 53941, France) et Charles River (Sulzfeld, 97633, Allemagne). La souche Brown Norway est bien adaptée à nos investigations car ces animaux bénéficient d'une amplitude de ROM particulièrement grande. Par ailleurs, les rats pigmentés ont des performances audiologiques plus homogènes comparées aux animaux albinos (Creel, 1980). Enfin, l'absence de mélanine au sein de la strie vasculaire rend les animaux albinos plus sensibles aux ototoxiques (Bock et Steel, 1984).

Les rats arrivaient à l'animalerie au moins une semaine avant les expérimentations. Ils étaient hébergés dans des cages en polycarbonate de 1032 cm² de surface au sol (2 à 4 par cages) garnies de carrés de cellulose irradiés (BCell8). La litière des cages était renouvelée tous les deux jours. Pour enrichir l'environnement, des tunnels en carton ont été disposés dans les cages. L'éclairage respectait le cycle circadien des rats à raison d'un cycle 12 h/12 h. La température était maintenue à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ avec un taux d'humidité de $55 \pm 10\%$. La nourriture (Special Diets Service, France. Réf : Gold cob 891180) et l'eau de boisson étaient fournies *ad libitum*. Cependant, les rats impliqués dans un protocole avec anesthésie étaient en restriction alimentaire la veille de l'expérimentation, mais la boisson restait à volonté.

L'animalerie est un établissement accrédité pour l'expérimentation animale (NC54-547-10) et les expérimentations ont été menées dans le respect du décret n°2013-118 publié au Journal Officiel le 7 février 2013, relatif à la réglementation de l'utilisation des animaux à des fins scientifiques.

Par ailleurs, les protocoles expérimentaux impliquant des animaux ont reçu l'aval du Comité d'Ethique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale et sont regroupés sous la saisine n°00569.02 validée par le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

B. Solvants

Les références et les caractéristiques des solvants utilisés pour toutes nos expérimentations sont recensées dans le tableau 1. Le choix des solvants se justifie par notre souhait d'observer d'une part, l'effet de la lipophilie, en optant pour des molécules ayant des log Kow différents, et d'autre part, l'effet de l'encombrement stérique des molécules en testant les isomères du xylène. Le log Kow est un paramètre est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau. Il permet ainsi d'appréhender le caractère hydrophobe d'un solvant : plus sa valeur est grande plus la molécule est hydrophobe. Par ailleurs, l'influence de la chaîne latérale a été étudiée en comparant les effets obtenus avec le benzène (noyau benzénique seul), le styrène (double liaison), le toluène (groupement méthyle) et l'éthylbenzène (chaîne latérale à 2 carbones). Le chlorobenzène a permis d'élargir le modèle à la famille des hydrocarbures aromatiques chlorés.

Tableau 1 : références et caractéristiques des solvants utilisés pour les expérimentations

Solvant	Fournisseur	Code fournisseur	Lot	Log Kow	Structure
toluène	VWR	28676.297	08B290506	2,65	
styrène	Fluka	363910/1	85959	3,02	
éthylbenzène	Fluka	03080	437998/1	3,15	
p-xylène	Acros Organics	158770025	A0220318001	3,15	
m-xylène	Acros Organics	18086-0025	A012082901	3,2	
o-xylène	Acros Organics	140990025	A0216902001	3,12	
benzène	Sigma Aldrich	401765	STBC4791V	2,13	
chlorobenzène	Sigma Aldrich	270644	SHBF5168V	2,84	

C. Exposition aux solvants par inhalation

Deux protocoles d'inhalation ont été utilisés dans l'ensemble des expérimentations :

- le premier concerne une exposition des animaux, par voie intra-trachéale, à une atmosphère polluée avec une concentration en solvant ciblée à 3000 ppm. Dans cette situation, les animaux étaient reliés au système de génération par une canule placée directement dans la trachée ;
- la seconde exposition a été réalisée en chambre d'inhalation dans laquelle les animaux étaient anesthésiés mais respiraient librement par leur voies

aériennes. Les concentrations en solvant à l'intérieur des chambres étaient de 100, 500 ou 1000 ppm.

a. Aptitude des solvants à se vaporiser

L'équation d'Antoine : $\log p = A - (B/(C+T))$, a permis de vérifier la possibilité de générer les solvants à une concentration cible de 3000 ppm (tableau 2). Dans notre étude, cette équation donne les valeurs de pressions saturantes des solvants à une température de 20°C et sous pression atmosphérique.

Tableau 2 : valeurs de pression de vapeur saturante (p') selon les constantes d'Antoine A, B et C.

Solvant	A	B	C	p' à 20°C et 1024 hPa (ppm)
toluène	6,95	1344,80	219,48	28423
styrène	7,14	1574,51	224,09	6370
éthylbenzène	6,96	1424,26	213,21	9216
m-xylène	7,01	1462,27	215,11	8019
o-xylène	7,00	1474,68	213,69	6354
p-xylène	6,99	1453,43	215,31	8480
benzène	6,91	1211,03	220,79	97896
chlorobenzène	6,98	1431,05	217,56	11765

^a les valeurs de pression saturante sont calculées selon l'équation d'Antoine :

$$\log p = A - (B/(C+T))$$

^b T = température en °C et p en torr.

^c 1 torr = 133,3 Pa

"Lang's Handbook of Chemistry", Editor John A. Dean, 13th Edition, McGraw-Hill Book Company

b. Inhalation par voie intra-trachéale

i. Anesthésie des animaux

L'anesthésie était induite par une injection intra-péritonéale (*ip*) (100 μ L/kg) d'un mélange initial de kétamine (45 mg/kg) et de xylazine (5 mg/kg). Ensuite, les animaux étaient maintenus sous anesthésie grâce à l'injection continue d'un mélange de kétamine et de xylazine dilué au 3/4 par rapport au mélange initial. À cet effet, un cathéter relié à un pousse-seringue (KdScientific) était placé dans l'abdomen du rat. L'anesthésique était délivré à un débit constant de 0,3 ml/h. Pendant l'anesthésie, les animaux étaient placés sur une couverture chauffante afin de maintenir leur température corporelle autour de 35°C.

ii. Chirurgie des animaux

Un examen otoscopique était réalisé avant la chirurgie pour s'assurer de l'intégrité du tympan, de l'absence d'infection ou d'obstruction du conduit auditif externe ou d'épanchement rétro tympanique. Les tympans étaient ensuite percés avec l'extrémité d'une électrode en verre afin de pallier les éventuelles variations de pression entre l'oreille interne et l'oreille moyenne qui perturbent la mesure des produits de distorsion acoustique (Büki *et al.*, 2002).

Une trachéostomie était pratiquée sur l'animal anesthésié et une canule en polypropylène était insérée dans la trachée pour relier l'animal au système de génération d'atmosphère. La respiration de l'animal demeurait passive et naturelle pendant toute l'expérimentation.

À la fin des mesures, une exsanguination était pratiquée à l'aorte abdominale. Le sang, le cerveau et les cochlées étaient prélevés en fin d'expérimentation. Le cerveau était rapidement congelé dans l'azote liquide alors que les cochlées étaient placées dans du fixateur

biologique (glutaraldéhyde 2,5%). Les échantillons de sang et de cerveau étaient ensuite conservés à -80 °C jusqu'à l'analyse.

iii. Système de génération d'atmosphère

Le système de génération d'atmosphère a été installé sous hotte et des tuyaux en Téflon ont permis le cheminement de l'air et des vapeurs de solvant jusqu'à l'animal placé dans une cabine audiométrique (figure 8).

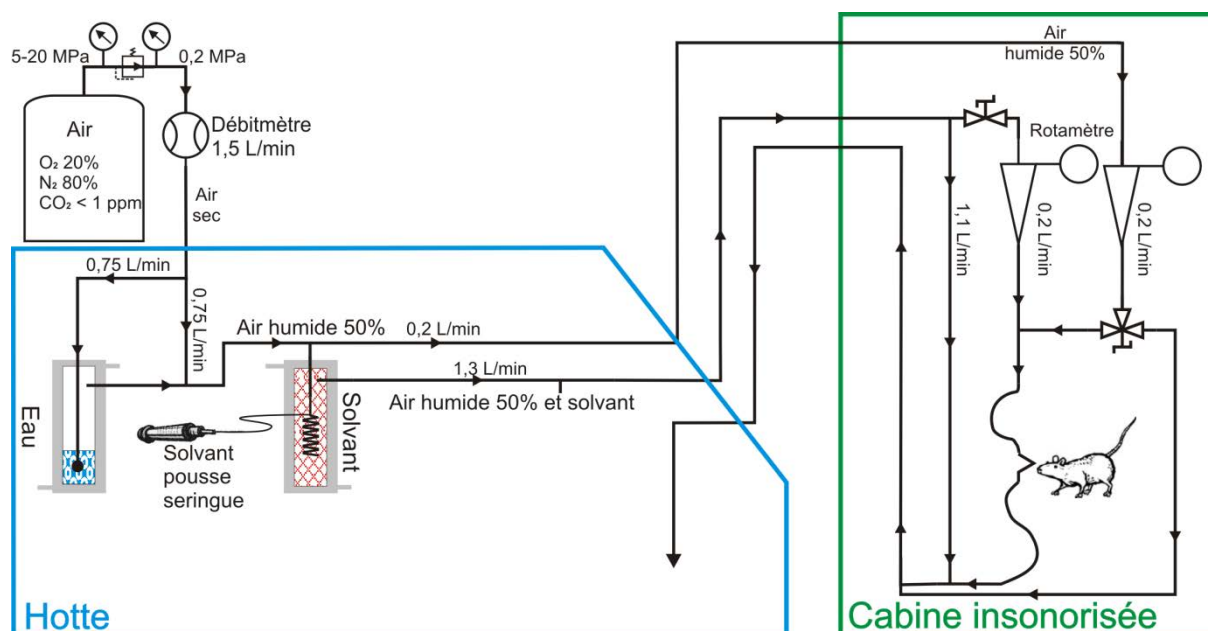


Figure 8 : schéma du système de génération d'atmosphère utilisé pour les expositions par voie intra-trachéale. La génération des solvants était réalisée sous hotte et l'animal était dans une cabine insonorisée.

Avec ce système, l'air sous pression sort à un débit de 1,5 L/min, la moitié de cet air était saturée en humidité par barbotage avant d'être mélangée à l'autre moitié de l'air sec. L'air humidifié à 50% était ensuite séparé en 2 circuits parallèles : le premier permettait de faire inhaler de l'air frais au rat, tandis que le second véhiculait les vapeurs de solvant. Ce dernier était apporté sous forme liquide par un pousse-seringue automatique au 2/3 de la hauteur d'un

serpentin et l'air envoyé à contre-courant portait le solvant à l'état de vapeur. Le serpentin était contenu dans une ampoule thermo régulée à 40 °C pour faciliter la vaporisation du solvant. Au moment de l'exposition, la manipulation simultanée de deux vannes permettait de passer d'une inhalation d'air frais à de l'air mélangé au solvant (Campo *et al.*, 2013).

Le débit du pousse-seringue pour atteindre une concentration ciblée de 3000 ppm était calculé selon l'équation ci-dessous. Les valeurs correspondantes ont été reportées dans le tableau 3 :

$$[\text{solvant}] = \text{dpl} \times 1000 / 60 \times \rho / d_A \times 1000$$

[solvant] : concentration diluée en mg/m³

dpl : débit de polluant liquide en ml/h

ρ : masse volumique du solvant en kg/l

d_A : débit d'air en l/min

Les concentrations atmosphériques étaient contrôlées en sortie pour valider le système. Pour cela, des prélèvements sur support adsorbant étaient réalisés de la façon suivante : 1 tube en verre contenant 2 plages de charbon actif (900 mg chacun) était positionné à la place du rat. Une pompe (Laboport KMF), couplée à une vanne millimétrée (HOKE), prélevait 2 L de l'atmosphère générée avec un débit de 0,2 L/min. La méthode d'analyse des prélèvements est détaillée au paragraphe E.a.

Tableau 3 : valeurs de débit du pousse-seringue pour obtenir une concentration atmosphérique en solvant proche de 3000 ppm.

Solvant	Masse molaire (g/mol)	Masse volumique (kg/L)	[solvant] diluée théorique (ppm)	dpl (ml/h)
toluène	92,14	0,87	3020	0,95
styrène	104,15	0,909	3027	1,03
éthylbenzène	106,16	0,867	3023	1,09
<i>m</i> -xylène	106,16	0,8642	3040	1,10
<i>p</i> -xylène	106,16	0,8611	3030	1,10
<i>o</i> -xylène	106,16	0,88	3040	1,08
chlorobenzène	112,56	1,11	3014	0,90
benzène	78,11	0,879	3057	0,80

$$^a [\text{solvant}]_{\text{ppm}} = [\text{solvant}]_{\text{mg/m}^3} \times 24,45 / M$$

iv. Exposition des animaux

Pour comparer les effets des solvants sur le ROM, 5 rats par solvant ont été nécessaires pour atteindre une significativité statistique.

L'exposition aux solvants par voie intra-trachéale a été réalisée comme suit :

- le système était équilibré pendant 30 minutes durant lesquelles l'animal était alimenté par le circuit d'air frais et humide ;
- la première période d'exposition au solvant durait 15 minutes ;
- la période intermédiaire d'arrêt de l'exposition de 20 minutes était destinée à contrôler la réversibilité de l'effet du solvant sur l'amplitude du ROM. En d'autres termes, 20 minutes étaient nécessaires pour un retour à des amplitudes proches des amplitudes avant exposition au solvant. Pendant cette période, l'animal était de nouveau alimenté par le circuit d'air frais ;

- la seconde période d'exposition au solvant de 15 minutes était réalisée au terme de laquelle le sang et le cerveau étaient prélevés.

À la fin de l'exposition, la génération des vapeurs de solvant était arrêtée et l'air continuait de circuler pendant 1 heure pour éliminer les résidus de solvant persistant dans le circuit.

c. Inhalation en chambre à atmosphère contrôlée

i. Génération d'atmosphère

Les expositions aux solvants étaient réalisées dans des chambres d'inhalation de 200 L maintenues sous un flux d'air dynamique de 5 à 6 m³/h. Afin de prévenir toutes fuites de l'atmosphère d'essai vers l'extérieur, ces chambres étaient maintenues en dépression (~ 5 mm H₂O). L'air insufflé dans les chambres était filtré et conditionné à une température de 22 ± 1 °C et à un taux d'humidité de 55 ± 10 %.

Les solvants étaient vaporisés dans les chambres à l'aide de serpentins en verre thermorégulés alimentés par des systèmes de perfusion équivalents à celui décrit dans le paragraphe C. b. iii.

Les niveaux d'exposition étaient contrôlés de deux façons :

- l'atmosphère d'essai était prélevée au travers de tubes remplis de support adsorbant (type INRS). Dans le cas présent, celui-ci était un charbon actif « pour chromatographie en phase gazeuse », de granulométrie 0,5-1,0 mm (18-35 mesh ASTM) (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France) ;

- en parallèle, un second GC/FID (Perkin Elmer Clarus 500), muni d'une vanne 6 voies permettant l'échantillonnage de gaz chaque minute, a également été utilisé pour effectuer des mesures de concentration en ligne afin de vérifier la stabilité de la génération au cours de l'exposition.

ii. Exposition des rats aux solvants

Des courbes étalons ont été établies pour les solvants suivants : toluène, styrène, éthylbenzène et *o-m-* et *p-*xylènes.

L'induction de l'anesthésie des rats était réalisée par une injection *ip* d'un mélange de kétamine (45 mg/kg) et de xylazine (5 mg/kg). Ensuite, l'anesthésie était maintenue par des injections en *ip* d'une dilution au $\frac{3}{4}$ de la solution initiale d'anesthésiques. Ces injections étaient réalisées dès les premiers signes de réveil des rats (rétractation de la patte par pincement).

Pour chaque solvant, 3 groupes de 5 animaux ont été exposés. Chaque groupe a été exposé à une concentration atmosphérique différente : 100, 500 ou 1000 ppm. Chaque groupe d'animaux anesthésiés était placé dans la même chambre d'inhalation pendant 2 heures.

À la fin de l'exposition, un prélèvement d'environ 800 μ L de sang était effectué à la veine de la queue. Le sang était recueilli dans des tubes héparinés et étanches. Les tubes étaient agités avant d'être pesés puis conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

D. Mesure du réflexe acoustique

a. Enregistrement des produits de distorsion acoustique

Les mesures étaient réalisées dans une cabine insonorisée. La sonde de mesure des produits de distorsion acoustique (PDAs) se compose de deux émetteurs (B&K type 4191) et d'un microphone (Knowles FG 23329-C05) (figure 9). Cette sonde était placée dans le conduit auditif externe de l'oreille ipsilatérale (gauche) du rat.

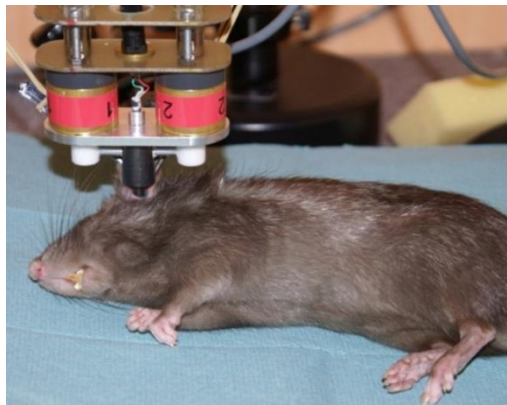


Figure 9 : photographie de la sonde regroupant les 2 émetteurs, pour l'émission des primaires f_1 et f_2 , et le microphone pour la mesure des produits de distorsion acoustique cubique.

Les primaires étaient produits par un synthétiseur de fréquences (B&K Pulse 3110) de façon à ce que $f_2/f_1 = 1,2$, avec $f_1 = 8000$ Hz et $f_2 = 9600$ Hz. Les émetteurs généraient les primaires f_1 et f_2 à une intensité de 62 et 51 dB SPL respectivement. L'intensité maximale de 62 dB a été choisie afin d'être en-dessous du seuil de déclenchement du réflexe de l'oreille moyenne. Les intensités des primaires ont été calibrées avec un microphone 1/8 pouces (B&K type 4138) placé dans une cavité de volume équivalent au conduit auditif externe du rat.

Le microphone de la sonde permet de mesurer la réponse acoustique dans le conduit auditif externe. Avec ce dispositif, le PDA $2 f_1 - f_2$ a été mesuré à une fréquence de 6400 Hz. Ce signal était transmis à un analyseur réalisant une transformée de Fourier (FFT) (B&K Pulse 3110) sur des blocs temporels de 62,5 ms avec un recouvrement de 66.6 % (fenêtrage Hanning). Une moyenne de 22 spectres a permis d'obtenir un spectre moyen toutes les 500 ms. Ce spectre était enregistré afin de suivre l'évolution temporelle du PDA sur la ligne FFT correspondant à 6400 Hz.

b. Stimulation acoustique controlatérale

La stimulation controlatérale (SC) était générée par un synthétiseur (B&K, Pulse 3109) et émise par un écouteur (Ethymotic Research ER4B) placé dans l'oreille controlatérale (droite) du rat. La procédure de calibration de cet émetteur était identique à celle réalisée pour la sonde de PDAs. Le ROM était déclenché par une SC émise à 4400 Hz avec une intensité de 95 dB SPL pendant 2,5 s et répétée toutes les 27,5 s.

L'amplitude du réflexe était calculée de la façon suivante (figure 10):

$$\text{ROM (dB)} = \text{PDA}_{(\text{sans SC})} - \text{PDA}_{(\text{SC})}$$

Pendant la phase d'exposition intra-trachéale aux solvants, les différences d'amplitude du ROM étaient calculées comme suit :

$$\text{ROM} = \text{ROM}_{(\text{exposition})} - \text{ROM}_{(\text{avant exposition})}$$

avec $\text{ROM}_{(\text{exposition})}$: la moyenne des amplitudes du ROM pendant les 5 dernières minutes de l'exposition au solvant soit entre 10 et 15 minutes après le début d'inhalation

$\text{ROM}_{(\text{avant exposition})}$: la moyenne des amplitudes du ROM pendant les 10 minutes précédant l'exposition

Le PDA est utilisé comme indicateur du bon fonctionnement des CCE, pour ce faire, une différence des moyennes des PDA avant et pendant l'exposition au solvant a été calculée de façon synchrone avec la mesure de l'amplitude du ROM. Ce calcul nous a permis de vérifier la stabilité du PDA pendant l'exposition aux solvants.

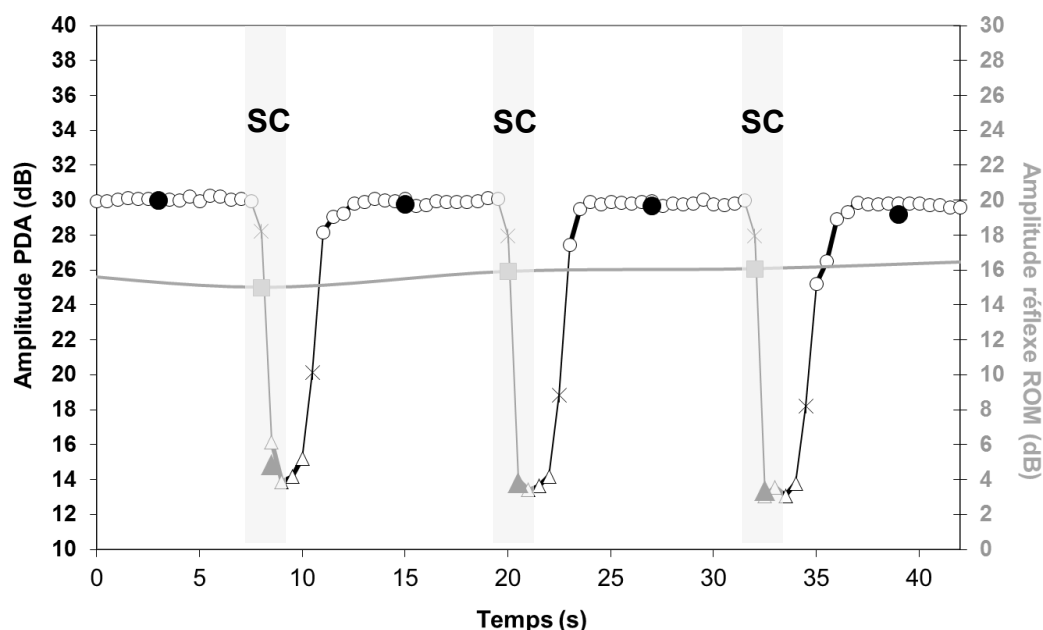


Figure 10 : mesure de l'amplitude du réflexe de l'oreille moyenne (ROM) par la méthode de suppression des produits de distorsion acoustique (PDA). Le ROM est déclenché par une stimulation contralatérale (SC) de 3 s ce qui provoque la diminution du niveau du PDA (ordonnée noire en gras). Les cercles blancs correspondent aux mesures de PDA sans SC, les triangles blancs correspondent au PDA avec SC. Les cercles noirs sont la moyenne de 18 valeurs de PDA et les triangles noirs représentent la moyenne des PDA avec SC. L'amplitude du ROM (carrés gris) est calculée en faisant la différence de la moyenne des valeurs des deux cercles noirs (pré et post stimulation) et du triangle gris. Les croix noires représentent les valeurs de PDA exclues pour le calcul.

E. Analyse des prélèvements atmosphériques et des échantillons biologiques

a. Dosage des solvants dans le charbon actif

Les polluants, piégés dans le charbon actif, étaient désorbés par voie liquide dans 10 mL de disulfure de carbone, contenant 30 μ L de toluène comme étalon interne (ou le styrène pour l'analyse du toluène). Les tubes étaient ensuite agités pendant 30 minutes. Les échantillons ainsi préparés étaient analysés avec un chromatographe en phase gazeuse (GC) (Shimadzu GC2010+) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La chromatographie était

réalisée sur une colonne capillaire UB-624 (30 m × 0,53 mm × 3 µm) avec l'hélium comme gaz vecteur.

b. Dosage des solvants dans le sang et le cerveau

La concentration sanguine de solvant était mesurée après une extraction liquide/liquide. Après décongélation, 500 µL de dichlorométhane étaient ajoutés au travers du septum des flacons contenant les échantillons de sang. Un étalon interne, le propylbenzène, était ajouté lors de cette étape à raison de 10 µL par échantillon. Les tubes étaient ensuite vortexés puis agités pendant 30 minutes. La phase aqueuse était enfin séparée de la phase organique par une centrifugation à 4000 g pendant 10 minutes à -4 °C.

Les échantillons de cerveaux étaient traités selon le même protocole que celui utilisé pour les échantillons de sang, néanmoins une étape préalable de broyage était nécessaire. Pour cela, un demi-cerveau était placé dans un tube contenant des billes de céramique (FastPrep Lysing Matrix D) avec 500 µL de dichlorométhane et 10 µL de propylbenzène. Les échantillons étaient ensuite broyés dans un homogénéiseur (FastPrep Instrument-24, MP Biomedicals) pendant 20 secondes à une vitesse de 4 m/s. Puis, les tubes étaient centrifugés pendant 10 minutes à 4000 g à -4°C.

L'analyse des sous-nageant était réalisée par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (Shimadzu GC2010 plus/QP2010Ultra). Les échantillons étaient injectés par un passeur automatique (Shimadzu AOC-20i) et analysés sur une colonne Rtx-1701 (30 m x 0,25 mm x 1 µm + 4 m Integra-Guard).

F. Histologie cochléaire

Au terme de l'exposition par voie intra-trachéale, les cochlées ont été prélevées dans le but d'observer la strie vasculaire et l'organe de Corti. L'animal était mis à mort par décapitation et les cochlées étaient rapidement prélevées puis perfusées via la fenêtre ronde par la solution de fixateur (glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate 0,1 M). Au terme de deux semaines de fixation, les cochlées étaient rincées avec deux bains successifs d'une heure dans un tampon cacodylate 0,2 M. Elles étaient ensuite post-fixées et colorées avec de l'acide osmique à 1% pendant une heure et de nouveau rincées dans du tampon cacodylate 0,2 M avant d'être déshydratées et conservées dans l'éthanol à 70% jusqu'au fraisage des cochlées. Après le fraisage, les cochlées étaient décalcifiées pendant 48 h dans une solution d'acide diéthylène-amino-tétra-acétique (EDTA) (DC-LMR Labomoderne) diluée 10 fois, puis elles étaient déshydratées par des bains successifs et croissants d'éthanol de 70 à 100%. Enfin, les cochlées étaient incluses dans une résine époxy (EPON[®]812 25%, Dodecenylsuccinic anhydride (DDSA) 55%, araldite 15%, dibutyl phtalate 2% et 2, 4, 6-Tris (diméthylaminométhyl) phenol (DMP30) 1,6%). Les blocs de résine étaient coupés de façon à obtenir des coupes axiales de la cochlée.

G. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données ont été réalisées avec le logiciel Statgraphics Centurion version XVI. Les variations de PDA $2f_1$ - $2f_2$ (amplitude du ROM), les concentrations sanguines et cérébrales ont été analysées avec une analyse de variance (ANOVA) à un facteur. Le résultat statistique est exprimé de la façon suivante : [F (df_b , df_i) = F-ratio ; p = p value] où df_b est le nombre de degrés de liberté inter-groupes et df_i le nombre de degrés de liberté intra-

groupe. *F*-ratio est la moyenne du carré des valeurs entre groupes divisée par la moyenne du carré des valeurs intra-groupe. L'analyse *post hoc* était réalisée en utilisant la méthode de Bonferroni, les résultats des comparaisons intergroupes sont présentés ainsi : $diff_{\text{solvant } x/\text{solvant } y} = \text{différence} \pm \text{limites}$. Le seuil de significativité était fixé à 95% ($p < 0,05$).

III. Résultats

A. Test de criblage

a. Contrôles de la génération d'atmosphère

Le tableau 4 reporte les valeurs obtenues lors des contrôles de génération d'atmosphère. Les écarts observés entre les valeurs mesurées et les valeurs théoriques restent inférieurs à 15%.

Le système de génération d'atmosphère utilisé pour exposer les animaux permet de générer les concentrations cibles de 3000 ppm et ceci avec un écart inférieur à 15%. Cet écart s'explique par les contraintes imposées par ce modèle : la génération des solvants doit se faire sous hotte et les vapeurs de solvant doivent ensuite être amenées jusqu'à l'animal installé dans une cabine insonorisée dans laquelle les mesures de PDA $2f_1$ - f_2 sont réalisées (figure 8).

Tableau 4 : concentrations atmosphériques obtenues par le système de génération.

Solvants	Débit pousse seringue (ml/h)	Concentration calculée ^a (ppm)	Concentration mesurée (ppm)	Concentration mesurée moyenne (ppm)	Ecart (%)
<i>m</i> -xylène	1,10	3040	2664	2719	10,6
	1,10	3040	2688		
<i>o</i> -xylène	1,08	3040	2946	2946	3,1
	1,08	3040	2946		
<i>p</i> -xylène	1,10	3030	2923	2918	3,7
	1,10	3030	2912		
toluène	0,95	3020	2965	2890	4,3
	0,95	3020	2814		
styrène	1,03	3027	3079	3042	0,5
	1,03	3027	3005		
éthylbenzène	1,09	3023	3224	3126	3,4
	1,09	3023	3027		
benzène	0,8	3050	2799	2762	9,5
	0,8	3050	2724		
chlorobenzène	0,9	3014	2556	2573	14,6
	0,9	3014	2589		

^a La méthode de calcul pour les concentrations est expliquée dans le tableau 3

b. Dosages des solvants dans les tissus

Les concentrations sanguines et cérébrales en solvant sont illustrées par la figure 11. Comme attendu, les concentrations sanguines sont inférieures aux concentrations cérébrales (Benignus *et al.*, 1981).

La concentration sanguine la plus élevée est celle du chlorobenzène ($0,211 \pm 0,044 \mu\text{mol/g}$) avec des différences statistiquement significatives par rapport aux autres solvants [$F(8;120) = 39,52$; $p < 0,001$]. Les solvants aromatiques ont des concentrations sanguines plus homogènes avec une différence significative de l'éthylbenzène ($0,150 \pm 0,035 \mu\text{mol/g}$) et du benzène ($0,163 \pm 0,032 \mu\text{mol/g}$) par rapport au toluène

($0,102 \pm 0,019 \text{ } \mu\text{mol/g}$) considéré comme notre molécule de référence ($\text{diff}_{\text{toluène/éthylbenzène}} = 0,048 \pm 0,039$ et $\text{diff}_{\text{toluène/benzène}} = 0,061 \pm 0,039$).

Les concentrations cérébrales présentent également des différences statistiquement significatives [$F(8 ; 35) = 22,19 ; p < 0,001$] :

- les concentrations des isomères du xylène sont différentes : l'*o*-xylène est le solvant qui a la concentration la plus élevée ($0,509 \pm 0,089 \text{ } \mu\text{mol/g}$), elle diffère significativement de la concentration en *p*-xylène ($\text{diff}_{\text{o-xylène/p-xylène}} = 0,147 \pm 0,133$). La concentration du *p*-xylène ($0,362 \pm 0,032 \text{ } \mu\text{mol/g}$) n'est pas significativement différente de celle de l'éthylbenzène ($0,382 \pm 0,076 \text{ } \mu\text{mol/g}$) avec $\text{diff}_{\text{p-xylène/éthylbenzène}} = 0,020 \pm 0,133$;
- le benzène ($0,206 \pm 0,054 \text{ } \mu\text{mol/g}$) a une concentration équivalente à celle du toluène ($0,278 \pm 0,058 \text{ } \mu\text{mol/g}$) mais il a une concentration cérébrale plus faible que le chlorobenzène ($0,376 \pm 0,033 \text{ } \mu\text{mol/g}$), avec $\text{diff}_{\text{benzène/toluène}} = 0,072 \pm 0,147$ et $\text{diff}_{\text{benzène/chlorobenzène}} = 0,169 \pm 0,147$.

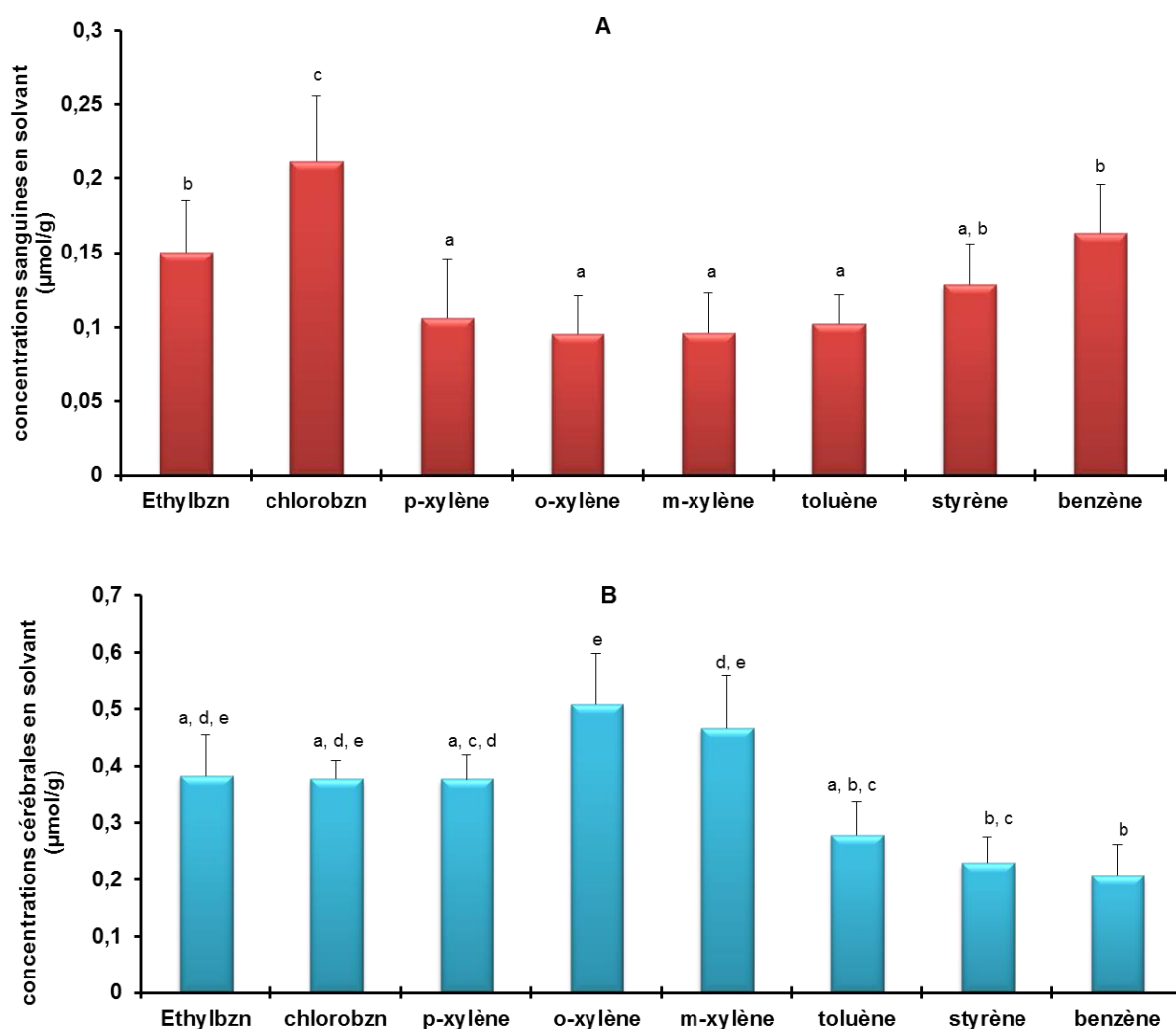


Figure 11 : concentrations sanguines (A) et cérébrales (B) en solvant après une exposition par voie intra-trachéale à 3000 ppm pendant 2 x 15 min chez le rat anesthésié. Les histogrammes représentent la moyenne obtenue avec cinq animaux $\pm$ déviation standard (barres d'erreur). Les différences statistiques sont représentées par des lettres : les groupes porteurs de la même lettre ne présentent pas de différences statistiquement significatives entre eux. De même, les groupes statistiquement différents ne portent pas les mêmes lettres.

c. Variation de l'amplitude du ROM

La figure 12 illustre les variations d'amplitude du ROM et celles du PDA $2f_1-f_2$ pendant toute la durée de l'expérimentation. Pour une intensité de f_1 de 62 dB, l'amplitude du PDA $2f_1-f_2$ était d'environ 28 dB ; elle s'est révélée stable pendant toute la durée de l'expérimentation. Par ailleurs, l'amplitude du ROM, après chirurgie, avoisinait les 5 dB. Dans cet enregistrement, l'amplitude du ROM a été stabilisée autour de 0,8 dB grâce à un pousse-seringue qui délivrait un mélange de kétamine et de xylazine à un débit de 0,3 mL/h. Au temps zéro, l'inhalation du benzène a permis de contrebalancer les effets de l'anesthésie jusqu'à atteindre une amplitude proche de 5 dB. L'arrêt de l'inhalation du solvant s'est soldé par un retour de l'amplitude du ROM à une valeur proche de 1 dB. Les effets sont donc bien synchronisés aux expositions au solvant. De plus, l'effet solvant est réversible et temporaire.

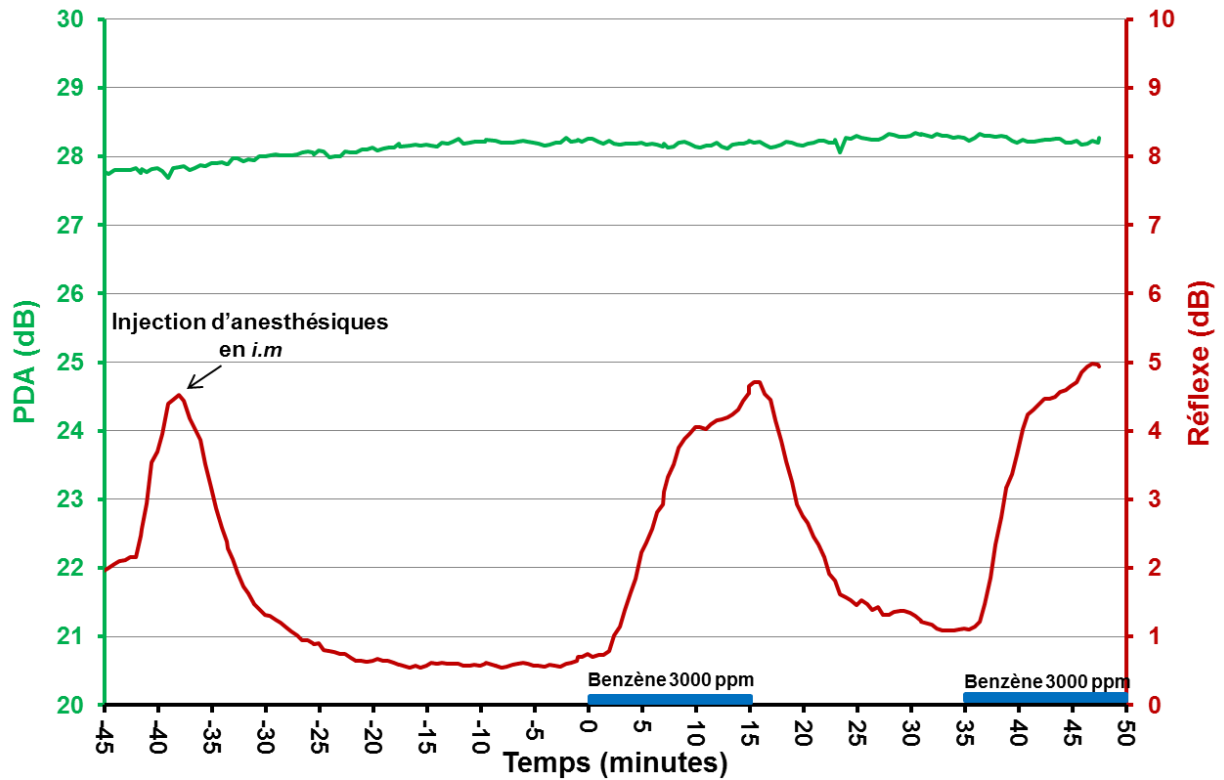


Figure 12 : déroulement temporel d'une expérimentation réalisée avec une exposition par voie intra-trachéale de benzène. La stimulation acoustique contralatérale est de 95 dB à 4400 Hz, $f_1 = 62$ dB à 8000 Hz, $f_1-f_2 = 9$ dB, $f_2/f_1 = 1,2$. La courbe verte représente l'intensité du PDA $2f_1-f_2$ avec l'ordonnée correspondante à gauche. La courbe rouge représente l'amplitude du ROM avec l'ordonnée correspondante à droite. Avant l'exposition, le ROM est inhibé après l'administration en *ip* d'un mélange de kétamine et de xylazine. Après stabilisation de l'amplitude du ROM autour de 0,8 dB, au temps zéro, l'animal inhale du benzène à 3000 ppm pendant 15 minutes. Après l'arrêt de l'exposition, l'amplitude du ROM diminue jusqu'à environ 1 dB. Une seconde exposition identique à la première est réalisée après 20 minutes de repos, au temps 35 minutes, avec de nouveau une augmentation de l'amplitude du ROM.

La figure 13 montre les différents effets mesurés sur l'amplitude du ROM après inhalation de solvants aromatiques ou chlorés. Son analyse permet de séparer les solvants en 3 groupes :

- le benzène et le chlorobenzène augmentent l'amplitude du réflexe de $2,7 \pm 0,7$ et $1,8 \pm 0,4$ dB respectivement. Ces modifications sont les plus importantes parmi les solvants testés ;
- le toluène, le styrène, le *p*-xylène modifient également l'amplitude du ROM mais avec une moindre amplitude, avec des augmentations d'amplitude de $0,5 \pm 0,2$ dB, $0,5 \pm 0,3$ dB et $0,7 \pm 0,3$ dB respectivement ;
- et enfin, le *m*-xylène, l'*o*-xylène et l'éthylbenzène qui ne modifient pas ou très peu l'amplitude.

L'analyse statistique confirme ces différences : le toluène perturbe moins le réflexe que le benzène mais plus que l'éthylbenzène ($diff_{\text{toluène/benzène}} = 2,2 \pm 0,83$ et $diff_{\text{toluène/éthylbenzène}} = -0,58 \pm 0,83$). Par ailleurs, l'effet de l'éthylbenzène est différent de l'effet du *p*-xylène ($diff_{\text{éthylbenzène/p-xylène}} = 0,74 \pm 0,54$) qui lui-même diffère de l'effet de l'*o*-xylène ($diff_{\text{p-xylène/o-xylène}} = 0,7 \pm 0,54$). Enfin, le chlorobenzène accroît plus l'amplitude du ROM que le toluène ($diff_{\text{chlorobenzène/toluène}} = 1,12 \pm 0,84$) et moins que le benzène ($diff_{\text{chlorobenzène/benzène}} = 0,88 \pm 0,84$) (figure 13 C).

Les variations de l'intensité du PDA 2f1-f2 ont été mesurées simultanément à la mesure du ROM, la moyenne des variations du PDA pour tous les animaux (n = 40) est de $0,1 \pm 0,1$ dB. La variation est si faible qu'il ne nous est pas paru nécessaire de l'illustrer par un histogramme.

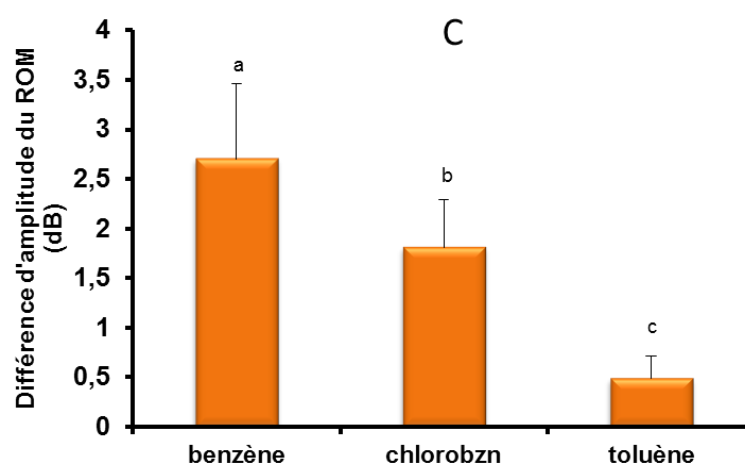
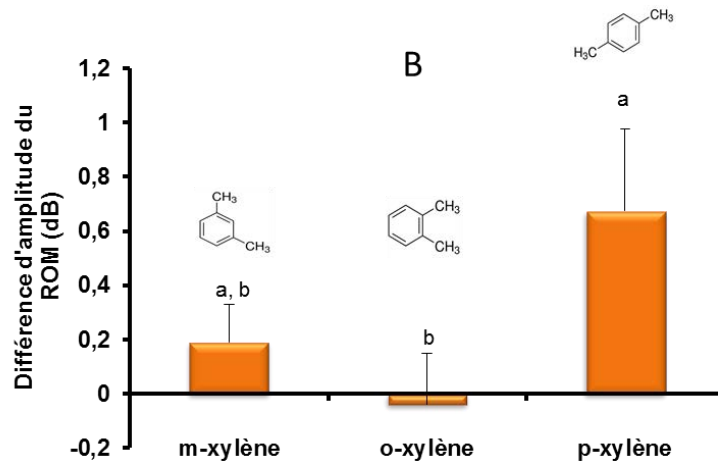
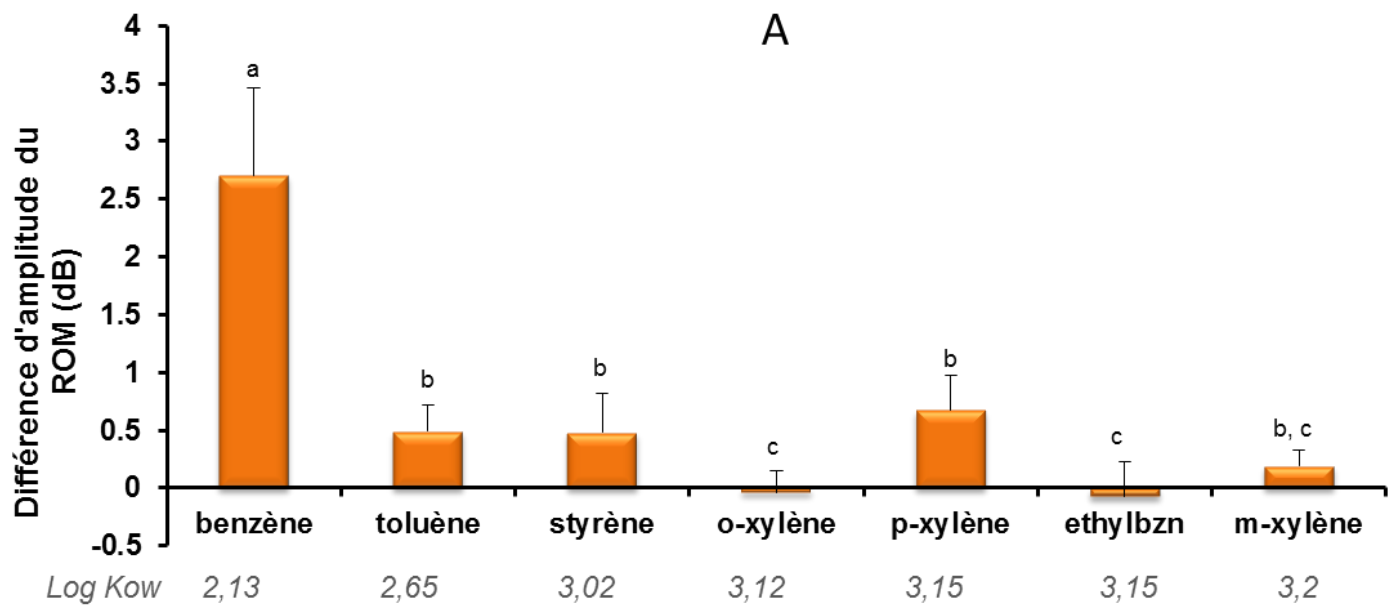


Figure 13 : variation de l'amplitude du réflexe de l'oreille moyenne après 15 min d'inhalation intra-trachéale de 3000 ppm de solvants chez le rat anesthésié. Les barres d'histogramme représentent la moyenne (n=5) $\pm$ déviation standard (barres d'erreur). (A) Variation d'amplitude du ROM en fonction du log Kow des solvants, (B) de la position des groupements méthyles autour du noyau benzénique avec les isomères du xylène et (C) du volume du nuage électronique. Les différences statistiques sont représentées par des lettres : les groupes porteurs de la même lettre ne présentent pas de différences statistiquement significatives entre eux. De même, les groupes statistiquement différents ne portent pas les mêmes lettres.

B. Absorption

La concentration inhérente aux expositions en solvant de 3000 ppm pendant 2 x 15 min auxquelles sont exposés les animaux par voie intra-trachéale peut paraître élevée. Pour cette raison, une approche expérimentale a été entreprise pour estimer quelles seraient les concentrations atmosphériques équivalentes aux 3000 ppm ciblés si les animaux respiraient par leurs voies aériennes supérieures, en d'autres termes, sans trachéotomie. Dans ce but, des animaux anesthésiés, mais non trachéotomisés, ont été exposés en chambre d'inhalation aux concentrations atmosphériques de 100, 500 ou 1000 ppm pendant 2h. Des dosages sanguins ont été réalisés afin de tracer des courbes « concentrations atmosphériques vs. concentrations sanguines » utilisées comme courbes étalons (figure 14).

Les concentrations sanguines moyennes des groupes d'animaux exposés par voie intra-trachéale ont été reportées sur ces courbes étalons afin de déterminer une concentration atmosphérique dite équivalente, comme illustré dans la figure 14A (tableau 5). Cette concentration atmosphérique équivalente reflète ainsi la concentration à laquelle auraient été exposés les animaux s'ils avaient été exposés en chambre d'inhalation pendant 2 h.

Ces expérimentations n'ont concerné que les solvants aromatiques car elle s'inscrivait dans la démarche de validation du test de criblage. Il est à noter que les concentrations

équivalentes pour le benzène n'ont été déterminées en raison de la dangerosité de ce solvant pour les expérimentateurs. Par ailleurs, la nécessité d'élargir les molécules à la famille des hydrocarbures aromatiques chlorés s'est imposée à la fin des expérimentations. Par conséquent, les expositions atmosphériques au chlorobenzène n'ont pas pu être réalisées. Ainsi, les solvants chlorés feront l'objet d'une étude complète en 2017.

Ainsi, l'exposition de 2 x 15 min réalisée au cours du test est équivalente à une exposition de 2 h à 790 ppm pour le toluène, à 950 ppm pour l'éthylbenzène, à 510 ppm pour le styrène, à 944 ppm pour le *p*-xylène, à 840 ppm pour le *m*-xylène, et enfin à 750 ppm pour l'*o*-xylène.

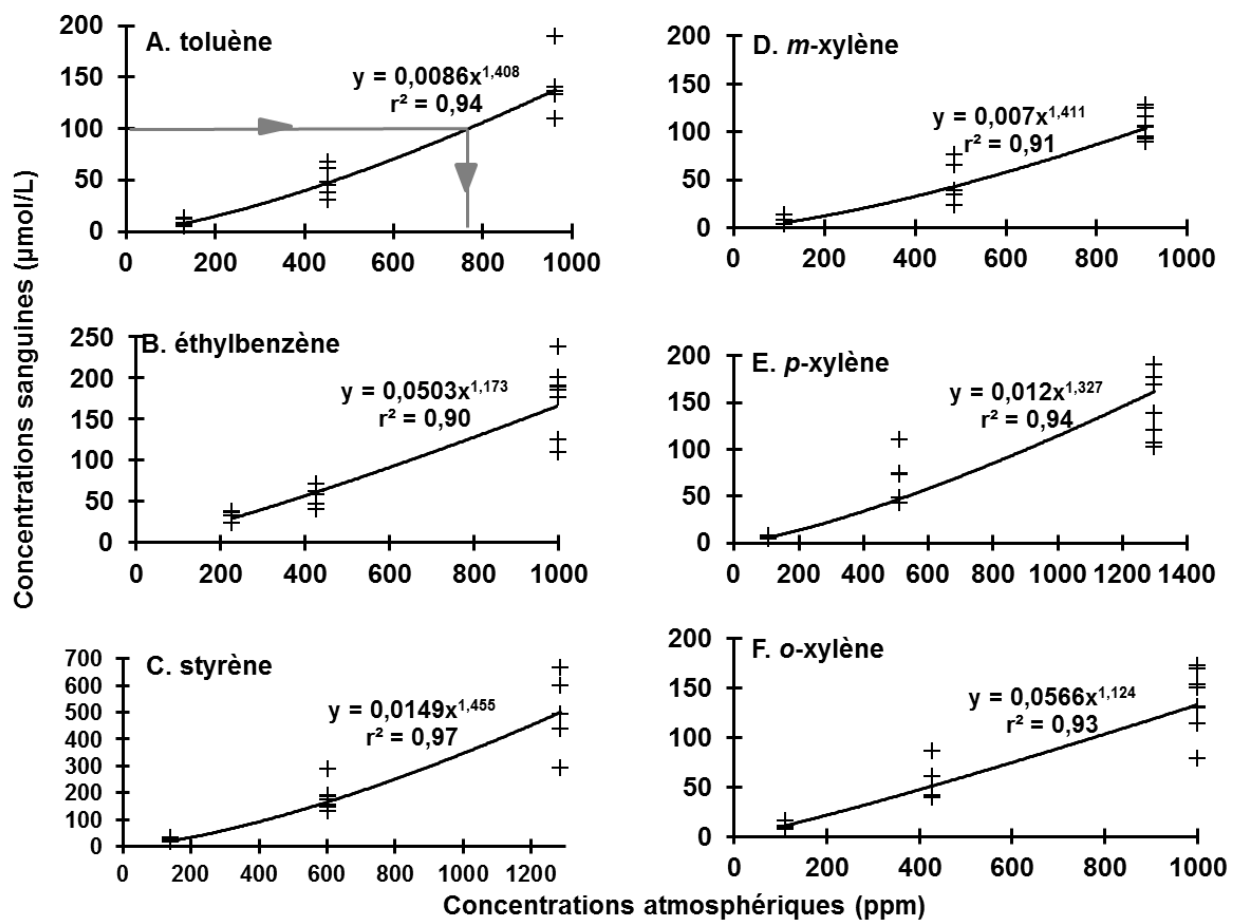


Figure 14 : courbes représentant la relation entre les concentrations sanguines en solvant chez l'animal anesthésié et non trachéotomisé par rapport aux concentrations atmosphériques d'exposition (100, 500 et 1000 ppm). En A, la moyenne de la concentration sanguine en toluène pour un groupe de 5 animaux exposés par voie intra-trachéale a été reportée sur la courbe pour déterminer la concentration atmosphérique dite équivalente. Ainsi, l'exposition à 3000 ppm de toluène pendant 2 x 15 min par voie intra-trachéale équivaut à une exposition à 790 ppm pendant 2h en chambre d'inhalation.

Tableau 5 : concentrations atmosphériques équivalentes aux 3000 ppm de solvants inhalés par voie intra-trachéale pendant 2 x 15 min.

Solvant	Equation ^a	Concentration atmosphérique équivalente (ppm)
toluène	$y = 0,0086 x^{1,4085}$	790
éthylbenzène	$y = 0,0503 x^{1,1732}$	950
styrène	$y = 0,0149 x^{1,455}$	510
<i>p</i>-xylène	$y = 0,012 x^{1,3266}$	944
<i>m</i>-xylène	$y = 0,007 x^{1,4108}$	840
<i>o</i>-xylène	$y = 0,0566 x^{1,1241}$	750

^a Equations des courbes étalons obtenues par les dosages sanguins de solvant après 2 h d'exposition des rats anesthésiés (n=5) aux concentrations 100, 500 et 1000 ppm en cellule à atmosphère contrôlée.

C. Histologie de la cochlée

Les observations des cochlées sur coupes semi-fines ne montrent pas de signe morphologique pathologique de la strie vasculaire ni des cellules présentes dans l'organe de Corti après inhalation des solvants par voie intratrachéale à 3000 ppm pendant 15 min (figure 15).

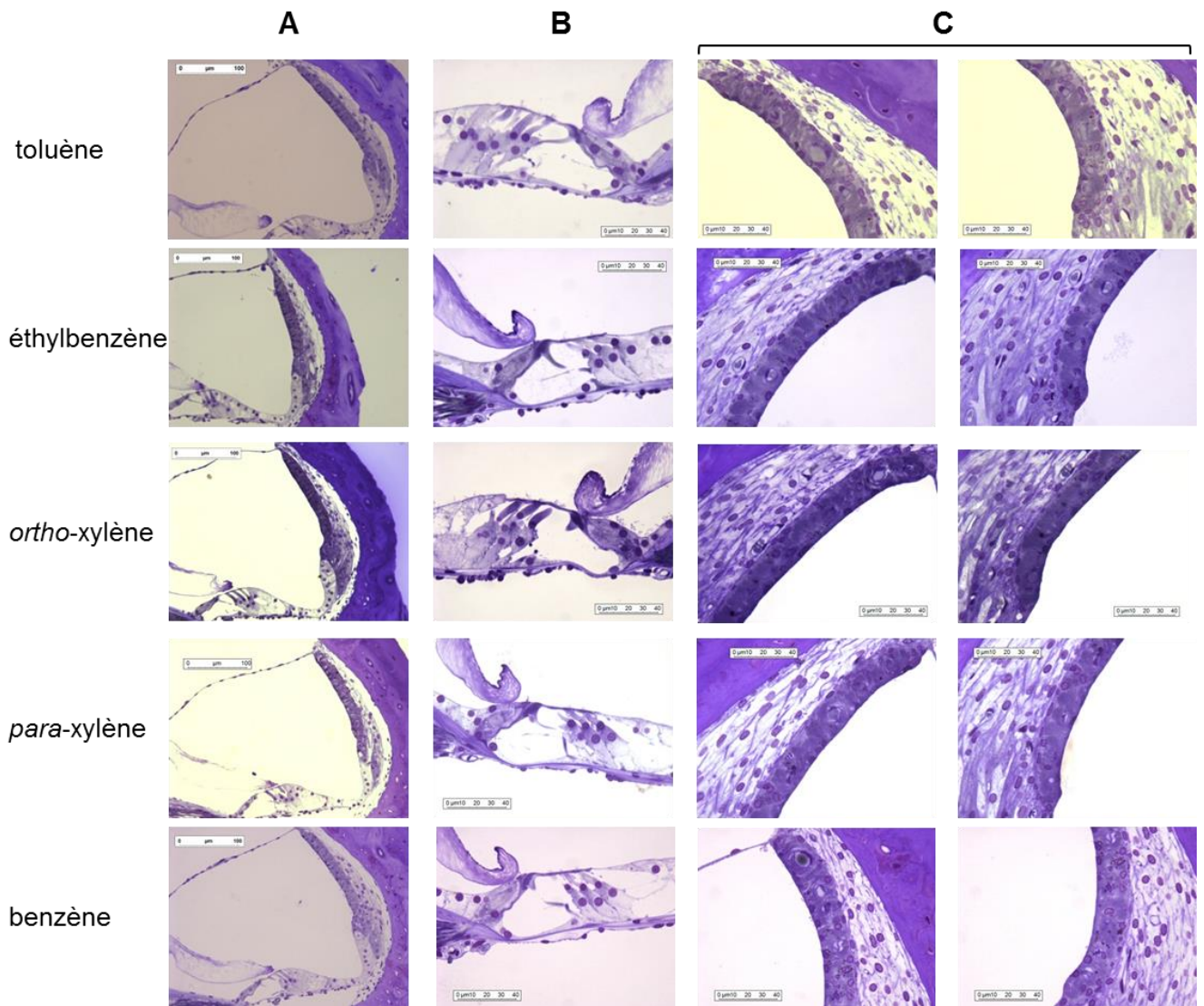


Figure 15 : coupes histologiques de cochlées en microscopie optique.
 Colonne A : strie vasculaire, sulcus externe et organe de Corti (tour apical). G x 400.
 Colonne B : organe de Corti (tour médian). G x 1000.
 Colonne C : strie vasculaire (tour médian). G x 1000.

Seconde partie :

Étude de la fluidité membranaire après exposition au toluène

I. Introduction

A. Composition lipidique de la membrane

La membrane plasmique permet de maintenir la composition d'un milieu intracellulaire différente de celle du milieu extracellulaire. Ainsi, elle est assimilée à une barrière, imperméable aux ions et aux macromolécules, et elle est le siège de nombreuses réactions indispensables à la communication intercellulaire. Elle se compose d'un feuillet interne et d'un feuillet externe formant une bicouche lipidique dans laquelle viennent s'ancrer des protéines et des glucides.

La membrane plasmique est essentiellement constituée de glycérophospholipides. Ils sont nommés ainsi en raison de leur composition : un glycérol, un acide phosphorique, un alcool estérifiant le phosphate et deux chaînes d'acides gras plus ou moins longues et saturées. Ces lipides sont nommés selon l'alcool qu'ils portent : l'acide phosphatidique, le phosphatidylglycérol, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylcholine, la phosphatidylsérine et le phosphatidylinositol (figure 16). La membrane plasmique est également constituée de glycolipides dont les principaux représentants sont les sphingolipides (molécule de sphingosine portant une chaîne d'acides gras). Les propriétés physicochimiques des sphingolipides sont semblables à celles des glycérophospholipides, dont les têtes polaires sont exposées à la surface alors que les chaînes d'acides gras et hydrocarbonées participent à la constitution de la bicouche hydrophobe. La troisième classe majeure de lipides membranaires est constituée par les stérols dont le cholestérol est le principal représentant chez les animaux. Le cholestérol est essentiellement apolaire et il contrarie la fluidité membranaire en perturbant l'empilement des chaînes hydrocarbonées dans la bicouche. Par ailleurs, le cholestérol a la particularité de s'associer aux molécules de sphingolipides pour

former des domaines de lipides ordonnés, aussi appelés radeaux lipidiques. Ces micro-domaines (10 à 100 nm) sont hétérogènes et permettent de compartimenter des protéines spécifiques dans la membrane. Les avancées en lipidomique ont permis de les impliquer dans de nombreuses fonctions cellulaires comme l'apoptose ou encore l'organisation du cytosquelette (Foger *et al.*, 2001). Par ailleurs, ces îlots sont retrouvés en grande quantité dans le cerveau qui est l'organe le plus riche en cholestérol (Pfrieger et Ungerer, 2011) et en sphingolipides. Il a été démontré que leur absence au niveau des dendrites induit une instabilité synaptique et une disparition des épines dendritiques (Hering *et al.*, 2003). De même, les radeaux lipidiques sont impliqués dans le maintien de la répartition du récepteur à l'acétylcholine (Brusés *et al.*, 2001).

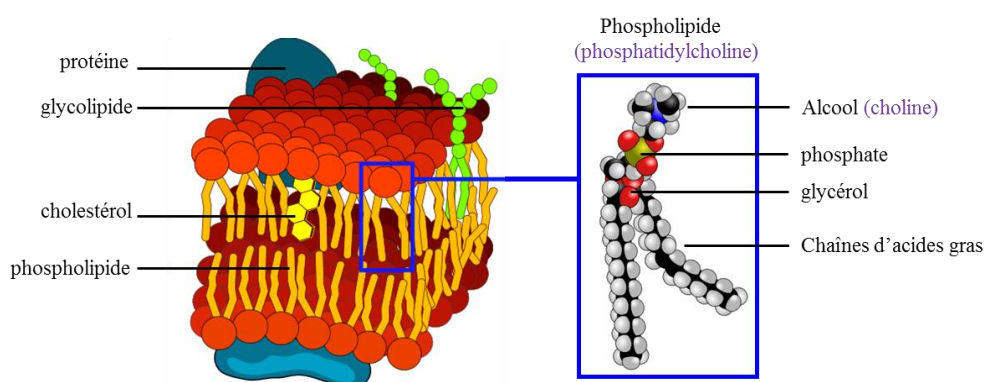


Figure 16 : schéma de la bicouche phospholipidique avec, en encadré bleu, un exemple de structure de glycérophospholipide : la phosphatidylcholine.

D'après <https://commons.wikimedia.org>

La répartition des lipides dans les feuillet interne et externe de la membrane plasmique est asymétrique (figure 17) : les phospholipides aminés, tels que la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine, se retrouvent presque exclusivement dans le feuillet interne alors que la phosphatidylcholine et la sphingomyéline se situent principalement dans le feuillet externe (Verkleij *et al.*, 1973). Cette asymétrie est mise en

place au moment de la biosynthèse des membranes et persiste en raison de la faible diffusion transversale des lipides chargés d'un feuillet à l'autre.

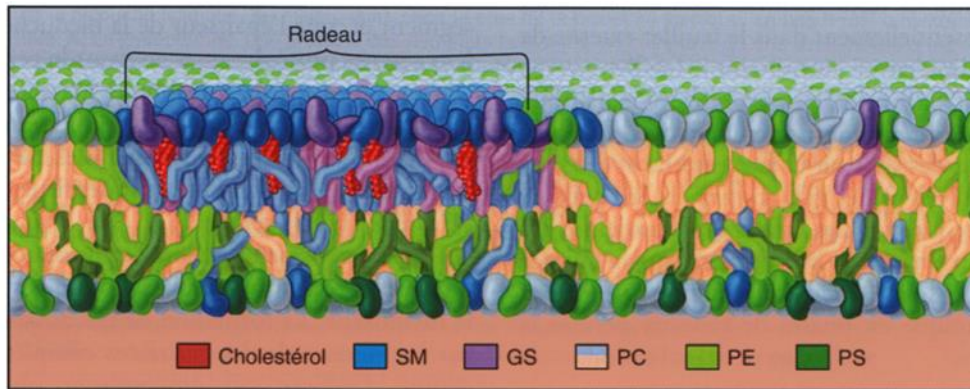


Figure 17 : schéma de la composition asymétrique en lipides entre les deux feuillets d'une membrane plasmique. Le cholestérol et la sphingomyéline (SM) se réunissent en radeau du côté externe de la membrane plasmique. GS : glycosphingolipides ; PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PS : phosphatidylsérine.

Biologie cellulaire. Editions Elsevier

B. Mouvements des phospholipides membranaires

La membrane plasmique est une structure mobile et les phospholipides peuvent se mouvoir de différentes manières :

- rotation des chaînes hydrocarbonées sur elles-mêmes ;
- diffusion latérale ;
- flip-flop, c'est-à-dire passage d'un feuillet à l'autre, ces mouvements sont permis grâce à une enzyme, la flippase, très présente dans le feuillet externe du réticulum endoplasmique.

Cette fluidité membranaire peut être influencée par la température mais aussi par des facteurs internes comme le taux de cholestérol ou la composition en acides gras : plus les chaînes sont courtes et insaturées, plus la membrane est fluide.

Dans une solution aqueuse, les lipides vont spontanément s'organiser en vésicules (les microsomes) afin de minimiser au maximum les contacts entre leurs compartiments hydrophobes et l'eau. Dans ces membranes, une espèce lipidique peut adopter collectivement une conformation particulière, dépendante de sa nature et de la température. La conformation d'un lipide, tels que les glycérophospholipides, fait référence aux arrangements spatiaux des atomes de la molécule dans la bicouche, notamment au niveau des atomes de carbones des chaînes acyles. La conformation la plus stable, car de plus faible énergie, permet une organisation très ordonnée des lipides appelée phase gel ($L_{\beta'}$). En augmentant la température du système, les mouvements de rotation autour des liaisons C-C vont s'accélérer ce qui va perturber l'organisation des lipides, cela va aboutir à une conformation désordonnée appelée phase liquide cristalline (L_{α}). La température à laquelle se produit ce passage de l'état gel à l'état liquide cristallin est appelée la température de transition de phase (T_m). La transition de phase est un phénomène qui fait appel aux propriétés collectives (ou coopératives) de l'ensemble des lipides de la membrane. Par conséquent, plus les lipides sont nombreux à changer de conformation en même temps, plus la transition de phase est nette.

Ainsi, nous avons décidé d'appliquer les techniques de RMN du solide pour étudier la transition de phase T_m entre les phases gel et liquide cristalline. Cette approche nous a permis d'évaluer les effets du toluène sur l'empilement des chaînes acyles et sur la coopérativité des lipides traduisant un effet sur la fluidité globale de la membrane.

C. Principe de la Résonance Magnétique Nucléaire

L'atome n'est pas seulement défini par sa charge électrique, il est également caractérisé par le spin de son noyau qui lui procure un moment magnétique « μ ». Sous l'influence unique du champ magnétique terrestre, les moments magnétiques des particules ont une orientation quasiment aléatoire. Mais, placés dans un champ magnétique puissant B_0 , les moments magnétiques ont tendance à s'aligner avec la direction imposée par ce champ (figure 18). Les noyaux ^{31}P et ^1H ont tous deux des spins de $1/2$. Cette particularité leur permet d'être sujets au phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN), à savoir que ces noyaux, placés dans un champ B_0 , ont la possibilité de se répartir selon deux niveaux énergétiques. Ces deux niveaux correspondent aux deux états possibles des spins du noyau : aligné ou non aligné par rapport à B_0 (figure 18).

A l'équilibre, les spins des noyaux vont de préférence s'aligner avec B_0 , cet état étant le plus stable. Par conséquent, le niveau énergétique regroupant les noyaux dont les spins sont alignés sur B_0 est le plus peuplé. Cet état d'équilibre peut être perturbé en excitant les noyaux grâce à une impulsion électromagnétique. Pour cela, cette onde électromagnétique doit être vectrice d'une énergie égale à la différence énergétique des deux niveaux. Pendant l'excitation, les noyaux vont se répartir sur les deux niveaux énergétiques, on parle alors d'égalisation des populations. Après excitation, les noyaux du niveau supérieur tendent à perdre l'énergie absorbée pour retrouver les niveaux de population d'équilibre ; ce mécanisme est appelé relaxation (figure 18). Il en résulte l'émission d'une onde de fréquence de résonance caractéristique du noyau pour un champ B_0 donné.

La fréquence de résonance émise varie selon l'environnement du noyau dans la matière. En effet, les électrons des atomes voisins sont considérés comme des écrans et protègent le noyau du champ magnétique B_0 . Au contact du noyau, le champ magnétique

ressenti est alors plus faible, il en résulte une fréquence de résonance inférieure par rapport à la fréquence de résonance du noyau sans l'influence des électrons voisins. Le calcul de cet écart est possible en confrontant la fréquence de résonance du noyau à celle d'un composé de référence dans lequel le noyau est le moins protégé par les électrons. Cet écart est appelé le déplacement chimique RMN δ et il se calcule de la façon suivante :

$$\delta = ((\nu_{\text{ech}} - \nu_{\text{ref}}) / \nu_{\text{ref}}) \times 10^6$$

avec δ : déplacement chimique en ppm

ν_{ech} : fréquence de résonance du noyau étudié

ν_{ref} : fréquence de résonance du noyau dans un composé de référence

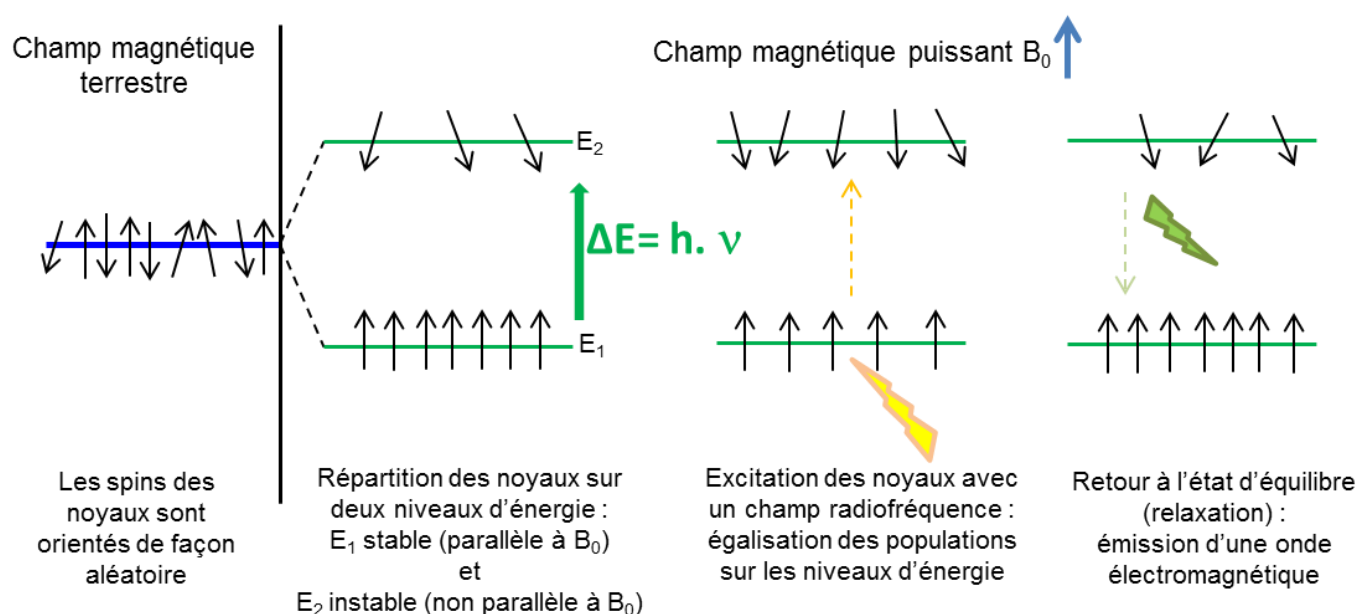


Figure 18: principe de résonance de l'excitation d'un spin nucléaire. L'excitation des noyaux est possible lorsque l'énergie apportée au système par le champ radiofréquence est égale à la différence d'énergie entre les niveaux E_1 et E_2 . Cette différence d'énergie se calcule en multipliant la fréquence de résonance du noyau ν par la constante de Planck ($h = 6,62607004 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg} / \text{s}$).

D. Etude de la fluidité des membranes de microsomes

L'étude de la fluidité des membranes de microsomes de cerveau par les techniques de RMN du solide repose sur la mesure de deux propriétés : l'anisotropie de déplacement chimique et la température de transition de phase de l'état gel vers l'état liquide cristallin.

Le déplacement chimique du ^{31}P dans les lipides est anisotrope par nature, cela signifie que chaque orientation de membrane par rapport au champ magnétique B_0 donne une valeur de déplacement chimique. Puisque les membranes de microsomes sont distribuées dans toutes les directions, il en résulte un signal RMN large regroupant toutes les valeurs de déplacement chimique (figure 19). Si les lipides décrivent un mouvement suffisamment ample et rapide, alors les orientations des noyaux sont moyennées de façon à annuler complètement l'anisotropie, ce qui se traduit par un signal RMN fin. Par conséquent, la mesure de l'anisotropie du ^{31}P est un bon indicateur de la mobilité des lipides dans les membranes. Sa valeur est obtenue en mesurant l'étalement du signal RMN phosphore puis en traitant par informatique le signal, ce qui va permettre de calculer la taille de l'anisotropie en ppm; ainsi une diminution de celle-ci reflétera une augmentation de la fluidité membranaire. Les atomes de ^{31}P étant localisés à la surface des membranes, ces mesures sont donc particulièrement sensibles aux mouvements à la surface des bicouches.

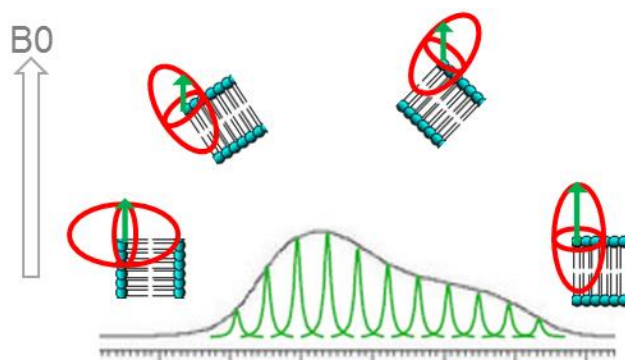


Figure 19 : représentation schématique des orientations de membranes sur un spectre RMN. La courbe grise est un exemple de pic large et asymétrique obtenu dans un solide et les pics verts montrent la décomposition du signal obtenue selon les signaux correspondants à chacune des orientations membranaires. Les flèches vertes représentent l'orientation des spins alignés avec le champ B_0 et les ellipsoïdes rouges représentent les écrans formés par les électrons circulant autour du noyau.

L'élargissement du signal RMN causé par l'anisotropie de déplacement chimique induit une diminution de l'intensité du signal qui se rapproche du bruit de fond et qui devient alors difficilement interprétable. Afin de pallier cette réduction de sensibilité, la RMN du solide repose sur la technique de rotation à l'angle magique de l'échantillon (MAS pour Magic Angle Speed). Dans cette technique, l'échantillon est placé dans un rotor tournant autour d'un axe orienté à $54,74^\circ$ par rapport au champ magnétique du spectromètre (l'« angle magique »). La rotation autour de cet axe permet de moyenniser les orientations des lipides en fonction de la vitesse de rotation. Ceci aboutit donc à un gain en résolution et en intensité comme illustré sur la figure 20.

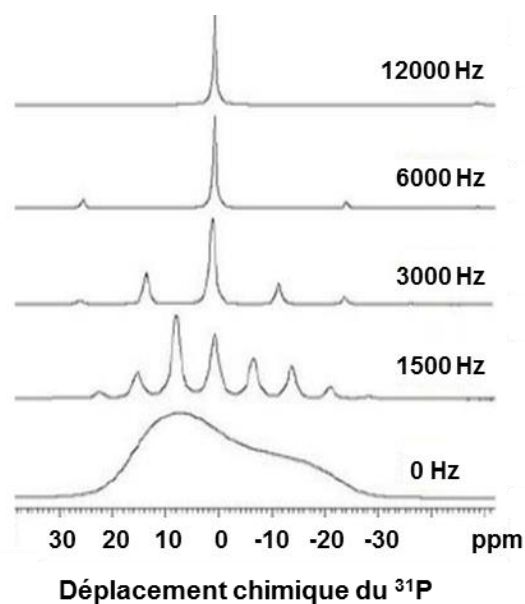


Figure 20 : effets de la vitesse de rotation de l'échantillon sur le spectre RMN du phosphore. Dans cet échantillon solide, l'augmentation de la vitesse permet de moyenner les différentes orientations des noyaux et ainsi d'affiner le signal en augmentant son intensité. Pour des raisons de clarté, les différents spectres n'ont pas les mêmes échelles d'intensité.

La température de transition de phase de l'état gel (L_β) vers l'état liquide cristallin (L_α) peut être suivie par la RMN du noyau d'hydrogène (^1H). Cette technique s'appuie sur le couplage dipolaire qui existe entre les protons de l'échantillon. L'interaction dipolaire est anisotrope et se traduit par un élargissement des signaux. Lors de la transition de la phase gel vers la phase liquide cristalline, le mouvement des chaînes hydrophobes augmente drastiquement. L'interaction dipolaire est ainsi réduite par des mouvements plus rapides ce qui permet d'affiner le signal et d'augmenter son intensité. Il est alors possible de suivre cette augmentation de mouvement en suivant l'augmentation de l'intensité du signal ^1H des groupements CH_2 des lipides. Son évolution suit une fonction sigmoïde dont le point d'inflexion correspond à la température de transition de phase : « T_m ». Les groupements CH_2 étant principalement localisés au cœur des membranes, ces mesures sont donc particulièrement sensibles aux mouvements des chaînes hydrophobes dans les bicouches membranaires.

Rappelons que cette seconde partie est consacrée à l'étude de la fluidité membranaire de microsomes de cerveau de rat exposé ou non au toluène pour vérifier si l'exposition aiguë à 3000 ppm pouvait perturber la mobilité des phospholipides.

II. Matériels et Méthodes

A. Exposition des animaux

La perturbation de la fluidité membranaire a été étudiée uniquement avec le toluène, considéré comme notre molécule de référence. Deux rats ont été placés en chambre d'inhalation et exposés à 3000 ppm de toluène pendant 6 heures par jour pendant 3 jours. À la fin de l'exposition, les rats ont été mis à mort par une injection létale de phénobarbital. Leur cerveau a été ensuite prélevé et placé dans l'azote liquide avant d'être conservé à -80°C. En parallèle, les cerveaux des rats témoins, exposés à de l'air frais, ont suivi le même protocole expérimental.

B. Préparation des microsomes

Les cerveaux ont été décongelés sur de la glace pilée puis broyés avec un homogénéisateur en verre-téflon dans un tampon d'homogénéisation : 10 mM d'HEPES (4-2-hydroxyéthyl) piperazine-1- acide éthanesulfonique) à pH7.

Les microsomes de cerveau ont été obtenus par des centrifugations successives à +4°C dont la dernière à très grande vitesse (140 000 g). Les différentes étapes sont présentées en figure 21. Au terme des centrifugations, le culot de microsomes a été remis en suspension dans 500 µL de tampon d'homogénéisation avant la conservation à -80°C de l'échantillon.

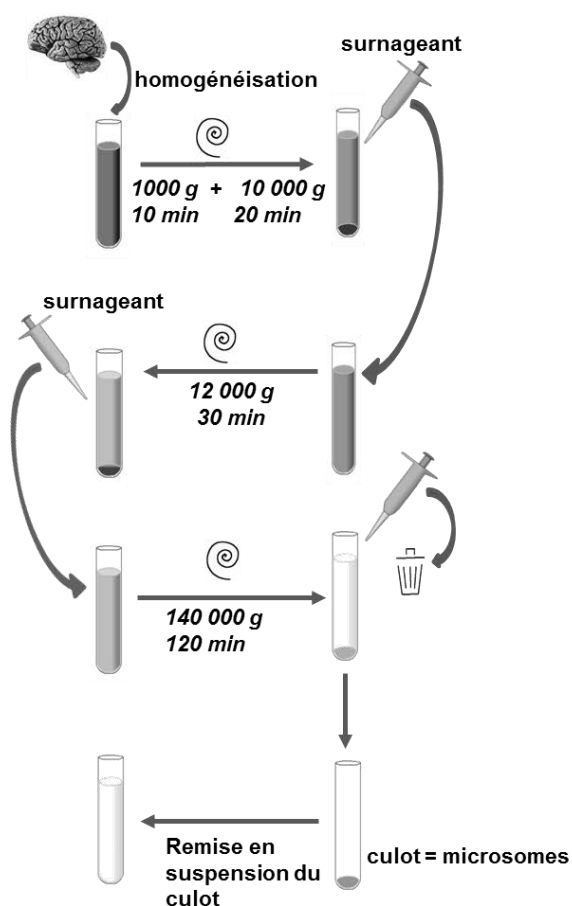


Figure 21 : schéma récapitulant les différentes étapes de préparation des microsomes de cerveau. © : centrifugation.

Pour les mesures en RMN MAS, les microsomes ont été directement centrifugés dans des rotors MAS en céramique de 4 mm de diamètre pendant 30 min à 15 800 g.

L'effet du toluène sur la fluidité membranaire des microsomes a également été étudié *in vitro* sur des échantillons avec ajouts dosés de toluène. Pour cela, les microsomes ont été mis en contact avec différents volumes de tampon d'homogénéisation contenant du toluène (0,13 M), pendant une heure, sous agitation, avant d'être centrifugés dans le rotor.

Les échantillons ont été dosés selon la méthode utilisée pour le dosage de solvant dans le cerveau (cf 1^{ère} partie, matériel et méthodes, paragraphe E.b). Après dosage des

échantillons contenant les ajouts, les microsomes contenaient 0,01%, 0,1%, 0,5% et 5,6% de toluène en poids.

C. Spectroscopie RMN

L'état physique de la membrane cellulaire pouvant être assimilé à un gel, la mobilité des têtes polaires des phospholipides a été étudiée en mesurant l'anisotropie du déplacement chimique du noyau phosphore (CSA ^{31}P). En revanche, les mouvements des chaînes hydrophobes des phospholipides ont été étudiés grâce à la mesure de la température de transition de phase (T_m) de l'état gel à l'état liquide cristallin. Ces mesures ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 doté d'un champ magnétique B_0 de 14,1 Tesla avec une sonde Bruker MAS 4mm.

a. Température de transition de phase

Lors des mesures à température variable, la température de la sonde était contrôlée grâce au système Bruker BCU-X. La température réelle de l'échantillon était calibrée de façon externe grâce au déplacement chimique du ^{79}Br d'un échantillon de bromure de potassium (Thurber et Tycko, 2009). Pour chaque palier de température, un temps d'équilibration de 10 min était respecté, les valeurs de température étaient précises à $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

Le champ radiofréquence (rf) appliqué aux noyaux ^1H était de 62,5 kHz avec une durée d'excitation de 4 μs . Pour chaque mesure 32 scans furent accumulés avec un délai inter-scan de 3s aboutissant ainsi à une durée totale de mesure de 1,5 min. La vitesse de rotation

appliquée à l'échantillon pour ces mesures était de 10 kHz et le déplacement chimique était donné relativement au ^1H du triméthylsilane (TMS).

Les courbes d'évolution de l'intensité ^1H ont été ajustées en utilisant l'équation de Boltzmann sur les fonctions sigmoïdes :

$$S(T) = t + \frac{a}{1 + e^{-d(T-T_m)}}$$

avec « t » et « a » les paramètres d'ajustement de la courbe, T la température de l'échantillon, T_m la température de transition de l'état de gel à l'état liquide cristallin, et d la pente de la transition de phase.

b. Anisotropie du déplacement chimique

Les mesures de l'anisotropie du déplacement chimique du ^{31}P (CSA ^{31}P) ont été réalisées avec un champ « rf » appliqué aux noyaux ^{31}P de 56,5 kHz pendant 7 μs . Pour un délai inter-scans de 3 secondes, 16032 scans ont été accumulés pendant 13h. La vitesse de rotation de l'échantillon était de 3 kHz et le déplacement chimique était donné par rapport au ^{31}P de l'acide phosphorique. Le logiciel DMFIT a été utilisé pour la déconvolution des spectres et l'ajustement de la taille de l'anisotropie CSA (Massiot *et al.*, 2002). Les valeurs d'anisotropie obtenues ont été exprimées selon la convention de Haeberlen, et notées $\sigma_{\text{CSA}}^{31}\text{P}$, cette convention étant la plus utilisée pour l'analyse des membranes cellulaires (Haeberlen, 1976).

III. Résultats

A. Composition des microsomes de cerveau de rat

Des essais préliminaires ont permis d'identifier les différentes formes de ^{31}P présentes dans nos échantillons. Ainsi, les espèces présentes dans les microsomes de cerveau de rat témoin ont été cartographiées (figure 22) : le spectre RMN ^{31}P montre deux pics principaux à -0,62 et -1,19 ppm correspondant respectivement à la phosphatidyléthanolamine (PE) et à la phosphatidylcholine (PC). Le décrochement observé entre -0,11 et 0,02 ppm correspond probablement à un mélange de phosphatidylsérine et de sphingomyéline. Par ailleurs, d'autres pics ne correspondant pas à des phospholipides sont également identifiables, il s'agit du phosphate inorganique (Pi) à 1,25 ppm et des phosphomonoesters (PME) de 2,78 à 3,32 ppm (Gyulai *et al.*, 1984).

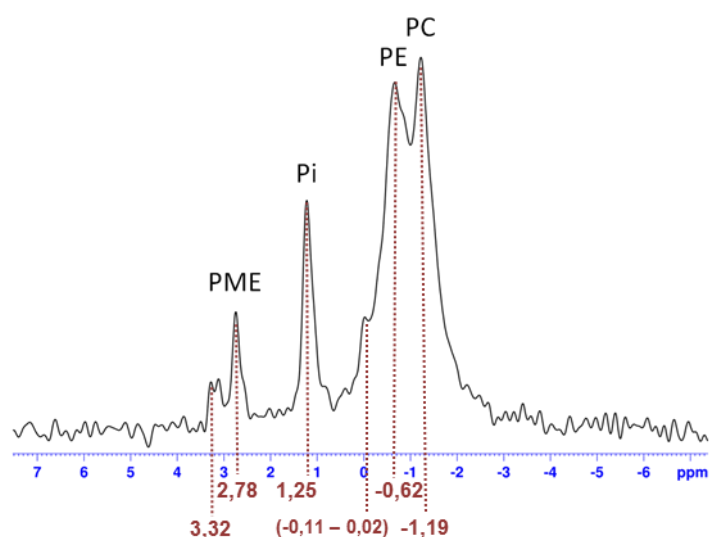


Figure 22 : spectre RMN MAS ^{31}P (vitesse de rotation de l'échantillon = 12,5 kHz) de microsomes de cerveau de rat témoin. T = 25°C. PME : phosphomonoesters ; Pi : phosphate inorganique ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PC : phosphatidylcholine.

B. Mobilité des têtes polaires

La figure 23 montre l'évolution de l'anisotropie $\sigma_{\text{CSA}}^{31\text{P}}$ pour un échantillon témoin dans une gamme de températures physiologiquement acceptables, c'est-à-dire variant de +51°C à -25°C. La lecture de cette courbe montre que la membrane des microsomes de cerveau de rat passe de l'état gel à l'état liquide cristallin en faisant varier le $\sigma_{\text{CSA}}^{31\text{P}}$ de 20 ppm, ce dernier passant de 33 à 53 ppm.

La température utilisée pour comparer les échantillons contenant du toluène avec l'échantillon témoin a été fixée à +28°C ; en effet, il était nécessaire de s'éloigner de la température de transition de phase (7°C) pour attribuer les effets observés à la présence de toluène et non à une éventuelle modification d'état physique de la membrane.

L'analyse de l'échantillon des rats exposés *in vivo* à 3000 ppm de toluène, avec une concentration cérébrale de $20,3 \pm 0,3$ µg/g, ne présente pas de différence d'anisotropie de déplacement chimique par rapport à l'échantillon témoin (34,5 et 35,2 vs. 36,7 ppm). Les valeurs obtenues sont si proches que, pour faciliter la lecture de la figure 23, seule la moyenne a été représentée (losange vert). Il a fallu une concentration de 1,6 mg/g de toluène, soit 0,1% pour observer une différence statistiquement significative (29,8 ppm).

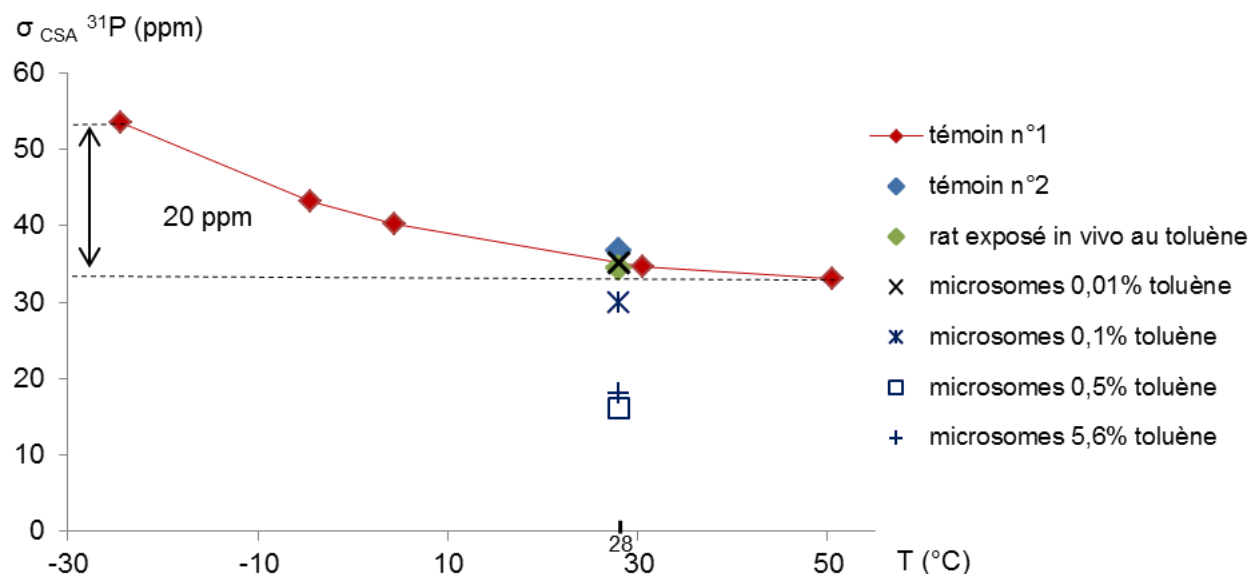


Figure 23 : effet de la température et de la concentration en toluène sur l'anisotropie du déplacement chimique du noyau phosphore ($\sigma_{\text{CSA}}^{31\text{P}}$). La courbe rouge montre l'évolution du $\sigma_{\text{CSA}}^{31\text{P}}$ pour un échantillon composé de microsomes de cerveau de rat témoin. Les microsomes de rats exposés *in vivo* à 3000 ppm de toluène sont représentés avec le losange vert ; les microsomes exposés au toluène *in vitro* sont représentés par les symboles bleus ouverts.

C. Mouvements des chaînes hydrophobes

Pour l'observation des mouvements des chaînes hydrophobes des phospholipides, le spectre ^1H (figure 24) montre que le signal de résonance du groupement méthylène à 1,3 ppm est adéquat pour observer la membrane aussi bien sous l'état de gel ($-24,5^\circ\text{C}$) que sous l'état de liquide cristallin ($35,5^\circ\text{C}$). À basse température ($-24,5^\circ\text{C}$), l'élargissement du pic à 1,3 ppm correspond à la présence de couplages dipolaires inter-protons. L'échantillon se rigidifie sous forme de gel et les mouvements moléculaires plus lents provoquent une diminution de résolution et donc de sensibilité (la surface du pic devant rester constante).

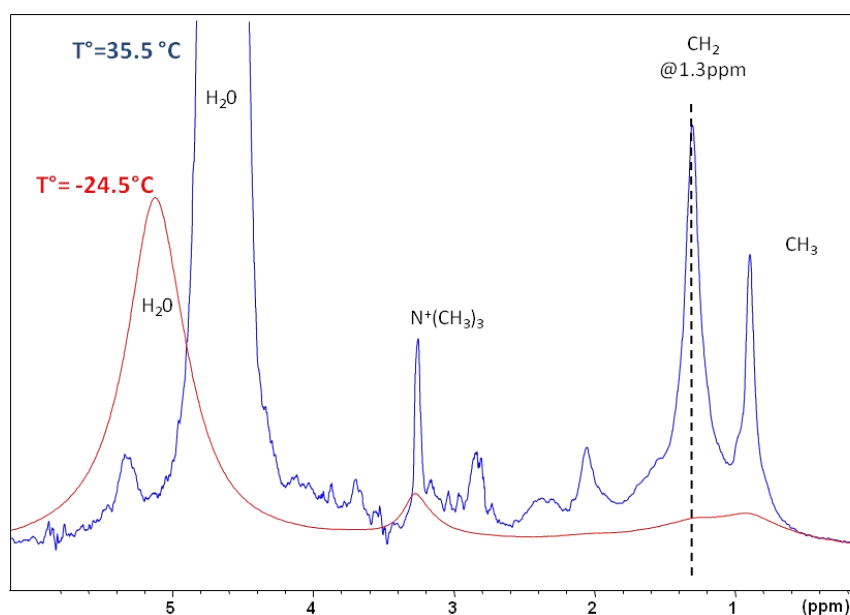


Figure 24 : spectre RMN MAS ^1H (vitesse de rotation de l'échantillon = 10 kHz) de microsomes de cerveau de rat témoin à $-24,5^\circ\text{C}$ (en bleu) et à $35,5^\circ\text{C}$ (en rouge). Les pointillés à 1,3 ppm marquent le site méthylène utilisé pour mesurer la température de transition de phase de l'état de gel à l'état cristallin.

L'intensité du pic méthylène à 1,3 ppm est donc sensible à la température et son évolution en fonction de la température est présentée en figure 25A. La température de transition de phase (T_m) a été calculée pour l'échantillon témoin à +7°C. Les T_m des échantillons exposés *in vivo* ou *in vitro* au toluène ne montrent pas de différence significative avec l'échantillon témoin (figure 25B), seul l'échantillon dopé à 5,4 mg/g (0,5%) a une allure de courbe différente qui ne permet pas de déterminer avec précision la T_m . Le calcul de la T_m n'étant plus possible à partir d'une concentration en toluène de 5,4 mg/g (0,5%), l'échantillon contenant 56,4 mg/g (5,6%) de toluène n'a donc pas été analysé. De plus, le paramètre d , qui correspond à la pente de la transition de phase, diminue de manière significative pour les échantillons dopés à 1,6 mg/g (0,1%) et à 5,4 mg/g (0,5%) de toluène (figure 25C).

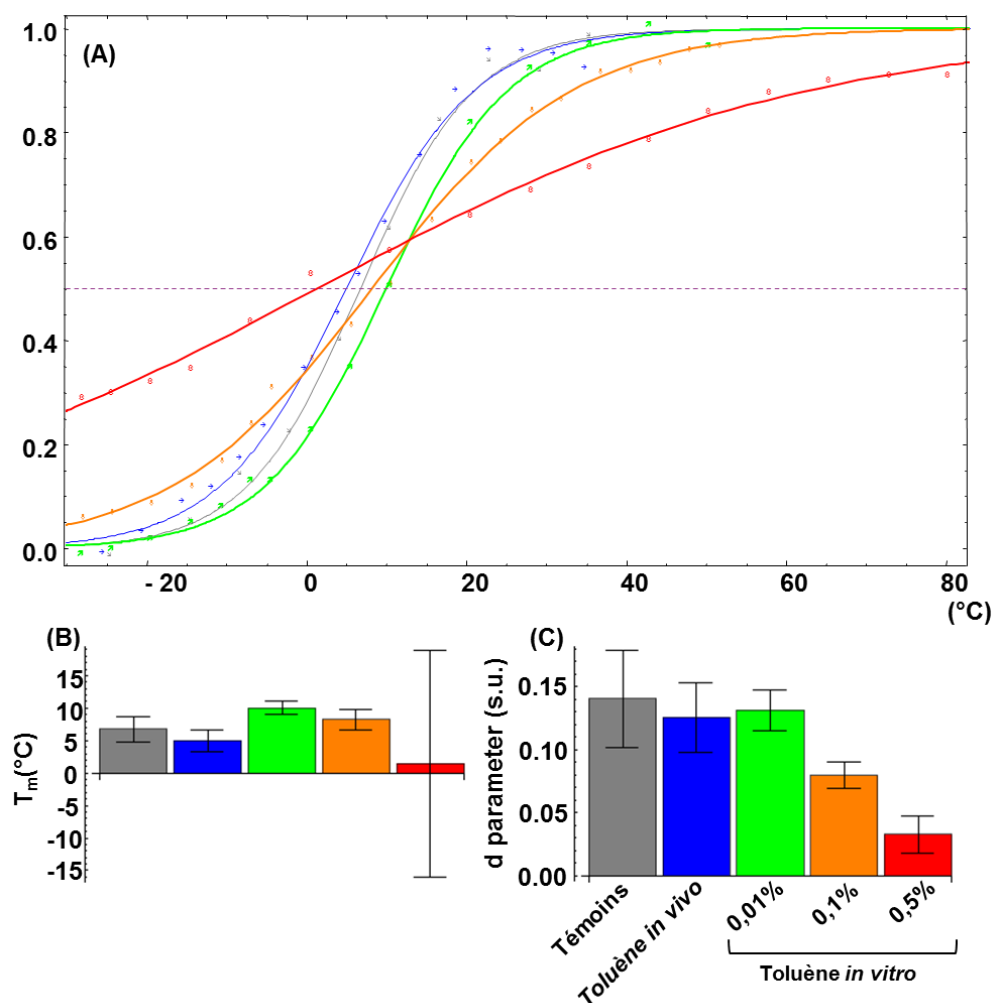


Figure 25 : (A) Evolution de l'intensité du signal ^1H méthylène à 1,3 ppm en fonction de la température. Les résultats ont été lissés et normalisés avec l'équation de Boltzmann.

(B) Comparaison des températures de transition de phase (T_m) avec leurs barres d'erreur.

(C) Comparaison des paramètres d avec leurs barres d'erreur. Les barres d'erreur correspondent à un intervalle de confiance de 95% de l'ajustement.

Résultats obtenus avec l'échantillon de microsomes témoins (en gris), l'échantillon de rat exposé *in vivo* au toluène (en bleu), les échantillons de microsomes exposés *in vitro* au toluène à 110 $\mu\text{g/g}$ (0,01% en vert), à 1,65 mg/g (0,1% en orange) et 5,4 mg/g (0,5% en rouge).

Discussion

Le premier objectif de cette thèse était de tester le réflexe de l'oreille moyenne (ROM) comme outil de criblage pour identifier des substances volatiles potentiellement dangereuses pour l'audition de sujets exposés à la fois au bruit et à des solvants. En effet, les solvants aromatiques, en perturbant le ROM, permettent à l'énergie acoustique de pénétrer dans la cochlée et d'exercer un effet cochléo-traumatisant sur l'organe de Corti. C'est ainsi qu'une co-exposition aux solvants et au bruit peut potentialiser les dommages occasionnés par le bruit au niveau de l'organe de Corti.

Lors des expositions aux solvants, les enregistrements du produit de distorsion acoustique (PDA) $2f_1$ - f_2 n'ont pas montré de variations significatives (0,1 dB). Cela nous permet d'affirmer que l'inhalation de solvant à 3000 ppm, pendant 15 minutes, n'a pas perturbé fondamentalement le fonctionnement des cellules ciliées externes, dont le PDA est un bon indicateur du fonctionnement physiologique. De plus, puisque l'amplitude du PDA reste constante, nous pouvons en déduire que la différence de potentiel entre l'endolymphe et l'organe de Corti n'a pas été non plus modifiée. Le solvant véhiculé par le sang n'a donc pas perturbé le fonctionnement des pompes Na^+ / K^+ ATPases au niveau des cellules du ligament spiral ni au niveau des cellules marginales. Puisque le PDA reste constant, le gradient électrique entre le compartiment endo-lymphatique et le milieu intracellulaire de l'organe de Corti n'a pas été fondamentalement modifié dans nos conditions expérimentales.

Il est donc raisonnable d'affirmer que les effets observés lors de ces expositions aiguës (15 minutes) sont des effets pharmacologiques transitoires dus à des perturbations du

fonctionnement des centres nerveux, et plus spécifiquement du tronc cérébral impliqué dans le ROM.

Par ailleurs, les courbes étalons représentant la relation entre les concentrations sanguines en solvant chez l'animal anesthésié non trachéotomisé et les concentrations atmosphériques d'exposition (figure 14) ont permis d'évaluer à quelles concentrations atmosphériques équivalentes, générées en cellule à atmosphère contrôlée, correspondaient les expositions par voie intra-trachéale à 3000 ppm pendant 15 minutes. Le tableau 5 donne les équations permettant de calculer les concentrations atmosphériques équivalentes pour chaque solvant. Quels que soient les solvants testés, les expositions des animaux à des concentrations de 3000 ppm par voie intra-trachéale correspondent à des expositions inférieures à 1000 ppm. Notons que nous ne disposons pas de valeur équivalente pour le benzène et le chlorobenzène (voir pages 47-48). Il n'en demeure pas moins que les concentrations utilisées au cours de notre protocole expérimental restent comparables à celles utilisées au cours des études mécanistiques que l'on peut lire dans la littérature (Hodgkinson et Prasher, 2006).

L'injection en *ip* d'un mélange de kétamine et de xylazine a réduit d'environ 4 dB l'amplitude du ROM (figure 12). Connaissant les mécanismes d'action de la kétamine sur les récepteurs nicotiniques et sur les récepteurs glutamatergiques décrits dans la littérature (Anis *et al.*, 1983; Coates et Flood, 2001), il est raisonnable de penser que le mélange d'anesthésiques utilisé dans nos expériences a inhibé les récepteurs impliqués dans l'arc nerveux du ROM. En dépit de cette inhibition provoquée pour stabiliser l'amplitude du ROM autour de 1 dB, une concentration en solvant de 3000 ppm a permis de « réveiller » le ROM. En d'autres termes, le solvant a perturbé l'action des anesthésiques de telle sorte que l'amplitude du ROM a gagné quelques dB (jusqu'à 2,7 dB pour le benzène) perdus lors de l'anesthésie. Par ailleurs, il ne faudrait pas négliger une éventuelle action du métabolite principal (époxyde issu de la voie d'oxydation avec le cytochrome P450 2E1), notamment

pour le benzène et le chlorobenzène dont les métabolites comme l'époxybenzène et le 4-chlorobenzène-1,2-époxyde sont connus pour être réactifs (Willhite et Book, 1990; Valentine *et al.*, 1996) . En résumé, la molécule mère n'est peut-être pas la seule molécule responsable de l'effet observé sur le ROM.

Le modèle *in vivo*, développé dans cette étude, a donc permis de montrer des différences statistiquement significatives entre les sept solvants testés (figure 13). Mais ces différences auraient pu être dues à des différences d'absorption des solvants, ou en d'autres termes à des différences de concentrations de solvant dans le cerveau. En fait, les dosages de concentrations sanguines et cérébrales montrent qu'il n'existe aucune relation entre les variations d'amplitude du ROM et les concentrations de solvants dans les tissus analysés. Par exemple, le benzène augmente d'environ 2,7 dB l'amplitude du ROM anesthésié alors que la concentration cérébrale en benzène n'est que de 0,206 $\mu\text{mol/g}$. En revanche, l'*o*-xylène dont la concentration cérébrale est deux fois plus élevée (0,509 $\mu\text{mol/g}$ > 0,206 $\mu\text{mol/g}$) ne perturbe pas le ROM (figure 11). Ce ne sont donc pas les concentrations cérébrales en solvant qui peuvent expliquer à elles seules les variations d'amplitude du ROM « anesthésié ». Une différence d'absorption ne peut donc pas expliquer les différences mesurées entre les solvants.

Les différences statistiquement significatives pourraient être dues à une différence de lipophilie (log Kow) entre les solvants. Cependant, la figure 13A montre qu'il n'existe pas de relation évidente entre le log Kow et la perturbation du ROM. En effet, l'éthylbenzène et le *p*-xylène ont la même valeur de log Kow (3,15) mais des effets significativement différents : le *p*-xylène augmente de 0,7 dB l'amplitude du ROM tandis que l'éthylbenzène est sans effet. De la même façon, l'*o*-xylène et le *p*-xylène ont des log Kow proches : 3,12 et 3,15 respectivement, alors que la différence d'amplitude mesurée entre les deux est de 0,7 dB. À la lecture de ces résultats, nous pouvons donc dire qu'il existe aucune relation entre les valeurs de log Kow et les effets des solvants aromatiques sur le ROM « anesthésié ».

En revanche, les isomères *o*-xylène et *p*-xylène se caractérisent par un arrangement spécifique des groupements méthyles autour du noyau benzénique. Cet arrangement, à l'origine d'un encombrement stérique inhérent à chaque isomère, pourrait expliquer la différence entre les résultats obtenus. Cette interprétation n'est d'ailleurs pas contredite par les résultats obtenus avec le benzène. En effet, le benzène est la molécule, qui possède le plus faible encombrement stérique, puisqu'elle ne porte aucun groupement chimique. C'est aussi la molécule qui augmente le plus l'amplitude du ROM « anesthésié » (figure 13). En suivant ce même raisonnement, nous pouvons interpréter la différence entre les effets obtenus avec le styrène et l'éthylbenzène de la façon suivante : bien que ces deux molécules portent une chaîne latérale composée de deux carbones, seul le styrène augmente l'amplitude du ROM. La différence entre ces composés tiendrait dans la double liaison du groupement vinyle porté par le styrène ; cette double liaison confère une rigidité à la molécule alors que l'absence de double liaison dans la chaîne latérale de l'éthylbenzène permet au groupement méthyle de s'orienter plus librement dans l'espace. Ainsi, l'éthylbenzène aurait moins d'effet que le styrène sur le ROM en raison de son encombrement stérique plus important.

Dans le but d'étayer cette hypothèse, le chlorobenzène a été ajouté à la liste des solvants testés dans le cadre de ce travail de thèse. L'avantage du chlorobenzène se trouve dans son atome de chlore, dont le nuage électronique est moins volumineux que celui du groupement méthyle autour du noyau benzénique. Si notre hypothèse se vérifie, en d'autres termes, si l'encombrement de la molécule joue un rôle déterminant dans le phénomène observé dans cette étude, les effets du chlorobenzène devraient se situer entre ceux du benzène et ceux du toluène. Les résultats montrent que le chlorobenzène augmente l'amplitude du ROM de 1,8 dB, ce qui se situe entre les valeurs obtenues pour le toluène et le benzène, 0,5 dB et 2,7 dB respectivement (figure 13C). Ces résultats vont dans le sens d'une action spécifique des solvants sur le ROM et discréditent l'hypothèse d'une action non

spécifique des solvants sur le compartiment lipidique des neurones impliqués dans la boucle du ROM « anesthésié ». Par conséquent, nous devons exclure la lipophilie comme paramètre déterminant pour expliquer les effets pharmacologiques mesurés sur le ROM.

Pour conforter cette hypothèse, nous avons eu recours à des techniques de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) avec le phosphore (^{31}P) et le proton méthylène (^1H) comme cibles. Ces techniques permettent d'évaluer la mobilité des têtes polaires avec le ^{31}P et des chaînes hydrophobes, avec le ^1H , des glycérophospholipides membranaires en présence de solvant et plus spécifiquement en présence de toluène. Pour ce faire, deux types d'échantillons ont été analysés : des microsomes réalisés à partir de cerveaux de rats exposés au solvant (3000 ppm, 6h/j, 3j) et des microsomes de rats témoins avec ajout de toluène *ex vivo*.

L'ajustement des spectres RMN du ^{31}P a permis d'obtenir une valeur de l'anisotropie du déplacement chimique du ^{31}P ($\sigma_{\text{CSA}}^{31}\text{P}$) pour les membranes de microsomes (figure 23). À notre connaissance, cette technique n'avait été réalisée que sur des membranes artificielles et jamais sur des membranes de microsomes de cerveau. Pour optimiser nos conditions expérimentales, les mesures RMN ont été effectuées à une température de $+28^\circ\text{C}$, ce qui est éloigné de la température de transition de phase du ^{31}P tout en restant compatible avec le bon fonctionnement de l'appareillage. Les résultats montrent clairement que des concentrations de toluène inférieures à $110\text{ }\mu\text{g/g}$ n'ont pas eu d'effet significatif sur $\sigma_{\text{CSA}}^{31}\text{P}$; il a fallu atteindre des concentrations supérieures à cette valeur, soit 1,6 et 5,6 mg/g pour observer une diminution significative comme illustré dans la figure 23. Ces concentrations nécessaires à une modification de l'anisotropie du déplacement chimique du ^{31}P sont en accord avec les résultats de la littérature obtenus sur des membranes artificielles, où il avait été montré que de très fortes concentrations de toluène pouvaient augmenter l'amplitude de mouvement des têtes lipidiques en augmentant l'espace entre les lipides (Lee et Barry, 1996).

Quant à l'analyse des spectres relatifs au ^1H réalisés sur les microsomes avec ajouts dosés de toluène, les résultats vont dans le même sens que ceux obtenus précédemment. Pour cette technique, les variations de température de transition de phase de l'état gel à l'état liquide cristallin sont révélatrices d'une modification de la mobilité des chaînes lipidiques. Les résultats de la figure 25 ne montrent pas de modification significative du point d'inflexion de la sigmoïde jusqu'à des concentrations de 1,6 mg/g. À partir de cette concentration de 1,6 mg/g, nous avons constaté une augmentation de la mobilité au niveau des têtes polaires mais pas au niveau des chaînes hydrophobes des phospholipides. Pour de très fortes concentrations de toluène soit 5,6 mg/g, le calcul précis de la température de transition de phase s'est révélé impossible dans notre fenêtre de température ; d'un point de vue expérimental, il aurait fallu étendre la fenêtre de température au-delà de $+51^\circ\text{C}$ mais une telle augmentation n'aurait pas été supportée par nos échantillons biologiques. Par ailleurs, le paramètre d , caractérisé dans l'équation de Boltzmann (page 66), définit la largeur de la phase de transition. Ce paramètre a augmenté significativement au-delà de 110 $\mu\text{g/g}$ de toluène, il reflète une réduction de la « coopérativité » entre les lipides, c'est-à-dire une répartition non homogène du toluène dans la membrane des microsomes.

Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus avec les ajouts de toluène dans les microsomes montrent des effets pour des concentrations de toluène qui ne peuvent pas être atteintes *in vivo*. Preuve en sont, les résultats relatifs aux analyses RMN des spectres ^{31}P et ^1H obtenus avec des microsomes préparés à partir de cerveaux de rat exposés *in vivo* au toluène. Les concentrations mesurées dans les microsomes préparés à partir de rats exposés sont cinq fois inférieures à celles mesurées après ajout de toluène (20,3 vs. 110 $\mu\text{g/g}$), bien que les expositions au solvant aient été de 3000 ppm. En outre, les concentrations cérébrales des rats exposés par voie intra-trachéale étaient proches des concentrations de toluène retrouvées dans les microsomes de rat exposés *in vivo* (20,3 vs. 25,6 $\mu\text{g/g}$).

Compte tenu de ce constat, il est raisonnable de penser que les effets du toluène observés *in vivo* sur le ROM, pendant l'exposition de 2 x 15 minutes à 3000 ppm, n'ont pas été provoqués par une perturbation de la fluidité neuronale. Pour cette raison, nous sommes enclins à penser que les solvants ont une action spécifique sur les neurones impliqués dans le ROM mais qu'ils modifient peu leur fluidité membranaire.

Les solvants auraient plusieurs cibles potentielles sur les neurones, comme les récepteurs liant des neurotransmetteurs, en particulier ceux inhibés par la kétamine comme les récepteurs à NMDA et/ou les récepteurs nicotiques (Flood et Krasowski, 2000; Orser *et al.*, 1997). Les canaux ioniques voltage-dépendant sont également connus pour être inhibés par le toluène, notamment les canaux voltage dépendant au Ca^{2+} et au K^{+} (Del Re *et al.*, 2006; Maguin *et al.*, 2008). Les solvants pourraient aussi perturber l'organisation des radeaux lipidiques et par là même contrarier l'inhibition des récepteurs nicotiques par les anesthésiques (Brusés *et al.*, 2001).

Le test développé au cours de ce travail de thèse permet de mettre en évidence l'impact neuropharmacologique des solvants. En conséquence, il permet d'anticiper les effets d'une co-exposition des solvants avec du bruit. En effet, en perturbant le ROM, l'énergie acoustique portée par les bruits de fortes intensités pénétrerait davantage dans la cochlée et engendrerait des dommages cochléaires plus sévères que ceux subis par les sujets bénéficiant d'un ROM efficace.

Conclusion générale

Le test de criblage élaboré dans cette étude permet d'observer les effets neuropharmacologiques des substances chimiques volatiles lors d'une exposition aiguë. Ce test repose sur la sensibilité du réflexe de l'oreille moyenne aux anesthésiques qui l'inhibent. Ce réflexe dit « anesthésié » peut être « réveillé » par des solvants qui ont une action pharmacologique spécifique au niveau des neurones impliqués dans la boucle du ROM. À l'avenir, de nouvelles substances volatiles ayant la capacité intrinsèque de perturber le fonctionnement central du ROM pourront être identifiées à l'aide de ce test. Des expérimentations toxicologiques chroniques pourront alors être envisagées afin d'étudier l'impact de ces perturbations neuronales sur l'audition de sujets co-exposés à du bruit et à des solvants. De plus, les résultats de ces expérimentations permettront d'évaluer la pertinence de la valeur limite d'exposition du solvant étudié lorsque celui-ci est associé à du bruit en milieu professionnel.

Enfin, ce test a mis en évidence un mode d'action des solvants encore peu connu. En effet, les travaux de la littérature montrent une toxicité des solvants au sein des cellules ciliées et/ou des cellules de l'organe de Corti, on parle de cochléotoxicité. Aujourd'hui, nous savons que les réflexes impliqués dans l'audition peuvent également être perturbés par l'action neuropharmacologique des solvants. Les solvants perturbent les centres nerveux de manière spécifique et non aléatoirement le long de la membrane plasmique neuronale. Cette étude met en évidence une action des solvants au niveau des centres nerveux, situés dans le tronc cérébral, qui sont impliqués dans la boucle du ROM. Ainsi, le modèle *in vivo* a permis de mettre en évidence les effets pharmacologiques des solvants au niveau du SNC, phénomène

différent de ceux impliqués en cochléotoxicité. Le benzène et l'éthylbenzène illustrent bien la scission entre les deux phénomènes : cochléotoxicité et neuropharmacologie. En effet, le benzène qui n'est pas cochléotoxique perturbe de façon importante le réflexe. En revanche, l'éthylbenzène, qui est un cochléotoxique puissant, ne perturbe pas le réflexe. En conclusion, les substances volatiles peuvent être dangereuses pour l'audition de deux manières différentes : elles peuvent avoir une action pharmacologique rapide et réversible sur les centres nerveux et/ou elles peuvent avoir une action cochléotoxique.

Bibliographie

Anis, N.A., Berry, S.C., Burton, N.R., Lodge, D., 1983. The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br. J. Pharmacol.* 79, 565–575.

Avan, P., Bonfils, P., Mom, T., 2001. Correlations among distortion product otoacoustic emissions, thresholds and sensory cell impairments. *Noise Health* 3, 1.

Bale, A.S., Smothers, C.T., Woodward, J.J., 2002. Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by the abused solvent, toluene. *Br. J. Pharmacol.* 137, 375–383. doi:10.1038/sj.bjp.0704874

Beckstead, M.J., Weiner, J.L., Eger, E.I., Gong, D.H., Mihic, S.J., 2000. Glycine and γ -aminobutyric acidA receptor function is enhanced by inhaled drugs of abuse. *Mol. Pharmacol.* 57, 1199–1205.

Benignus, V.A., Muller, K.E., Barton, C.N., Bittikofer, J.A., 1981. Toluene levels in blood and brain of rats during and after respiratory exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 61, 326–334. doi:10.1016/0041-008X(81)90353-7

Billig, I., Yeager, M.S., Blikas, A., Raz, Y., 2007. Neurons in the cochlear nuclei controlling the tensor tympani muscle in the rat: A study using pseudorabies virus. *Brain Res.* 1154, 124–136. doi:10.1016/j.brainres.2007.04.007

Bock, G.R., Steel, K.P., 1984. Use of albino animals for auditory research. *Hear. Res.* 13, 201–202. doi:10.1016/0378-5955(84)90109-6

Borg, E., 1973. On the neuronal organization of the acoustic middle ear reflex. A physiological and anatomical study. *Brain Res.* 49, 101–123. doi:10.1016/0006-8993(73)90404-6

Brown, A.M., Harris, F.P., Beveridge, H.A., 1996. Two sources of acoustic distortion products from the human cochlea. *J. Acoust. Soc. Am.* 100, 3260–3267.

Brusés, J.L., Chauvet, N., Rutishauser, U., 2001. Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J. Neurosci.* 21, 504–512.

Büki, B., de Kleine, E., Wit, H.P., Avan, P., 2002. Detection of intracochlear and intracranial pressure changes with otoacoustic emissions: a gerbil model. *Hear. Res.* 167, 180–191. doi:10.1016/S0378-5955(02)00392-1

Campo, P., Venet, T., Thomas, A., Cour, C., Castel, B., Nunge, H., Cosnier, F., 2013. Inhaled toluene can modulate the effects of anesthetics on the middle-ear acoustic reflex. *Neurotoxicol. Teratol.* 35, 1–6. doi:10.1016/j.ntt.2012.11.002

Cappaert, N.L., Klis, S.F., Muijser, H., de Groot, J.C., Kulig, B.M., Smoorenburg, G.F., 1999. The ototoxic effects of ethyl benzene in rats. *Hear. Res.* 137, 91–102.

Cappaert, N.L., Klis, S.F., Muijser, H., Kulig, B.M., Smoorenburg, G.F., 2001. Simultaneous exposure to ethyl benzene and noise: synergistic effects on outer hair cells. *Hear. Res.* 162, 67–79.

Checkoway, H., Costa, L.G., Camp, J., Coccini, T., Daniell, W.E., Dills, R.L., 1992. Peripheral markers of neurochemical function among workers exposed to styrene. *Br. J. Ind. Med.* 49, 560–565.

Coates, K.M., Flood, P., 2001. Ketamine and its preservative, benzethonium chloride, both inhibit human recombinant $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Br. J. Pharmacol.* 134, 871–879. doi:10.1038/sj.bjp.0704315

Creel, D., 1980. Inappropriate use of albino animals as models in research. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12, 969–977. doi:10.1016/0091-3057(80)90461-X

Cruz, S.L., Balster, R.L., Woodward, J.J., 2000. Effects of volatile solvents on recombinant N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1303–1308.

Cruz, S.L., Mirshahi, T., Thomas, B., Balster, R.L., Woodward, J.J., 1998. Effects of the Abused Solvent Toluene on Recombinant N-Methyl-d-Aspartate and non-N-Methyl-d-Aspartate Receptors Expressed in *Xenopus* Oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 334–340.

Del Re, A.M., Dopico, A.M., Woodward, J.J., 2006. Effects of the abused inhalant toluene on ethanol-sensitive potassium channels expressed in oocytes. *Brain Res.* 1087, 75–82. doi:10.1016/j.brainres.2006.03.031

Edelfors, S., Ravn-Jonsen, A., 1989. The effect of toluene exposure for up to 18 months (78 weeks) on the $(Ca^{2+}/Mg^{2+})ATPase$ and fluidity of synaptosomal membranes isolated from rat brain. *Pharmacol. Toxicol.* 65, 140–142.

Ehyai, A., Freemon, F.R., 1983. Progressive optic neuropathy and sensorineural hearing loss due to chronic glue sniffing. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 46, 349–351.

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

Flood, P., Krasowski, M.D., 2000. Intravenous Anesthetics Differentially Modulate Ligand-gated Ion Channels. *J. Am. Soc. Anesthesiol.* 92, 1418–1425.

Foger, N., Marhaba, R., Zoller, M., 2001. Involvement of CD44 in cytoskeleton rearrangement and raft reorganization in T cells. *J. Cell Sci.* 114, 1169–1178.

Frazier, C.J., Buhler, A.V., Weiner, J.L., Dunwiddie, T.V., 1998. Synaptic potentials mediated via α -bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 18, 8228–8235.

Greenberg, M.M., 1997. The Central Nervous System and Exposure to Toluene: A Risk Characterization. *Environ. Res.* 72, 1–7. doi:10.1006/enrs.1996.3686
Gyulai, L., Bolinger, L., Leigh, J.S., Barlow, C., Chance, B., 1984.

Phosphorylethanolamine - the major constituent of the phosphomonoester peak observed by ³¹P-NMR on developing dog brain. *FEBS Lett.* 178, 137–142. doi:10.1016/0014-5793(84)81257-0

Haeberlen, U., 1976. In *advances in Magnetic Resonance*; Suppl. 1; J. S. Waugh, Ed.; Academic Press: New York

Hackney, C.M., Furness, D.N., 1995. Mechanotransduction in vertebrate hair cells: structure and function of the stereociliary bundle. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 268, C1–C13.

Hering, H., Lin, C.-C., Sheng, M., 2003. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J. Neurosci.* 23, 3262–3271.

Hibino, H., 2006. Molecular and Physiological Bases of the K⁺ Circulation in the Mammalian Inner Ear. *Physiology* 21, 336–345. doi:10.1152/physiol.00023.2006

Hodgkinson, L., Prasher, D., 2006. Effects of industrial solvents on hearing and balance: A review. *Noise Health* 8, 114. doi:10.4103/1463-1741.33952

Hormes, J.T., Filley, C.M., Rosenberg, N.L., 1986. Neurologic sequelae of chronic solvent vapor abuse. *Neurology* 36, 698–702.

Kobald, S.O., Wascher, E., Blaszkewicz, M., Golka, K., van Thriel, C., 2015. Neurobehavioral and neurophysiological effects after acute exposure to a single peak of 200 ppm toluene in healthy volunteers. *NeuroToxicology* 48, 50–59. doi:10.1016/j.neuro.2015.03.005

Lataye, R., Campo, P., Loquet, G., 2000. Combined effects of noise and styrene exposure on hearing function in the rat. *Hear. Res.* 139, 86–96. doi:10.1016/S0378-5955(99)00174-4

Lataye, R., Campo, P., Loquet, G., 1999. Toluene Ototoxicity in Rats: Assessment of the Frequency of Hearing Deficit by Electrocochleography. *Neurotoxicol. Teratol.* 21, 267–276. doi:10.1016/S0892-0362(98)00057-9

Lazar, R.B., Ho, S.U., Melen, O., Daghestani, A.N., 1983. Multifocal central nervous system damage caused by toluene abuse. *Neurology* 33, 1337–1340.

Lebel, C.P., Schatz, R.A., 1990. Altered synaptosomal phospholipid metabolism after toluene: possible relationship with membrane fluidity, Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase and phospholipid methylation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 1189–1197.

LeBel, C.P., Schatz, R.A., 1989. Effect of toluene on rat synaptosomal phospholipid methylation and membrane fluidity. *Biochem. Pharmacol.* 38, 4005–4011.

Lee, J.M., Barry, J.A., 1996. Influence of membrane lipid packing on T-2-weighted magnetic resonance images: Study of relaxation parameters in model membrane systems. *Magn. Reson. Med.* 36, 420–426. doi:10.1002/mrm.1910360314

Liberman, M.C., Guinan Jr, J.J., 1998. Feedback control of the auditory periphery: anti-masking effects of middle ear muscles vs. olivocochlear efferents. *J. Commun. Disord.* 31, 471–483.

Lim, D.J., 1986. Cochlear micromechanics in understanding otoacoustic emission. *Scand. Audiol. Suppl.* 25, 17–25.

Lopreato, G.F., Phelan, R., Borghese, C.M., Beckstead, M.J., Mihic, S.J., 2003. Inhaled drugs of abuse enhance serotonin-3 receptor function. *Drug Alcohol Depend.* 70, 11–15. doi:10.1016/S0376-8716(02)00330-7

Maguin, K., Campo, P., Parietti-Winkler, C., 2008. Toluene Can Perturb the Neuronal Voltage-Dependent Ca²⁺ Channels Involved in the Middle-Ear Reflex. *Toxicol. Sci.* 107, 473–481. doi:10.1093/toxsci/kfn242

Maguin, K., Lataye, R., Campo, P., Cossec, B., Burgart, M., Waniusiow, D., 2006. Ototoxicity of the three xylene isomers in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 28, 648–656. doi:10.1016/j.ntt.2006.08.007

Massiot, D., Fayon, F., Capron, M., King, I., Le Calvé, S., Alonso, B., Durand, J.-O., Bujoli, B., Gan, Z., Hoatson, G., 2002. Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra. *Magn. Reson. Chem.* 40, 70–76. doi:10.1002/mrc.984

Meyer, H., 1899. Zur theorie der alkoholnarkose. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 42, 109–118.

Molnár, J., Paksy, K., Náray, M., 1985. Changes in the rat's motor behaviour during 4-hr inhalation exposure to preanarcotic concentrations of benzene and its derivatives. *Acta Physiol. Hung.* 67, 349–354.

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

Ogata, J., 2006. Effects of Anesthetics on Mutant N-Methyl-D-Aspartate Receptors Expressed in *Xenopus* Oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 434–443. doi:10.1124/jpet.106.101691

Orser, B.A., Pennefather, P.S., MacDonald, J.F., 1997. Multiple Mechanisms of Ketamine Blockade of N-methyl-D-aspartate Receptors. *J. Am. Soc. Anesthesiol.* 86, 903–917.

Overton, E., 1901. Studien über die Narkose. Zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie. Ed. Jena, Gustav Fischer.

Pang, X.D., Guinan Jr, J.J., 1997. Effects of stapedius-muscle contractions on the masking of auditory-nerve responses. *J. Acoust. Soc. Am.* 102, 3576–3586.

Pfriege, F.W., Ungerer, N., 2011. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog. Lipid Res.* 50, 357–371. doi:10.1016/j.plipres.2011.06.002

Pilz, P.K., Ostwald, J., Kreiter, A., Schnitzler, H.U., 1997. Effect of the middle ear reflex on sound transmission to the inner ear of rat. *Hear. Res.* 105, 171–182.

Rosenberg, N.L., Spitz, M.C., Filley, C.M., Davis, K.A., Schaumburg, H.H., 1988. Central nervous system effects of chronic toluene abuse—Clinical, brainstem evoked response and magnetic resonance imaging studies. *Neurotoxicol. Teratol.* 10, 489–495. doi:10.1016/0892-0362(88)90014-1

Rumeau, C., Campo, P., Venet, T., Thomas, A., Cour, C., Parietti-Winkler, C., 2011. Toluene effect on the olivocochlear reflex. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 121, 140–145. doi:10.1093/toxsci/kfr025

Sagara, T., Furukawa, H., Makishima, K., Fujimoto, S., 1995. Differentiation of the rat stria vascularis. *Hear. Res.* 83, 121–132. doi:10.1016/0378-5955(94)00195-V

Sliwinska-Kowalska, M., Zamyslowska-Szmytko, E., Szymczak, W., Kotylo, P., Fiszer, M., Wesolowski, W., Pawlaczyk-Luszczynska, M., 2005. Exacerbation of noise-induced hearing loss by co-exposure to workplace chemicals. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, The Ninth Meeting of the International Neurotoxicology Association (INA) 19, 547–553. doi:10.1016/j.etap.2004.12.018

Thurber, K.R., Tycko, R., 2009. Measurement of sample temperatures under magic-angle spinning from the chemical shift and spin-lattice relaxation rate of ⁷⁹Br in KBr powder. *J. Magn. Reson.* 196, 84–87. doi:10.1016/j.jmr.2008.09.019

Ueda, I., Hirakawa, M., Arakawa, K., Kamaya, H., 1986. Do Anesthetics Fluidize Membranes? *J. Am. Soc. Anesthesiol.* 64, 67–71.

Valentine, J.L., Lee, S.S.-T., Seaton, M.J., Asgharian, B., Farris, G., Corton, J.C., Gonzalez, F.J., Medinsky, M.A., 1996. Reduction of benzene metabolism and toxicity in mice that lack CYP2E1 expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141, 205–213.

Van den Berge, H., Kingma, H., Kluge, C., Marres, E.H., 1990. Electrophysiological aspects of the middle ear muscle reflex in the rat: latency, rise time and effect on sound transmission. *Hear. Res.* 48, 209–219.

Van den Berge, H., Van der Wal, J.C., 1990. The innervation of the middle ear muscles of the rat. *J. Anat.* 170, 99.

Van den Berge, H., Wirtz, P., 1989a. Detailed morphology of the stapedius muscle of the rat. An integrated light microscopical, morphometrical, histochemical, immunohistochemical and electron microscopical study in relation to function. *J. Anat.* 166, 157.

Van den Berge, H., Wirtz, P., 1989b. Detailed morphology of the tensor tympani muscle of the rat. An integrated light microscopical, morphometrical, histochemical, immunohistochemical and electron microscopical study in relation to function. *J. Anat.* 164, 215.

Venet, T., Rumeau, C., Campo, P., Rieger, B., Thomas, A., Cour, C., 2011. Neuronal circuits involved in the middle-ear acoustic reflex. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 119, 146–155. doi:10.1093/toxsci/kfq312

Verkleij, A.J., Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D., van Deenen, L.L.M., 1973. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 323, 178–193. doi:10.1016/0005-2736(73)90143-0

Willhite, C.C., Book, S.A., 1990. Toxicology update. *J. Appl. Toxicol.* 10, 307–310. doi:10.1002/jat.2550100414

Yamashita, M., Mori, T., Zhao, X., Nagata, K., Marszalec, W., Yeh, J.Z., Narahashi, T., 2005. General anesthetic modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Int. Congr. Ser., Basic and Systemic Mechanisms of Anesthesia: Proceedings of the 7th International Conference on Basic and Systematic Mechanisms of Anesthesia held in Nara, Japan between 25 and 27 October 2005* 1283, 243–246. doi:10.1016/j.ics.2005.07.048

Annexe

Wathier L., Venet T., Thomas A., Nunge H., Bonfanti E., Cosnier F., Parietti-Winkler C., Campo P., Tsan P., Bouguet-Bonnet S., Gansmüller A. (2016) **Membrane fluidity does not explain how solvents act on the middle-ear reflex.** *Neurotox.* 57, 13-21.

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Le réflexe de l'oreille moyenne (ROM) diminue l'énergie acoustique des bruits riches en basses fréquences, et de fortes intensités, qui pénètrent dans la cochlée. Son déclenchement bilatéral permet alors de protéger la cochlée. La perturbation de ce réflexe par des solvants peut accroître les effets cochléo-traumatisants du bruit, notamment chez les salariés du secteur industriel, où bruit et solvant sont souvent associés. L'objectif principal de ces travaux était d'élaborer un test de criblage capable d'identifier les substances volatiles susceptibles de modifier le réflexe. Le choix des solvants nous a permis d'étudier le mode d'action des solvants sur les neurones impliqués dans l'arc réflexe. Pour cela, des rats Brown Norway anesthésiés ont inhalé des solvants aromatiques choisis en fonction de leur lipophilie (log Kow) et/ou de leur structure. L'amplitude du ROM a été déterminée grâce à la mesure de l'intensité du produit de distorsion acoustique. Les résultats ont montrés que les effets des solvants sur le ROM étaient conditionnés par les paramètres stéréospécifiques des molécules et non pas par leur lipophilie. Par ailleurs, l'analyse RMN des microsomes de cerveaux de rats a confirmé que le toluène n'influence pas la fluidité membranaire. En conclusion, la mesure du ROM est un bon outil pour détecter des substances dangereuses pour l'audition en cas de co-exposition : solvant plus bruit. Enfin, nous pouvons dire que les solvants aromatiques ont une action neuropharmacologique et/ou cochléotoxique qui peuvent retentir de façon distincte sur l'audition des sujets co-exposés au bruit et à des solvants.

MOTS CLES

Réflexe de l'oreille moyenne ; solvants ; fluidité membranaire ; produit de distorsion acoustique

ABSTRACT

The middle-ear reflex (MER) reduces acoustic energy of high intensity noises rich in low frequencies at entering the cochlea. Therefore, its bilateral trigger protects the cochlea. Disruption of this reflex by solvents can increase cochleo-traumatic effects of noise, especially among industrial workers exposed to both noise and solvent. The main objective of this work was to develop a screening test capable of identifying the volatile substances that could disturb the reflex. Moreover, the choice of solvents allowed us to study the mode of action of solvents on the neurons involved in the reflex circuit. For this purpose, Brown Norway rats were anesthetized and then exposed to aromatic solvents selected depending on their lipophilicity (log Kow) and/or on their structure. The amplitude of the MER was determined by measuring the amplitude of cubic distortion product oto-acoustic emissions. Aromatic solvents appear to act directly on the neuronal targets involved in the acoustic reflex circuit, rather than on membrane fluidity. The affinity of this interaction was determined by stereospecific parameters rather than lipophilicity. Additionally, NMR spectra of brain microsomes confirmed that brain lipid fluidity was unaffected by toluene exposure. In conclusion, the MER can be used to detect hazardous volatile substances for hearing in case of co-exposures to noise and solvent. Finally, this study revealed that aromatic solvents have a neuropharmacological and/or cochleotoxic action that can act separately on hearing of workers exposed to noise and solvents simultaneously.

KEYWORDS

Middle ear reflex; solvents; membrane fluidity; distortion products of otoacoustic emissions