



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

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 **Valentin TALLANDIER**

## **Etude de la vestibulotoxicité périphérique des solvants aromatiques par une approche *in vitro***

### Membres du jury :

<b>Rapporteurs :</b>	<b>Paul Avan</b>	Professeur, Université d'Auvergne
	<b>Christian Chabbert</b>	Directeur de Recherches au CNRS recherches, Université d'Aix-Marseille
<b>Examineurs :</b>	<b>Carine Bossenmeyer-Pourié</b>	Maître de conférences, Université de Lorraine
	<b>Monique Chalansonnet</b>	Responsable d'études, INRS
	<b>Jordi Llorens</b>	Professeur, Université de Barcelone
<b>Directeur de thèse :</b>	<b>Pierre Campo</b>	Chef du département Toxicologie et Biométrie, INRS
<b>Co-directeur de thèse :</b>	<b>Gérôme Gauchard</b>	Professeur, Université de Lorraine

**Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS)**, Département Toxicologie et Biométrie (TB), 1 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 - 9 Avenue de la Forêt de Haye CS 50184 - 54505 Vandœuvre-lès-Nancy



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont consacré du temps à l'évaluation de ces travaux de thèse. Je remercie sincèrement **Paul Avan** et **Christian Chabbert** d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. J'aimerais remercier chaleureusement les examinateurs de thèse, **Carine Bossenmeyer-Pourié** et **Jordi Lorens**, qui ont suivi de près ce projet en ayant accepté d'être membres du comité de suivi individuel de thèse. J'ai apprécié votre implication, vos conseils mais aussi les échanges scientifiques que l'on a pu avoir durant ces 3 années.

Je remercie **Gérôme Gauchard** d'avoir co-encadré cette thèse. J'ai vraiment apprécié nos échanges et votre point de vue sur les différents résultats expérimentaux obtenus. Votre sympathie et votre soutien m'ont permis d'avancer en toute sérénité. Merci à vous.

Un grand merci à **Pierre Campo**, mon directeur de thèse, qui m'a ouvert les portes de l'INRS. Vous m'avez accueilli à bras ouverts et vous m'avez fait confiance très rapidement. Durant ces trois années de thèse, j'ai pu bénéficier de votre expérience et de vos connaissances étendues dans le domaine de la toxicologie. Vos conseils avisés m'ont été d'une grande utilité et me permettront, à l'avenir, d'adopter une bonne attitude scientifique. Le soutien et la motivation que vous m'avez apportés m'ont permis de gagner en assurance et d'avancer en toute confiance. Vous m'avez beaucoup apporté, et pour cela, je vous en suis extrêmement reconnaissant.

Merci à tous les membres du laboratoire ONE, qui m'ont accueilli chaleureusement au sein de leur équipe et qui m'ont fait partager leur passion pour la recherche :

**Lise**, tu es la première personne sur cette liste (Cysteur, premier du nom). Tu as été un binôme de compét' durant ce projet. Je n'aurais sûrement jamais pu mener seul ce travail si tu n'avais pas été là et un simple merci ne semble pas suffire pour tout ce que tu as fait. Tu as réalisé un travail colossal et tu as fait de nombreuses concessions pour cette étude. Tu m'as aussi transmis ton savoir-faire, et tu m'as appris à être rigoureux et organisé (deux choses qui m'étaient jusqu'alors inconnues).

Ces longues heures passées dans le labo à faire des mesures auraient été bien monotones sans toi. C'est durant ces longues heures de manip' que je me suis aperçu de ta mémoire extraordinaire (*Lisipédia*), tu avais toujours les bonnes réponses aux questions que nous nous posions. Grâce à toi, j'ai aussi pu apprendre beaucoup d'expressions qui m'étaient inconnues (du genre ; « terminé patate ! »). Merci pour tout !

**Aurélie**, la reine de l'histologie du labo ! C'est à toi que je dois les belles images de MEB et de MO présentées dans cette thèse. Tu m'as montré et appris toutes les techniques d'histologie du labo. Tu as aussi joué le rôle d'infographiste et de correcteur d'orthographe. Tous mes fichiers, PowerPoint et posters y sont passés ! Nous avons passé de bons moments ensemble. Tu étais très bon public et tes éclats de rire me manqueront. Grâce à toi, maintenant je sais qu'on peut tromper une personne mille fois, qu'on peut tromper mille personnes une fois, mais qu'on ne peut pas tromper mille personnes, mille fois. Mais je sais aussi que mille mercis ne seront toujours pas suffisants !

**Thomas**, l'esprit ingénu du labo ! Tu as résolu beaucoup de problèmes dans ce projet. Tu avais toujours une solution pour n'importe quelle situation. Tu nous as beaucoup aidés dans la mise au point des mesures électrophysiologiques. Merci de m'avoir fait profiter de ton expertise dans de nombreux domaines. En plus de tes nombreuses qualités sur le plan technique, j'ai apprécié ton esprit tordu et ton goût pour l'humour noir. Tu m'auras beaucoup fait rire et saches qu'un sens de l'humour bien développé donne plus d'équilibre à nos pas sur la corde raide de la vie (*William A. Ward*). Je te souhaite une bonne continuation et le meilleur dans la poursuite de ta thèse.

**Benoit**, le petit chef au grand bureau ! Tu es arrivé dans le laboratoire ONE quasiment au même moment que moi et tu t'es très vite adapté à l'équipe. Tu as toujours été à l'écoute et j'ai vraiment apprécié ta bienveillance. Tu t'es toujours montré disponible et tes conseils m'ont toujours été très utiles, surtout dans des situations plus complexes. Ta confiance m'a permis d'avancer sereinement. J'ai aussi pu bénéficier de ta précieuse aide lors de l'écriture des articles scientifiques. J'espère avoir une carrière scientifique aussi enrichissante que la tienne.

**Stéphane**, l'hyperactif de l'équipe ! Tu m'as tout de suite mis à l'aise dès le jour où je suis arrivé. Je suis très content d'avoir eu un collègue comme toi, une relation amicale s'est tout de suite installée. Coté manip' tu as aussi été très bon. Même si on a eu quelques difficultés avec l'immuno-histo, tu as toujours réussi à trouver la solution pour obtenir des belles images. Tu as toujours été partant pour tenter de nouvelles choses et tu n'as jamais fait de scène même si je t'ai fait acheter un tas d'anticorps. On a aussi passé de bons moments et de belles soirées ! J'espère que notre amour pour les terrasses de café perdurera et qu'on partagera d'autres bons moments au-delà des murs de l'INRS !

Je tiens aussi à remercier **Monique**, **Cristina**. Monique tu as encadré ce projet de thèse durant ces 3 années. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée. J'ai aussi aimé nos discussions qui ne se limitaient pas toujours au projet de thèse. Cristina, j'ai apprécié ta bonne humeur et tes éclats de rire. Ta gentillesse et tes petits cadeaux me manqueront.

Merci aussi aux ex-membres du laboratoire. **Benoit C.**, le petit boute-en-train du labo qui s'est enfui juste avant la fin de ma thèse et **Maria** qui m'a passé le relais avant de repartir sur son île paradisiaque.

Je voulais aussi remercier **Laureline**, qui a fait un stage au sein du laboratoire. Même si tu n'as pas pu rester longtemps, j'ai vraiment apprécié ces quelques manip' réalisées ensemble et ta passion pour les blagues sur les animaux.

Je voudrais aussi remercier les membres du laboratoire CMR. **Laurent**, toujours disponible pour répondre à mes questions. **Yves**, avec qui j'ai eu de nombreux échanges scientifiques. **Carole**, avec qui je partage une passion pour les films de Spielberg. **Marie**, pour son côté pétillant. **Hélène**, pour tous les petits services qu'elle m'a rendus. Et merci à **Jean-Philippe**, **Sarah** et **Mylène**.

Je remercie vivement les membres du laboratoire IMSA. **Samuel**, **Julianne** et **Isabelle L.** qui nous ont beaucoup aidés dans la préparation de nos traitements. Vous avez toujours été disponibles pour nous rendre service. Merci à leur petit boutchou, **Adrien**, avec qui j'ai eu de nombreuses discussions de « thésards ».

Et merci aux autres membres du laboratoire : **Fabrice**, **Isabelle S.** et **Amélie**. Je tiens aussi à remercier chaleureusement l'ex responsable de laboratoire, **François**, qui m'a

été d'une grande aide durant cette thèse. Je ne compte même plus le nombre d'heures passées dans votre bureau à écouter vos explications et vos raisonnements scientifiques. J'ai énormément appris à vos côtés.

Merci à tous les membres du laboratoire TIPC. Je remercie **Frédéric** et **Stéphane**, pour leurs essais de dosage de solvants. Merci aux autres : **Fabrice**, **Catherine**, **Lisa**, **Claire**, **Matthieu** et **Marie-Jo**.

J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire BM. **Alain**, le chef rigolo de l'équipe. **Ogier**, avec qui j'ai eu des discussions passionnantes. **Mathieu**, avec qui j'ai passé de très bons moments en terrasse rue Stan. **Guillaume**, pour ces moments de pause agréables passés avec toi. **Philippe**, pour ses petits cadeaux et ses conversations enrichissantes. Merci aussi pour tous les services que tu m'as rendus. **Aurélie**, pour ta gentillesse et tes explications claires en biostatistiques. **Anne-Marie**, pour sa gentillesse. Et merci aux autres : **Sophie**, **Flavien** et **Radia**.

Merci aussi à **Marie-Jo** et **Laurine** qui ont pris soin des animaux et qui ont géré les commandes. Vous avez toujours été disponibles et votre aide m'é a été précieuse.

Merci aussi à tous les autres membres du département TB. Merci à **Karine**, pour ta disponibilité lors de mes petits soucis administratifs mais aussi pour ces bons moments passés dans des occasions plus festives.

Je voudrais aussi remercier tous les copains de l'INRS pour tout ce que nous avons partagé (je risque de répéter quelques prénoms) : **Régis**, pour ton esprit futé. **François**, pour ton côté spirituel mais aussi pour ton goût de la fête. **Mathieu**, pour tes discussions posées. **Guillaume**, pour nos passions communes. **Matthieu**, pour ta fraîcheur (tu rajeunis un peu le groupe). **Steph'** pour tes coups de gueule, ta passion des apéros, et tes blagues style « Bigard ». Et à tous les autres : **Karine**, **Lise**, **Aurélie**, **Véro**, **Claire**, **Marie**, **Adrien**, **Julianne**.... J'espère que cette amitié perdurera et que l'on continuera ces réunions festives.

Merci à tous mes amis.

**Florent**, nous nous sommes rencontrés sur les bancs de la fac et depuis, une sincère amitié nous lie (sacwé Flowent). Nous avons affronté, ensemble, tous les petits soucis rencontrés lors des études. Nos passions communes nous ont amenés à faire un petit bout de chemin ensemble (je repense à la cueillette de mirabelles). Tu n'assisteras probablement pas à ma soutenance de thèse mais j'espère venir te voir très bientôt au Canada.

J'aimerais remercier mes autres amis rencontrés à Nancy avec qui j'ai passé de bonnes soirées : **Lucie, Jacques, Martin, David, Ugo, Matthieu** .... Et ceux avec qui j'ai passé des moments un peu plus studieux : **Claire, Mathieu, JB, Camille**, ...

Je remercie aussi les copains de Reims, **Marius et Laeti**, avec qui on passe des bons week-ends. Si tu lis ce passage Marius, pense à me rendre ma perceuse à l'occaz' !

Un grand merci à tous mes amis de Bar-le-Duc, que je connais depuis de nombreuses années maintenant. C'est toujours un réel plaisir de revenir vous voir pour partager quelques tranches de rigolades. **Quentin**, qui sait autant mettre les gens à l'aise, que mal à l'aise (c'est un art que toi seul maîtrise). **Valou**, le philosophe du groupe et depuis peu, devenu bouilleur de cru. **Arnaud** (Nonox), qui connaît à peu près tous les titres musicaux depuis les années 90 jusqu'aux années 2010. **Dominique** (Dom' ou Bobbitz), le gardien des dés du gros poulet. **Armand** (Gégé) le *Golden Boy*. Et bien sûr **Antoine** (Tail), qui place toujours la meilleure blague au bon moment.



Merci à ma famille.

J'aimerais remercier mes beaux-parents, **Fodel** et **Rachel**, qui m'ont toujours soutenu. Vous avez toujours su trouver les mots justes pour me remotiver et pour me remonter le moral dans les moments difficiles.

Merci à mon frère, **Antoine**, et sa moitié, **Aurélié**. Vous avez toujours été fiers de mon travail de thèse, et pour cela je vous en suis très reconnaissant. Durant ces trois années, nous avons passé de nombreuses heures dans les bars et les restaurants, à jouer à des jeux de sociétés, mais aussi à rien faire du tout !

Merci à ma petite sœur **Elisa** et son époux **Anthony**. Merci d'avoir toujours été là dans les bons, mais aussi les moments difficiles. J'ai apprécié votre soutien et votre écoute attentive et pour cela je ne vous remercierais jamais assez.

Merci à mes **parents** qui ont toujours cru en moi. Vous avez toujours été là pour moi et j'ai pu compter sur vous dans toutes les épreuves que j'ai affrontées. Merci infiniment !

Enfin, merci à ma chérie **Anaïs** qui m'a soutenu et qui a supporté mes différentes humeurs durant ces 3 années. Tu as été à l'écoute et tu as su me donner de bons conseils. Merci d'avoir été à mes côtés.

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	1
TABLE DES MATIERES .....	7
LISTE DES FIGURES .....	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>
LISTE DES TABLEAUX .....	12
LISTE DES ABBREVIATIONS .....	13
CONTEXTE DE LA THESE .....	16
INTRODUCTION GENERALE .....	18

## CHAPITRE I. ÉTAT DE L'ART..... 20

<b>1. Rôle du système vestibulaire dans la fonction d'équilibration</b> .....	<b>21</b>
<b>2. Descriptions anatomique et fonctionnelle du récepteur vestibulaire</b> .....	<b>23</b>
2.1. Innervations et voies centrales vestibulaires.....	26
2.2. Cellules ciliées vestibulaires .....	28
2.2.1. Processus de transduction mécano-électrique (TME) .....	30
2.2.2. Types de cellules ciliées vestibulaires.....	34
2.3. Cycle du potassium dans le récepteur vestibulaire .....	35
2.3.1. Les mécanismes d'efflux potassique (endolymphe vers périlymphe) par les cellules sensorielles.....	37
2.3.2. Les mécanismes d'influx potassique (périlymphe vers endolymphe) par les cellules sécrétrices .....	38
2.3.3. Les cellules non sensorielles et non sécrétrices.....	42
2.4. Similarités entre les récepteurs vestibulaires et auditifs .....	43
<b>3. Solvants aromatiques</b> .....	<b>44</b>
3.1. Généralités .....	44
3.2. Effets des solvants aromatiques sur l'audition et l'équilibre .....	46
3.2.1. Cochléotoxicité des solvants aromatiques.....	46
3.2.2. Neurotoxicité des solvants aromatiques .....	54
3.3. Evaluations de la vestibulotoxicité .....	66
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE .....	69

## CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES..... 72

<b>1. Animaux</b> .....	<b>73</b>
<b>2. Culture des cystes</b> .....	<b>74</b>
2.1. Dissection des organes vestibulaires.....	74
2.1.1. Prélèvement des organes vestibulaires.....	74

2.1.2. Microdissection des différentes structures vestibulaires .....	75
2.2. Obtention des cultures 3D .....	76
2.2.1. Revêtement de la surface de la lamelle avec la laminine .....	76
2.2.2. Préparation de la culture tridimensionnelle.....	76
2.2.3. Maintien des cultures tridimensionnelles .....	76
<b>3. Mesures électrophysiologiques.....</b>	<b>77</b>
3.1. Préparations des électrodes .....	77
3.1.1. Étirement des capillaires .....	77
3.1.2. Imperméabilisation des microélectrodes .....	78
3.1.3. Remplissage des microélectrodes.....	79
3.1.4. Contrôles visuel et électrique des microélectrodes.....	80
3.2. Mesures de la concentration potassique.....	81
3.2.1. Étalonnage du signal de la microélectrode.....	81
3.2.2. Mesure de la concentration du K <sup>+</sup> endolymphatique des explants vestibulaires .....	83
<b>4. Traitement avec des agents inhibiteurs de transporteurs potassiques.....</b>	<b>85</b>
<b>5. Exposition aux solvants aromatiques .....</b>	<b>86</b>
5.1. Solvants aromatiques étudiés.....	86
5.2. Méthode d'exposition aux solvants aromatiques.....	88
<b>6. Histologie .....</b>	<b>89</b>
6.1. Inclusion des explants vestibulaires.....	89
6.1.1. Inclusion en résine .....	89
6.1.2. Inclusion dans la paraffine .....	90
6.2. Microscopie optique.....	90
6.3. Immunohistochimie par révélation enzymatique de la caspase-3 .....	91
6.4. Microscopie électronique à transmission .....	92
6.5. Microscopie électronique à balayage.....	92
<b>7. ATPmétrie.....</b>	<b>93</b>
<b>8. Analyses statistiques .....</b>	<b>94</b>
<b>CHAPITRE III. RESULTATS.....</b>	<b>95</b>
<b>1. Évolutions morphologique et fonctionnelle des cultures 3D.....</b>	<b>96</b>
1.1. Culture tridimensionnelle d'explant d'utricule .....	96
1.2. Culture tridimensionnelle d'explant d'ampoule .....	98
<b>2. Histologie des cultures d'explants vestibulaires.....</b>	<b>100</b>
2.1. Culture tridimensionnelle d'explants utriculaires .....	100
2.1.1. Organisation cellulaire.....	100
2.1.2. Surface apicale de l'épithélium sensoriel.....	102
2.1.3. Ultrastructure des cellules utriculaires .....	104
2.2. Culture tridimensionnelle d'explants ampullaires .....	106
2.2.1. Organisation cellulaire.....	106
2.2.2. Surface apicale de la crête ampullaire .....	108
2.2.3. Ultrastructure cellulaire des cultures 3D ampullaires .....	110
<b>3. Validation de la fonctionnalité des transporteurs potassiques .....</b>	<b>112</b>

3.1. Effets des inhibiteurs d'influx de $K^+$ sur la concentration endolymphatique .....	112
3.2. Effets des inhibiteurs d'efflux de $K^+$ sur la concentration endolymphatique .....	115
<b>4. Effets des solvants aromatiques .....</b>	<b>118</b>
4.1. Sur les cultures 3D d'utricules .....	118
4.1.1. Effet du styrène.....	118
4.1.2. Effet des autres solvants aromatiques .....	124
4.2. Effets du styrène sur les cultures 3D d'ampoules .....	132
4.2.1. Concentration en $K^+$ .....	132
4.2.2. Analyses histologiques.....	133
4.2.3. Quantification de l'ATP.....	137
<b><u>CHAPITRE IV. DISCUSSION.....</u></b>	<b>139</b>
<b>1. Développement des explants vestibulaires .....</b>	<b>141</b>
1.1. Création du compartiment endolymphatique.....	141
1.2. Evolution de la concentration en $K^+$ dans le compartiment endolymphatique.....	142
1.3. Caractéristiques cellulaires des cultures 3D .....	143
1.4. Propriétés physiologiques des cellules des cultures 3D.....	145
1.4.1. Cellules ciliées .....	146
1.4.2. Les cellules sécrétrices .....	148
<b>2. Toxicité vestibulaire des solvants aromatiques .....</b>	<b>149</b>
2.1. Exposition au styrène .....	150
2.2. Exposition aux solvants aromatiques.....	154
CONCLUSIONS .....	159
PERSPECTIVES.....	160
INTERETS POUR LA PREVENTION .....	162
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	163
VALORISATIONS .....	182
ANNEXES.....	184

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Mécanismes impliqués dans l'équilibration. ....	22
<b>Figure 2</b> : Rôles du système vestibulaire dans le processus d'équilibration. ....	23
<b>Figure 3</b> : Anatomie du récepteur vestibulaire.....	24
<b>Figure 4</b> : Physiologie des canaux semi-circulaires et des organes otolithiques. ....	26
<b>Figure 5</b> : Voies centrales du système vestibulaire. ....	27
<b>Figure 6</b> : Épithéliums neurosensoriels des récepteurs vestibulaires.....	29
<b>Figure 7</b> : Modulation de l'ouverture des canaux de TME. ....	31
<b>Figure 8</b> : Transduction mécano-électrique d'une cellule ciliée vestibulaire. ....	32
<b>Figure 9</b> : Modulation de l'activation des cellules ciliées vestibulaires.....	33
<b>Figure 10</b> : Principaux courants potassiques dans les cellules ciliées de type I et de type II. .....	35
<b>Figure 11</b> : Cycle du potassium du récepteur vestibulaire.....	37
<b>Figure 12</b> : Voies d'intoxication dans la cochlée de différentes substances. ....	47
<b>Figure 13</b> : Prélèvement des organes vestibulaires. ....	75
<b>Figure 14</b> : Microdissection des récepteurs vestibulaires.....	75
<b>Figure 15</b> : Etireuse de capillaire. ....	77
<b>Figure 16</b> : Silanisation de la surface interne de la microélectrode.....	79
<b>Figure 17</b> : Mesure de la gamme étalon. ....	82
<b>Figure 18</b> : Etalonnage de la microélectrode lors de la mesure de la concentration potassique endolymphatique. ....	83
<b>Figure 19</b> : Mesure de la concentration potassique dans le compartiment endolymphatique des explants vestibulaires.....	84
<b>Figure 20</b> : Mesures électrophysiologiques avec Pulse®.....	85
<b>Figure 21</b> : Mesure de la quantité d'ATP avec le CellTiter-Glo 3D. ....	93
<b>Figure 22</b> : Développements morphologique et fonctionnel des cultures 3D d'utricule.....	97
<b>Figure 23</b> : Développements morphologique et fonctionnel de cultures 3D d'ampoule. ....	99
<b>Figure 24</b> : Composition cellulaire de culture 3D d'utricules - Microscopie optique. ....	102
<b>Figure 25</b> : Épithélium sensoriel des cultures 3D utriculaires - observation au MEB de la partie apicale .....	103
<b>Figure 26</b> : Ultrastructure cellulaire des cultures 3D d'utricules - MET.....	105
<b>Figure 27</b> : Composition cellulaire de culture 3D d'ampoules - Microscopie optique. ....	107
<b>Figure 28</b> : Crêtes ampullaires des cultures 3D - MEB. ....	109
<b>Figure 29</b> : Ultrastructure cellulaire de l'épithélium sensoriel ampullaire - MET.....	110
<b>Figure 30</b> : Ultrastructure cellulaire de la zone sécrétrice ampullaires –MET. ....	111
<b>Figure 31</b> : Effets des inhibiteurs de la Na/K-ATPase et de NKCC1 sur la concentration potassique endolymphatique. ....	114

<b>Figure 32</b> : Effets des inhibiteurs des canaux de transduction mécano-électrique sur la concentration potassique endolymphatique. ....	117
<b>Figure 33</b> : Effets du styrène sur la concentration potassique endolymphatique des cultures 3D d'utricules. ....	119
<b>Figure 34</b> : Cultures 3D d'utricules après 2 h d'exposition à différentes concentrations de styrène – microscopie optique. ....	121
<b>Figure 35</b> : Cultures 3D d'utricules après 72 h d'exposition à différentes concentrations de styrène – microscopie optique. ....	122
<b>Figure 36</b> : Caspase-3 clivée des cultures 3D d'utricules exposées 72 h au styrène. ....	123
<b>Figure 37</b> : Caspase-3 clivée d'une culture 3D d'utricule exposée 72 h à 1mM de styrène	124
<b>Figure 38</b> : Effets des solvants aromatiques sur la concentration en K <sup>+</sup> des cultures d'utricules. ....	125
<b>Figure 39</b> : Cultures 3D d'utricules après 72 h d'exposition aux solvants aromatiques – microscopie optique. ....	127
<b>Figure 40</b> : Caspase-3 clivée des cultures 3D d'utricules exposées 72 h aux solvants aromatiques. ....	129
<b>Figure 41</b> : Caspase-3 clivée des cultures 3D d'utricules exposées 72 h à l' <i>o</i> -xylène. ....	130
<b>Figure 42</b> : Effets des solvants aromatiques sur la quantité d'ATP totale des cultures d'utricules exposées 72 h. ....	131
<b>Figure 43</b> : Effets du styrène sur la concentration potassique endolymphatique des cultures 3D d'ampoule. ....	133
<b>Figure 44</b> : Cultures 3D d'ampoules après 2 h d'exposition à différentes concentrations de styrène – microscopie optique. ....	135
<b>Figure 45</b> : Cultures 3D d'ampoules après 72 h d'exposition à différentes concentrations de styrène – microscopie optique. ....	136
<b>Figure 46</b> : Effets du styrène sur la quantité d'ATP totale des cultures 3D d'ampoules. ....	138

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Composition chimique des liquides extra-cellulaires de l'utricule (en mM).....	36
<b>Tableau 2</b> : <i>LOAEL</i> des différents solvants aromatiques.....	53
<b>Tableau 3</b> : Effets du toluène et du styrène sur le système vestibulaire chez les humains et les animaux .....	58
<b>Tableau 4</b> : Structure, proportion et fonctions des composants de la membrane liquide échangeuse d'ions K <sup>+</sup> .....	80
<b>Tableau 5</b> : Molécules utilisées pour étudier les mécanismes d'influx et d'efflux potassiques .....	86
<b>Tableau 6</b> : Caractéristiques des solvants aromatiques étudiés.....	87
<b>Tableau 7</b> : Comparaison entre les effets cochléotoxiques et vestibulotoxiques des solvants aromatiques.....	158

## LISTE DES ABBREVIATIONS

3D	Tridimensionnel
ATP	Adénosine Triphosphate
CC I	Cellule ciliée de type I
CC II	Cellule ciliée de type II
CCa	Cellule canalaire
CCE	Cellule ciliée externe
CCI	Cellule ciliée interne
CELMA	Comité d'éthique lorrain en matière d'expérimentation animale
Cl <sup>-</sup>	Ion chlorure
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CS	Cellule sombre
CSo	Cellule de soutien
CT	Cellule transitionnelle
DAB	3,3'- diaminobenzidine
DevAH	Développement, Adaptation et Handicap
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)
ENaC	<i>Epithelial Na<sup>+</sup> channel</i> (canal sodique épithélial)
ENG	Electronystagmographie
EOG	Electro-oculographie
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
EU	Etablissement utilisateur
$g_{met}$	Courant de transduction
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
IG	Courant de fuite
$I_k$	Courant potassique rectifiant retardé
$I_{k,L}$	Courant potassique rectifiant retardé à faible voltage
$I_{KS}$	Courant potassique à rectification retardé à faible voltage (niveau apical)
$I_{sc}$	Courant de court-circuit
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité
J0-J9	Jour de culture 0 à 9
K <sup>+</sup>	Ion potassique



K <sub>2P</sub> 1.1 / 2.1 / 3.1	canaux potassiques à deux pores (ou à pores tandem) 1.1 / 2.1 / 3.1
KCl	Chlorure de potassium
LCS	Liquide cérébro-spinal
LOAEL	<i>Lowest observed adverse effect level</i> (dose minimale entraînant un effet nocif observé)
LogP	Coefficient de partage octanol / eau
MEB	Microscope électronique à balayage
MESRI	Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation
MET	Microscope électronique à transmission
Na <sup>+</sup>	Ion sodique
NaCl	Chlorure de sodium
Na/K-ATPase	Pompe sodium-potassium
NKCC1	Na-K-Cl co-transporter 1
N.i	Noyau inférieur (caudal)
N.l	Noyau lateral (Deiters)
N.m	Noyau median (Schawlbe)
NMDA	Acide <i>N</i> -méthyl-D-aspartique
N.s	Noyau supérieur (Betcherew)
ONE	Ototoxicité et Neurotoxicité
P0-P4	Jour post-partum (jour de naissance jusqu'au 4 <sup>ème</sup> jour post-partum)
P2Y	Recepteur purinergique de la famille des récepteurs couplés aux protéines G
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBPK	<i>Physiologically Based Pharmacokinetic</i> (pharmacocinétique physiologique)
PEVMc	Potentiel évoqué vestibulaire myogénique cervical
PEVMo	Potentiel évoqué vestibulaire myogénique oculaire
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
pS	Picosiemens (unité de mesure de conductance électrique)
PSM	Poste de sécurité microbiologique
RVO	Réflexe vestibulo-oculaire
RVS	Réflexe vestibulo-spinal
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> (transcription inverse – réaction de polymérisation en chaîne)
SBEA	Structure bien-être animal
SNC	Système nerveux central
SiOH	Silanol

TB	Toxicologie et Biométrie
TBST	Tris Buffered Saline Tween
TCo	Tissu conjonctif
TME	Transduction mécano-électrique
Tris-HCl	Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane chlorhydrate
UTP	Uridine triphosphate
UE	Union Européenne

## CONTEXTE DE LA THESE

L'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) est une association à but non lucratif spécialisée dans la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles. Les missions de l'INRS s'articulent autour de trois axes : **l'identification** des risques professionnels, **l'analyse** de leurs conséquences pour la santé et la sécurité des salariés et la **diffusion** et la **promotion** des moyens de maîtrise de ces risques dans les entreprises. Pour mener ses missions, l'INRS emploie plusieurs modes d'action : **l'assistance** pilotée par des experts, la **formation** adaptée aux besoins des acteurs de la prévention, **l'information et la communication** de l'ensemble des thèmes de la sécurité au travail et les **études et recherches** pour mieux connaître les risques professionnels et leurs conséquences sur la santé du salarié et ainsi proposer des moyens et des outils de prévention.

Les thématiques de recherche de l'INRS au service de la santé et sécurité au travail s'articulent autour des risques biologiques, risques chimiques, risques physiques et mécaniques et des risques liés à l'organisation et aux situations de travail.

Pour mettre en œuvre ses plans d'action, l'INRS est divisé en 11 départements dont le département **Toxicologie et Biométrie** (TB) spécialisé dans la recherche en toxicologie. Le département TB se concentre sur 2 missions majeures : la surveillance biologique des expositions (biométrie), ainsi que leurs conséquences en milieu professionnel chez l'Homme et l'évaluation de leurs effets toxiques sur des modèles expérimentaux (toxicologie).

Le laboratoire **ONE** (Ototoxicité et Neurotoxicité) du département **TB** a pour objectif principal d'évaluer les effets néfastes de polluants chimiques ou physiques industriels sur les systèmes nerveux, central et périphérique, avec un intérêt particulier sur l'oreille interne. Certains agents chimiques, tels que les solvants aromatiques, peuvent provoquer des surdités en ciblant directement le récepteur auditif localisé dans l'oreille interne. Ces substances chimiques sont qualifiées « d'agents ototoxiques ».

Depuis plusieurs années, de nombreuses études avec des modèles animaux décrivant les mécanismes ototoxiques des solvants aromatiques à usage industriel ont été menées au sein du laboratoire ONE.

Les travaux présentés dans ce mémoire de thèse sont le fruit d'une collaboration entre le laboratoire ONE et l'équipe d'accueil 3450 Développement, Adaptation et Handicap (DevAH) – Régulations cardio-respiratoires et de la motricité. Parmi leurs nombreuses thématiques de recherche, le laboratoire DevAH possède une grande expérience dans le domaine de la posture et de l'équilibration humaines. Certaines de leurs études ont montré qu'une exposition professionnelle prolongée aux solvants aromatiques entraîne des troubles de l'équilibre. Bien que les précédentes recherches du laboratoire ONE aient montré que les solvants aromatiques pouvaient entraîner des troubles auditifs par un mécanisme ototoxique, aucune étude n'a montré l'impact de ces substances sur le récepteur de l'équilibre, le labyrinthe vestibulaire, lui aussi localisé dans l'oreille interne.

## INTRODUCTION GENERALE

Les solvants aromatiques sont encore très répandus dans le milieu industriel et sont utilisés dans de nombreux secteurs : automobile, bâtiment, construction navale, .... Ces agents chimiques sont volatils à température ambiante et sont principalement assimilés par l'organisme par la voie pulmonaire. Encore largement utilisés dans de nombreuses industries, les solvants aromatiques représentent un risque non négligeable pour les professionnels de ce secteur. Leur exposition, dans le cadre de leur activité professionnelle, peut provoquer des maladies professionnelles, le syndrome ébrieux ou narcotique, ou des encéphalopathies caractérisées par des altérations des fonctions cognitives.

De nombreuses études menées sur des professionnels du secteur industriel et expérimental ont mis en exergue les effets toxiques des solvants aromatiques. Parmi celles-ci, un grand nombre d'entre elles ont démontré les effets nuisibles de certains solvants aromatiques sur l'audition et l'équilibre. En effet, les solvants peuvent entraîner des troubles auditifs et altérer les performances posturales ainsi que les réflexes vestibulaires. Bien que les effets toxiques sur le récepteur auditif, la cochlée, soient connus depuis quelques années, aucune étude à ce jour n'a montré leurs effets sur le récepteur vestibulaire, localisé aussi dans l'oreille interne.

Les solvants aromatiques entraînent des troubles auditifs par un mécanisme ototoxique. Des études expérimentales ont montré que ces molécules entraînent la perte des cellules sensorielles de l'organe de Corti. Bien que le mécanisme ototoxique précis ne soit pas clairement identifié, il est supposé que les solvants aromatiques traversent les cellules du sulcus externe pour atteindre les cellules de Deiters qui sont impliquées dans le cycle du  $K^+$ . Les perturbations ioniques des liquides de l'oreille interne provoqueraient la mort des cellules ciliées de l'organe de Corti.

Etant donné que la cochlée et le labyrinthe vestibulaire partagent la même circulation des liquides de l'oreille interne (endolymphe et périlymphe), que leurs mécanismes de régulation sont proches et qu'ils possèdent tous les deux des cellules ciliées sensorielles, les solvants aromatiques cochléotoxiques pourraient aussi être vestibulotoxiques.

Pour répondre à ces questions, cette thèse décrit les résultats obtenus à partir d'un modèle *in vitro* développé dans le but d'évaluer la toxicité vestibulaire des solvants aromatiques. Outre l'intérêt fondamental de démontrer les mécanismes toxiques impliqués dans la toxicité du récepteur vestibulaire, ce modèle *in vitro* pourrait être utilisé pour cribler le potentiel vestibulotoxique des solvants aromatiques.

# **CHAPITRE I.**

## **ÉTAT DE L'ART**

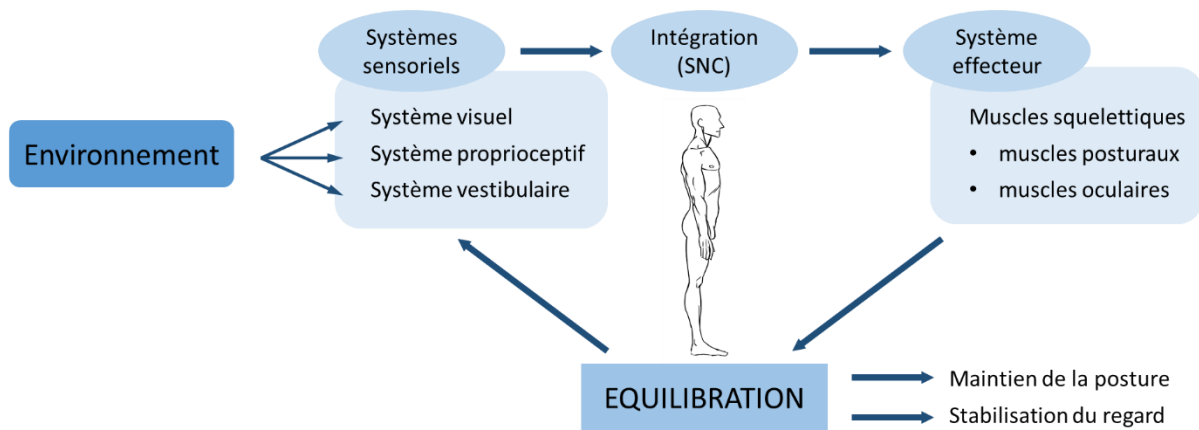
## 1. Rôle du système vestibulaire dans la fonction d'équilibration

La posture est une position automatique et inconsciente du corps maintenue par la contraction de différents muscles squelettiques et coordonnée par différents stimuli sensoriels (Carini *et al.*, 2017; Horak, 2006). Le contrôle postural permet la stabilisation du corps entier, par rapport à la force de gravité, aussi bien en position debout qu'en mouvement. Le système de contrôle postural fonctionne généralement comme des unités fonctionnelles guidées par des signaux sensoriels spécifiques pour stabiliser l'orientation de la tête et du tronc. L'orientation de la tête est principalement stabilisée par les informations visuelles et vestibulaires tandis que la proprioception est déterminante pour la stabilisation du tronc (Deliagina *et al.*, 2006).

La notion d'équilibration repose sur des réactions neuromusculaires impliquées dans la stabilisation de la posture et du regard en dépit des circonstances externes qui la perturbent. Le maintien de l'équilibre dépend d'intégrations sensorielles provenant des systèmes visuel, proprioceptif et vestibulaire. Ces informations sont envoyées au niveau des centres supérieurs du système nerveux central (SNC) où elles sont intégrées et analysées de manière coordonnée. Après traitement de ces informations, le SNC envoie des réponses motrices au niveau des muscles squelettiques posturaux et oculaires. L'intensité des stimuli sensoriels est modulée via des boucles rétroactives provenant des muscles squelettiques (Figure 1) (Carini *et al.*, 2017; Horak, 2006).

En règle générale, dans un environnement bien éclairé sur une surface d'appui solide et stable, l'équilibre d'une personne en bonne santé repose sur 70 % d'informations proprioceptives, 10 % d'informations visuelles et 20 % d'informations vestibulaires. Cependant, lorsque l'environnement devient instable ou moins bien éclairé, les informations sensorielles sont re-pondérées : les informations provenant des systèmes visuel et vestibulaire deviennent plus importantes que celles provenant du système proprioceptif. C'est pour cette raison que des troubles du système vestibulaire peuvent limiter l'adaptation sensorielle de la posture et par conséquent entraîner des chutes dans des environnements instables (Horak, 2006; Peterka, 2002).





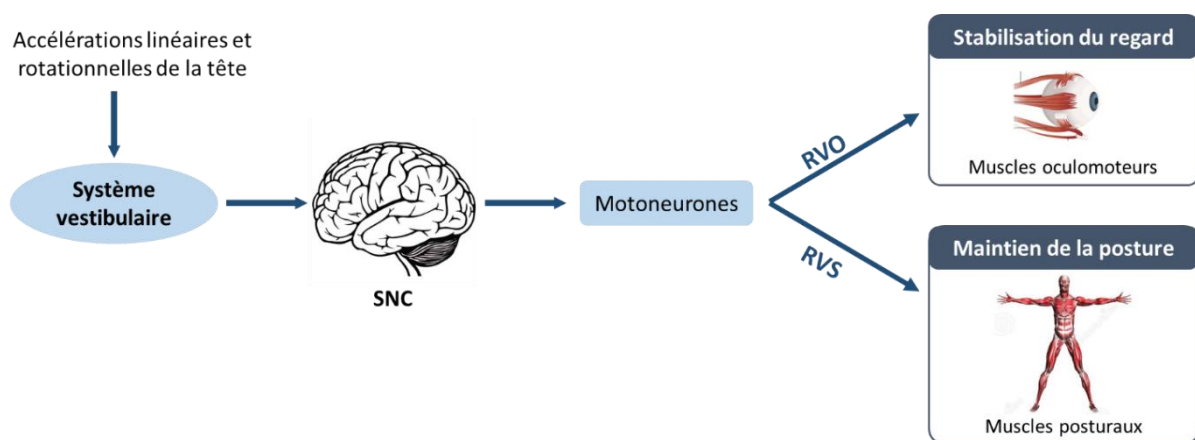
### Figure 1 : Mécanismes impliqués dans l'équilibration.

L'équilibration se définit comme le maintien du contrôle postural et de la stabilisation du regard. Les systèmes visuel, proprioceptif et vestibulaire donnent des informations sur l'environnement interne ou externe du sujet. Ces informations sont traitées par le système nerveux central (SNC) qui renvoie une réponse effectrice aux muscles squelettiques posturaux et oculaires pour maintenir l'équilibre. Les réponses motrices renvoient des signaux rétrocontrôlés pour adapter l'intensité des stimuli sensoriels.

Le système vestibulaire est impliqué dans l'équilibration, il permet de détecter les déplacements de la tête et sa position dans l'espace par rapport aux forces de gravité exercées sur le corps. Localisé dans l'oreille interne, le récepteur vestibulaire agit comme un capteur capable d'informer le SNC des accélérations angulaires et linéaires de la tête. Après traitement de l'information vestibulaire et coordination avec les informations visuelles et somesthésiques, deux réflexes sont mis en jeu pour maintenir la posture et stabiliser le regard durant le mouvement de la tête par des actions motrices : le réflexe vestibulo-spinal et le réflexe vestibulo-oculaire (Figure 2) (Britton and Arshad, 2019; Carini *et al.*, 2017; Casale and Gupta, 2020; Day and Fitzpatrick, 2005; Sakka and Vitte, 2004).

**Le réflexe vestibulo-spinal (RVS)** joue un rôle essentiel dans le maintien de la posture et du centre de gravité du corps sur un support. Les afférences vestibulaires transmettent des informations relatives aux accélérations linéaires ou rotationnelles au SNC qui répond par une modulation des motoneurons impliqués dans l'activité des muscles posturaux, en particulier les muscles extenseurs du cou, des membres inférieurs et supérieurs et du tronc (Minor, 1998; Sarah and Richard, 2013; Wilson and Peterson, 1978).

**Le réflexe vestibulo-oculaire (RVO)** stabilise l'image lors d'un mouvement de tête. Le RVO produit des mouvements oculaires compensatoires d'amplitude égale mais de sens opposé aux mouvements de la tête pour stabiliser le regard. Lors d'un mouvement de tête, des informations sensorielles provenant du récepteur vestibulaire sont transmises au SNC qui, à son tour, agit sur des motoneurones pour commander aux muscles oculomoteurs d'exercer un mouvement compensatoire des yeux (Cullen, 2012; Minor, 1998; Sarah and Richard, 2013; Zenner and Gummer, 1996).



**Figure 2 : Rôles du système vestibulaire dans le processus d'équilibration.**

Le système vestibulaire détecte les accélérations linéaires et rotationnelles de la tête et transmet les informations au système nerveux central (SNC). Après intégration et analyse des signaux, le réflexe vestibulo-spinal (RSV) maintient la posture tandis que le réflexe vestibulo-oculaire (RVO) stabilise le regard.

## 2. Descriptions anatomique et fonctionnelle du récepteur vestibulaire

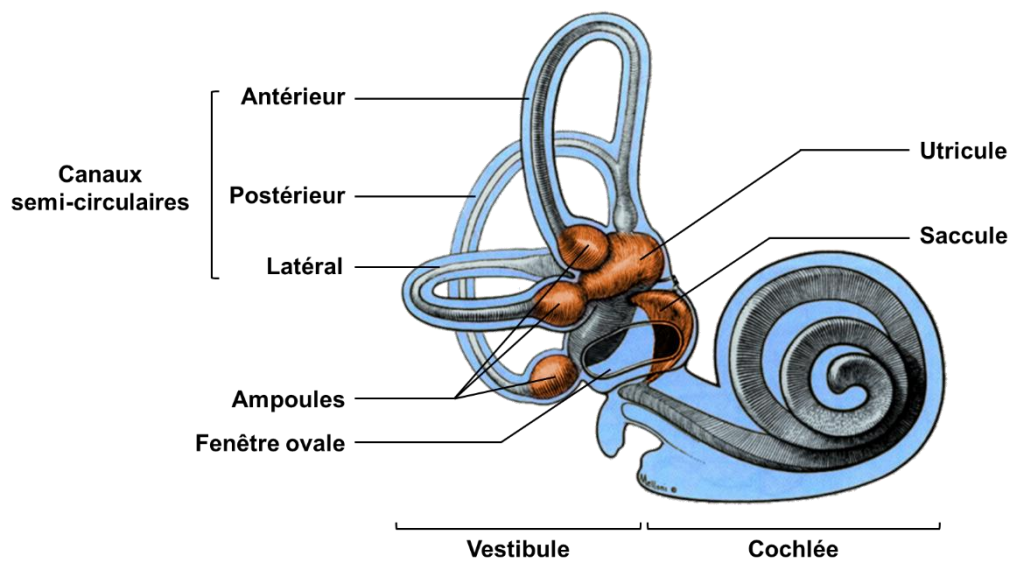
Le récepteur vestibulaire est la partie périphérique du système vestibulaire. Il est localisé dans l'oreille interne divisée en deux entités que sont les labyrinthes osseux et membraneux.

Le labyrinthe osseux est constitué d'un ensemble de cavités creusées dans le rocher au niveau de l'os temporal et dans lesquelles sont localisés les récepteurs auditif et vestibulaire.

Le labyrinthe membraneux, logé dans le labyrinthe osseux, constitue un réseau de cavités et de conduits dans lesquels se trouvent les différents épithéliums neurosensoriels du récepteur vestibulaire (Minor, 1998; Sakka and Vitte, 2004).

Entre le labyrinthe osseux et le labyrinthe membraneux circule la périlymphe, liquide dont la composition chimique est proche de celle du liquide cérébro-spinal (LCS) : faible concentration en  $K^+$  et forte concentration en  $Na^+$ . À l'inverse, le labyrinthe membraneux est rempli d'endolymphe, dont la composition chimique est proche de celle du liquide intracellulaire : une concentration élevée en  $K^+$  et une faible concentration en  $Na^+$  (Ferrary *et al.*, 2007; Ferrary and Sterkers, 1998).

Le récepteur vestibulaire périphérique est composé de cinq structures sensorielles : deux organes otolithiques, le saccule et l'utricule, et trois canaux semi-circulaires (latéral, postérieur et antérieur) (Figure 3).



**Figure 3 : Anatomie du récepteur vestibulaire.**

Le récepteur vestibulaire, spécialisé dans la fonction d'équilibration, est composé de cinq structures sensorielles interconnectées : 2 organes otolithiques, l'utricule et le saccule, 3 canaux semi-circulaires (antérieur, postérieur et latéral) (d'après Tortora G.J and Grabowski S.R., 2001).

Chacune de ces structures sensorielles est tapissée d'un épithélium neurosensoriel impliqué dans la détection des mouvements de la tête. Les épithéliums sensoriels vestibulaires sont composés de cellules sensorielles, appelées aussi cellules ciliées vestibulaires.

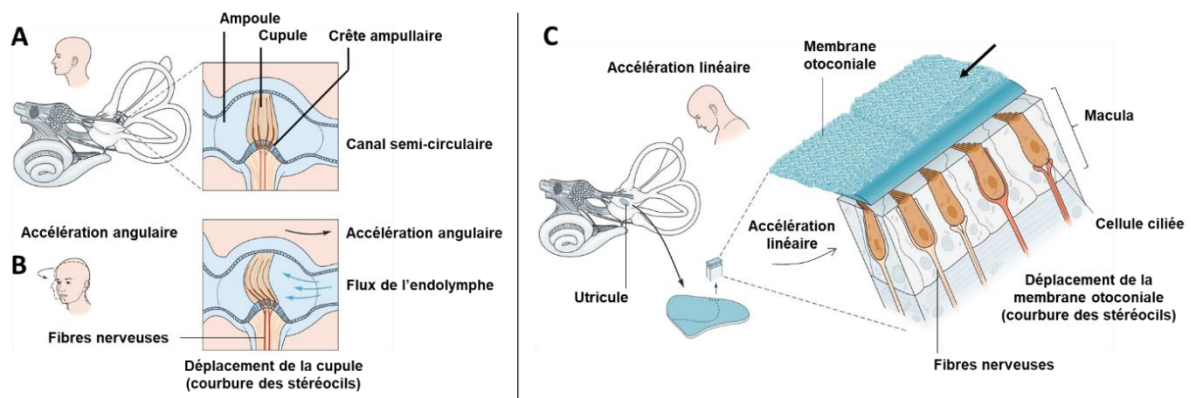
Ces cellules jouent un rôle de mécano-senseurs pour détecter les mouvements de la tête et envoyer les informations sensorielles au SNC par le biais des fibres nerveuses afférentes.

Les organes otolithiques (utricule et saccule) détectent les accélérations linéaires de la tête dans l'espace. L'utricule détecte les accélérations linéaires dans le plan horizontal, tandis que le saccule réagit aux accélérations linéaires dans le plan vertical, comme l'accélération soudaine d'un ascenseur. Les canaux semi-circulaires détectent les accélérations angulaires de la tête dans les 3 dimensions de l'espace. La macula est l'épithélium neurosensoriel qui tapisse les organes otolithiques. Chacun des canaux semi-circulaires se termine par un renflement, l'ampoule, qui est tapissée par un épithélium neurosensoriel appelé crête ampullaire (Figure 4).

Les cellules sensorielles de la macula sont recouvertes de la membrane otoconiale, composée de petites particules de carbonate de calcium appelées otoconies, qui est l'élément inertiel des organes otolithiques. La gravité, les accélérations linéaires ou une inclinaison de la tête provoquent une force inertielle entraînant un cisaillement entre la membrane otoconiale et la surface maculaire. Le mouvement de la membrane otoconiale courbe les stéréocils des cellules ciliées déclenchant ainsi la transduction mécano-électrique (TME). Le sens de courbure des stéréocils module le taux d'activation des fibres nerveuses afférentes (excitation ou inhibition).

Les cellules sensorielles de la crête ampullaire sont recouvertes par une substance gélatineuse appelée cupule qui intègre les stéréocils des cellules ciliées et se prolonge jusqu'au toit de l'ampoule. Les canaux semi-circulaires sont au nombre de 3 et détectent les mouvements de la tête dans les 3 plans de l'espace. La stimulation d'un canal dépend du type de mouvement effectué par la tête. Le canal antérieur et le canal postérieur sont orientés en position verticale, ils forment un angle de 45°. Quant au canal latéral, il est orienté en position horizontale. Lors d'accélérations angulaires ou de rotations de la tête, l'endolymphe crée une pression sur la cupule permettant de courber les stéréocils des cellules ciliées. Comme pour la macula, la courbure des stéréocils déclenche le processus de TME modulant le taux d'excitation des fibres

afférentes associées (Sarah and Richard, 2013; Swenson, 2017; Takumida, 2001; Zenner and Gummer, 1996).



**Figure 4 : Physiologie des canaux semi-circulaires et des organes otolithiques.**

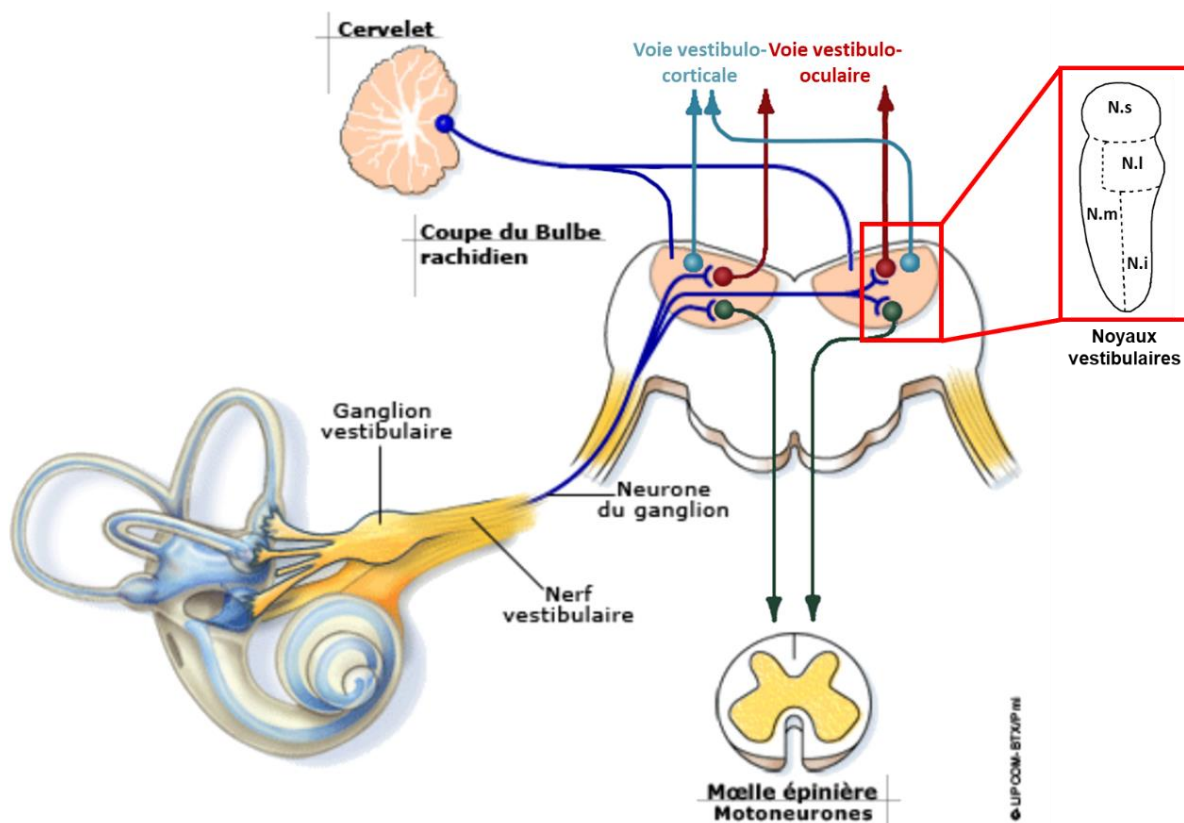
(A-B) La crête ampullaire est l'épithélium neurosensoriel des canaux semi-circulaires qui permettent de détecter les accélérations angulaires de la tête. (C) La macula est l'épithélium neurosensoriel des organes otolithiques qui détectent les accélérations linéaires de la tête. Lors d'un mouvement de la tête, la cupule (B), ou la membrane otoconiale (C), courbe les stéréocils des cellules ciliées vestibulaires (d'après l'ouvrage « *Principles of Neural Sciences* » 5<sup>ème</sup> édition - Chapter 40 - Michael E. Goldberg Mark F. Walker A. J. Hudspeth).

## 2.1. Innervations et voies centrales vestibulaires

Les cellules sensorielles des maculas et des crêtes ampullaires sont reliées par connexions synaptiques aux afférences vestibulaires primaires qui se projettent principalement vers les noyaux vestibulaires du tronc cérébral et du cervelet (Barmack, 2003). Ces neurones (environ 20 000) sont bipolaires et les corps cellulaires sont contenus dans le ganglion vestibulaire, appelé aussi ganglion de Scarpa (Sakka and Vitte, 2004; Sarah and Richard, 2013). Les axones des fibres vestibulaires primaires forment le nerf vestibulaire qui se combine avec le nerf cochléaire pour former le nerf vestibulo-cochléaire (nerf VIII). Ce nerf traverse l'angle ponto-cérébelleux pour atteindre le tronc cérébral où les fibres vestibulaires se séparent des fibres cochléaires. Les afférences vestibulaires se projettent sur les noyaux vestibulaires (tronc cérébral) et le cervelet (Sarah and Richard, 2013). Les noyaux vestibulaires sont les intégrateurs primaires des informations vestibulaires et se répartissent en 4 zones situées dans le tronc cérébral : le noyau supérieur (Betcherew), le noyau inférieur (caudal), le noyau médian (Schawlbe) et le noyau latéral (Deiters). En plus des informations vestibulaires,

ces structures cérébrales reçoivent des informations provenant des systèmes visuel et somesthésique, et aussi du cervelet (vestibulo-cervelet).

En retour, les noyaux vestibulaires projettent des fibres vers les noyaux oculomoteurs pour contrôler les mouvements oculaires lors du RVO, vers les centres réticulaires et rachidiens pour moduler les motoneurones de la moelle épinière lors du RVS et vers le thalamus qui distribue les informations sensorielles sur différentes zones du cortex cérébral. Le cervelet permet de réajuster et d'adapter les informations vestibulaires (par d'autres informations inhibitrices si cela est nécessaire par exemple) pour coordonner les mouvements selon les variations de la posture (Barmack, 2003; Sakka and Vitte, 2004; Sarah and Richard, 2013; Zenner and Gummer, 1996) (Figure 5).



**Figure 5 : Voies centrales du système vestibulaire.**

Les épithéliums sensoriels des canaux semi-circulaires et des organes otolithiques transmettent les informations sensorielles vestibulaires aux noyaux vestibulaires du tronc cérébral et au cervelet *via* le nerf vestibulaire. Les noyaux vestibulaires projettent des fibres nerveuses au niveau des noyaux oculomoteurs et vers les centres réticulaires et rachidiens pour contrôler le réflexe vestibulo-oculaire et le réflexe vestibulo-spinal. La voie vestibulo-corticale passe par le relais thalamique avant d'atteindre le cortex cérébral. Le cervelet permet d'adapter et de réajuster les informations vestibulaires. N.s : noyau supérieur (Betcherew) ; N.i : noyau inférieur (caudal) ; N.m : noyau médian (Schawlbe) ; N.l : noyau latéral (Deiters).

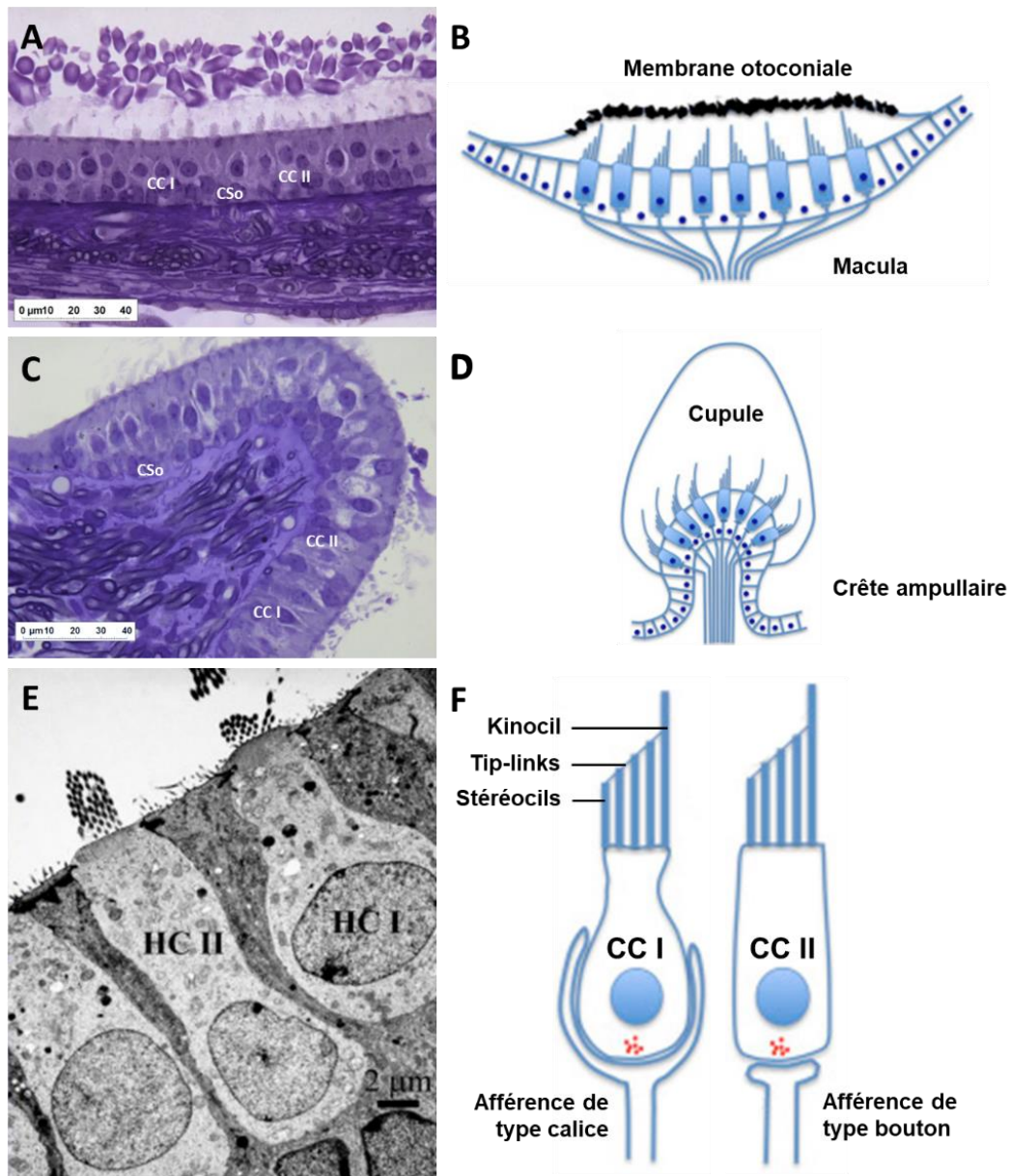
## 2.2. Cellules ciliées vestibulaires

L'épithélium neurosensoriel des organes otolithiques (macula) ou des canaux semi-circulaires (crêtes ampullaires) est composé de cellules sensorielles polarisées : les cellules ciliées qui sont imbriquées dans des cellules de soutien (Figure 6.A-D). Les cellules ciliées, comme leur nom l'indique, sont coiffées d'une touffe ciliaire au niveau du pôle apical, tandis que leur pôle basal fait synapse avec des fibres nerveuses afférentes et efférentes reliées aux structures du SNC. Le nombre de cellules ciliées diffère en fonction de l'épithélium sensoriel et de l'espèce. Les crêtes ampullaires sont les épithéliums contenant le moins de cellules ciliées ( $\approx 7\,500$  chez l'Homme et  $2\,500$  chez le rat). La macula du saccule compte moins de cellules ciliées que celle de l'utricule (saccule  $\approx 18\,500$  chez l'Homme et  $3\,000$  chez le rat – utricule  $\approx 34\,000$  chez l'Homme et  $3\,500$  chez le rat) (Desai *et al.*, 2005a, 2005b; Lim and Brichta, 2016).

La touffe ciliaire comprend entre 70 et 100 stéréocils, composés essentiellement d'actine, qui sont ancrés dans la plaque cuticulaire du pôle apical de la cellule ciliée. Un cil plus long et unique, le kinocil, surmonte la touffe ciliaire. Le kinocil a une structure microtubulaire et se localise à l'extrémité de la rangée de stéréocils. Le kinocil et les stéréocils des cellules ciliées agissent comme des capteurs des mouvements de la tête et permettent de déclencher le processus de TME (Sarah and Richard, 2013; Swenson, 2017).

Les maculas et les crêtes ampullaires sont composées de deux types de cellules ciliées (de type I et II) qui se différencient d'un point de vue morphologique et physiologique (Eatock *et al.*, 1998; Eatock and Songer, 2011; Lysakowski and Goldberg, 1997).

Les deux paragraphes suivants sont consacrés au mécanisme de TME des cellules vestibulaires et à la présentation des différentes caractéristiques des cellules ciliées de type I et de type II.



### Figure 6 : Épithéliums neurosensoriels des récepteurs vestibulaires.

Coupes semi-fines de macula (A) et de crête ampullaire (C) de rat en microscopie optique. Échelle = 40 µm. Source : INRS. Schémas de la macula (B) et de la crête ampullaire (D) avec leur élément inertiel, la membrane otoconiale (B) et la cupule (D). Coupes ultrafines de cellules ciliées de type I (CC I ou HC I) en forme d'amphore et de type II (CC II ou HC II) en forme de bâtonnet en microscopie électronique à transmission (E). Barre d'échelle = 2 µm. Schéma de cellule ciliée de type I connectée à une fibre afférente en forme de calice et de cellule ciliée de type II en contact avec une afférence en bouton synaptique simple (F). Images de MET obtenues par Werner *et al.*, (2012) et schémas adaptés de Swenson, (2017).

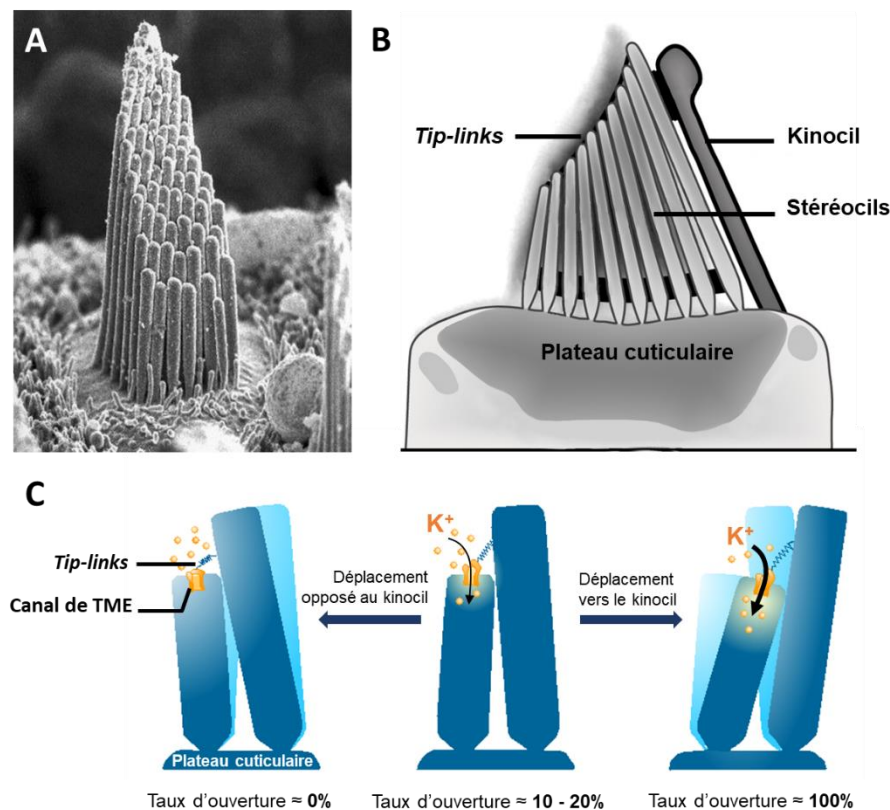


### 2.2.1. Processus de transduction mécano-électrique (TME)

La transduction mécano-électrique (TME) se définit par un changement d'énergie, où une force mécanique est transformée en signaux électriques.

Cette étape est assurée par les cellules ciliées vestibulaires dont le mouvement des stéréocils, déclenché par des accélérations angulaires ou linéaires de la tête, modifie le potentiel membranaire de ces cellules pour moduler la libération de neurotransmetteurs et donc du signal nerveux (Eatock and Songer, 2011; Qiu and Müller, 2018).

Le processus de TME est déclenché par le mouvement de la touffe ciliaire qui module l'ouverture des canaux de TME localisés à l'apex des stéréocils. De fins filaments protéiques, appelés *tip-links*, connectent l'apex du stéréocil le plus court à la région subapicale du stéréocil adjacent le plus long et sont reliés directement aux canaux de TME. Le déplacement des stéréocils modifie la tension des *tip-links* pour ouvrir ou fermer les canaux de TME (Gillespie and Müller, 2009; Gillespie and Walker, 2001; Hackney and Furness, 2013). L'ouverture ou la fermeture des canaux TME dépend du sens de courbure des stéréocils : la courbure des stéréocils vers le kinocil exerce une tension des *tip-links* entraînant l'ouverture des canaux de TME, tandis qu'une courbure dans le sens opposé du kinocil induit un relâchement des *tip-links* et donc une fermeture de ces canaux. À l'état de repos, seuls 10 à 20 % des canaux de TME sont ouverts (Gillespie, 1995) (Figure 7).

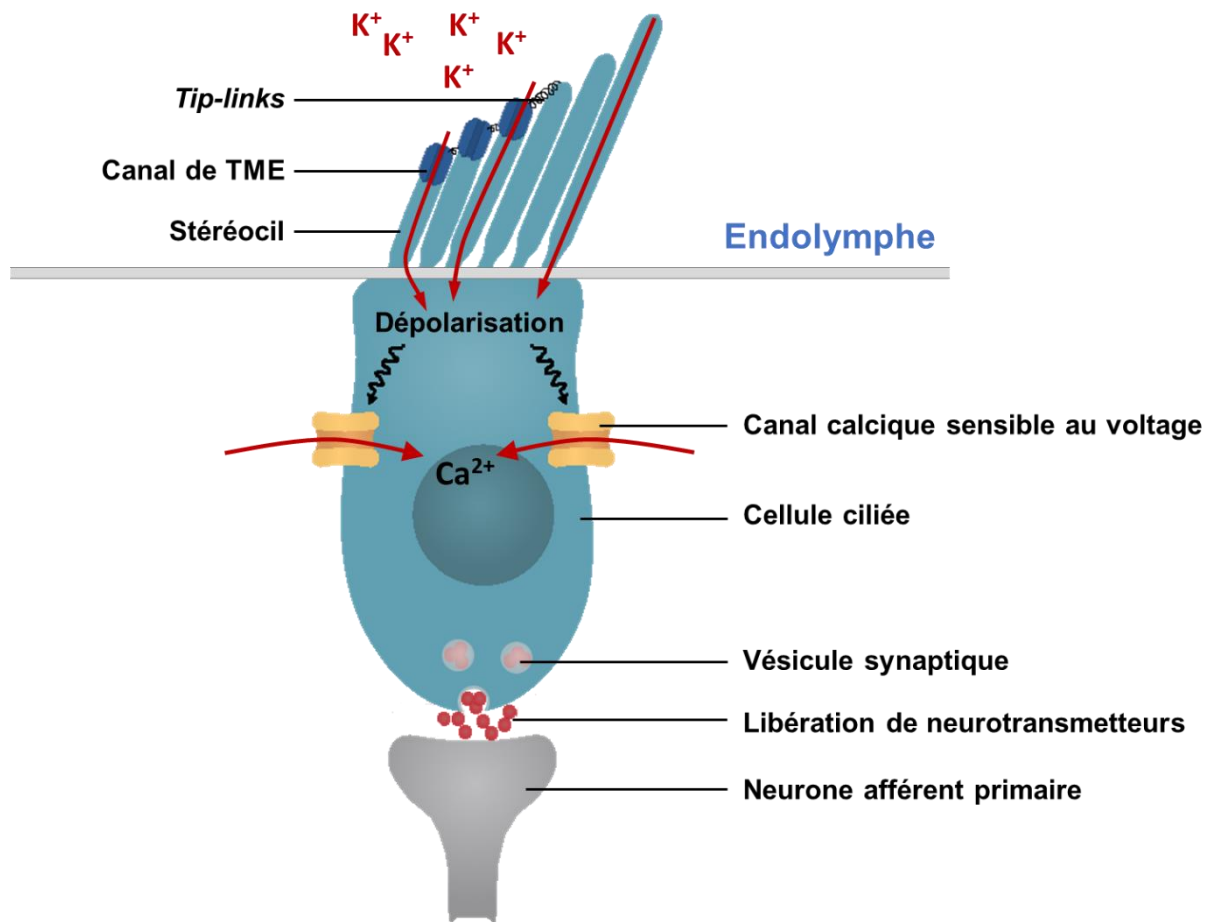


**Figure 7 : Modulation de l'ouverture des canaux de TME.**

(A) Stéréocils reliés entre eux par des *tip-links* en microscopie électronique à balayage. (B) Schéma d'une touffe ciliaire d'une cellule ciliée (Gillespie and Müller, 2009) (C) Schéma des mécanismes d'ouverture et de fermeture des canaux de TME. Au repos, 10 à 20 % des canaux de TME sont ouverts. Un déplacement des stéréocils vers le kinocil exerce une tension des *tip-links* pour ouvrir les canaux de TME. Un déplacement des stéréocils dans l'autre sens relâche la tension des *tip-links* pour refermer les canaux de TME (Gillespie, 1995).

Les canaux de TME sont perméables aux cations ( $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ , ...). L'ouverture des canaux de TME entraîne une entrée massive dans la cellule ciliée d'ions potassiques provenant de l'endolymphe (fortement concentrée en ions  $K^+$ ) qui baigne les touffes ciliaires. Les ions potassiques, poussés par le gradient électrique, entrent dans la cellule ciliée à travers les canaux de TME pour modifier le potentiel membranaire (Howard *et al.*, 1988; Qiu and Müller, 2018; Roberts *et al.*, 1988). La dépolarisation provoque l'ouverture des canaux calciques sensibles au voltage ; ils sont situés au niveau basolatéral de la cellule ciliée, entraînant un influx de  $Ca^{2+}$  dans le compartiment intracellulaire (Bao *et al.*, 2003; Boyer *et al.*, 1998; Rennie and Ashmore, 1991). Les ions calciques participent au transport des vésicules synaptiques et à l'exocytose du glutamate, neurotransmetteur excitateur, dans la fente synaptique.

Le glutamate se fixe sur les récepteurs post-synaptiques présents sur la membrane des afférences neuronales pour transmettre l'information sensorielle (Eatock and Songer, 2011) (Figure 8).

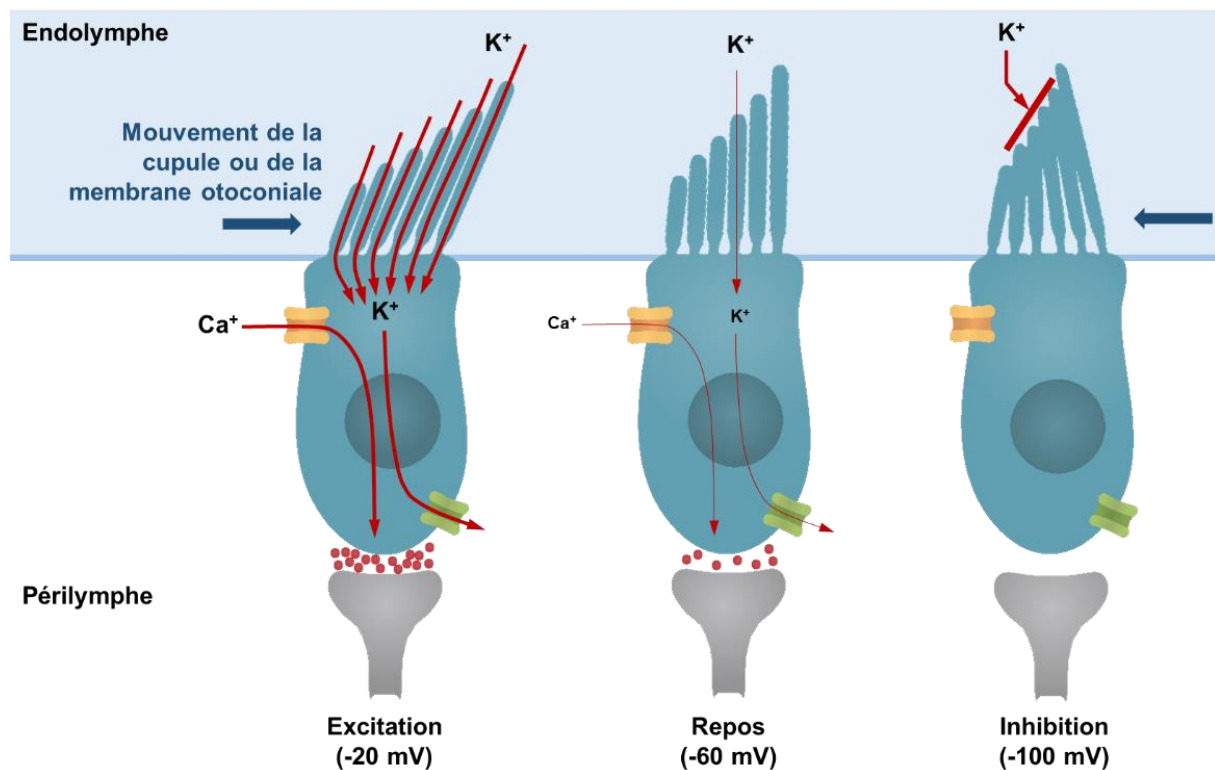


**Figure 8 : Transduction mécano-électrique d'une cellule ciliée vestibulaire.**

La courbure des stéréocils exerce une traction sur les *tip-links* permettant une ouverture mécanique des canaux de TME de chaque stéréocil. Les ions potassiques entrent dans la cellule ciliée, dépolarisent la membrane ce qui entraîne l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  permet la libération de glutamate dans la fente synaptique générant le signal nerveux (d'après l'ouvrage « Neurosciences. A la découverte du cerveau » 4<sup>ème</sup> édition – chapitre 11 – Bear M.F., Connors B.W., Paradiso M.E.).

Comme décrit précédemment, 10 à 20 % des canaux de TME restent ouverts dans une cellule ciliée non stimulée (Howard *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988). Le potentiel de repos d'une cellule ciliée, proche de -60 mV, est donc maintenu en partie par le flux de cations entrant par les canaux de TME restés ouverts. Le déplacement des stéréocils vers le kinocil entraîne l'ouverture des canaux de TME pour faire rentrer massivement des ions  $\text{K}^+$  et dépolarisent la cellule ciliée (jusqu'à -20 mV).

La dépolarisation déclenche la libération de neurotransmetteurs pour activer la décharge des neurones primaires. À l'inverse, la courbure des stéréocils dans le sens opposé au kinocil provoque une fermeture des canaux de TME et par conséquent une hyperpolarisation de la cellule ciliée (jusque  $-100$  mV), ce qui inhibe l'activité neuronale des afférences primaires (Hudspeth, 1989). L'activité des neurones afférents primaires est modulée par le sens de courbure des stéréocils et par conséquent par la direction de l'accélération linéaire ou angulaire de la tête (Figure 9).



**Figure 9 : Modulation de l'activation des cellules ciliées vestibulaires.**

À gauche, le déplacement des stéréocils vers le kinocil entraîne une ouverture des canaux de TME provoquant une entrée massive d'ions  $K^+$  et donc une dépolarisation de la cellule ciliée ( $-20$  mV). La dépolarisation provoque une libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique pour augmenter la décharge neuronale des afférences primaires (excitation). Au centre, la cellule ciliée non activée maintient une décharge électrique de base dans l'afférence primaire. Les 10-20 % de canaux de TME ouverts stabilisent le potentiel de repos de la cellule ciliée à  $-60$  mV. À droite, la courbure des stéréocils dans le sens inverse du kinocil entraîne la fermeture des canaux de TME provoquant ainsi une hyperpolarisation de la cellule ciliée ( $-100$  mV) ; ceci empêche la libération de neurotransmetteurs (inhibition) (schéma adapté de C. Chabbert « Anatomie et physiologie du vestibule » - 2015).

### 2.2.2. Types de cellules ciliées vestibulaires

Les épithéliums sensoriels vestibulaires sont composés de deux types de cellules ciliées bien distinctes morphologiquement et physiologiquement : les cellules ciliées de type I et les cellules ciliées de type II.

Ces deux types cellulaires se différencient en premier lieu par leur morphologie. Les cellules de type I sont piriformes avec une forme ronde qui s'étrécit au niveau de l'apex et un noyau en position centrale, tandis que les cellules de type II sont cylindriques, en forme de bâtonnet, avec un noyau en position basale (Figure 6.E-F).

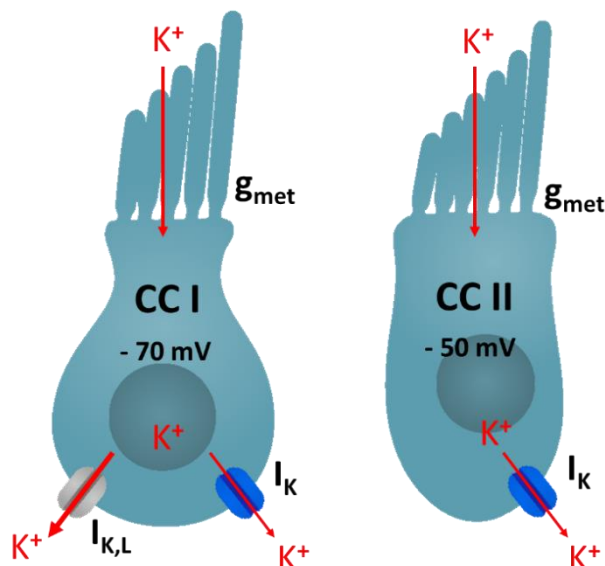
Les cellules ciliées de type I et II se distinguent aussi par leur innervation. Les cellules ciliées de type II sont innervées par des afférences de type bouton tandis que les cellules ciliées de type I sont innervées par des afférences de type calice qui entourent toute la partie basolatérale de la cellule (Figure 6.E-F).

La troisième différence majeure est la répartition de ces deux types cellulaires dans les neuroépithéliums vestibulaires. Les cellules ciliées de type I sont plus abondantes que les cellules ciliées de type II au niveau de la striola (bande centrale) des maculas et au niveau de la zone centrale des crêtes ampullaires, tandis que les cellules ciliées de type I et II sont en proportion égale dans les zones périphériques des crêtes ampullaires et les zones extrastriolaires des maculas (zone périphérique), (Desai *et al.*, 2005a, 2005b).

En plus d'avoir des caractéristiques morphologiques différentes, les cellules ciliées de type I et de type II présentent quelques nuances d'un point de vue physiologique. L'amplitude du potentiel de repos des cellules ciliées de type I est plus négative ( $\approx -70$  mV) que celle des cellules ciliées de type II ( $\approx -50$  mV) (Correia and Lang, 1990; Eatock *et al.*, 2002; Eatock and Songer, 2011; Rennie and Correia, 1994). Les deux types de cellules ciliées sont traversées par le même courant de transduction,  $g_{met}$ , au niveau des canaux de TME (Eatock *et al.*, 2002). Après l'entrée des ions potassiques dans la cellule ciliée, celle-ci se repolarise par des flux sortants de  $K^+$  à travers des canaux  $K^+$  rectifiants sensibles au voltage (Figure 10).

Les deux types de cellules ciliées expriment un courant de fuite  $I_K$  (courant potassique rectifiant retardé) qui est actif dès que le potentiel membranaire atteint  $-55$  mV. La différence de potentiel de repos entre les deux types de cellules ciliées s'explique par le fait que la cellule ciliée de type I exprime un courant de fuite supplémentaire,  $I_{K,L}$  (courant potassique rectifiant retardé à faible voltage), qui est actif jusqu'à un potentiel membranaire de  $-90$  mV (Correia and Lang, 1990; Eatock *et al.*, 2002; Rennie and Ashmore, 1991).

L'expression différentielle des courants potassiques rectifiants sortants a une conséquence sur le potentiel électrique de ces deux types de cellules ciliées et par conséquent une activité différente dans la transmission nerveuse (Eatock and Songer, 2011).



**Figure 10 : Principaux courants potassiques dans les cellules ciliées de type I et de type II.**

Le courant de transduction ( $g_{met}$ ) s'exprime à l'ouverture des canaux de TME. Le potentiel de repos des cellules ciliées de type I (CC I) est d'environ  $-70$  mV, tandis que celui des cellules ciliées de type II (CC II) est d'environ  $-50$  mV. Les deux types de CC expriment un courant potassique rectifiant retardé ( $I_K$ ) mais seules les CC I expriment un courant potassique rectifiant retardé à faible voltage ( $I_{K,L}$ ) (d'après Eatock *et al.*, 2002).

### 2.3. Cycle du potassium dans le récepteur vestibulaire

Comme décrit précédemment, la composition ionique de l'endolymphe baignant les touffes ciliaires joue un rôle crucial dans la physiologie des cellules sensorielles vestibulaires. Sa forte concentration en ions potassiques ( $K^+$ ) est l'élément clé de la transduction mécano-électrique. Contrairement aux autres liquides extra-cellulaires, l'endolymphe est fortement concentrée en ions  $K^+$  (115 à 140 mM) et faiblement en ions  $Na^+$  (15 à 65 mM). Seule la concentration en ions  $Cl^-$  est similaire à celle des autres liquides extra-cellulaires (110 à 150 mM) (Tableau 1).

Malgré les différences de composition chimique entre l'endolymphe et la périlymphe, le potentiel électrique transépithélial (ou endolymphatique) vestibulaire est proche de 0 mV ;  $1,8 \pm 4,4$  mV dans l'utricule et  $-2,8 \pm 3,9$  mV dans le saccule (Sellick *et al.*, 1972; Sellick and Johnstone, 1972).

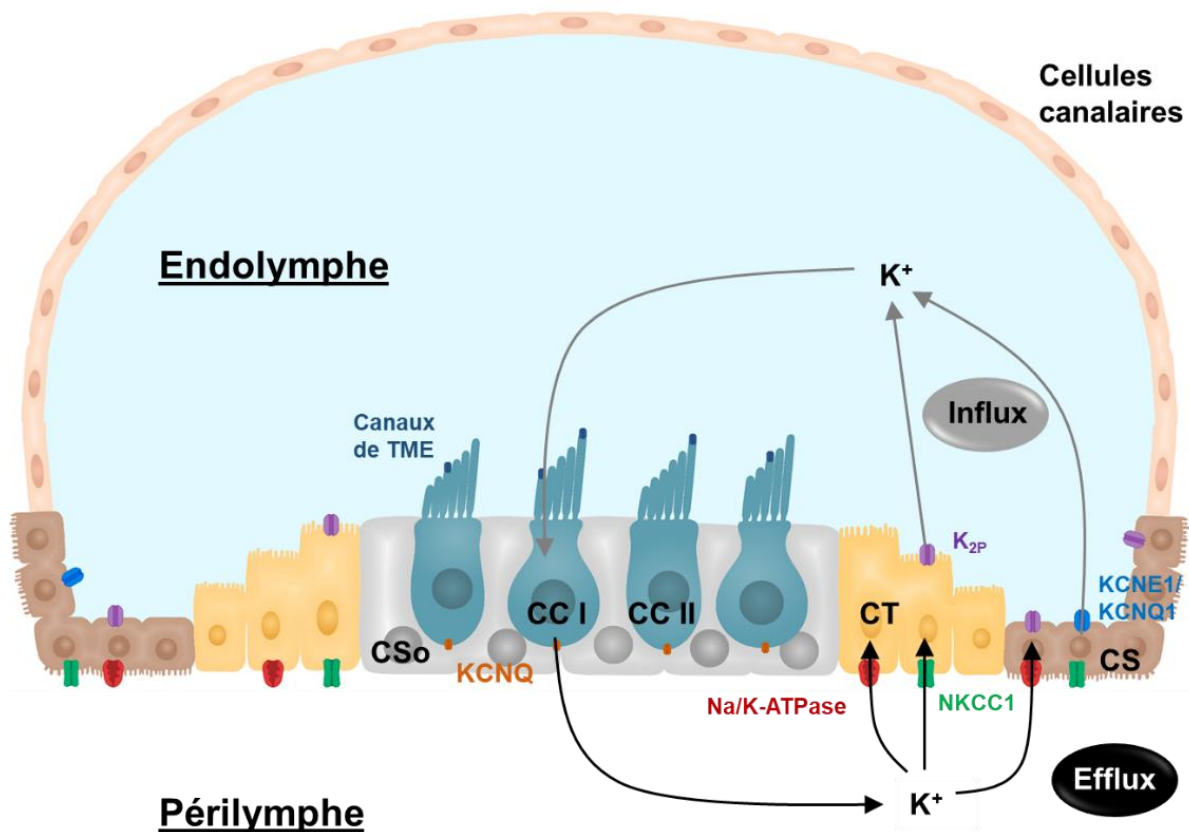
**Tableau 1** : Composition chimique des liquides extra-cellulaires de l'utricule (en mM).

Références	Animal adulte	Liquide	[K <sup>+</sup> ]	[Na <sup>+</sup> ]	[Cl <sup>-</sup> ]
Smith <i>et al.</i> , 1954	Cobaye	Endolymphe	144,4	15,8	107,1
		Périlymphe	4,8	150,3	121,5
		LCS	4,2	152	122,4
Citron and Exley, 1957	Cobaye	Endolymphe	142	26	110
		Périlymphe	5	148	120
		LCS	4	150	122
	Chat	Endolymphe	117	66	-
		Périlymphe	6	164	150
		LCS	5,9	162	150

La composition chimique particulière de l'endolymphe est maintenue par le cycle du potassium. Un équilibre entre les mécanismes d'absorption et de sécrétion de K<sup>+</sup> permet de maintenir une concentration potassique endolymphatique élevée (Figure 11). Globalement, les cellules sensorielles sont responsables des flux potassiques de l'endolymphe vers la périlymphe tandis que les cellules sécrétrices (cellules sombres et transitionnelles) sécrètent le K<sup>+</sup> dans le compartiment endolymphatique (voir revues : Ciuman, 2009; Ferrary and Sterkers, 1998; Lang *et al.*, 2007; Wangemann 1995, 2002b). Quant aux cellules canalaire, elles participent aussi au maintien de la composition chimique originale de l'endolymphe.

L'homéostasie de l'endolymphe est le résultat de mouvements ioniques (majoritairement K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>), permis par le fonctionnement de transporteurs membranaires, dans les différentes zones du récepteur vestibulaire.

Les principaux échanges d'ions de chaque cellule vestibulaire impliqués dans le cycle du potassium sont décrits dans les paragraphes suivants.



**Figure 11 : Cycle du potassium du récepteur vestibulaire.**

Le cycle du potassium résulte d'un équilibre entre les mécanismes d'absorption de K<sup>+</sup> par les cellules sensorielles (efflux de K<sup>+</sup>) et de sécrétion de K<sup>+</sup> dans l'endolymphe par les cellules sécrétrices (influx de K<sup>+</sup>). L'efflux potassique est assuré par les cellules ciliées vestibulaires (CC I et CC II) à travers les canaux de TME présents sur la partie apicale des stéréocils et les canaux KCNQ en position basolatérale. L'influx potassique est maintenu par la pompe Na/K-ATPase et le canal NKCC1 en position basolatérale et les canaux KCNE1/KCNQ1 et K<sub>2</sub>P au niveau apical des cellules sombres (CS) et transitionnelles (CT). Les cellules canaliculaires sont des cellules non sécrétrices et non sensorielles qui participent à l'homéostasie de la composition chimique de l'endolymphe.

### 2.3.1. Les mécanismes d'efflux potassique (endolymphe vers périlymphe) par les cellules sensorielles

En plus de leur rôle de récepteur sensoriel, les cellules ciliées participent activement au cycle du potassium. La circulation du K<sup>+</sup> commence à l'étape de transduction mécano-électrique où les ions potassiques rentrent dans la cellule ciliée. Ensuite, pour repolariser la cellule ciliée, les ions K<sup>+</sup> sont libérés dans la périlymphe *via* des canaux K<sup>+</sup> rectifiants sortants sensibles au voltage, présents au niveau basolatéral (Eatock *et al.*, 2002; Hurley *et al.*, 2006; Kharkovets *et al.*, 2000; Rennie *et al.*, 2001; Ricci *et al.*, 1996).



### 2.3.2. Les mécanismes d'influx potassique (pérylimphe vers endolymphe) par les cellules sécrétrices

Les cellules sombres et transitionnelles sont des cellules sécrétrices non sensorielles qui bordent l'épithélium sensoriel. Ces cellules secrètent du  $K^+$  de la pérylimphe jusque dans l'endolymphe (Marcus, 1986; Marcus and Marcus, 1987, 1985). La sécrétion potassique par les cellules sécrétrices varie en fonction de la concentration en  $K^+$  dans la pérylimphe. En effet, une augmentation de la concentration en  $K^+$  pérylimphatique augmente l'activité des cellules sécrétrices. Ce mécanisme de régulation permet de maintenir une faible concentration potassique dans le compartiment pérylimphatique (Marcus and Marcus, 1990; Valli *et al.*, 1990).

#### 2.3.2.1. Les cellules sombres

##### ○ Caractéristiques morphologiques

Les cellules sombres forment une monocouche cellulaire présente dans une zone adjacente à la macula des utricules et à la base des crêtes ampullaires (Coppens *et al.*, 2004). Les cellules sombres sont cubiques et sont séparées de la zone sensorielle par les cellules transitionnelles (Kawasaki *et al.*, 1992; Spicer *et al.*, 1990). Leur pôle basolatéral est fortement invaginé, traduisant une forte activité sécrétrice, avec peu de microvillosités au niveau apical (Kawasaki *et al.*, 1992). Ces invaginations sont moins prononcées dans les cellules sombres utriculaires que dans celles des ampoules (Pitovski and Kerr, 2002).

##### ○ Transports ioniques au niveau du pôle basolatéral

La pompe Na/K-ATPase est surtout présente au niveau du pôle basolatéral des cellules sombres (Fina and Ryan, 1994; Schulte and Steel, 1994).

Les sous-unités de la Na/K-ATPase les plus représentées au niveau des cellules sombres sont  $\alpha 1$  et  $\beta 2$  (McGuirt and Schulte, 1994; Ten Cate *et al.*, 1994). Le co-transporteur Na-K-Cl (NKCC1) se trouve également au niveau basal des cellules sombres (Crouch *et al.*, 1997; Delpire *et al.*, 1999; Young Choi *et al.*, 2005).

Le  $K^+$  périlymphatique est assimilé au niveau basolatéral de la cellule sombre par l'action de la Na/K-ATPase et de NKCC1 (Ferrary *et al.*, 1992; Marcus, 1996; Marcus *et al.*, 1994; Marcus and Shipley, 1994). La pompe Na/K-ATPase hydrolyse une molécule d'ATP pour permettre l'entrée de 2 ions  $K^+$  dans le cytosol et la sortie de 3 ions  $Na^+$  dans le compartiment extra-cellulaire contre leur gradient de concentration (Schwartz *et al.*, 1972). En augmentant la concentration extra-cellulaire d'ions sodiques, la Na/K-ATPase crée une force motrice nécessaire au transport par NKCC1 de 2 ions  $Cl^-$ , 1 ion  $Na^+$  et 1 ion  $K^+$  à l'intérieur de la cellule (Wangemann and Marcus, 1990). De ce fait, pour chaque molécule d'ATP hydrolysée par la Na/K-ATPase, 5 ions  $K^+$  sont assimilés par les cellules sombres (2 ions  $K^+$  par la Na/K-ATPase et 3 ions  $K^+$  par l'action des NKCC1) (Wangemann, 1995). L'ouabaïne, qui est un inhibiteur de la pompe Na/K-ATPase, et la bumétanide qui inhibe NKCC1, baissent la sécrétion de  $K^+$  transépithéliale (baisse de  $I_{SC}$ ) des cellules sombres et perturbent les concentrations ioniques endolymphatiques (Marcus *et al.*, 1994; Marcus and Shipley, 1994).

Une grande conductance  $Cl^-$  (95 pS) localisée au niveau basolatéral de la membrane des cellules sombres permet de relarguer dans la périlymphe les ions  $Cl^-$  apportés dans le cytosol à travers le NKCC1 (Marcus *et al.*, 1993; Wangemann and Marcus, 1992). Ce passage d'ions  $Cl^-$  vers le milieu intracellulaire est exécuté par des canaux ClC-K/barttine (ClC-K1 et ClC-K2) présents au niveau de la membrane basolatérale (Estévez *et al.*, 2001; Sage and Marcus, 2001).

L'importance des échanges ioniques de  $Cl^-$  des cellules sombres dans le cycle du potassium est illustrée par le syndrome de Bartter. En effet, une mutation du gène *BSND* codant pour la barttine entraîne une surdité profonde et des troubles vestibulaires (Fahlke and Fischer, 2010; Gradogna and Pusch, 2010; Rickheit *et al.*, 2008).

- Régulation des flux ioniques au niveau basolatéral

Les variations de la concentration potassique dans la périlymphe modulent la sécrétion de  $K^+$  transépithéliale.

Une augmentation de la concentration potassique au niveau basolatéral, de 3,6 à 25 mM, stimule la sécrétion de  $K^+$  transépithéliale ( $I_{sc}$ ) par l'action de NKCC1 ou de la Na/K-ATPase (Marcus *et al.*, 1994; Marcus and Shipley, 1994; Wangemann, 1995). Ces canaux régulent aussi le volume des cellules sombres lors de changements d'osmolarité (environnement hyper- ou hypotonique) (Shiga and Wangemann, 1995; Wangemann *et al.*, 1992; Wangemann and Shiga, 1994).

- Transports ioniques du pôle apical

Une fois dans le cytosol des cellules sombres, le  $K^+$  est sécrété dans l'endolymphe principalement à travers le canal KCNQ1/KCNE1 situé au niveau de la membrane apicale (Nicolas *et al.*, 2001). KCNQ1/KCNE1 est un canal potassique dépendant du voltage activé par la modification du potentiel membranaire des cellules sombres (Marcus and Shen, 1994; Shen *et al.*, 1995; Wangemann *et al.*, 1995b, 1996). Une dépolarisation active le canal KCNQ1/KCNE1 (augmentation du courant  $I_{KS}$ ) tandis qu'une hyperpolarisation le désactive. L'importance de ce canal dans le cycle du  $K^+$  est illustrée par le syndrome de Jervell et Lange-Nielsen où la mutation du gène *KCNQ1* peut entraîner des troubles vestibulaires (Casimiro *et al.*, 2001; Warth and Barhanin, 2002; Winbo and Rydberg, 2015).

D'autres canaux pourraient être impliqués dans l'homéostasie de l'endolymphe et la sécrétion de  $K^+$ . Les cellules sombres possèdent au niveau apical  $K_{2P}1.1$  (ou TWIK-1),  $K_{2P}2.1$  (ou TREK-1) et  $K_{2P}3.1$  (ou TASK-1) qui sont des canaux potassiques à deux pores (ou à pores tandem). Ce sont des canaux non inactivants et indépendants du potentiel membranaire qui pourraient participer à la sécrétion de  $K^+$  dans le compartiment endolympatique (Nicolas *et al.*, 2004, 2003; Popper *et al.*, 2008).

- Régulation des flux ioniques au niveau apical

Il existe un lien étroit entre l'assimilation du potassium au niveau basolatéral et la sécrétion de  $K^+$  au niveau apical. En effet, le blocage de NKCC1 par la bumétanide entraîne une baisse du courant  $I_{KS}$  au niveau apical, tandis qu'une élévation de la concentration potassique au niveau basolatéral entraîne une augmentation de ce courant (Marcus and Shen, 1994; Wangemann *et al.*, 1995b, 1996).

La concentration ionique endolymphatique joue donc un rôle de régulateur de la sécrétion de  $K^+$  au niveau apical. Une augmentation de la concentration en  $K^+$  au niveau apical entraîne une baisse du voltage transépithélial à travers la cellule sombre (Marcus *et al.*, 1994). La cellule sombre joue un rôle important dans le maintien d'une stabilité de la concentration potassique de l'endolymphe (Wangemann *et al.*, 1996).

Le pH cytosolique joue aussi un rôle dans la sécrétion du  $K^+$  au niveau apical. Une acidification du cytosol entraîne une activation du courant  $I_{KS}$ , tandis qu'une alcalinisation le baisse (Wangemann *et al.*, 1995c). La sécrétion du  $K^+$  dans le compartiment endolymphatique est aussi sous contrôle hormonal (Wangemann *et al.*, 1999)

La sécrétion de  $K^+$  peut aussi être régulée par des récepteurs purinergiques (Lee and Marcus, 2008; Liu *et al.*, 1995). La fixation d'une molécule d'ATP (Adénosine triphosphate) ou d'UTP (Uridine triphosphate) sur le récepteur P2Y<sub>4</sub> exprimé au niveau apical entraîne une baisse du courant  $I_{KS}$  en impliquant la phospholipase C (PLC) et la protéine kinase C (PKC) (Marcus *et al.*, 1997; Marcus and Scofield, 2001).

#### 2.3.2.2. Les cellules transitionnelles

Les cellules transitionnelles forment une monocouche cellulaire séparant la zone sensorielle des cellules sombres. Ces cellules de forme allongée sont localisées à la base des crêtes ampullaires et sont dans la continuité des maculas (Kawasaki *et al.*, 1992; Spicer *et al.*, 1990).

Comme dans les cellules sombres, les cellules transitionnelles expriment au niveau de leur pôle basolatéral la pompe Na/K-ATPase (McGuirt and Schulte, 1994; Schulte and Steel, 1994).

La pompe Na/K-ATPase est environ dix fois moins exprimée dans les cellules transitionnelles par rapport aux cellules sombres (Pitovski and Kerr, 2002). Il existe une conductance membranaire des ions  $K^+$  dominante, résultant probablement du fonctionnement de la pompe Na/K-ATPase (Wangemann and Marcus, 1989).

Même s'il n'existe pas d'information sur son fonctionnement dans les cellules transitionnelles, le co-transporteur NKCC1 est exprimé au niveau du pôle basolatéral des cellules transitionnelles (Young Choi *et al.*, 2005).

Au niveau apical, des canaux potassiques à deux pores existent :  $K_{2P}2.1$  (ou TREK-1) et  $K_{2P}3.1$  (ou TASK-1). Ces canaux pourraient participer au cycle du potassium et à la régulation du volume de l'endolymphe (Nicolas *et al.*, 2004; Popper *et al.*, 2008).

Les cellules transitionnelles ont un rôle important dans la sécrétion de  $K^+$  durant la formation du compartiment endolympatique. En dépit de l'imaturité des cellules sombres (expression immature de NKCC1), les cellules transitionnelles pourraient assister les cellules sombres en sécrétant le  $K^+$  dans le compartiment endolympatique. C'est seulement à des stades plus avancés du développement vestibulaire que les cellules transitionnelles ont un rôle d'absorption de cations du compartiment endolympatique pour protéger les cellules ciliées d'une sur-stimulation du labyrinthe vestibulaire (Bartolami *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2001).

### 2.3.3. Les cellules non sensorielles et non sécrétrices

Les cellules canalaire ne sont ni sensorielles, ni sécrétrices mais elles jouent un rôle très important dans l'électroneutralité de l'endolymphe. En effet, pour maintenir le potentiel transépithélial vestibulaire à une valeur proche de 0 mV, des charges négatives doivent être apportées dans l'endolymphe pour neutraliser les charges positives des ions potassiques sécrétées majoritairement par les cellules sombres.

Les cellules canalaire sécrètent des ions  $Cl^-$  par un canal chlorique au niveau apical, dont l'activité est modulée par des récepteurs adrénergiques  $\beta_2$  (Milhaud *et al.*, 2002). Les ions chlorures sont transportés dans la cytosol par l'action du co-transporteur NKCC (Pondugula *et al.*, 2013).

De plus, pour maintenir une faible concentration en ions  $\text{Na}^+$  et stabiliser l'électroneutralité de l'endolymphe, un canal sodique épithélial (ENaC : Epithelial  $\text{Na}^+$  channel) est présent au niveau apical des cellules canalaire (Kim and Marcus, 2011; Pondugula *et al.*, 2006, 2004). L'activité de la pompe Na/K-ATPase au niveau basal constitue la force motrice (par la sortie de 3  $\text{Na}^+$  dans la périlymphe) pour l'absorption électrogénique de  $\text{Na}^+$  au niveau du pôle apical (Kim and Marcus, 2009; Pondugula *et al.*, 2004).

#### 2.4. Similarités entre les récepteurs vestibulaires et auditifs

Localisés tous les deux dans l'oreille interne, les récepteurs auditif (ou cochlée) et vestibulaire ont de nombreuses caractéristiques en commun. Ils partagent la même circulation des liquides de l'oreille interne ; l'endolymphe riche en ions  $\text{K}^+$  et la périlymphe dont la composition chimique est proche de celle des liquides extracellulaires (Ferrary and Sterkers, 1998; Wangemann, 2002b).

Tout comme pour le récepteur vestibulaire, la cochlée est dotée de cellules sensorielles – trois rangées de cellules ciliées externes (CCE) et une de cellules ciliées internes (CCI) – permettant de traduire un signal mécanique (les vibrations sonores) en un influx électrique par le mécanisme de transduction mécano-électrique. Comme dans le labyrinthe vestibulaire, ce processus est dépendant de la concentration potassique de l'endolymphe maintenue élevée par des mécanismes de régulation du cycle du  $\text{K}^+$ .

Les vibrations sonores provoquent un mouvement des membranes tectoriale et basilaire, qui courbe les stéréocils des CCE et CCI pour ouvrir de manière mécanique les canaux de TME et déclencher le processus de transduction sensorielle par l'entrée d'ions  $\text{K}^+$  (Qiu and Müller, 2018).

Le potassium est excrété dans la périlymphe par des canaux  $\text{K}^+$  rectifiants sortants sensibles au voltage exprimés au niveau basolatéral des cellules ciliées (Wong *et al.*, 2004). Même si la composition moléculaire varie entre les cellules ciliées vestibulaires et cochléaires, le fonctionnement de ces cellules dans la TME et leur rôle dans le cycle du potassium restent comparables.

Pour maintenir une concentration endolymphatique élevée en ions  $K^+$ , les cellules de la strie vasculaire jouent un rôle crucial dans le cycle du potassium. Contrairement au potentiel électrique de l'endolymphe vestibulaire, qui est proche de 0 mV, le potentiel électrique de l'endolymphe cochléaire est de 80 mV chez les mammifères.

L'organisation cellulaire des systèmes sécréteurs (trois couches cellulaires dans la strie vasculaire et une monocouche cellulaire dans le vestibule) pourrait expliquer cet écart de potentiel endolymphatique entre ces deux récepteurs (Hibino *et al.*, 2010; Hibino and Kurachi, 2006). La strie vasculaire comprend des cellules basales, des cellules intermédiaires et des cellules marginales qui participent toutes les trois à la génération du potentiel endocochléaire élevé et au maintien de la composition chimique particulière de l'endolymphe. Il existe une très grande ressemblance d'un point de vue physiologique entre les cellules marginales cochléaires et les cellules sombres vestibulaires (Wangemann, 1995). Ces deux types cellulaires sont responsables de la sécrétion de  $K^+$  dans le compartiment endolymphatique par la présence de la pompe Na/K-ATPase et du co-transporteur NKCC1 au niveau basolatéral et du canal KCNQ1/KCNE1 au niveau apical (Liu *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1997; Wangemann *et al.*, 1995a).

### 3. Solvants aromatiques

#### 3.1. Généralités

Les solvants aromatiques, tels que le toluène, le styrène, l'éthylbenzène ou les xylènes, sont des agents chimiques très utilisés dans le milieu industriel. Ils sont présents dans de nombreux secteurs comme celui de l'automobile, du bâtiment ou de l'aéronautique. Ces substances chimiques peuvent être utilisées comme matières premières dans la fabrication de résine ou de produits pétroliers ou dans les activités utilisant les colles, les peintures, les dégraissants, les adhésifs, les encres d'imprimerie, les cosmétiques ou les nettoyants ménagers (Dick, 2006; Miller *et al.*, 1994).

En 2005, la consommation française de solvants aromatiques se situait aux alentours de 79000 tonnes par an, soit 14,4 % de la consommation mondiale. En France, les xylènes représentaient 43 % (soit 34 000 tonnes), le toluène 23 % (soit 18 000 tonnes) et l'éthylbenzène 4 % (soit 3200 tonnes) de la consommation des solvants aromatiques (*Fiche solvants ED 4226 – les hydrocarbures aromatiques, INRS*).

Le styrène est principalement utilisé pour la fabrication de matière plastique et de caoutchoucs (*Fiche toxicologique n°2 – styrène, INRS, 2019*). Le styrène est utilisé dans le secteur de l'automobile, dans la construction navale et aéronautique, son exposition la plus élevée étant située autour des postes de production de plastiques renforcés de fibres de verre (Miller *et al.*, 1994). Le toluène peut être un intermédiaire de synthèse pour la fabrication de nombreux produits (benzène, xylènes, phénol, ...) et comme constituants des peintures, vernis, encres d'imprimerie, colles. Il peut aussi être utilisé comme solvant d'extraction dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique (*Fiche toxicologique n°74 – toluène, INRS, 2012*). Il est principalement présent dans les usines du secteur de la peinture et des encres (Hoet and Lison, 2008). Le xylène technique est un solvant très utilisé dans la fabrication de peintures, vernis, colles et encres d'imprimerie, dans la préparation d'insecticides et de matières colorantes, dans l'industrie du caoutchouc et dans l'industrie pharmaceutique (*Fiche toxicologique n°77 – les xylènes, INRS, 2009*).

Le xylène technique est un mélange qui contient des pourcentages variables des trois isomères du xylène – ortho-xylène (*o*-xylène), para-xylène (*p*-xylène) et méta-xylène (*m*-xylène) – et d'éthylbenzène.

En raison de leur forte volatilité, les solvants aromatiques sont principalement absorbés par les voies respiratoires. Ils deviennent volatils à température ambiante et les expositions professionnelles se produisent bien plus souvent par inhalation de vapeurs de solvants que par pénétration cutanée (Dick, 2006). Leur propriété lipophile favorise leur accumulation dans les tissus riches en lipides comme le SNC par exemple.



### 3.2. Effets des solvants aromatiques sur l'audition et l'équilibre

Une exposition chronique aux solvants aromatiques peut entraîner des effets néfastes sur l'audition et l'équilibre (Hodgkinson and Prasher, 2006). En effet, des élévations du seuil auditif ont été enregistrées chez des travailleurs du secteur industriel exposés aux solvants aromatiques (Sułkowski *et al.*, 2002; Unlu *et al.*, 2014; Vyskocil *et al.*, 2012). Des expositions chroniques à ces agents chimiques ont montré des modifications des performances posturales et des réflexes vestibulaires chez des professionnels du secteur industriel (Aylott and Prasher, 2002; Iwata *et al.*, 2005; Niklasson *et al.*, 1997).

De nombreuses études expérimentales avec des modèles animaux exposés aux solvants aromatiques ont permis de montrer que les pertes auditives étaient associées à des dommages cochléaires (Campo and Maguin, 2007; Cappaert *et al.*, 2000; Loquet *et al.*, 1999; Maguin *et al.*, 2006). Une exposition chronique aux solvants aromatiques peut avoir des effets néfastes sur l'intégration sensori-motrice de la stabilité posturale et sur les voies vestibulaires (Aylott and Prasher, 2002; Niklasson *et al.*, 1997). Bien que leurs effets neurotoxiques soient bien connus et qu'ils aient une influence sur le système vestibulaire, il n'existe à ce jour aucune donnée bibliographique de leurs effets toxiques sur le labyrinthe vestibulaire de l'oreille interne (Gans *et al.*, 2019; Hodgkinson and Prasher, 2006).

En revanche, la cochléotoxicité de certains solvants aromatiques, ainsi que leur mécanisme ototoxique, sont largement documentés chez l'animal.

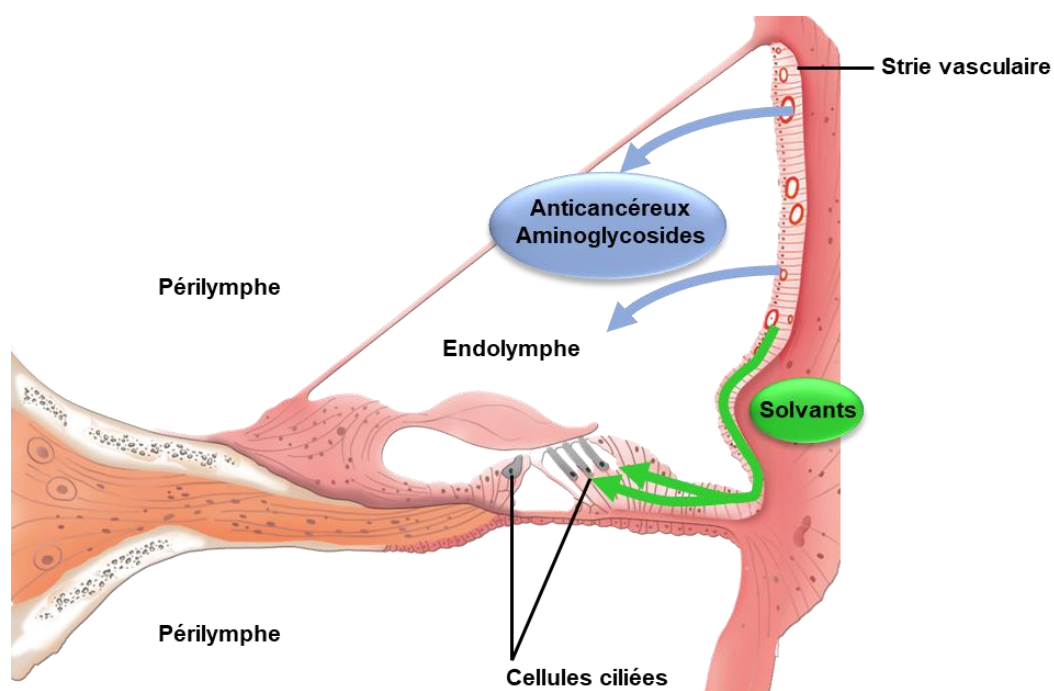
#### 3.2.1. Cochléotoxicité des solvants aromatiques

##### 3.2.1.1. Mécanismes cochléotoxiques

Des mesures électrophysiologiques réalisées sur des rongeurs exposés aux vapeurs de solvants ont montré des troubles auditifs corrélés à une perte de cellules ciliées externes (CCE) dépendante de la dose de solvants (Cappaert *et al.*, 2000; Loquet *et al.*, 1999; Maguin *et al.*, 2006).

Bien que le mécanisme précis conduisant à la mort cellulaire des CCE après une exposition aux solvants aromatiques ne soit pas totalement compris, ces agents chimiques atteignent ces cellules en traversant les tissus cochléaires plutôt que la voie endolympatique (Campo *et al.*, 2001, 1999; Fetoni *et al.*, 2016). Contrairement aux molécules hydrophiles, comme les aminoglycosides qui atteignent les CCE à partir de l'endolymphe (Li and Steyger, 2011), les solvants aromatiques lipophiles gagnent les cellules sensorielles en empruntant le sulcus externe (Figure 12).

Il a été démontré que les cellules de soutien, comme les cellules de Deiters et de Hensen, étaient plus vulnérables que les cellules sensorielles après une exposition aux vapeurs de styrène (Campo *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2007; Fetoni *et al.*, 2016). Les pertes de CCE s'étendent de la troisième vers la première rangée de CCE (Campo *et al.*, 1997). Ces données histopathologiques sont dues à la progression du solvant dans la cochlée (Campo and Maguin, 2007; Hoet and Lison, 2008). En plus de cette voie d'intoxication, il existe aussi un second trajet des solvants passant par le ganglion spiral (Lataye *et al.*, 2001).



**Figure 12 : Voies d'intoxication dans la cochlée de différentes substances.**

Les aminoglycosides et les anticancéreux sont des substances hydrophiles qui atteignent les cellules sensorielles en traversant la barrière hémato-labyrinthique pour circuler dans l'endolymphe. A l'inverse, les solvants aromatiques lipophiles traversent les tissus riches en lipides du sulcus externe pour atteindre les cellules ciliées (d'après Campo *et al.*, 2013a)

Bien que le mécanisme de mort cellulaire des cellules ciliées cochléaires induit par les solvants aromatiques ne soit pas encore bien établi, il existe plusieurs scénarii.

- Les solvants aromatiques entraînent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui engendreraient la peroxydation lipidique de la membrane des cellules ciliées externes. L'oxydation des lipides des CCE provoquerait des perturbations de la membrane plasmique pouvant induire la mort cellulaire (Campo and Maguin, 2007; Fetoni *et al.*, 2016).
- Les cellules de Deiters jouent un rôle déterminant dans la recirculation du K<sup>+</sup> (Hibino and Kurachi, 2006; Spicer and Schulte, 1998) et leur altération par les solvants aromatiques pourraient entraîner une accumulation de potassium dans la périlymphe et par conséquent empoisonner les cellules ciliées externes (Campo and Maguin, 2007; Chen *et al.*, 2007; Fetoni *et al.*, 2016).

La plupart des études menées sur des modèles animaux exposés aux vapeurs de styrène ont montré que l'apoptose induite par les solvants aromatiques est la voie de mort cellulaire majoritaire des cellules cochléaires (Chen *et al.*, 2008, 2007; Chen and Henderson, 2009; Yang *et al.*, 2009).

#### 3.2.1.2. Cochléotoxicité du styrène

Nies (2012) a montré que le styrène avait des effets ototoxiques chez l'Homme. De nombreuses études sur des travailleurs du secteur industriel (construction navale, fabrication de fibres de verre, usines de plastique...) montrent qu'une exposition professionnelle au styrène peut entraîner des pertes auditives. Les expositions professionnelles au styrène relevées dans certaines études épidémiologiques sont comprises entre 15 et 600 ppm.

Les expérimentations avec des rongeurs exposés au styrène ont permis de décrire les mécanismes ototoxiques des solvants aromatiques. Les premières études expérimentales démontrant les effets du styrène sur l'audition étaient réalisées avec des rongeurs exposés de manière subchronique aux vapeurs de styrène.

Les pertes auditives étaient évaluées avec des tests comportementaux (tests d'évitement) et des enregistrements électrophysiologiques (potentiel auditif évoqué au niveau de la cochlée ou du cortex cérébral) (Fechter, 1993; Pryor *et al.*, 1987; Rebert *et al.*, 1993). Les analyses histologiques associées aux enregistrements électrophysiologiques ont, par la suite, permis de mieux comprendre les mécanismes ototoxiques du styrène. Les effets cochléotoxiques ont été reportés dans de nombreuses études (Campo *et al.*, 1999, 2001; Loquet *et al.*, 1999, 2000; Mäkitie *et al.*, 2002). Bien que les pertes de CCE soient spécifiques de l'effet cochléotoxique du styrène, les cellules du ganglion spiral semblent aussi être endommagées lorsque les doses sont très élevées (Lataye *et al.*, 2001). Loquet *et al.* (1999) rapporte une dose minimale entraînant un effet nocif observé (*LOAEL : lowest observed adverse effect level*) de 650 ppm et Mäkitie *et al.* (2002) de 600 ppm chez les rats après une exposition chronique au styrène. En plus d'entraîner des pertes auditives irréversibles, le processus toxique du styrène persiste même après la fin de l'exposition (Campo *et al.*, 2001; Nylén and Hagman, 1994).

Les données obtenues après exposition au styrène ont permis de décrire les mécanismes cochléotoxiques des solvants aromatiques (voir section précédente). Le modèle animal utilisé pour évaluer les effets cochléotoxiques du styrène est un facteur déterminant à prendre en compte car les effets de ce solvant dépendent de l'espèce. Les pertes auditives provoquées par le styrène sont bien plus prononcées chez le rat que chez le cobaye (Fechter, 1993; Lataye *et al.*, 2003). Les études expérimentales ont aussi permis de mettre en évidence qu'une co-exposition bruit / styrène provoquait une synergie des effets et pas seulement une simple addition des conséquences du bruit seul ou du styrène seul (Campo *et al.*, 2005; Lataye *et al.*, 2000; Mäkitie *et al.*, 2003; Pouyatos *et al.*, 2005, 2004).

### 3.2.1.3. Cochléotoxicité du toluène

Le toluène perturbe la fonction auditive chez l'Homme, il est considéré aujourd'hui comme un agent ototoxique (Nies, 2012). La majorité des études démontrant les effets du toluène sur le système auditif a été réalisée avec des travailleurs du secteur industriel dans le domaine de la peinture et de l'impression. Des mesures du potentiel auditif évoqué ou d'audiométrie tonale ont permis de mettre en évidence des pertes auditives après une exposition au toluène seul, mélangé avec d'autres solvants aromatiques ou combiné au bruit (Abbate *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 2006; Hughes and Hunting, 2013; Morata *et al.*, 1993).

Les études avec des modèles animaux ont permis de mieux comprendre les effets cochléotoxiques du toluène. De la même manière que pour les expérimentations avec le styrène, les mesures de potentiels auditifs évoqués et produits de distorsion acoustique, associées aux analyses histologiques de la cochlée, montrent que le toluène provoque des troubles auditifs permanents et induit des pertes de CCE au niveau de la 3<sup>ème</sup> rangée (Campo *et al.*, 1997; Johnson and Canlon, 1994; Sullivan *et al.*, 1988). Les effets toxiques du toluène sur la cochlée sont aussi progressifs et continuent même après la fin de l'exposition (Johnson and Canlon, 1994).

Des mesures de potentiels auditifs évoqués et des analyses morphologiques de l'organe de Corti ont montré que le styrène est 2,4 fois plus cochléotoxique que le toluène après exposition par inhalation dans les mêmes conditions expérimentales (Loquet *et al.*, 1999). Des traitements modifiant le métabolisme hépatique indiquent que le toluène est plus ototoxique que ses métabolites (Campo *et al.*, 2008; Waniusiow *et al.*, 2008).

En plus de son effet cochléotoxique, le toluène entraîne des modifications des réflexes acoustiques (réflexes de l'oreille moyenne et interne) perturbant ainsi le système auditif en réponse au bruit (Campo *et al.*, 2013b; Rumeau *et al.*, 2011; Venet *et al.*, 2011).

Les études avec les rongeurs ont démontré qu'une co-exposition bruit / toluène provoque un effet synergique de ces deux expositions sur le système auditif (Brandt-Lassen *et al.*, 2000; Lund and Kristiansen, 2008).

#### 3.2.1.4. Cochléotoxicité des xylènes

Avant les années 2000, des résultats de mesures électrophysiologiques, telles que des mesures de potentiels évoqués auditifs du cortex cérébral, et de tests comportementaux comme des tests de condition d'évitement ont montré des pertes de la fonction auditive après exposition de rongeurs à des vapeurs de xylènes mélangés (Crofton *et al.*, 1994; Nylén and Hagman, 1994; Pryor *et al.*, 1987).

Par la suite, l'évaluation du potentiel ototoxique de chaque isomère du xylène (*o*-xylène, *p*-xylène et *m*-xylène) par des analyses histologiques des cellules cochléaires et des mesures électrophysiologiques de la fonction auditive d'animaux exposés aux vapeurs d'*o*-xylène, de *p*-xylène ou de *m*-xylène a montré que le *p*-xylène était plus ototoxique que les deux autres isomères (Gagnaire *et al.*, 2001, 2007a, 2007b; Maguin *et al.*, 2006). Ces études ont permis de souligner que l'ototoxicité est dépendante de la structure du solvant aromatique.

Quelques études menées sur des salariés du secteur industriel exposés durant une longue période aux vapeurs de certains solvants aromatiques ont montré que les xylènes engendraient des troubles de l'audition (Sliwinska-Kowalska *et al.*, 2005; Unlu *et al.*, 2014).

### 3.2.1.5. Cochléotoxicité de l'éthylbenzène

Bien qu'il n'existe aucune donnée portant sur les effets de l'éthylbenzène sur la fonction auditive chez l'Homme, de nombreuses études expérimentales menées avec des rongeurs ont permis de mettre en avant le caractère ototoxique de ce solvant (Vyskocil *et al.*, 2008). Les résultats de mesures électrophysiologiques et d'analyses histologiques ont montré que l'éthylbenzène augmentait le seuil auditif et engendrait une perte de CCE (Cappaert *et al.*, 1999, 2000, 2001, , , 2002; Fechter *et al.*, 2007). D'autres études ont montré que l'éthylbenzène était l'un des solvants les plus cochléotoxiques avec un *LOAEL* situé entre 200 et 400 ppm pour des temps d'exposition entre 1 et 4 semaines (Cappaert *et al.*, 2001; Gagnaire *et al.*, 2007; Gagnaire and Langlais, 2005).

### 3.2.1.6. Comparaison des effets cochléotoxiques des différents solvants aromatiques

Les sections précédentes décrivent les effets cochléotoxiques de différents solvants aromatiques utilisés dans le secteur industriel. D'une manière générale, les expérimentations animales montrent que l'ototoxicité des solvants aromatiques se manifeste par des troubles auditifs permanents et une perte de CCE. Dans de nombreuses études, les animaux étaient exposés à différentes concentrations d'un solvant spécifique pour pouvoir déterminer son *LOAEL* (Tableau 2).

**Tableau 2** : LOAEL des différents solvants aromatiques

Solvant	LOAEL		Référence
	Mesures fonctionnelles	Analyses histologiques	
<b>Styrène</b>	600 ppm (animaux actifs)	400 ppm (animaux actifs)	Campo <i>et al.</i> , 2005
	800 ppm (animaux sédentaires)	650 ppm (animaux sédentaires)	
	600 ppm	600 ppm	Mäkitie <i>et al.</i> , 2002
	750 ppm	650 ppm	Pouyatos <i>et al.</i> , 2002
	850 ppm	650 ppm	Loquet <i>et al.</i> , 1999
<b>Toluène</b>	1000 ppm	-	Pryor <i>et al.</i> , 1984
	1200 ppm	-	Pryor and Rebert, 1992
	1000 ppm	-	Nylén & Hagman, 1994
	1500 ppm	1250 ppm	Campo <i>et al.</i> , 1997
	1500 ppm	1500 ppm	Loquet <i>et al.</i> , 1999
<b>Ethylbenzène</b>	400 ppm	400 ppm	Cappaert <i>et al.</i> , 2000
<b>p-Xylène</b>	1800 ppm	900 ppm	Gagnaire <i>et al.</i> , 2001

Il est difficile d'évaluer le degré de cochléotoxicité des solvants aromatiques en comparant les LOAEL. En effet, les temps d'exposition sont différents selon les études (exposition de 5 jours à 9 semaines et de 6 à 12h / jour), le modèle animal utilisé n'est pas toujours le même et les méthodes utilisées pour évaluer la cochléotoxicité ne sont pas toujours identiques.

Néanmoins, les données relevées dans le [tableau 2](#) indiquent que les analyses histopathologiques sont plus sensibles que les pertes auditives enregistrées par des moyens électrophysiologiques. Ce constat avait déjà été observé par Gagnaire *et al.*, 2001. Une étude comparative, basée sur le niveau de pertes des CCE dans l'organe de Corti, a permis de classer les solvants aromatiques selon leur degré de cochléotoxicité (Gagnaire and Langlais, 2005). Parmi les six solvants aromatiques précédemment décrits, le styrène et l'éthylbenzène sont les plus cochléotoxiques, le toluène et le *p*-xylène provoquent une cochléotoxicité modérée, tandis que le *m*-xylène et l'*o*-xylène ne sont pas cochléotoxiques aux doses testées.



### 3.2.2. Neurotoxicité des solvants aromatiques

#### 3.2.2.1. Effets du styrène et du toluène

Les effets du toluène et du styrène sur le système vestibulaire ont été moins étudiés que leurs effets sur le système auditif. Bien que certaines études aient mis en évidence que le toluène et le styrène impactaient les fonctions vestibulaires, leurs effets seraient plutôt neurotoxiques qu'ototoxiques. À ce jour, aucune étude n'a montré les effets des solvants aromatiques sur le labyrinthe vestibulaire (Hodgkinson and Prasher, 2006).

Les différentes études mettant en exergue les effets du toluène ou du styrène sur le système vestibulaire ont été reportées dans le [tableau 3](#).

- Études expérimentales : effets du toluène sur le système vestibulaire

L'impact du toluène sur le système vestibulaire a largement été étudié chez l'animal depuis les années 70-80 pour comprendre son mécanisme d'action. La plupart des expérimentations ont été pratiquées sur des rongeurs et des enregistrements des mouvements des yeux, par électronystagmographie (ENG) ou électrooculographie (EOG), ont été réalisés après stimulation du système vestibulaire, visuel, ou les deux en même temps, pour évaluer les effets du toluène sur le système vestibulaire. La plupart des études ont montré que le toluène avait un effet sur le système vestibulaire et optocinétique après une courte exposition (Larsby *et al.*, 1986; Niklasson *et al.*, 1993; Tham *et al.*, 1990). Seule l'étude de Nylén *et al.* (1991) a montré un effet similaire des solvants aromatiques sur le système vestibulaire après une exposition longue de 11 semaines. Deux études ont mis en évidence que le toluène perturbe les fonctions vestibulaires en agissant sur des récepteurs GABA (Niklasson *et al.*, 1995; Tham *et al.*, 1990).

Bien que le mécanisme précis ne soit pas connu, plusieurs auteurs suggèrent que ce solvant pourrait avoir une action sur le cervelet (Larsby *et al.*, 1986; Niklasson *et al.*, 1993; Nylén *et al.*, 1991; Tham *et al.*, 1984). Des expérimentations *in vitro* sur des tranches du tronc cérébral de rats ont démontré que le toluène perturbait l'activité électrique des neurones du noyau vestibulaire médian (Magnusson *et al.*, 1998).

- Études sur l'Homme : effets du toluène sur le système vestibulaire

Les troubles de l'équilibre induits par le toluène sont considérés comme une manifestation précoce d'un effet neurotoxique. Même si ces effets sur les fonctions d'équilibration ont largement été montrés chez l'Homme, l'impact du toluène sur le système vestibulaire a, quant à lui, été beaucoup moins étudié (Morata *et al.*, 1995).

Des enregistrements du mouvement des yeux par ENG, ou EOG, après différentes stimulations du système vestibulo-oculomoteur de volontaires sains exposés entre 100 et 150 ppm de toluène ont permis de mettre en évidence un dysfonctionnement du RVO.

Les effets perturbateurs du toluène sur le système vestibulo-oculomoteur pourraient être la conséquence d'une action du toluène sur le tronc cérébral ou le cervelet (Hydén *et al.*, 1983; Odkvist *et al.*, 1983).

Des tests de posturographie et des enregistrements des mouvements des yeux après différentes stimulations ont mis en avant des troubles de l'équilibre et un contrôle du regard moins performant chez des employés exposés aux solvants aromatiques sur leur lieu de travail (Herpin *et al.*, 2008, 2009). Ces travailleurs étaient exposés principalement à des mélanges toluène / éthanol (Herpin *et al.*, 2008) et toluène / *n*-hexane (Herpin *et al.*, 2009) à des niveaux de toluène allant de 8 à 27 ppm. Ces études suggèrent que le toluène peut impacter les fonctions vestibulaires impliquées dans le contrôle postural.

D'autres études ont montré qu'une exposition à un mélange de solvants organiques volatils, dont le toluène, pouvait avoir des effets neurotoxiques et altérer les fonctions vestibulaires (Arlie-Søborg *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1997; Zamyslowska-Szmytko *et al.*, 2011a).

- Études expérimentales : effets du styrène sur le système vestibulaire

Les effets du styrène sur le système vestibulaire ont été étudiés essentiellement chez le lapin et le rat. La fonction vestibulaire était évaluée avec des enregistrements ENG après différents types de stimulations du système vestibulo-oculomoteur.

Toutes ces études ont mis en avant les effets néfastes du styrène sur les voies centrales du système vestibulaire et évoquent un impact possible de ce solvant sur le cervelet.

D'une manière générale, les expérimentations avec des modèles animaux montrent que le styrène entraîne les mêmes effets que le toluène sur le système vestibulaire (Niklasson *et al.*, 1993; Odkvist *et al.*, 1979; Tham *et al.*, 1982, 1984).

- Études sur l'Homme : effets du styrène sur le système vestibulaire

En plus de leurs effets neurotoxiques bien décrits chez les humains (Bergamaschi *et al.*, 1997; Kishi *et al.*, 2000), plusieurs études chez l'Homme indiquent que le styrène a un effet néfaste sur l'équilibre (Hodgkinson and Prasher, 2006).

Des troubles du RVO ont été mis en évidence chez des sujets sains exposés aux vapeurs de styrène (80 à 140 ppm durant 1 h) par des enregistrements ENG. Les auteurs de ces études suggéraient que le styrène pourrait avoir un impact sur le cervelet, modifiant ainsi le RVO (Hydén *et al.*, 1983; Odkvist *et al.*, 1983).

Des études de la posture statique et dynamique, destinées à évaluer le RVS, montrent qu'une exposition professionnelle au styrène peut entraîner des dysfonctionnements vestibulaires (Calabrese *et al.*, 1996; Ledin *et al.*, 1989; Möller *et al.*, 1990; Toppila *et al.*, 2006; Zamyslowska-Szmytke *et al.*, 2011b). Des enregistrements des mouvements des yeux après différentes stimulations (tests caloriques, rotationnels, de poursuite lente, de suppression visuelle,...) réalisés sur des travailleurs du secteur industriel, ont démontré que le styrène entraîne des troubles du système-oculomoteur probablement par une atteinte du cervelet ou du tronc cérébral (Ledin *et al.*, 1989; Möller *et al.*, 1990). Dans l'ensemble, le styrène provoque des dysfonctionnements vestibulaires se traduisant par des effets perturbateurs du RVO et du RVS.

Les études chez l'Homme relatant les effets délétères du styrène sur le système vestibulaire suggèrent que le styrène pourrait avoir un effet central et périphérique mais ne permettent pas d'identifier clairement son mécanisme d'action (Calabrese *et al.*, 1996).

Comme pour le toluène, des expositions à un mélange de différents solvants aromatiques, comprenant le styrène, peuvent altérer la fonction vestibulaire (Sułkowski *et al.*, 2002).

Tableau 3 : Effets du toluène et du styrène sur le système vestibulaire chez les humains et les animaux

TOLUENE						
Etudes expérimentales						
Auteurs et al	Modèle	Exposition	But de l'étude	Méthodes	Résultats	Conclusion
<b>Tham 1982</b>	Rats SP	Injection IV avec un débit de 1,73 à 5,77 mg/kg/min	Evaluer l'effet du toluène sur le syst. vestibulaire (étude comparative)	ENG après un test rotatoire ( $10^\circ/\text{sec}^2$ - 1 min) toutes les 5 min après injection	Prolongation de la durée du nystagmus en réponse au mouvements rotationnels à partir de 75 ppm de toluène dans le sang	Le toluène entraîne des perturbations vestibulaires
<b>Tham 1984</b>	Rats SP	Injection IV d'une solution de 0,1 à 10 % avec un débit de 32 $\mu\text{l}/\text{min}$	Etudier l'effet du toluène sur le RVO (étude comparative)	ENG après un test rotatoire ( $10^\circ/\text{sec}^2$ - 1 min) toutes les 5 min après l'injection	Prolongation de la durée du nystagmus en réponse aux mouvements rotationnels) à partir de 0,9 mM de toluène dans le sang	Rôle excitateur du toluène sur le RVO. Possibilité d'une inhibition de la modulation cérébelleuse
<b>Larsby 1986</b>	Rats DA-HAN	1500 ppm de toluène 10 à 50 min	Etudier l'effet d'une exposition courte de toluène sur les systèmes vestibulo-oculomoteur et optocinétique	EOG après stimulation des systèmes vestibulo- et optocinétique	Prolongation du nystagmus post-rotatoire, augmentation de la vitesse du gain, baisse du SPV	L'exposition aiguë au toluène induit des perturbations des systèmes vestibulo-oculomoteur et optocinétique pouvant être associées à un impact sur le cervelet
<b>Tham 1990</b>	Rats DA-HAN	Vapeurs de toluène 1000 ppm de toluène 30 min	Evaluer les effets d'agonistes des récepteurs GABA du toluène sur les systèmes vestibulo-oculomoteur et optocinétique	EOG après stimulation des systèmes vestibulo- et optocinétique	Prolongation du nystagmus après stimulation des systèmes vestibulo- et opto-oculomoteur Abolition de ces effets lors de traitements avec agonistes des récepteurs GABA	Le toluène perturbe les systèmes vestibulo-oculomoteur et optocinétique et pourrait exercer son action sur des récepteurs GABA

<b>Nylén 1991</b>	Rats DA- HAN	1000 ppm de toluène 6 à 11 sem (21h / j ; 7 j / sem)	Evaluer l'effet d'une exposition chronique de toluène sur les systèmes vestibulo- oculomoteur et optocinétique	EOG après stimulation des systèmes vestibulo- et optocinétique: test rotatoire, oscillation sinusoïdale, oscillation randomisée, stimulation opto-cinétique	↘ du gain après stimulation vestibulaire (oscillations sinusoïdale et randomisée) Pas d'effet avec le test rotatoire	L'exposition chronique au toluène entraîne des perturbations centrales de la fonction vestibulaire probablement par un impact sur le cervelet Pas d'effet sur le syst. vestibulaire périphérique
<b>Niklasson 1993</b>	Rats pigmentés	1000 à 5000 ppm de toluène 10 à 60 min	Evaluer l'effet du toluène sur les systèmes vestibulo- oculomoteur et optocinétique (étude comparative)	Enregistrement du mouvement horizontal des yeux après stimulation des systèmes vestibulo- et optocinétique: stimulation opto-cinétique, stimulation vestibulaire et stimulation vestibulo-opto-cinétique	↘ du gain après stimulation opto- cinétique et ↗ de la durée du nystagmus (en réponse aux mouvements rotationnels) de manière dose-réponse	Le toluène a un effet sur les systèmes vestibulo- oculomoteur et optocinétique et pourrait avoir un impact sur le circuit cérébelleux-vestibulaire
<b>Niklasson 1995</b>	Rats DA- HAN	2220 ppm de toluène 15 à 40 min	Evaluer les effets du toluène sur les systèmes vestibulo- oculomoteur et optocinétique et comprendre son mécanisme (implication ou non de récepteurs GABA <sub>B</sub> )	Enregistrement des mouvements des yeux après stimulation des systèmes vestibulo- et optocinétique : stimulation opto-cinétique, stimulation vestibulaire et stimulation vestibulo-opto-cinétique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prolongation du nystagmus après stimulation vestibulaire</li> <li>↗ du SPV après stimulation vestibulo-opto-cinétique</li> <li>• ↘ du gain après stimulation optocinétique</li> </ul> Abolition des effets du toluène après stimulation vestibulaire lors de traitement avec des antagonistes du récepteur GABA <sub>B</sub>	L'exposition aiguë du toluène entraîne des perturbations des systèmes vestibulo-oculomoteur et optocinétique via une action sur les récepteurs GABA <sub>B</sub>

<b>Magnusson 1998</b>	Partie dorsale du TC de rats SP	0,55 ; 1,1 ; 1,8 ; 2,8 et 5,5 mM directement dans le milieu de culture 1 à 2 min	Etudier l'effet du toluène sur les propriétés électriques membranaires des neurones du noyau vestibulaire médian <i>in vitro</i>	Enregistrement extra-cellulaire des potentiels d'action par « patch-clamp » de la cellule entière des neurones du NVM	↘ dose-réponse de l'activité électrique membranaire	Le toluène inhibe de façon réversible l'activité électrique membranaire des neurones du noyau vestibulaire médian. Le toluène pourrait modifier la fluidité membranaire et perturber certains canaux ioniques
<b>Pascual 2004</b>	Rats SP	Injection IP de 1,3 ml/Kg de toluène par jour durant 5 jours consécutifs	Analyser l'expression de p75 <sup>NTR</sup> dans différentes zones du tronc cérébral après exposition au toluène	Analyses immuno-histochimiques de p75 <sup>NTR</sup> dans différentes zones du tronc cérébral	↗ de l'expression de p75 <sup>NTR</sup> dans le noyau vestibulaire	La voie du p75 <sup>NTR</sup> pourrait être impliquée dans la perturbation du système vestibulaire par le toluène

## Etudes sur l'Homme

<b>Hydén 1983</b>	15 volontaires sains	103 à 148 ppm de toluène durant 70 min	Analyser les effets d'une exposition de toluène sur les fonctions vestibulo-oculomotrices	EOG après stimulation du système vestibulo-oculomoteur : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Test de suppression visuelle</li> <li>• Etude des saccades oculaires</li> <li>• Test optocinétique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↗ du gain au test de suppression visuelle</li> <li>• ↗ de la vitesse des saccades</li> </ul>	Le toluène entraîne des troubles du système vestibulo-oculomoteur via une action sur le tronc cérébral ou le cervelet
<b>Odkvist 1983</b>	15 volontaires sains	104 à 152 ppm de toluène durant 1 h	Evaluer les troubles vestibulaires et oculomoteurs après une exposition au toluène (étude comparative)	ENG après stimulation (oscillations sinusoïdales) dans le noir ou à la lumière, test de poursuite visuelle, test optocinétique, test des saccades et test de suppression visuelle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• de la vitesse des saccades</li> <li>• ↗ du gain au test de suppression visuelle</li> </ul>	Le toluène a une influence sur le circuit du RVO via une action sur le cervelet

STYRENE						
Etudes expérimentales						
<b>Larsby 1978</b>	Lapins	Injection IV avec un débit de 3,1 à 12,6 mg/kg par min durant 20 min	Evaluer les effets du styrène sur le syst. vestibulaire	ENG en position verticale, latérale droite et gauche et durant une accélération rotatoire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nystagmus positionnel à partir de 40 ppm dans le sang</li> <li>• Nystagmus paradoxal après une accélération rotatoire</li> </ul>	L'exposition aiguë au styrène pourrait avoir une action centrale sur le syst. vestibulo-oculomoteur
<b>Odkvist 1979</b>	Lapins	Injection IV avec un débit de 0,2 à 3,8 mg/kg par min durant 1 h	Evaluer les effets des solvants organiques sur le syst. vestibulaire (étude comparative)	ENG en position latérale et verticale et durant une accélération rotatoire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nystagmus positionnel à partir de 40 ppm dans le sang</li> <li>• Troubles du nystagmus après une accélération rotatoire</li> <li>• Potentialisation des effets après une co-exposition avec le trichloréthylène</li> </ul>	L'exposition aiguë au styrène entraîne des perturbations des voies centrales du système vestibulaire. Le styrène pourrait avoir une action sur le cervelet
<b>Tham 1982</b>	Rats SP	Injection IV avec un débit de 1,73 à 5,77 mg/kg par min durant 1 h	Evaluer l'effet du styrène sur le syst. vestibulaire (étude comparative)	ENG après un test rotatoire (10°/sec <sup>2</sup> - 1 min) toutes les 5 min après injection	↗ durée du nystagmus en réponse aux mouvements rotationnels à partir de 75 ppm de styrène dans le sang	Le styrène entraîne des perturbations vestibulaires de manière dose-dépendante
<b>Tham 1984</b>	Rats SP	Injection IV d'une solution de 0,1 à 10 % avec un débit de 32 µl / min durant 1 h	Etudier l'effet du styrène sur le RVO (étude comparative)	ENG après un test rotatoire (10°/sec <sup>2</sup> - 1 min) toutes les 5 min après l'injection	Effet exciteur sur le RVO (↗ durée du nystagmus en réponse aux mouvements rotationnels) à partir de 0,8 mM de styrène dans le sang	Rôle exciteur du styrène sur le RVO. Possibilité d'une inhibition de la modulation cérébelleuse
<b>Niklasson 1993</b>	Rats pigmentés	850 à 5100 ppm de toluène durant 10 à 60 min	Evaluer l'effet du styrène sur les systèmes vestibulo-oculomoteur et optocinétique (étude comparative)	Enregistrement du mouvement horizontal des yeux après stimulation optocinétique, vestibulaire et vestibulo-opto-cinétique	↘ du gain après stimulation optocinétique et augmentation de la durée du nystagmus (en réponse aux mouvements rotationnels) de manière dose-réponse	Le styrène a un effet sur les systèmes vestibulo-oculomoteur et optocinétique et pourrait avoir une action sur le circuit cérébelleux-vestibulaire



Etudes sur l'Homme						
<b>Odkvist 1982</b>	10 volontaires sains	87 à 139 ppm de styrène 1 h	Evaluer l'effet du styrène sur le syst. vestibulo-oculomoteur	ENG avant, durant et après exposition au styrène : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Test d'oscillation sinusoïdale (dans le noir)</li> <li>• Test opto-vestibulaire</li> <li>• Test de suppression visuelle</li> <li>• Test optocinétique</li> <li>• Test des saccades</li> <li>• Test de poursuite lente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↗ de la vitesse des saccades</li> <li>• ↗ du gain lors du test de suppression visuelle</li> </ul>	Le styrène agit sur le système vestibulo-oculaire probablement en perturbant le fonctionnement du cervelet
<b>Odkvist 1983</b>	10 volontaires humains sains	80 à 120 ppm de styrène 1 h	Evaluer les troubles vestibulaires et oculomoteurs après une exposition au styrène (étude comparative)	ENG après stimulation (oscillations sinusoïdales) dans le noir ou à la lumière, test de poursuite visuelle, test optocinétique, test des saccades et test de suppression visuelle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↗ de la vitesse des saccades</li> <li>• ↗ du gain durant les balancements sinusoïdales (↘ test de suppression visuelle)</li> </ul>	Le styrène a une influence sur le circuit du RVO en perturbant le fonctionnement du cervelet
<b>Ledin 1989</b>	18 travailleurs d'une entreprise de construction navale	Exposition moyenne de 10,8 ans au styrène Pas d'information sur le niveau d'exposition	Evaluer le contrôle postural et les fonctions vestibulo-oculomotrices des travailleurs exposés chroniquement au styrène	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posturographie statique (test de Romberg)</li> </ul> ENG pour enregistrer les mouvements des yeux durant les tests caloriques, tests de saccades, tests de poursuite lente, tests de suppression visuelle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↗ de la surface de l'ellipse de confiance (<i>sway area</i>) avec yeux ouverts et fermés</li> <li>• Plus faible habilité à supprimer le nystagmus vestibulaire (test de suppression visuelle)</li> <li>• Corrélations entre les résultats du test de suppression visuelle et les test posturaux (yeux ouverts)</li> </ul>	Le styrène pourrait agir sur le cervelet et entraîner des troubles du système vestibulo-oculaire et du contrôle postural

<b>Möller 1990</b>	18 travailleurs d'une usine de fabrication de bateaux	Exposition moyenne de 10 ans au styrène Niveau d'exposition en dessous de la valeur limite (ND)	Evaluer les effets du styrène sur l'équilibre	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posturographie statique</li> <li>• Test calorique</li> <li>• Test des saccades</li> <li>• Test de poursuite lente</li> <li>• Tests de suppression visuelle du RVO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ de la latence des saccades (7/18)</li> <li>• ↑ du gain lors du test de suppression visuelle (13/18)</li> <li>• Décalage de phase lors du test de poursuite lente (7/18)</li> <li>• ↑ de la surface de l'ellipse de confiance (<i>sway area</i>) yeux ouverts (9/18) et yeux fermés (6/18)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les résultats indiquent que le styrène entraîne des troubles au niveau du SNC du système de l'équilibre</li> <li>• Le styrène entraîne des troubles du système vestibulo-oculomoteurs</li> <li>• Le styrène pourrait avoir un impact sur le TC ou le cervelet</li> </ul>
<b>Calabrese 1996</b>	20 travailleurs d'usines de fibres de verre	Exposition moyenne de 7,6 ans (styrène + acétone) Styrène : 36,6 ppm Acétone : 65,3 ppm	Evaluer les effets du styrène sur les systèmes auditif et vestibulaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RVO : tests caloriques et test rotationnels (test de suppression visuelle)</li> <li>• RVS : posturographie statique (6 conditions différentes)</li> <li>• Potentiels auditifs évoqués</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas d'effet avec les tests de posturographie</li> <li>• 85 % des sujets présentent des résultats anormaux aux tests caloriques</li> <li>• 30 % des sujets présentent des résultats anormaux aux tests rotationnels</li> <li>• Pas d'effet sur les potentiels auditifs évoqués</li> </ul>	<p>Le syst. vestibulaire (central et périphérique) semble être sensible au styrène</p> <p>Le syst. vestibulaire semble plus sensible au styrène que le syst. auditif</p>

<b>Zamyslowska-Szmytke 2011b</b>	74 travailleurs d'une usine de plastique	Exposition moyenne de 14,3 ans (styrène + dichlorométhane) Styrène : 8,6 ppm Dichlorométhane : 12 ppm	Evaluer les effets d'une exposition professionnelle de styrène et de dichlorométhane sur l'équilibre et le syst. vestibulaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Test des saccades</li> <li>• Test de poursuite lente</li> <li>• Tests optocinétiques</li> <li>• Test caloriques</li> <li>• Posturographie statique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↘ gain pour les tests de poursuite lente</li> <li>• ↘ gain pour les tests optocinétiques</li> <li>• ↘ réactivité pour les tests caloriques</li> <li>• ↗ de la latence des saccades</li> <li>• ↗ vitesse de balancement les yeux clos</li> </ul>	Les résultats suggèrent que l'exposition au styrène et au dichlorométhane entraîne une perte vestibulaire bilatérale
<b>Fischer 2014</b>	1 homme de 76 ans	Exposition au styrène à l'intérieur d'une maison : quelques mois Styrène : 0,32 ppm	Décrire les effets d'une exposition au styrène sur le syst. vestibulaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Test du réflexe vestibulo-spinal</li> <li>• Tests caloriques</li> <li>• Potentiel évoqué vestibulaire myogénique cervical</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↘ de la réponse des canaux semi-circulaires</li> <li>• Fonction du saccule affaiblie</li> <li>• Dysfonctionnement périphérique vestibulaire</li> </ul>	Dysfonctionnement du RVO et de la fonction sacculaire transitoire après une exposition au styrène

**Abbreviations :**

**SP** : Sprague-Dawley ; **IP** : intra-péritonéale ; **IV** : Intraveineuse ; **syst. vestibulaire** : système vestibulaire ; **ENG** : Electronystagmographie ; **EOG** : Electro-oculographe ; **RVO** : réflexe vestibulo-oculaire ; **SPV** : *Slow-phase velocity* (vitesse de la phase lente du nystagmus) ; **j** : jour ; **sem** : semaine ; **TC** : tronc cérébral ; **NMV** : noyau vestibulaire médian ; ↗ : augmentation ; ↘ : baisse ; **ND** : non défini

### 3.2.2.2. Effets des xylènes

Des enregistrements électroystagmographiques réalisés avec des modèles animaux ont montré que les xylènes pouvaient affecter les voies centrales du système vestibulaire (Aschan *et al.*, 1977; Odkvist *et al.*, 1979; Tham *et al.*, 1984). Deux autres études avec des rongeurs ont révélé des différences de performances motrices en fonction de l'isomère testé. Par exemple, Moser *et al.* (1985) a montré que le *p*-xylène entraînait une plus forte baisse des performances motrices, tandis que Korsak *et al.* (1990) a montré que l'*o*-xylène avait un effet plus prononcé. Ces résultats pourraient s'expliquer par la différence du test utilisé (test d'écran inversé par Moser *et al.* (1985) ou test Rotarod par Korsak *et al.* (1990)). Bien que ces deux études aient montré une modification des performances motrices après exposition aux xylènes, aucune information n'est mentionnée sur les fonctions vestibulaires.

Des études sur des volontaires ont été réalisées pour évaluer les effets du *m*-xylène sur l'équilibre et la fonction vestibulaire (Savolainen *et al.*, 1980, 1985a, 1985b; Savolainen and Linnavuo, 1979). Les résultats de ces études suggèrent que les troubles de l'équilibre engendrés par le *m*-xylène sont le résultat d'un impact du solvant sur le SNC.

Plusieurs études relatant les effets d'expositions professionnelles de solvants aromatiques sur des salariés ont mis en évidence des perturbations du système vestibulaire par les xylènes. Les tests de posturographie et les enregistrements ENG ont permis de mettre en évidence que les xylènes auraient un impact au niveau central sur le système vestibulaire (Arlie-Søborg *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1997; Sułkowski *et al.*, 2002; Yokoyama *et al.*, 1997; Zamysłowska-Szmytko *et al.*, 2011a).

### 3.2.2.3. Effets de l'éthylbenzène

Il existe très peu de données concernant les effets de l'éthylbenzène sur le système vestibulaire. L'étude comparative de Tham *et al.* (1984) des différents composés organiques sur le système vestibulaire montre que l'éthylbenzène a un effet excitateur du RVO chez le rat.

### 3.3. Evaluations de la vestibulotoxicité

Des données épidémiologiques révèlent que les dysfonctionnements vestibulaires entraînent un risque accru de chutes et d'accidents graves (Agrawal *et al.*, 2009, 2013; Ward *et al.*, 2013). L'évaluation de la fonction vestibulaire permet d'évaluer par la même occasion le risque de chutes et par conséquent de prévenir les accidents et blessures (Agrawal *et al.*, 2009).

Même s'il est bien connu que les solvants aromatiques perturbent la régulation sensori-motrice du contrôle postural et les fonctions vestibulaires (Tableau 2), il n'existe encore aucune donnée sur les conséquences de ces molécules sur le récepteur vestibulaire.

Les effets des solvants aromatiques sur la fonction vestibulaire chez l'Homme étaient généralement évalués avec des mesures de performances du RVO ou du RVS. La plupart de ces études concluent que les effets des solvants aromatiques sont neurotoxiques et qu'ils pourraient avoir un impact central sur le système vestibulaire (au niveau du circuit cérébelleux-vestibulaire) modulant ainsi le RVO (Hodgkinson and Prasher, 2006).

Chez les animaux, une batterie de tests comportementaux peut aussi être utilisée pour obtenir une évaluation semi-quantitative des dysfonctionnements vestibulaires après une exposition à des agents vestibulotoxiques. Ces tests sont spécifiques à la fonction vestibulaire et comprennent des observations de comportements spontanés et de réflexes anti-gravité (Martins-Lopes *et al.*, 2019). Des analyses histologiques du récepteur vestibulaire associées à des tests fonctionnels peuvent aussi être réalisées pour décrire les mécanismes vestibulotoxiques. L'histologie permet de localiser précisément les dommages cellulaires induits par un agent vestibulotoxique. Par exemple, des études expérimentales montrent que certaines molécules vestibulotoxiques, telles que le cisplatine, la gentamicine ou certains nitriles, altèrent l'épithélium neurosensoriel du récepteur vestibulaire entraînant ainsi des dysfonctionnements vestibulaires (Callejo *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2013; Llorens *et al.*, 1993). Ces troubles vestibulaires sont relevés aussi chez l'Homme (Kobayashi *et al.*, 1987; Rutka, 2019; Sedó-Cabezón *et al.*, 2014).

Toutes ces techniques pourraient être utilisées pour évaluer les effets des solvants aromatiques sur le système vestibulaire mais leur utilisation nécessiterait un recours à l'expérimentation animale et à un équipement spécifique. Étant donné que l'exposition des modèles animaux aux vapeurs de solvants est chronophage et que le matériel utilisé pour l'évaluation de la fonction vestibulaire est onéreux, une méthode alternative pour évaluer la vestibulotoxicité des solvants aromatiques est aujourd'hui indispensable. Compte tenu du très grand nombre de solvants aromatiques utilisés dans l'industrie, un outil fiable et rapide serait nécessaire pour discriminer leur potentiel toxique sur le système vestibulaire.

Ces travaux de thèse utilisent un modèle *in vitro* pour évaluer de façon rapide la fonction des cellules vestibulaires et les conséquences histologiques sur le récepteur vestibulaire après une exposition à plusieurs solvants aromatiques. Ce modèle *in vitro* est une culture 3D d'utricule de rats nouveau-nés, initialement développé par Bartolami *et al.* (2011) et Gaboyard *et al.* (2005), pour étudier les mécanismes précoces de formation de l'endolymphe au niveau du récepteur vestibulaire.

Après quelques jours de culture dans un Matrigel<sup>®</sup>, des explants utriculaires se referment pour former un cyste. Le cyste est une structure sphérique qui, au cours du temps, se remplit d'un liquide de composition chimique proche de celui de l'endolymphe. En effet, l'évolution de la concentration  $K^+$  démontre une accumulation d'ions potassique dans la lumière du cyste qui atteint un niveau élevé après quelques jours de culture (J5). Durant la culture du cyste, toutes les cellules de l'utricule : cellules ciliées, sombres, transitionnelles et canalaies, sont préservées, ainsi que les pompes et canaux potassiques impliqués dans la production de l'endolymphe. En effet, des mesures électrophysiologiques montrent que la pompe Na/K-ATPase, les canaux de TME et le co-transporteur NKCC1 sont fonctionnels dans les cultures de cyste. L'acquisition de la transduction sensorielle des cellules ciliées au stade embryonnaire (Géléoc and Holt, 2003) et la maturation complète des cellules sombres à partir du quatrième jour de développement post-partum (Anniko and Nordemar, 1980) semblent être en adéquation avec la production de l'endolymphe dans la lumière du cyste.

Comme décrit précédemment, la composition chimique particulière de l'endolymphe joue un rôle crucial dans la physiologie vestibulaire. Les ions  $K^+$  étant des éléments essentiels dans la physiologie des cellules ciliées, la mesure de la concentration potassique du compartiment endolymphatique du modèle « cyste » devrait permettre d'évaluer l'impact vestibulotoxique des solvants aromatiques sur le modèle. Le cas échéant, cela permettra de développer un outil de criblage pour réduire le nombre d'animaux.

## PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE

En perturbant les fonctions impliquées dans la vigilance et le contrôle postural, une exposition chronique aux solvants aromatiques peut engendrer des chutes à l'origine d'accidents professionnels (Hunting *et al.*, 1991; Vouriot *et al.*, 2005). De nombreuses études épidémiologiques ont montré que certains des solvants aromatiques peuvent générer des troubles de l'équilibre et de l'audition (Aylott and Prasher, 2002; Hodgkinson and Prasher, 2006; Sułkowski *et al.*, 2002; Vyskocil *et al.*, 2012; Yokoyama *et al.*, 1997; Zamyslowska-Szmytko *et al.*, 2011a).

Des études expérimentales chez l'animal ont montré qu'une exposition à des solvants aromatiques entraînant des pertes auditives altèraient la cochlée (Cappaert *et al.*, 2000; Loquet *et al.*, 1999; Maguin *et al.*, 2006) ; en revanche, aucune étude n'a montré les effets toxiques de ces solvants sur le récepteur vestibulaire, localisé lui aussi dans l'oreille interne.

La cochléotoxicité des solvants aromatiques est bien décrite dans la littérature (Campo *et al.*, 1997, 2001; Maguin *et al.*, 2006) et se traduit par une altération des cellules sensorielles de l'organe de Corti. Il a aussi été montré que les solvants aromatiques, en particulier le styrène, endommagent d'abord les cellules de Deiters et de Hensen avant d'endommager les cellules ciliées (Campo *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2007; Fetoni *et al.*, 2016). Or, les cellules de soutien sont impliquées dans le cycle du  $K^+$  (Hibino and Kurachi, 2006; Spicer and Schulte, 1998). Leur altération pourrait donc modifier la composition chimique des liquides de l'oreille interne. Bien que cette hypothèse n'ait jamais été confirmée par une approche expérimentale *in vivo*, il est raisonnable de penser que les mécanismes ototoxiques ne sont pas limités à la perte de cellules sensorielles ; une perturbation de la composition chimique des liquides de l'oreille interne pourrait être considérée comme un évènement physiologique précoce.

À notre connaissance, et contrairement à la cochléotoxicité, la vestibulotoxicité des solvants aromatiques n'a jamais été mise en évidence. Or la cochlée et le labyrinthe vestibulaire partagent la même circulation des liquides de l'oreille interne (endolymphe et périlymphe) et leurs mécanismes de régulation sont proches.



En effet, il existe une analogie fonctionnelle entre les cellules ciliées vestibulaires et cochléaires permettant la transduction mécano-électrique ; il existe aussi une analogie dans le fonctionnement des cellules sombres et des cellules marginales qui maintiennent la concentration potassique élevée dans l'endolymphe (Ciuman, 2009; Hibino *et al.*, 2010; Wangemann, 2002a). Ces analogies fonctionnelles et morphologiques entre ces deux récepteurs sensoriels de l'oreille interne nous interpellent quant à une vestibulotoxicité potentielle des solvants aromatiques. En d'autres termes, l'altération des cellules sensorielles ou sécrétrices du récepteur vestibulaire par les solvants aromatiques est une question qui, aujourd'hui, ne trouve pas réponse dans la littérature.

Sont-elles une cible privilégiée des solvants ?

Jusqu'à présent, les études démontrant les effets neurotoxiques ou cochléotoxiques des solvants aromatiques ont été réalisées avec des modèles « animaux » impliquant l'utilisation d'un grand nombre d'entre eux et mettant en œuvre des procédures expérimentales longues et coûteuses.

Pourtant, un modèle *in vitro* existe et peut être utilisé pour évaluer la toxicité des solvants aromatiques sur le récepteur vestibulaire. Ce modèle, rappelons-le, est issu d'un explant d'utricule de nouveau-né de rat qui, après quelques jours, se referme pour former des cystes (Bartolami *et al.*, 2011; Gaboyard *et al.*, 2005). Les explants vestibulaires ont la particularité de préserver toutes les cellules de l'utricule, et de renfermer un compartiment clos où circule un liquide dont la composition chimique est proche de celle de l'endolymphe chez l'animal adulte. La physiologie des cellules du récepteur vestibulaire dépend de la concentration potassique de ce compartiment riche en  $K^+$ .

L'objectif principal de cette thèse est d'évaluer le potentiel vestibulotoxique des solvants aromatiques les plus utilisés en milieu professionnel en s'appuyant sur un modèle 3D d'explants d'utricule et d'ampoules.

Ce modèle présente des propriétés physiologiques et anatomiques qui permettent de mesurer la concentration potassique du compartiment endolymphatique, la mesure de la concentration en  $K^+$  se faisant à l'aide de microélectrodes remplies d'une membrane échangeuse d'ions. Ces mesures physiologiques seront complétées par des observations histologiques pour analyser l'intégrité tissulaire.

Pour ce faire, il faudra, dans un premier temps, s'assurer de la pertinence du modèle. Il sera donc nécessaire de vérifier la stabilité de la concentration potassique endolymphatique au cours du temps de culture. Différentes techniques d'analyses histologiques seront mises en œuvre pour décrire la morphologie cellulaire des cultures 3D et pour vérifier que toutes les cellules vestibulaires sont préservées durant la culture des explants. Enfin, la fonctionnalité des transporteurs potassiques du modèle sera validée à l'aide d'agents pharmacologiques inhibiteurs de canaux et pompes potassiques.

Dans un deuxième temps, l'impact d'un solvant aromatique ototoxique, le styrène, dont les effets cochléotoxiques ont été étudiés au sein du laboratoire, sera évalué. Le modèle sera exposé à différentes concentrations de styrène pendant 2 h et 72 h pour discriminer les effets pharmacologiques des effets toxiques. À quelle concentration le styrène entraîne-t-il des variations de la concentration de  $K^+$  ? Est-ce que le styrène entraîne des dommages tissulaires ? Le styrène déclenche-t-il un processus apoptotique dans notre modèle ? Ce sont autant de questions auxquelles il faudra répondre.

Enfin, le modèle sera utilisé pour comparer, à concentration égale, l'impact des solvants aromatiques (toluène, éthylbenzène et les 3 isomères du xylènes) dont les propriétés cochléotoxiques sont connus. Il s'agira d'étudier l'impact des solvants d'une part, sur la concentration potassique, et d'autre part, sur leurs cibles cellulaires au niveau du récepteur vestibulaire. En effet, il est raisonnable de s'interroger sur le parallèle entre cochléotoxicité et vestibulotoxicité périphérique puis, le cas échéant, sur les mécanismes toxiques impliqués : apoptose ou nécrose ? L'avantage de ce modèle sera de mettre à disposition des chercheurs et préventeurs un test de criblage pour évaluer la toxicité périphérique vestibulaire des solvants aromatiques.

# **CHAPITRE II.**

## **MATERIELS ET METHODES**

## 1. Animaux

Toutes les expérimentations conduites avec les animaux ont été réalisées dans le respect de la Directive Européenne du 22 Septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (2010/63/UE, 22 septembre 2010) et des décrets et arrêtés du 1<sup>er</sup> février 2013 du code rural, qui transposent cette directive. Les protocoles expérimentaux de cette étude n'ont pas nécessité une demande d'autorisation de projet auprès du Ministère de l'enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI), ni l'approbation du Comité d'Ethique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale (CELMEA). Cependant, un avis favorable a été émis par le responsable de la Structure Bien-Etre Animale (SBEA), ainsi que par le responsable de l'Etablissement Utilisateur (EU) de l'INRS, quant à l'objectif et aux protocoles d'expérimentation animale développés dans cette étude. Les locaux hébergeant les animaux sont accrédités pour l'expérimentation animale (NC54-547-10), par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt et leur utilisation respecte l'arrêté du 1<sup>er</sup> février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leur contrôle.

Des femelles gestantes de souche Long Evans ont été fournies par le laboratoire Janvier (Le Genest St Isle, St Berthevin, 53941, France). Les animaux étaient stabulés dans les locaux de l'INRS dès leur arrivée, une semaine avant la mise-bas (à partir du 15<sup>ième</sup> jour de gestation). À leur arrivée dans la zone d'hébergement, les femelles étaient placées seules dans des cages de polycarbonate (1032 cm<sup>2</sup> de surface au sol et 20 cm de hauteur) garnies de plaquettes de cellulose BCell8 irradiée (ANIBED, Pontvallain, France). Les animaux étaient pesés au 15<sup>ème</sup> et au 20<sup>ème</sup> jour de gravidité de manière à suivre l'évolution de la gestation. La nourriture et l'eau étaient distribuées à volonté et les litières des cages étaient renouvelées tous les 7 jours. L'environnement des animaux était enrichi en plaçant des rouleaux en carton. La température des locaux d'hébergement était maintenue à 22 ± 2°C avec un taux d'humidité de 55 ± 15 % et le cycle de l'éclairage était 12 h / 12 h (lumière de 7 h à 19 h et obscurité de 19 h à 7 h).

La mise-bas se déroulait par voie naturelle et les nouveau-nés étaient utilisés entre 0 et 4 jours après leur naissance (P0-P4). Suite au post-partum, la femelle était réutilisée dans le cadre d'un autre projet scientifique.

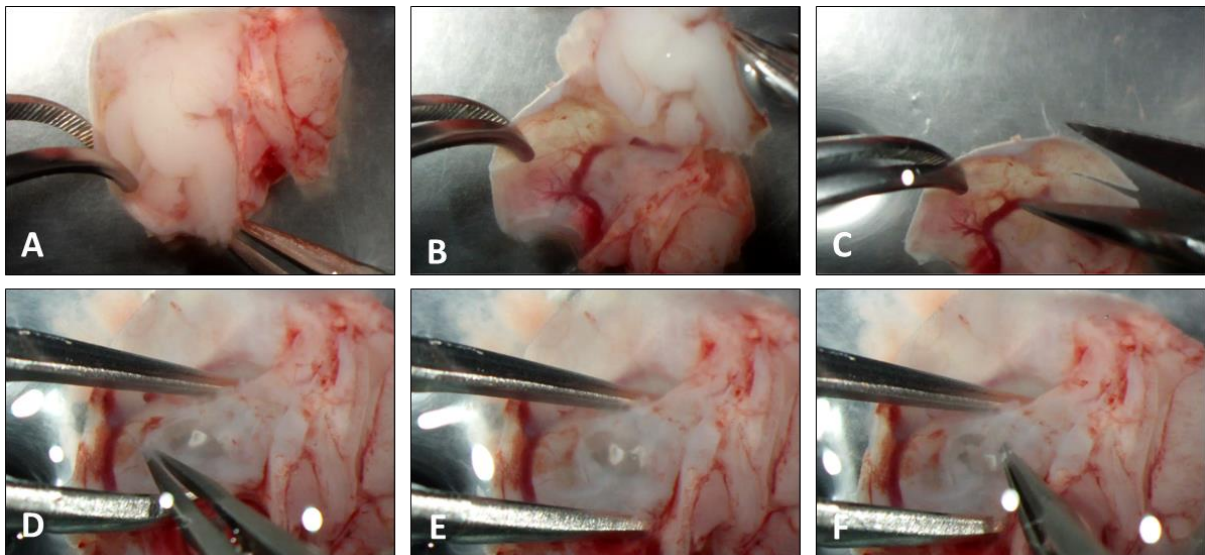
## 2. Culture des cystes

### 2.1. Dissection des organes vestibulaires

#### 2.1.1. Prélèvement des organes vestibulaires

Les rats nouveau-nés étaient mis à mort par décapitation puis les structures vestibulaires étaient extraites sous loupe binoculaire. Les dissections étaient réalisées de manière aseptique sous un poste de sécurité microbiologique (PSM). Pour éviter toute contamination, la tête était aspergée avec de l'éthanol à 70 % avant de retirer la peau. Ensuite, les deux hémisphères du crâne étaient séparés à l'aide de ciseaux fins puis l'os temporal était extrait et placé dans du milieu de Leibovitz L-15 (Gibco™). Les tissus cérébraux étaient dégagés à l'aide de pinces fine et courbée, tandis que la partie supérieure de l'os pariétal était découpée à l'aide d'une paire de ciseaux fins (Figure 13 A-C).

Sous le cartilage, la couleur blanchâtre des otolithes permet de repérer le labyrinthe vestibulaire. Le reste des tissus cérébraux était dégagé puis le cartilage était découpé autour du récepteur vestibulaire pour donner libre accès aux pinces fines afin d'en extraire la structure (Figure 13 D-F).

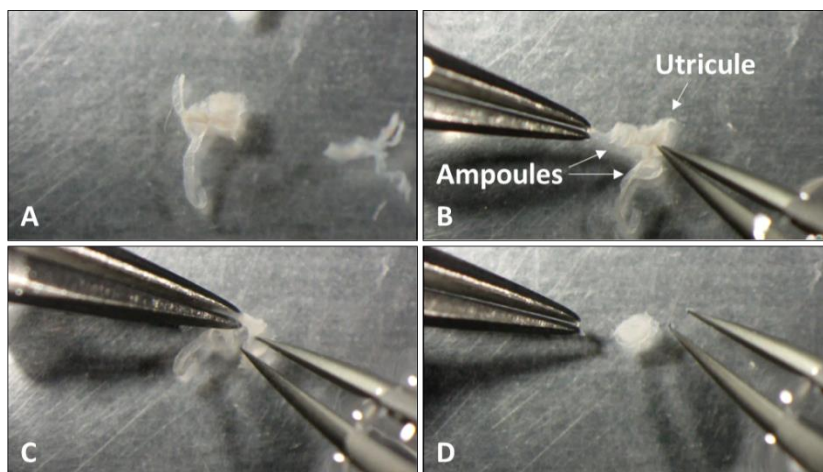


**Figure 13 : Prélèvement des organes vestibulaires.**

(A-B) Les tissus cérébraux sont retirés à l'aide de pinces fine et courbée. (C) La partie supérieure de l'os pariétal est découpée à l'aide d'une paire de ciseaux fins. (D-F) Le cartilage recouvrant les structures vestibulaires est découpé. L'ensemble des structures vestibulaires est extirpé pour la réalisation de la microdissection.

### 2.1.2. Microdissection des différentes structures vestibulaires

Le labyrinthe vestibulaire extrait comprend les trois canaux semi-circulaires et les deux organes otolithiques : utricule et saccule. Dans un premier temps, le saccule était dégagé du reste de la structure. Les ampoules des canaux semi-circulaires étaient ensuite délicatement détachées de l'utricule à l'aide d'une aiguille et d'une pince fine de manière à conserver la membrane recouvrant la macula et préserver le tissu autour de la crête ampullaire (Figure 14).



**Figure 14 :**

### Microdissection des récepteurs vestibulaires.

(A-B) L'organe vestibulaire comprend les ampoules des canaux semi-circulaires et l'utricule. (C-D) Les ampoules des canaux semi-circulaires et l'utricule sont isolées.

## 2.2. Obtention des cultures 3D

### 2.2.1. Revêtement de la surface de la lamelle avec la laminine

Chaque structure vestibulaire (ampoule ou utricule) était placée sur une lamelle en verre de 12 mm de diamètre préalablement traitée avec 10 µg/l de laminine (1 mg/ml dans 50 mM de Tris-HCl, avec 150 mM de NaCl, Sigma-Aldrich). La laminine était diluée au 1/100 dans du milieu DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, 50 % / 50 % v/v) contenant 2,5 mM de L-Glutamine et de 15 mM d'Hépès (Gibco™ Thermo Fisher Scientific). Dix microlitres de préparation de laminine étaient déposés sur la lamelle en verre. Les lamelles en verre étaient déposées dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre et la préparation était placée dans un incubateur à 37°C pendant une heure. Ensuite, les lamelles en verre étaient rincées avec du milieu DMEM-F12 avant d'y déposer les explants vestibulaires.

### 2.2.2. Préparation de la culture tridimensionnelle

Chaque structure vestibulaire déposée sur lamelle était recouverte de 10 µl de Matrigel® (Matrigel Basement Membrane Matrix PhenolRed Free, Corning). Les explants étaient positionnés de manière à ce que la partie basale de la macula de l'utricule soit face à la lamelle et que l'ampoule soit orientée horizontalement ; cette étape était nécessaire à la croissance des explants vestibulaires. Ensuite, les échantillons étaient incubés à 37°C durant 30 minutes pour permettre la gélification du Matrigel® et immobiliser les explants. Au terme de l'incubation, du milieu de culture DMEM-F12 supplémenté avec 2 % de N2 (100X, Gibco™) était ajouté dans les boîtes de Pétri. Les cultures étaient maintenues à 37°C sous atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 2.2.3. Maintien des cultures tridimensionnelles

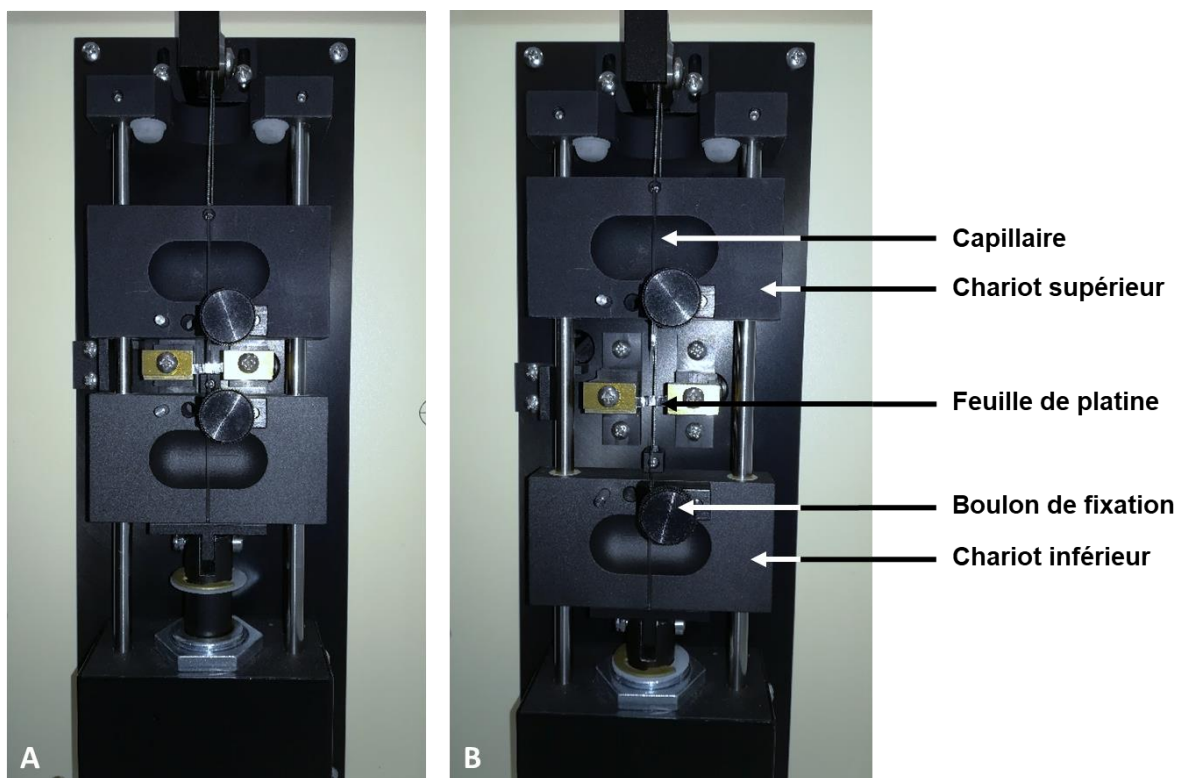
Les milieux de culture des explants vestibulaires étaient renouvelés de moitié 3 fois par semaine avec du milieu de culture DMEM-F12 supplémenté avec 2 % de N2.

### 3. Mesures électrophysiologiques

#### 3.1. Préparations des électrodes

##### 3.1.1. Étirement des capillaires

Des capillaires en verre borosilicaté avec filament (1B 100 F-4 ; World Precision Instrument) étaient chauffés et étirés verticalement à l'aide d'une étireuse de capillaires (PUL-100 ; Microprocessor-controlled micropipette Puller ; World Precision Instrument). L'extrémité supérieure du capillaire était fixée sur le charriot supérieur et la partie inférieure sur le charriot inférieur qui sert de contrepoids. La partie centrale du capillaire était encerclée par une feuille de platine traversée par un courant alternatif permettant de contrôler sa température lors du chauffage (Figure 15).



**Figure 15 : Étireuse de capillaire.**

(A) Capillaire en verre borosilicaté avant étirement. (B) Obtention de deux microélectrodes après chauffage et étirement du capillaire.



Pour obtenir des microélectrodes avec une taille et une forme de pointe standardisées, la température de chauffage (HEAT) contrôlée par l'intensité du courant passant dans la feuille de platine, la force d'étirement exercée entre les 2 charriots (PULL), la vitesse de déclenchement de l'étirement (TRIP) et le délai de refroidissement de la feuille de platine avant l'étirement (DELAY) devaient être définis au préalable. Les paramètres recommandés par le fournisseur pour réaliser des microélectrodes étaient : HEAT = 485, PULL = 150, TRIP = 50 et DELAY = 100.

Une fois le capillaire chauffé et étiré, deux microélectrodes de forme conique, à pointe identique, étaient obtenues.

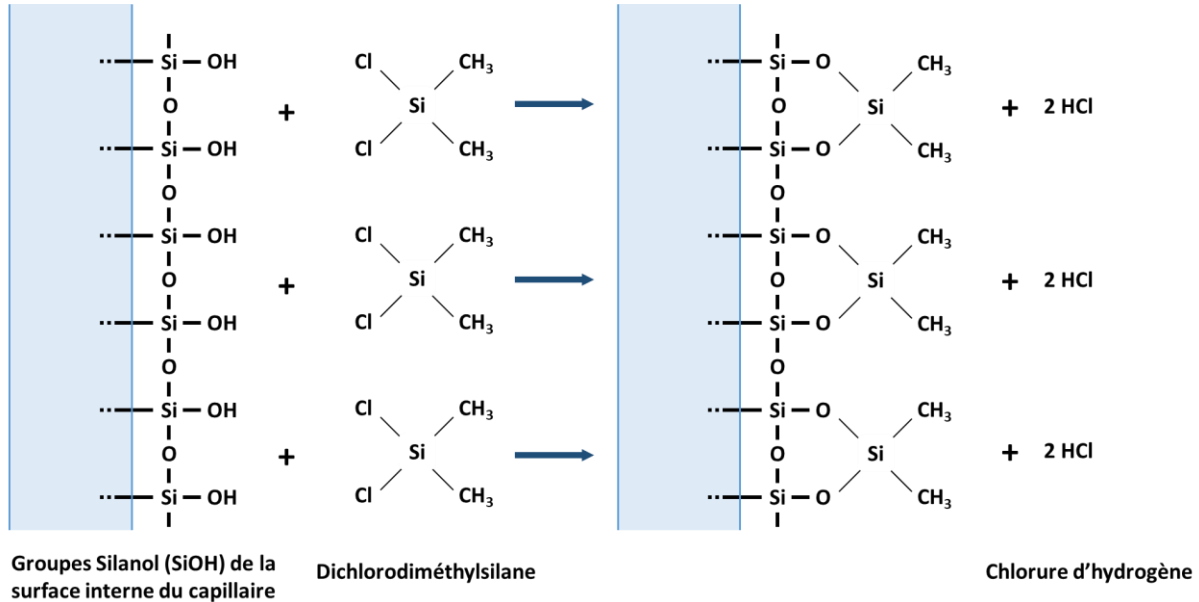
### 3.1.2. Imperméabilisation des microélectrodes

Dans le but d'éliminer tous les contaminants pouvant nuire à leur conductivité, tels que des protéines, des résidus, ou des particules d'eau, les microélectrodes étaient chauffées à 200°C durant 2 heures.

Ensuite, les microélectrodes étaient imperméabilisées par silanisation avec du dichlorodiméthylsilane (pureté > 99,5 %, Sigma-Aldrich) qui réagit avec les groupes SiOH à la surface des capillaires, rendant ainsi l'intérieur de la microélectrode hydrophobe (Figure 16). L'hydrophobicité de la face interne de la microélectrode permet de créer un contact étroit entre la membrane liquide échangeuse d'ions et la surface en verre du capillaire, évitant ainsi le passage d'électrolytes de part et d'autre de la membrane, ce qui pourrait court-circuiter le signal lors des mesures (Lee *et al.*, 2013). Pour ce faire, la partie supérieure d'un bécher était recouverte avec du Parafilm<sup>®</sup>, dans lequel les microélectrodes étaient plantées, pointe vers le haut, de façon à ce que la partie inférieure du capillaire soit à l'intérieur du bécher.

Les microélectrodes étaient exposées aux vapeurs de dichlorodiméthylsilane ; 100 µl étaient ajoutés dans le bécher placé sur une plaque chauffante à 90°C durant 5 minutes. Cette étape était réalisée sous une sorbonne de laboratoire afin d'éviter l'inhalation au chlorure d'hydrogène libéré durant la réaction.

Pour finir, les microélectrodes étaient séchées à 200°C durant 3 heures puis stockées dans une cloche à dessiccation pour leur conservation. Les électrodes peuvent être stockées ainsi durant plusieurs semaines (Reid and Zhao, 2011).



**Figure 16 : Silanisation de la surface interne de la microélectrode.**

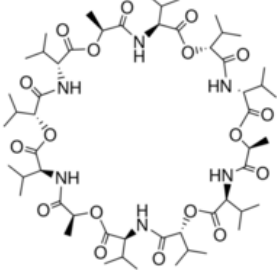
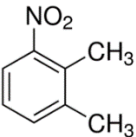
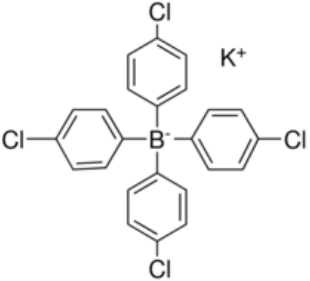
Le dichlorodiméthylsilane réagit avec les groupes silanol (SiOH) des capillaires en verre borosilicaté pour rendre leur surface interne hydrophobe. Cette réaction libère du chlorure d'hydrogène (HCl).

### 3.1.3. Remplissage des microélectrodes

Pour mesurer la concentration potassique, la pointe des microélectrodes était remplie avec une membrane liquide échangeuse d'ions  $\text{K}^+$  (Potassium Ionophe I – Cocktail B, Sigma-Aldrich). Cette substance est composée d'un ionophore spécifique au potassium (Valinomycine) transportant l'ion potassique à travers la membrane, d'un solvant immiscible dans l'eau dans lequel le transporteur est dissout (1,2-diméthyl-3-nitrobenzène) et d'additifs modifiant la résistance électrique, l'hydrophobicité, la viscosité et la sélectivité ionique du cocktail (potassium tétrakis(4-chlorophényl)borate) (Tableau 4) (Lee *et al.*, 2013). Cette membrane échangeuse d'ions  $\text{K}^+$  est sensible aux variations des ions potassiques de part et d'autre de celle-ci, entraînant des modifications du potentiel électrochimique se traduisant par des variations du signal électrique mesuré.

Une fois la membrane en place, la microélectrode était remplie par une solution de 150 mM de KCl jusqu'à son extrémité en évitant de laisser des espaces d'air.

**Tableau 4 :** Structure, proportion et fonctions des composants de la membrane liquide échangeuse d'ions K<sup>+</sup>

Composant	Structure	Proportion	Fonctions
<b>Valinomycine</b>		5 %	Transporteur spécifique du K <sup>+</sup>
<b>1,2-Diméthyl-3-nitrobenzène</b>		93 %	Solvant dans lequel est dissout le transporteur (sans altérer sa fonctionnalité)
<b>Potassium tétrakis(4-chlorophényl)borate</b>		2 %	Hydrophobicité Viscosité Sélectivité ionique du cocktail Réduction de la résistance

### 3.1.4. Contrôles visuel et électrique des microélectrodes

Après avoir rempli la microélectrode, la pointe de la microélectrode était observée sous loupe binoculaire. La forme concave de l'interphase entre la membrane liquide et la solution en KCl traduit une réaction de silanisation propre (Lee *et al.*, 2013).

La résistance de la microélectrode était ensuite mesurée à l'aide d'un ohmmètre (Omega TipZ, World Precision Instrument) et seules les microélectrodes inférieures à 200 MΩ étaient utilisées. Ce paramètre donne une indication sur la stabilité du signal électrique mesuré et sur la sensibilité et la sélectivité de la microélectrode ; plus l'impédance est faible, plus le signal électrique est stable et plus la sélectivité et la sensibilité de la microélectrode sont élevées (Lee *et al.*, 2013).

### 3.2. Mesures de la concentration potassique

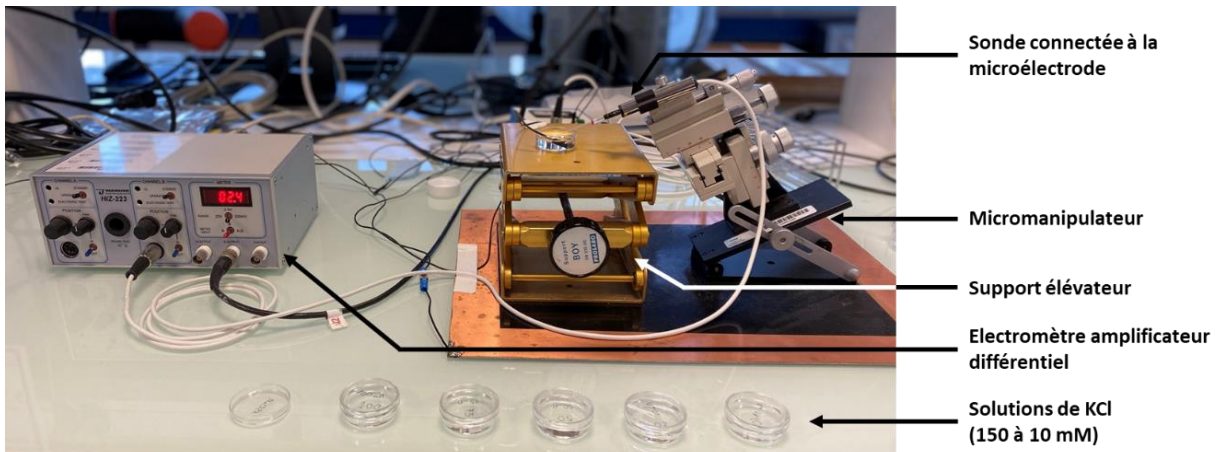
Après contrôle, la microélectrode était connectée à un électromètre amplificateur différentiel (HiZ-223, Warner Instruments) par un holder (microelectrode holder half-cells, 1,5 mm, World Precision Instrument). L'électrode de référence était baignée dans les solutions de calibration ou dans le milieu de culture pour fermer le circuit électrique.

Avant de commencer les mesures du potentiel électrique, des paramètres propres à l'amplificateur différentiel étaient réglés selon les recommandations du fournisseur : le courant de fuite (IG) était ajusté à 0,1 mV et « l'électrode test » à 100.

Le périphérique de sortie (output) de l'électromètre était connecté à un ordinateur afin de suivre le signal électrique à l'aide du logiciel Pulse® et d'un analyseur 3160-A-022 (Bruel & Kjaer). Ce logiciel donne une moyenne de toutes les valeurs de tension enregistrées par seconde et permet de déterminer la stabilité du signal électrique lors de la mesure de la gamme étalon ou dans le compartiment endolymphatique.

#### 3.2.1. Étalonnage du signal de la microélectrode

Avant de mesurer la concentration potassique du compartiment endolymphatique des structures vestibulaires, le signal de la microélectrode était calibré avec des solutions de concentration décroissante: 150, 100, 75, 50, 20 et 10 mM de KCl) (Figure 17). Chaque solution contenait 150 mM de cations, supplémentée par une concentration de NaCl appropriée. Par exemple, la solution contenant 50 mM de KCl comprenait aussi 100 mM de NaCl. Les différentes solutions de KCl étaient tamponnées par ajout de 5 mM d'Hépès (Hepes Buffer, Gibco™ Thermo Fisher Scientific).



**Figure 17 : Mesure de la gamme étalon.**

La microélectrode connectée à la sonde de l'électromètre est fixée sur un micromanipulateur. La microélectrode à membrane échangeuse d'ions  $K^+$  et la référence sont trempées dans la solution de KCl à l'aide du support élévateur, pour mesurer la tension électrique.

La gamme étalon était réalisée avant et après la mesure dans le compartiment endolymphatique des structures vestibulaires pour déterminer sa concentration en  $K^+$ . La courbe étalon des différentes valeurs de tensions des solutions de KCl obtenues suivait un modèle logarithmique. Une régression simple à tendance exponentielle de la concentration potassique (en mM) en fonction de la tension (en mV) de l'ensemble des valeurs des 2 gammes étalons était tracée (Figure 18).

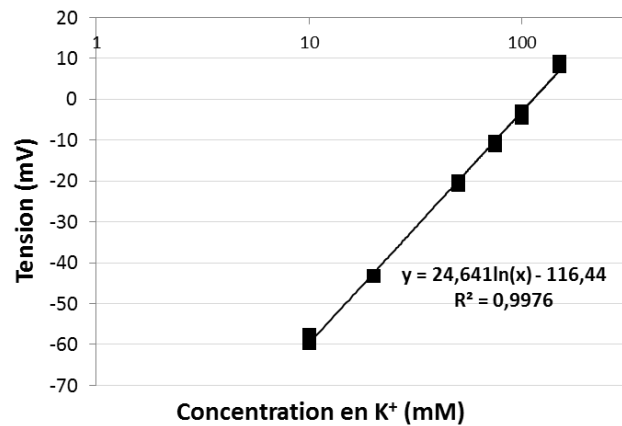
La concentration potassique du compartiment endolymphatique était ensuite déterminée à partir de la relation concentration en  $K^+$  (mM) / voltage (mV) :

$$V = \ln ([K^+]) + b.$$

Pour obtenir une valeur de la concentration potassique exploitable, le  $R^2$  et le coefficient de corrélation calculés à partir de la régression linéaire simple devaient respectivement être supérieurs à 0,99 et 99 %.

La sensibilité de la microélectrode à l'ion  $K^+$  était vérifiée à l'aide de la gamme étalon. Chaque décade (de 10 à 100 mM de KCl) devait donner une différence de potentiel électrique de 58 mV (Lee *et al.*, 2013).

[KCl] (mM)	1 <sup>ère</sup> gamme (mV)	2 <sup>ème</sup> gamme (mV)
150	9,2	8,1
100	-2,9	-4,5
75	-10,3	-11,2
50	-20,1	-21
20	-43,3	-43,3
10	-57,7	-59,7

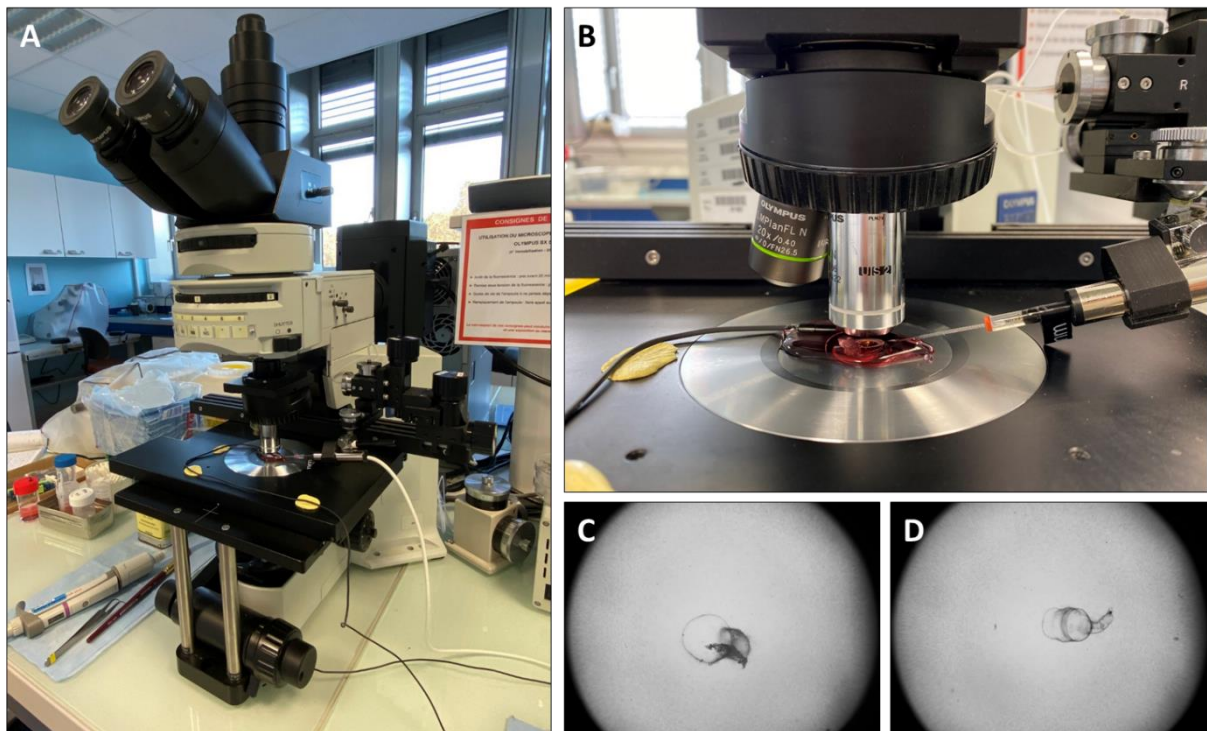


**Figure 18 : Etalonnage de la microélectrode lors de la mesure de la concentration potassique endolymphatique.**

Exemple de valeurs de tension obtenues lors de la mesure des solutions de KCl de la gamme étalon (Tableau). Régression linéaire à tendance exponentielle de l'ensemble des mesures de tension des deux gammes. L'équation de droite de la régression linéaire et le  $R^2$  sont calculés.

### 3.2.2. Mesure de la concentration du K<sup>+</sup> endolymphatique des explants vestibulaires

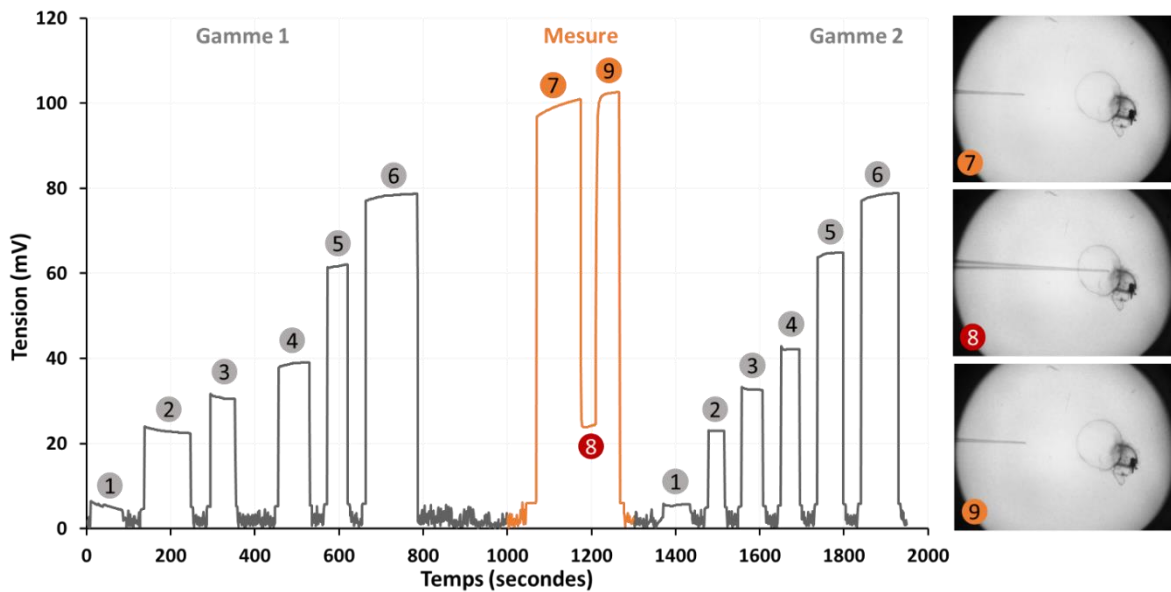
Après la mesure de la première gamme étalon, l'explant vestibulaire était placé sur la platine du microscope optique et recouvert de milieu de culture correspondant. Dans un premier temps, la pointe de la microélectrode et la référence étaient trempées dans le milieu de culture contenant une concentration potassique connue (4,15 mM de KCl, DMEM-F12, Gibco™ Thermo Fisher Scientific) (Figure 19).



**Figure 19 :** Mesure de la concentration potassique dans le compartiment endolymphatique des explants vestibulaires.

(A-B) La référence baigne dans le milieu recouvrant la structure vestibulaire. La microélectrode connectée à la sonde est avancée à l'aide d'un micromanipulateur jusque dans le compartiment endolymphatique sous le microscope optique pour en mesurer la concentration en  $K^+$ . Cultures 3D utriculaire (C) et ampullaire (D) observées au microscope optique (X20) durant la mesure de la concentration potassique.

La microélectrode était avancée sous contrôle optique à l'aide d'un micromanipulateur jusque dans le compartiment endolymphatique de la culture 3D. La valeur de tension était déterminée en quelques secondes après l'introduction de la microélectrode dans la lumière de l'explant (Figure 20). L'enregistrement ne devait pas dépasser 30 secondes car le piquage de la microélectrode dans la paroi de l'explant peut entraîner une fuite du liquide endolymphatique. Les échantillons dégonflés étaient exclus de l'étude.



**Figure 20 : Mesures électrophysiologiques avec Pulse®.**

Les valeurs de 1 à 6 représentent les tensions mesurées dans les 6 solutions de référence de la gamme étalon : 150 (1) ; 100 (2) ; 75 (3) ; 50 (4) ; 20 (5) et 10 mM (6). La tension est mesurée dans le milieu de culture avant (7) et après (9) la mesure dans le compartiment endolymphatique. Les valeurs 8 représentent la tension mesurée dans le compartiment endolymphatique des explants vestibulaires.

#### 4. Traitement avec des agents inhibiteurs de transporteurs potassiques

Les cultures 3D d'ampoules ou d'utricules étaient traitées avec des inhibiteurs de transporteurs potassiques pour étudier les mécanismes d'efflux et d'influx potassique. La gentamicine et le gadolinium bloquent les canaux de transduction mécano-électrique des stéréocils (Kimitsuki *et al.*, 1996; Kroese *et al.*, 1989), l'ouabaïne inhibe la pompe Na/K-ATPase et la bumétanide est un diurétique de l'anse connu pour inhiber le co-transporteur NKCC1 (Bartolami *et al.*, 2011; Marcus and Shipley, 1994). L'ouabaïne, la bumétanide, le gadolinium et la gentamicine provenaient de chez Sigma-Aldrich.

Au 7<sup>ème</sup> jour de culture, les échantillons étaient placés en incubation dans le milieu DMEM-F12 supplémenté avec 2 % de N2 contenant soit de la gentamicine, soit du gadolinium, soit de la bumétanide, ou de l'ouabaïne, à 37°C durant un temps court (Tableau 5).



Immédiatement après le traitement, les échantillons étaient placés sur la platine du microscope et recouverts de milieu contenant la molécule étudiée dans le but de mesurer la concentration en  $K^+$  du compartiment endolymphatique. Les explants vestibulaires témoins étaient placés en incubation dans les mêmes conditions de traitement avec le volume de véhicule propre à chaque molécule.

**Tableau 5** : Molécules utilisées pour étudier les mécanismes d'influx et d'efflux potassiques.

Molécule	Cible	Concentration	Temps de traitement	Véhicule
<b>Gentamicine (solution)</b>	Inhibiteur des canaux TME	1 ; 3 et 5 mM	2 h	Eau ultra pure (moins de 5 %)
<b>Chlorure de Gadolinium hexahydraté (poudre)</b>	Inhibiteur des canaux TME	0,1 ; 0,3 et 1 mM	2 h	NaCl 0,9% (2,5 %)
<b>Bumétanide (poudre)</b>	Inhibiteur de NKCC1	0,05 ; 0,1 et 0,15 mM	0,5 h	DMSO (0,125 %)
<b>Ouabaïne octahydratée (poudre)</b>	Inhibiteur de Na/K-ATPase	0,15 ; 0,5 et 1 mM	2 h	Eau ultra pure (5 %)

La cible moléculaire, le temps de traitement et la concentration finale étudiée sont donnés pour chaque molécule. Le véhicule utilisé pour solubiliser la molécule, ainsi que leur pourcentage (volume / volume) dans le milieu de culture sont indiqués pour chaque traitement.

## 5. Exposition aux solvants aromatiques

### 5.1. Solvants aromatiques étudiés

Les solvants aromatiques étudiés dans les expérimentations avec des cultures 3D d'explants d'utricules ou d'ampoules sont décrits dans le [tableau 6](#).

Le LogP est un paramètre qui caractérise la lipophilie d'une molécule : plus sa valeur est élevée, plus la molécule est lipophile. Chacune de ces molécules comporte un cycle benzénique avec une ou plusieurs chaînes latérales : le styrène possède une chaîne latérale insaturée, le toluène un seul groupement méthyle, l'éthylbenzène une chaîne latérale à 2 carbones et les xylènes deux groupements méthyle dont les positions autour du noyau différencient les 3 isomères. Pour tous les solvants aromatiques, le seuil de solubilité dans l'eau à 25°C est supérieur à 1 mM.

**Tableau 6** : Caractéristiques des solvants aromatiques étudiés.

Solvant aromatique	Cochléotoxicité (oui / non)	Fournisseur	Pureté	Poids moléculaire (g / mol)	Seuil de solubilité (mM)	LogP	Structure chimique
<b>Styrène</b>	Oui	Acros Organics	99%	104,15	2,88	2,95	
<b>Toluène</b>	Oui	VWR	≥ 99,5%	92,14	5,70	2,73	
<b>Ethylbenzène</b>	Oui	Acros Organics	99,8%	106,17	1,60	3,15	
<b>p-Xylène</b>	Oui	Acros Organics	99%	106,16	1,55	3,15	
<b>m-Xylène</b>	Non	Acros Organics	≥ 99%	106,16	1,50	3,2	
<b>o-Xylène</b>	Non	Sigma-Aldrich	99,5%	106,16	1,69	3,12	

Le fournisseur, la pureté, le numéro de lot, le poids moléculaire, le LogP et la structure chimique sont indiqués pour chaque solvant aromatique. Pour chacun des solvants, la concentration seuil de solubilité dans l'eau (à 25°C) est précisée.

## 5.2. Méthode d'exposition aux solvants aromatiques

La méthode d'exposition utilisée pour étudier les effets des solvants aromatiques sur les cultures 3D d'utricules ou d'ampoules est dite directe et statique (Bakand and Hayes, 2010), c'est-à-dire que les solvants sont ajoutés directement dans le milieu de culture.

Chaque solvant aromatique était mélangé avec du milieu DMEM-F12 dans une fiole jaugée pour préparer des solutions de concentrations différentes : 0,25, 0,5, 0,75 et 1 mM pour le styrène et 0,75 mM pour les autres solvants.

Ensuite, les préparations de solvants étaient transférées dans des flacons chimiques en verre de 8 ml avec 140  $\mu$ l de N<sub>2</sub> ( $\approx$  2 %). Le volume de la préparation de solvants était ajusté de manière à ne pas contenir de phase gazeuse qui favoriserait la stagnation du solvant dans ce compartiment. Les flacons étaient immédiatement scellés avec un bouchon en Téflon et une capsule d'aluminium de façon à éviter l'évaporation des solvants. Ensuite, la capsule était retirée pour placer la culture 3D dans le flacon avant de le sertir de nouveau et de le placer en incubation à 37°C.

Les cultures 3D étaient maintenues dans ces conditions durant 2 h ou 72 h. Les mesures de la concentration en K<sup>+</sup> étaient réalisées au 7<sup>ème</sup> jour de culture. L'exposition des échantillons de 2 h était réalisée au 7<sup>ème</sup> jour de culture, tandis que celle de 72 h se faisait du 4<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> jour de culture. Les cultures 3D témoins étaient placées en incubation dans le même milieu de culture sans solvant et dans les mêmes flacons en verre scellés durant 2 h ou 72 h. Les durées d'exposition aux solvants aromatiques ont été choisies de façon à étudier leurs effets pharmacologiques, de durée brève (2 h), ou leurs effets cytotoxiques dont l'étude nécessite une durée prolongée (72 h).

## 6. Histologie

### 6.1. Inclusion des explants vestibulaires

#### 6.1.1. Inclusion en résine

Les cultures 3D utriculaires ou ampullaires étaient fixées durant 24 h, à 4°C, dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % préparée dans du tampon cacodylate 0,2 M.

Ensuite les échantillons étaient rincés dans du tampon cacodylate 0,2 M, post-fixés 1 h à l'obscurité, dans une solution de tétraoxyde d'osmium à 1 % préparée dans du cacodylate 0,2 M, puis rincés de nouveau 1 h dans le tampon cacodylate. Les cultures 3D étaient ensuite stockées à 4°C dans de l'éthanol à 70 %.

Les échantillons étaient déshydratés dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (70, 80, 90 et 100 %). Les échantillons étaient ensuite inclus dans une résine époxy contenant 25,3 % d'Epon<sup>®</sup>, 55,8 % d'anhydride dodécénylsuccinique, 15,2 % d'araldite, 2 % de dibutylphtalate et 1,6 % de 2,4,6-Tris (diméthylaminoéthyle) phénol. L'inclusion des échantillons était réalisée dans des concentrations croissantes d'un mélange d'oxyde de propylène et de résine ; 1 h d'un mélange 50 % résine / 50 % oxyde de propylène dans un premier temps, 1 h d'un mélange 75 % résine / 25 % oxyde de propylène dans un deuxième temps et dans un bain de résine pure durant une nuit pour finir.

Pour éviter que les échantillons ne reposent directement dans le fond du moule d'inclusion, une fine tranche de cerveau, préalablement fixée dans du liquide de Bouin puis déshydratée selon les étapes décrites précédemment, était placée en dessous de chaque échantillon. Chaque explant était orienté de façon à ce que l'épithélium sensoriel soit parallèle au fond du moule d'inclusion. Les moules d'inclusion étaient ensuite placés sous vide dans un dessiccateur durant 1 h pour permettre le débullage puis placés à 30°C durant une nuit. Après vérification sous loupe binoculaire de la position des échantillons dans leur moule d'inclusion, ceux-ci étaient portés à 60°C durant 24 h pour solidifier la résine. Les blocs de résine polymérisée étaient ensuite sortis de leur moule d'inclusion et conservés à température ambiante.

### 6.1.2. Inclusion dans la paraffine

Les explants utriculaires ou ampullaires étaient placés dans une solution de formaldéhyde à 4 % préparée dans du PBS et tamponnée à pH 6,9 durant 24 h à 4°C.

Ensuite, les échantillons étaient rincés au PBS (3 bains de 10 minutes sous agitation) avant d'être colorés à l'encre histologique dans le but de les localiser dans le bloc de paraffine. Les structures étaient de nouveau rincées avant d'être stockées dans de l'éthanol 70 % à 4°C.

Les échantillons étaient progressivement déshydratés avec un automate de déshydratation (STP 120, Myr) dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes : 2 bains de 1 h dans l'éthanol 70 %, 1 bain de 1 h dans l'éthanol 80 %, 1 bain de 1 h dans l'éthanol 90 % et 3 bains de 1 h dans l'éthanol absolu. L'étape d'éclaircissement était réalisée avec 3 bains de xylène de 1 h. Les échantillons étaient ensuite imprégnés dans de la paraffine liquide permettant sa substitution au xylène ; un bain de 3 h dans la paraffine Richard Allan de type 1 et un bain de 3 h dans la paraffine Richard Allan de type 9. Ensuite, les échantillons étaient placés et orientés, sous loupe binoculaire, dans un moule d'inclusion en plastique rempli avec de la paraffine Richard Allan de type 9. Les moules d'inclusion étaient finalement placés sur une plaque réfrigérée pour permettre le durcissement de la paraffine.

### 6.2. Microscopie optique

Les échantillons enrobés de résine étaient débités au microtome (EM UC7 ultramicrotome, Leica) pour obtenir des coupes transversales de 2,5 µm d'épaisseur. Les coupes étaient déposées sur lame dans une goutte de bleu de toluidine préalablement filtrée (10 mg dans 40 ml d'eau distillée) puis observées au microscope optique (BX41, Olympus). Les photos des coupes étaient obtenues à l'aide d'une caméra (TXD14c, Baumer Optic) et du logiciel Archimed.

### 6.3. Immunohistochimie par révélation enzymatique de la caspase-3

Les échantillons enrobés de paraffine étaient débités au microtome (Microm HM340E Rotatory microtome, Thermo Fisher Scientific) pour obtenir des coupes de 4  $\mu\text{m}$ . Les coupes étaient déposées sur lame, puis séchées une nuit à 37°C avant d'être conservées à 4°C.

Le déparaffinage des coupes était réalisé dans 3 bains de xylènes successifs (5 min chacun) et la réhydratation était réalisée dans des bains de concentration décroissante d'éthanol (absolu à 80 %) et terminée dans de l'eau ultrapure.

Le démasquage antigénique des lames était réalisé dans du tampon Na-citrate (10 mM à pH 6) à 120°C durant 10 minutes. Pour réduire le marquage non spécifique, les peroxydases endogènes étaient neutralisées avec du peroxyde d'hydrogène à 3 %. Après deux rinçages à l'eau ultrapure et dans un tampon PBS-Tween (PBS 0,1 %, Tween 20) durant 5 minutes, les sites non spécifiques étaient bloqués avec du sérum normal de chèvre (5 % dans du TBST-1X) durant 1 h à température ambiante.

Les lames étaient ensuite placées en incubation avec l'anticorps primaire anti-caspase-3 clivée (provenance : lapin, dilution : 1/800, Cell Signaling) dans du SignalStain® Antibody diluent (Cell Signaling) durant une nuit à 4°C. Au terme de cette incubation, les coupes étaient rincées avec 3 bains de 3 minutes de TBST (Tris Buffered Saline Tween).

Les lames étaient placées en incubation avec le réactif de détection contenant l'enzyme peroxydase (SignalStain® Boost Detection Reagent, HRP, Lapin, Cell Signaling) durant 30 minutes à température ambiante suivi d'un rinçage dans 3 bains de TBST. L'immuno-réaction était révélée en ajoutant le 3,3'-diaminobenzidine (DAB) et les coupes étaient contre-colorées à l'hémalum de Mayer. Les coupes étaient montées dans du milieu de montage Eukitt® et observées au microscope optique (BX41, Olympus). Les images étaient obtenues avec la caméra (TXD14c, Baumer Optic) et le logiciel Archimed.

#### 6.4. Microscopie électronique à transmission

Les échantillons enrobés de résine étaient débités à l'ultramicrotome (EM UC7 ultramicrotome, Leica) pour obtenir des coupes transversales de 80 nm. Les coupes étaient déposées sur des grilles en cuivre puis séchées sur du papier Whatman.

Les grilles contenant les coupes ultrafines étaient déposées dans une goutte d'acétate d'uranyle (5 % dans de l'eau milliQ, préalablement filtrée à 0,2 µm) durant une heure. Ensuite les grilles étaient rincées dans de l'eau ultrapure dégazée, puis séchées en utilisant du papier Whatman. Ensuite les grilles étaient déposées dans une goutte de citrate de plomb (1,54 g dans 25 ml d'eau ultrapure contenant de la soude, préalablement filtrée à 0,2 µm) durant une heure.

Après 3 rinçages des grilles dans des gouttes d'eau ultrapure dégazée, celles-ci étaient séchées sur du papier Whatman avant d'être analysées au microscope électronique à transmission (HT 7700, Hitachi) à 100 kV.

#### 6.5. Microscopie électronique à balayage

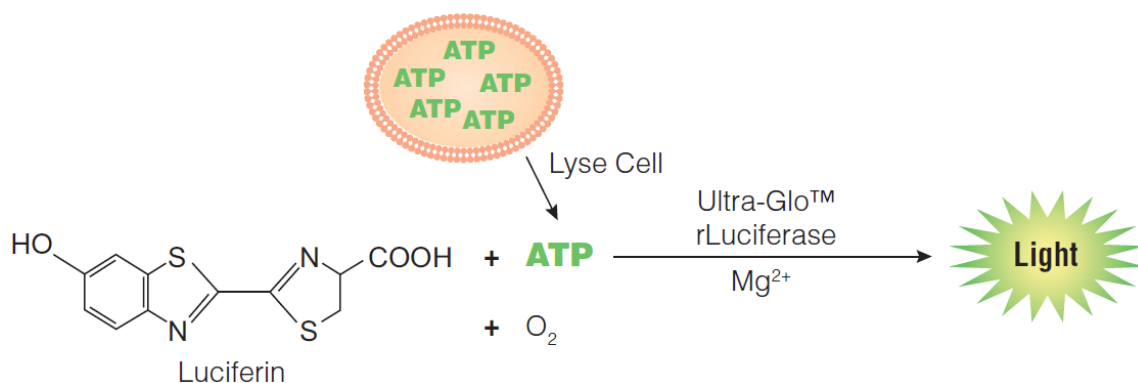
Les explants vestibulaires étaient placés dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 %, préparée extemporanément dans du tampon cacodylate 0,2 M à 4°C. Après 24 h de fixation, la membrane recouvrant l'épithélium sensoriel (macula ou crête ampullaire) était délicatement retirée à l'aide d'une aiguille. Les échantillons étaient rincés avec 2 bains de 1 h de tampon cacodylate 0,2 M préalablement filtré à 0,22 µm, post-fixés dans une solution de tétraoxyde d'osmium à 1 % préparée dans du cacodylate 0,2 M durant 1 h, puis de nouveau rincés durant 1 h dans le tampon cacodylate 0,2 M filtré. Les échantillons étaient placés dans des capsules poreuses de 0,3 µm (Microsystemes SAS, Leica) avant d'être déshydratés dans des bains d'éthanol filtré de concentrations croissantes allant de 25 à 100 %. Les échantillons étaient ensuite séchés dans un appareil à point critique utilisant du CO<sub>2</sub> liquide (EM CDP300, Leica), puis collés sur un plot en laiton par une pastille adhésive double face en carbone conducteur (Electron Microscopy Sciences).

Pour finir, les échantillons étaient métallisés à l'or durant 150 secondes et conservés sous vide jusqu'à leur observation en microscopie électronique à balayage (Jeol 7400F) à 2 kV.

## 7. ATPmétrie

La quantité d'ATP mesurée dans les cultures 3D reflète le niveau de cellules métaboliquement actives. La quantité d'ATP des explants utriculaires ou ampullaires était mesurée par bioluminescence avec le kit CellTiter-Glo 3D Viability Assay (Promega) (Figure 21).

Les explants vestibulaires étaient décollés de la lamelle et placés dans 100  $\mu$ l de milieu de culture DMEM-F12 dans une plaque 96 puits à fond plat blanc (Greiner Bio-One). Pour déterminer la quantité d'ATP présente dans les échantillons, 3 gammes étalons étaient réalisées à chaque mesure avec différentes concentrations de rATP (Promega) diluées dans du milieu de culture (0 à 0,8  $\mu$ M). Ensuite, 100  $\mu$ l de réactif CellTiter-Glo 3D étaient ajoutés dans chaque puits pendant 5 minutes d'incubation sous agitation, suivies de 25 minutes sans agitation à température ambiante. Au terme de ces 30 minutes, la luminescence de la plaque était mesurée avec un lecteur de microplaque (Synergy™ HTX multi-mode microplate reader, BioTek Instruments).



**Figure 21 : Mesure de la quantité d'ATP avec le CellTiter-Glo 3D.**

La quantification de l'ATP repose sur le principe de la bioluminescence. Le réactif du CellTiter-Glo 3D possède une activité lytique pour lyser toutes les cellules de l'échantillon, une enzyme luciférase recombinante thermorésistante, le substrat luciférine, de l'oxygène et du magnésium. La lyse des cellules de l'échantillon libère l'ATP intracellulaire permettant la réaction d'oxyluciférine par la formation du complexe luciférase-luciférine. Cette réaction enzymatique émet des photons quantifiables avec un luminomètre.



## 8. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés comme la moyenne des mesures expérimentales répétées  $\pm$  écart-type à la moyenne. Une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur était utilisée pour analyser la différence entre les groupes expérimentaux. Les résultats statistiques s'expriment de la manière suivante :

$$F(\text{dfb}, \text{dfr}) = F\text{-ratio} ; p = p \text{ value}$$

où dfb est le degré de liberté inter-groupe et dfr est le degré de liberté intra-groupe. Une analyse post hoc était réalisée avec un test de Dunnett pour comparer les variations entre les groupes de différentes concentrations d'agents pharmacologiques ou de styrène et les groupes de différents solvants. Un test posthoc LSD était réalisé pour comparer les variations de concentrations potassiques entre les différents groupes J2 à J9. Un test de Student était utilisé pour comparer deux conditions expérimentales. Le seuil de significativité a été fixé à 95 % ( $p = 0,05$ ).

## **CHAPITRE III.**

## **RESULTATS**

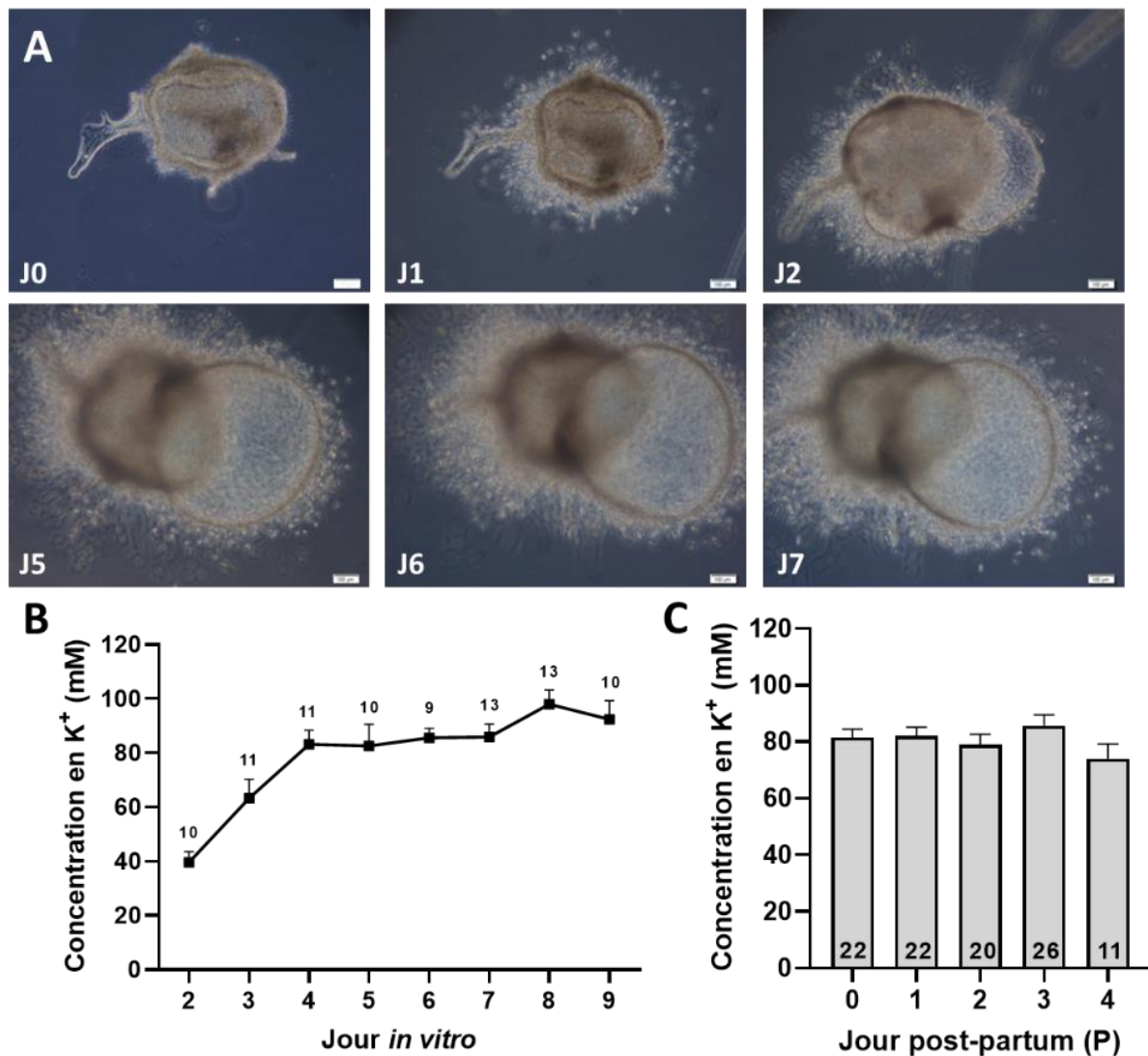
## 1. Évolutions morphologique et fonctionnelle des cultures 3D

### 1.1. Culture tridimensionnelle d'explant d'utricule

Des photographies prises chaque jour depuis la mise en culture de l'utricule dans le Matrigel® jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour de culture (J7) ont permis d'illustrer le développement morphologique des cultures 3D d'utricule. La [figure 22.A](#) montre qu'après un jour de culture, des cellules fusiformes ressemblant à des fibroblastes apparaissent autour de la structure. À partir de J2, l'explant se referme sur lui-même pour former le compartiment endolymphatique. En effet, l'utricule paraît gonflé et une petite vésicule est visible (cyste). À J5, cette petite vésicule atteint sa taille maximale et reste inchangée jusqu'à J7 ([Figure 22.A](#)).

La concentration de potassium dans le compartiment endolymphatique des cultures 3D utriculaires a été mesurée de J2 jusqu'à J9 à l'aide d'une microélectrode contenant une membrane échangeuse d'ions K<sup>+</sup> ([Figure 22.B](#)). Étant donné que la vésicule apparaît à partir du 2<sup>ème</sup> jour de culture, la concentration en K<sup>+</sup> a été mesurée à partir de J2. L'ANOVA à un facteur révèle que la concentration potassique est significativement [ $F = (7, 79) = 10,33$  ;  $p < 0,001$ ] différente en fonction du jour de culture. La courbe indique une augmentation progressive de la concentration de K<sup>+</sup> mesurée entre J2 et J4 ( $39,5 \pm 3,9$  mM à J2 ;  $63,2 \pm 6,9$  mM à J3 et  $83,1 \pm 5,2$  mM à J4). Une comparaison des groupes entre eux avec le test post hoc LSD indique que la concentration en K<sup>+</sup> mesurée à J2 et J3 est significativement ( $p < 0,05$ ) plus faible que celle mesurée entre J4 et J9. Par ailleurs, la concentration potassique atteint un plateau entre le J4 et J7 ( $82,5 \pm 7,9$  mM à J5 ;  $85,5 \pm 3,4$  mM à J6 et  $85,8 \pm 4,8$  mM à J7) avant d'augmenter légèrement à partir de J8 ( $97,9 \pm 5,1$  mM à J8 et  $92,3 \pm 6,9$  mM à J9). Néanmoins, le test post hoc LSD ne révèle pas de différence significative ( $p > 0,05$ ) de la concentration en K<sup>+</sup> entre J4 et J9. De ce fait, on peut considérer que la concentration en K<sup>+</sup> mesurée est stable à partir de J4.

La concentration potassique endolymphatique des explants utriculaires cultivés durant 7 jours a été mesurée en fonction de l'âge du rat (jour post-partum : P) (Figure 22.C). L'ANOVA à un facteur ne révèle aucune différence entre les groupes [ $F(4, 96) = 1,13$  ;  $p = 0,346$ ], indiquant ainsi que le développement des cultures 3D d'utricule n'est pas dépendant de l'âge du rat.



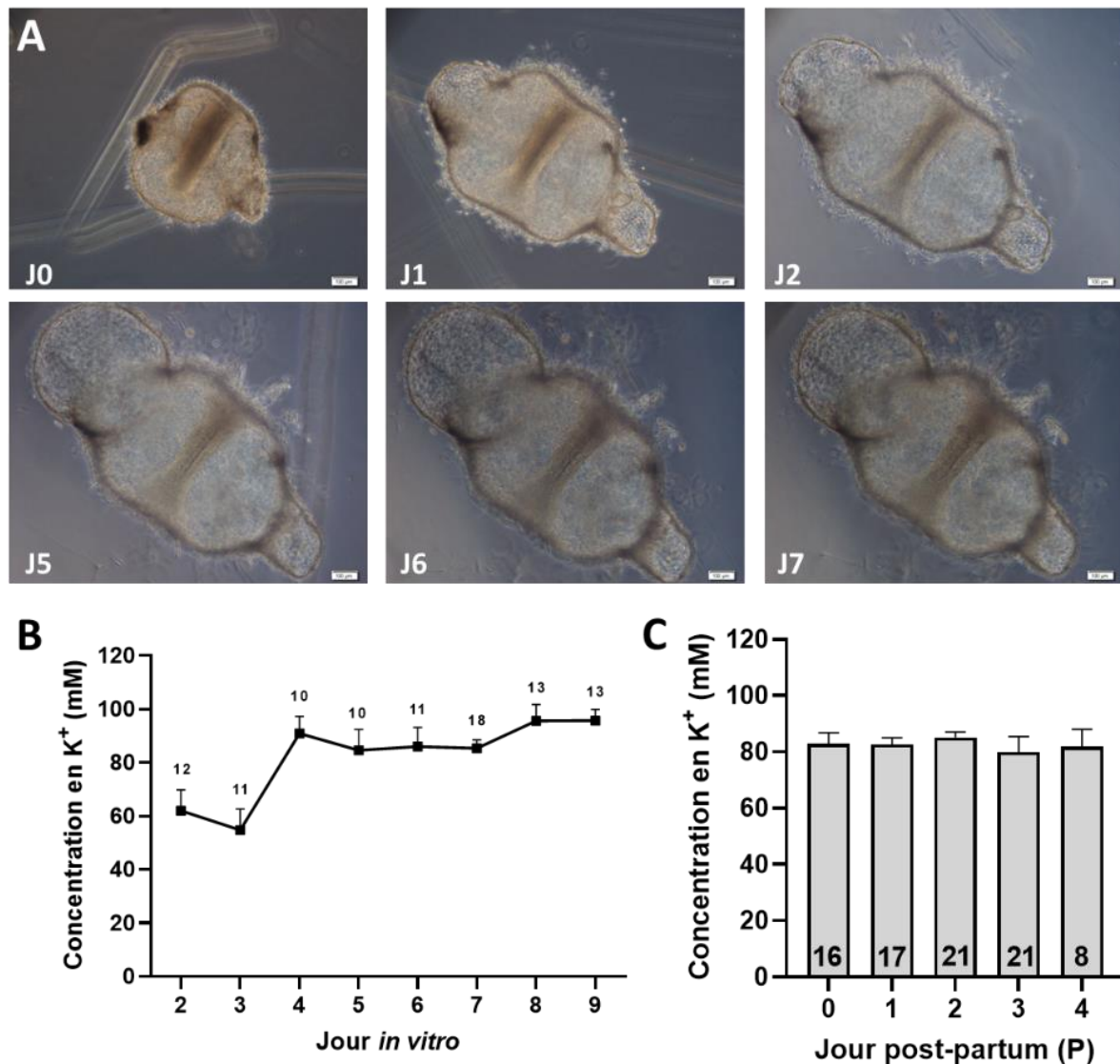
**Figure 22 : Développements morphologique et fonctionnel des cultures 3D d'utricule-.** (A) Utricule de rat nouveau-né prélevé à 2 jours post-partum (P2) depuis la mise en culture jusqu'à J7 – microscopie optique. Le jour de culture est indiqué en bas à gauche de chaque photo (J0-J7). Barre d'échelle = 100  $\mu$ m. (B) Concentration de potassium endolymphatique d'explants d'utricule P0-P4 mesurée de J2 à J9. (C) Concentration en K<sup>+</sup> d'explants utriculaires cultivés durant 7 jours en fonction de l'âge des rats nouveau-nés (P). Moyenne  $\pm$  écart-type à la moyenne, le nombre d'échantillons utilisés pour chaque groupe est indiqué au-dessus des points (B) ou en dessous des barres d'histogramme (C).

## 1.2. Culture tridimensionnelle d'explant d'ampoule

Le développement morphologique des cultures 3D d'ampoule est mis en évidence avec des photographies de la structure prises depuis le jour de prélèvement et de mise en culture des ampoules jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour de culture. La [figure 23.A](#) montre que le compartiment endolymphatique apparaît dès le premier jour de culture dans le Matrigel® (J1) ; la structure ampullaire apparaît gonflée et une petite vésicule est déjà visible. Comme pour les explants utriculaires, des cellules fusiformes s'apparentant à des fibroblastes entourent la structure ampullaire. À J2, le volume de la vésicule augmente légèrement et atteint sa taille maximale à J5. La taille de la vésicule reste constante jusqu'à J7 ([Figure 23.A](#)).

La concentration en  $K^+$  a été mesurée dans le compartiment endolymphatique des cultures 3D d'ampoules de J2 à J9 ([Figure 23.B](#)). L'ANOVA à un facteur révèle une augmentation de la concentration potassique en fonction du jour de culture [ $F = (7, 90) = 5,93$  ;  $p < 0,001$ ]. La courbe [26.B](#) montre une augmentation de la concentration en  $K^+$  dans les explants ampullaires entre J2 et J4 ( $62,0 \pm 7,7$  mM à J2 ;  $54,7 \pm 7,9$  mM à J3 et  $90,8 \pm 6,4$  mM à J4). La comparaison des groupes avec un test post hoc LSD indique que la concentration en  $K^+$  à J2 et J3 est significativement ( $p < 0,05$ ) plus faible que celle mesurée entre J4 et J9. En revanche, il n'y a pas de différence significative de la concentration en  $K^+$  entre J4 et J9 ( $84,6 \pm 7,7$  mM à J5 ;  $85,9 \pm 7,1$  mM à J6 ;  $85,3 \pm 3,0$  mM à J7 ;  $95,5 \pm 6,1$  mM à J8 et  $95,6 \pm 4,1$  mM à J9), indiquant que la concentration potassique reste stable durant cette période de culture et à partir de J4, malgré une légère augmentation à partir de J8.

Pour vérifier que l'âge du rat nouveau-né n'est pas un facteur limitant dans le développement des cultures, la concentration potassique endolymphatique a été mesurée dans des explants ampullaires, prélevés à partir de rats P0-P4 et cultivés durant 7 jours ([Figure 23.C](#)). L'ANOVA à un facteur indique qu'il n'y a aucune différence entre les groupes [ $F (4, 82) = 0,25$  ;  $p = 0,905$ ]. La concentration potassique mesurée dans les cultures 3D d'ampoules n'est donc pas dépendante de l'âge (P0-P4) du rat nouveau-né.



**Figure 23 : Développements morphologique et fonctionnel de cultures 3D d'ampoule.**

(A) Ampoule de rat nouveau-né prélevé à 2 jours post-partum (P2) depuis la mise en culture jusqu'à J7 – microscopie optique. J0-J7 : jour de culture. Barre d'échelle = 100  $\mu$ m. (B) Concentration du potassium endolymphatique d'explants ampullaires P0-P4 mesurée de J2 à J9. (C) Concentration potassique d'explants ampullaires cultivés durant 7 jours en fonction de l'âge des rats nouveau-nés (P). Moyenne  $\pm$  écart-type à la moyenne, le nombre d'échantillons utilisés est indiqué au-dessus des points (B) ou en dessous des barres d'histogramme (C).

## 2. Histologie des cultures d'explants vestibulaires

La culture dans le Matrigel® des explants utriculaires et ampullaires a permis la formation d'un compartiment endolymphatique rempli d'un liquide riche en potassium ( $85,83 \pm 4,83$  mM à J7 pour les utricules et  $85,32 \pm 3,09$  mM à J7 pour les ampoules) (Figures 22.B et 23.B). La concentration potassique élevée de l'endolymphe résulte d'un équilibre ionique entre la sécrétion et l'absorption du  $K^+$  qui est assuré par différentes cellules vestibulaires. La préservation de toutes les cellules impliquées dans le cycle du  $K^+$  a été vérifiée par différentes techniques histologiques dans les cultures 3D d'utricules et d'ampoules. Ce chapitre décrit les caractéristiques morphologiques des différents types cellulaires composant les cultures d'utricules et d'ampoules. Étant donné que la concentration de  $K^+$  est stable entre le 4<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour de culture, les différentes analyses histologiques des cultures 3D d'ampoules et d'utricules ont été réalisées à J7.

### 2.1. Culture tridimensionnelle d'explants utriculaires

#### 2.1.1. Organisation cellulaire

Pour différencier les types cellulaires en fonction de leur forme et de la position de leur noyau, les échantillons ont été observés en microscopie optique. La figure 24 montre l'organisation cellulaire des cultures 3D d'explants d'utricules.

La figure 24.A montre trois zones cellulaires distinctes d'une coupe d'utricule cultivé (P2J7) :

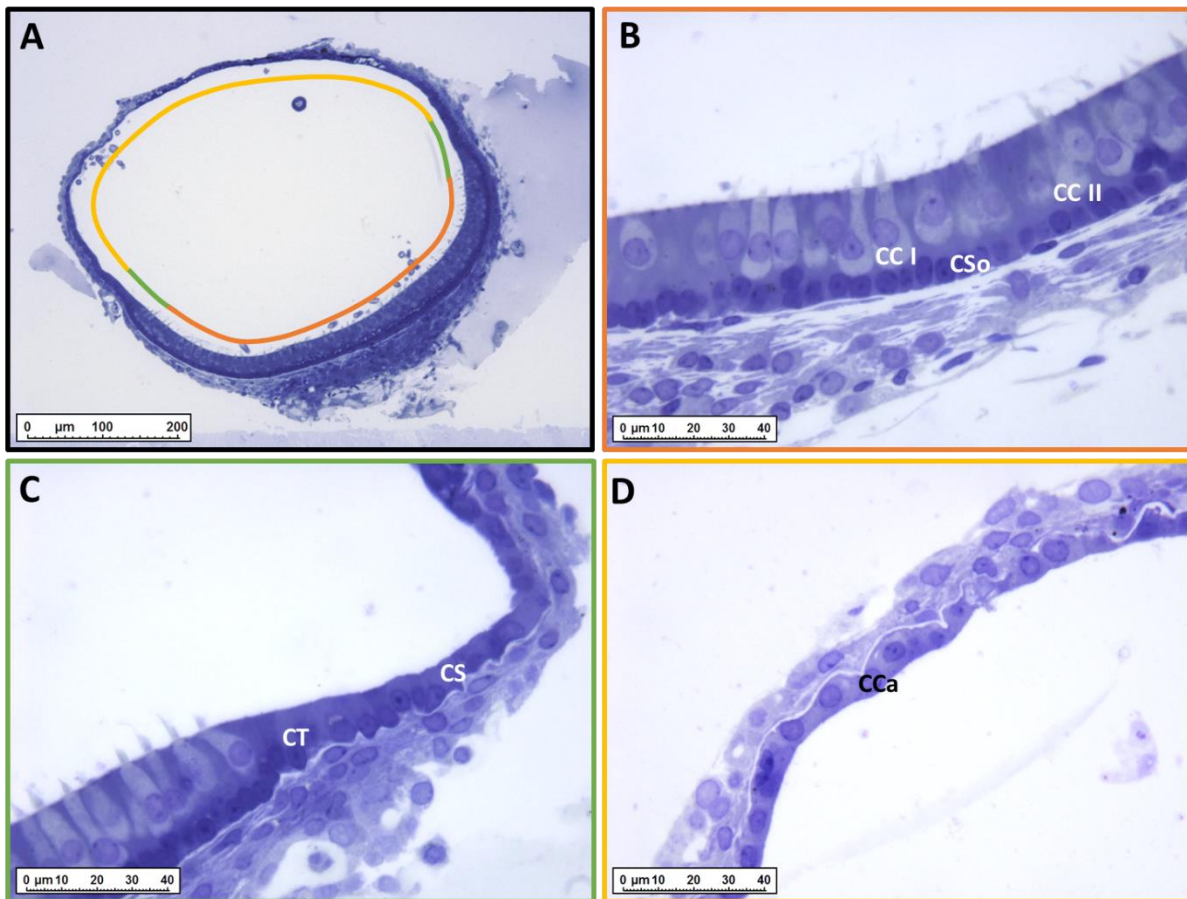
- l'épithélium sensoriel qui comprend des cellules ciliées imbriquées dans des cellules de soutien ;
- les aires de cellules sécrétrices jouxtant l'épithélium sensoriel qui sont composées de cellules transitionnelles et de cellules sombres ;
- la zone de cellules canalaire, cellules non sensorielles et non sécrétrices, qui recouvre entièrement l'épithélium sensoriel pour refermer la structure et définir le compartiment endolymphatique.

La [figure 24.B](#) montre les deux types de cellules ciliées vestibulaires au niveau de l'épithélium sensoriel. Les cellules ciliées de type I (CC I) sont piriformes, tandis que les cellules ciliées de type II (CC II) sont en forme de bâtonnet. Les cellules de soutien (CSo), identifiables par leur noyau en position basale, s'intercalent entre les cellules ciliées et reposent sur la lame basale. Le tissu sous-jacent de l'épithélium sensoriel, de structure plus lâche, est composé de cellules fusiformes ; il s'apparente à un tissu conjonctif.

La [figure 24.C](#) montre les aires sécrétrices du  $K^+$ , qui bordent l'épithélium sensoriel. Elles sont constituées de cellules transitionnelles (CT) et de cellules sombres (CS). Jouxant l'épithélium sensoriel, les cellules transitionnelles sont identifiables par leur forme allongée. Les cellules sombres, accolées aux cellules transitionnelles, sont reconnaissables par leur forme cubique et leur noyau en position basale.

La [figure 24.D](#) montre les cellules canalaire (CCa) qui recouvrent entièrement l'épithélium sensoriel et qui sont de forme allongée avec un noyau en position centrale.



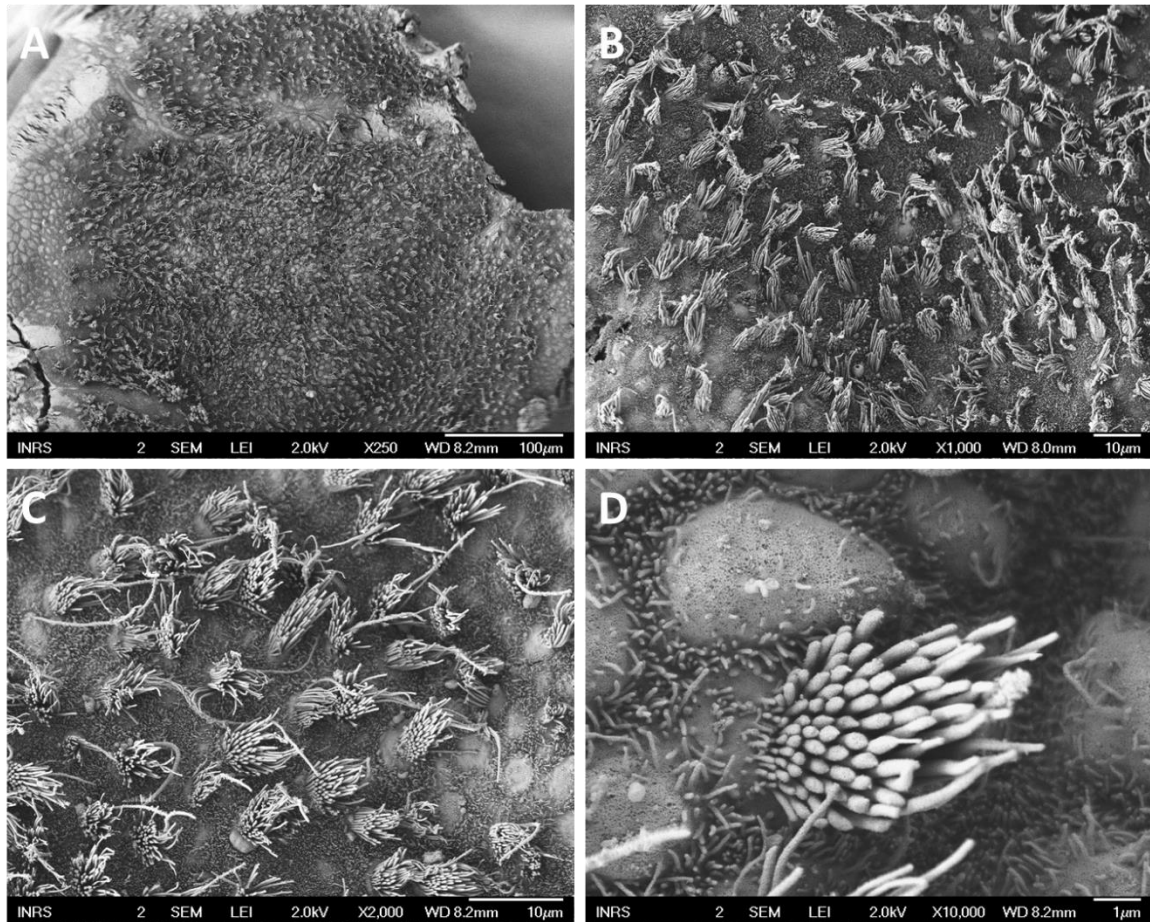


**Figure 24 : Composition cellulaire de culture 3D d'utricules - Microscopie optique.**

(A) Structure close comprenant une zone sensorielle (en orange), des zones sécrétrices (en vert) et une zone de cellules canalaire (en jaune). (B) Épithélium sensoriel comprenant les cellules ciliées de type I et de type II (CC I et CC II) et les cellules de soutien (CSo). (C) Zones sécrétrices composées de cellules transitionnelles (CT) et de cellules sombres (CS). (D) Cellules canalaire (CCa) recouvrant entièrement l'épithélium sensoriel. Barre d'échelle = 200 µm (A) et 40 µm (B, C, D).

### 2.1.2. Surface apicale de l'épithélium sensoriel

La surface apicale de l'épithélium sensoriel des cultures d'utricules 3D (P1J7) a été observée au MEB (Figure 25). La figure 25.A montre la concavité de la macula tapissée de touffes ciliaires. La polarisation des cellules ciliées, identifiées par la présence de stéréocils, est conservée après 7 jours de culture. Les figures 25.B-C montrent que les cellules ciliées sont délimitées par des cellules de soutien exprimant des microvillosités à l'apex. La figure 25.D montre que les touffes ciliaires des cellules ciliées sont composées de stéréocils disposés en rangées régulières de taille croissante ressemblant à des tuyaux d'orgue.



**Figure 25 : Épithélium sensoriel des cultures 3D utriculaires - observation au MEB de la partie apicale**

(A) Touffes ciliaires tapissant la macula de forme concave. (B - C) Zones revêtues de microvillosités entourant les touffes ciliaires. (D) Touffes composées de stéréocils organisés en rangées de taille croissante. Barre d'échelle = 100  $\mu\text{m}$  (A), 10  $\mu\text{m}$  (B et C) et 1  $\mu\text{m}$  (D).

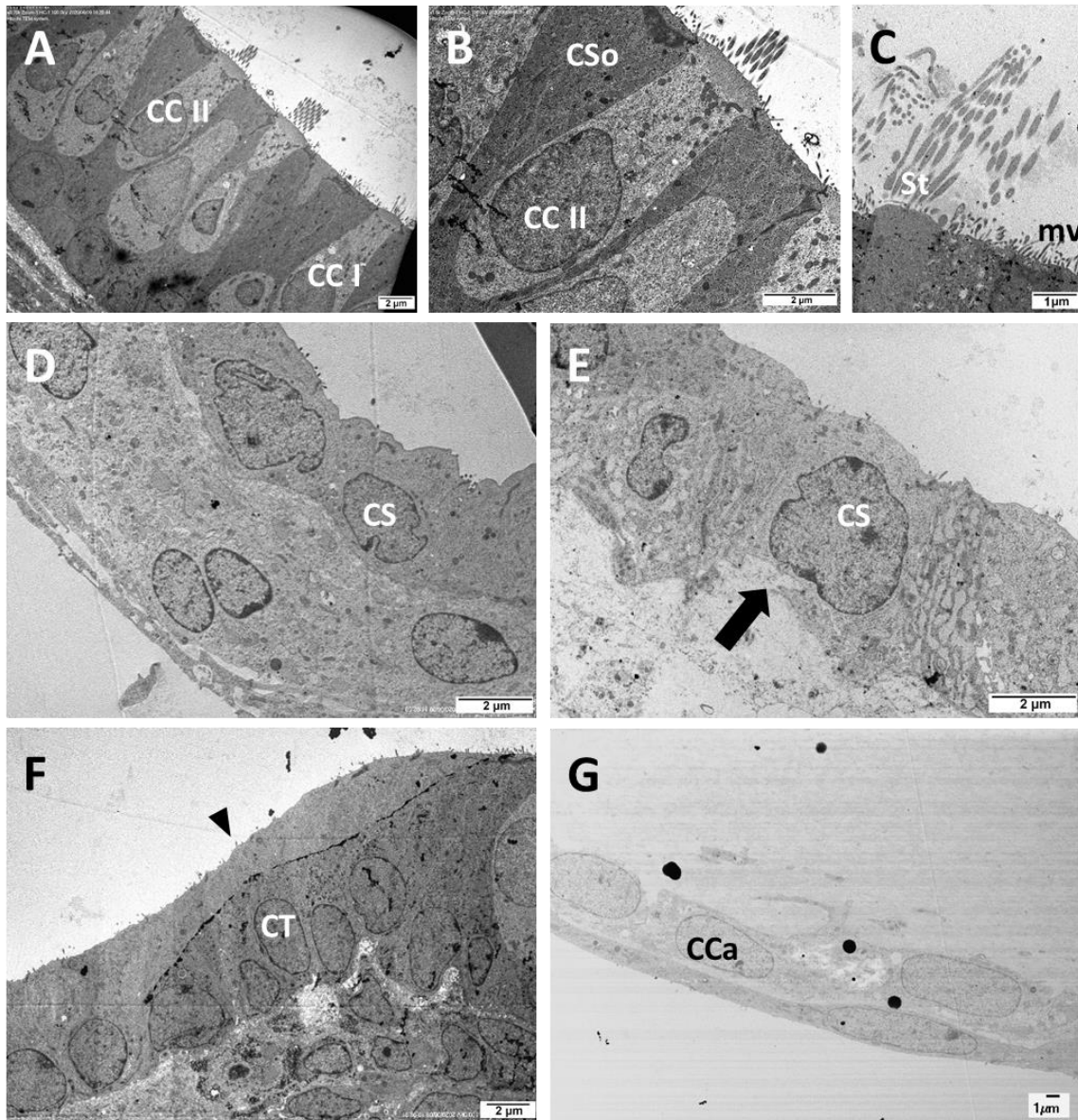
### 2.1.3. Ultrastructure des cellules utriculaires

L'ultrastructure des cellules des cultures d'utricules (P3-4 J7) a été observée en MET (Figure 26). Les images A, B et C de la figure 26 montrent que l'épithélium sensoriel est composé de cellules ciliées (type I et II) où s'intercalent des cellules de soutien entre chacune d'elles. Les cellules ciliées sont coiffées de stéréocils au niveau du pôle apical, tandis que les cellules de soutien présentent des microvillosités. Comme observé en microscopie optique, les noyaux des cellules de soutien sont en position basale et leur pôle basal repose sur la lame basale.

La figure 26.D-E montre que les cellules sombres forment une monocouche de cellules cubiques. Leur noyau en position basale est très invaginé par rapport à celui des autres cellules de l'utricule. De nombreuses vacuoles dans le cytoplasme sont visibles, ce qui traduit une forte activité sécrétrice des cellules (Köppl *et al.*, 2018). La partie apicale des cellules sombres ne comporte pas de microvillosité et la partie basale présente de nombreuses invaginations. Les caractéristiques des cellules sombres des cultures 3D d'utricules sont conformes avec celles décrites *in vivo* (Coppens *et al.*, 2004; Kawasaki *et al.*, 1992; Pitovski and Kerr, 2002).

La figure 26.F montre les cellules transitionnelles, de forme allongée, bordant la zone sensorielle. Leur pôle apical présente des microvillosités et leur noyau de forme ronde est localisé en position basale.

La figure 26.G montre les cellules canalaire de forme allongée avec un noyau allongé en position centrale.



**Figure 26 : Ultrastructure cellulaire des cultures 3D d'utricules - MET.**

(A - B) Epithélium sensoriel composé de cellules ciliées de type I (CC I) et de type II (CC II) et de cellules de soutien (CSo). (C) Cellules ciliées coiffées de stéréocils (st) et cellules de soutien, microvillosités (mv). (D - E) Cellules sombres de forme cubique avec un noyau invaginé et des vacuoles dans le cytoplasme. La flèche noire montre des invaginations membranaires au niveau de leur pôle basal. (F) Cellules transitionnelles de forme allongée et coiffées de microvillosités (triangle noir). (G) Cellules canalaire allongées comportant un noyau de forme allongée. Barre d'échelle = 1  $\mu\text{m}$  (C et G) et 2  $\mu\text{m}$  (A, B, D, E et F).

## 2.2. Culture tridimensionnelle d'explants ampullaires

### 2.2.1. Organisation cellulaire

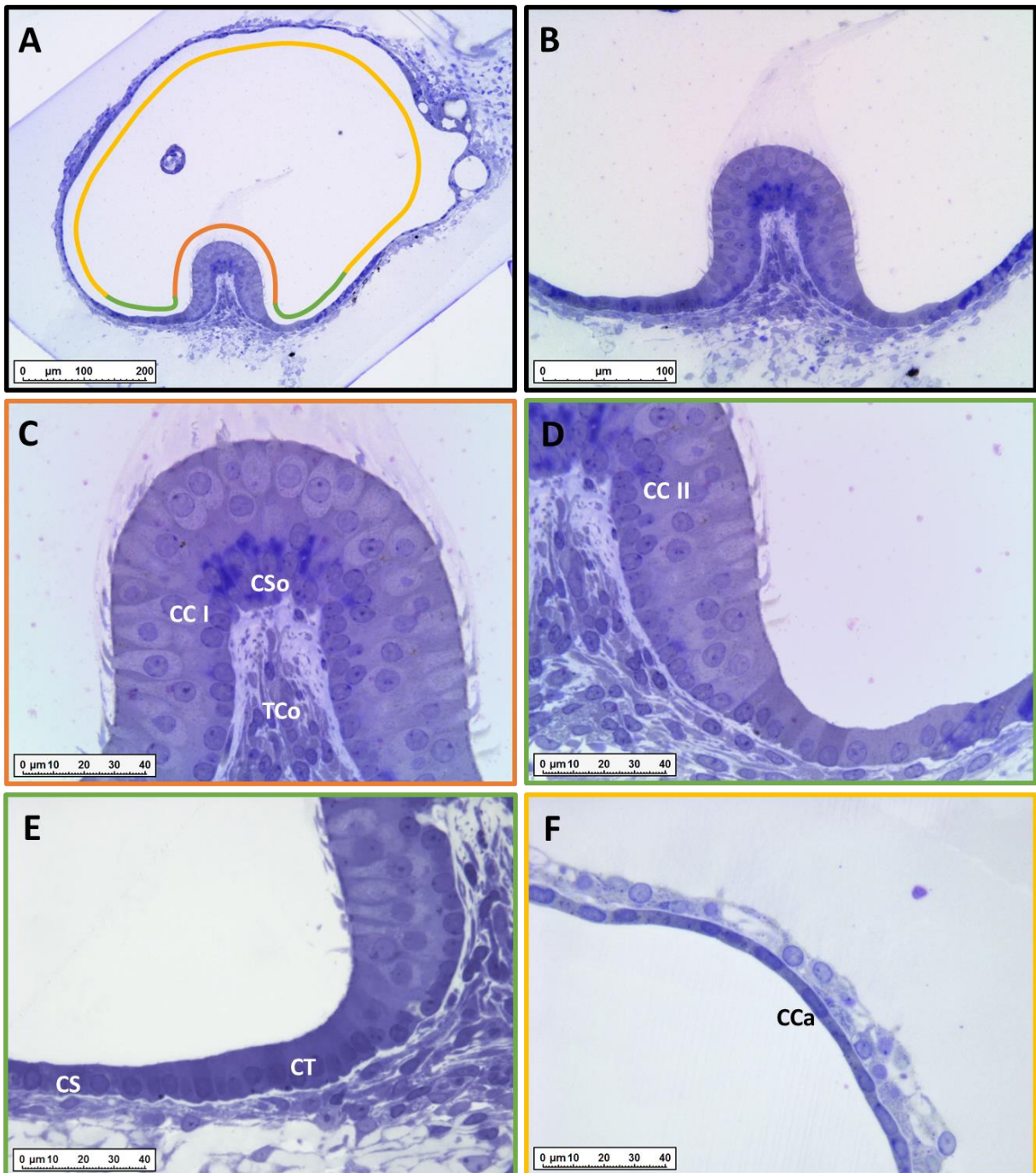
Les cultures 3D d'ampoules ont été observées en microscopie optique pour différencier les différents types cellulaires. La [figure 27](#) montre l'organisation cellulaire générale des cultures 3D d'explants ampullaires (P1J7).

La [figure 27.A](#) montre une structure close renfermant le compartiment endolymphatique. À la différence des cultures 3D d'utricules, l'épithélium sensoriel des cultures 3D d'ampoules constitue un renflement à la base de l'ampoule, appelé crête ampullaire ([figure 27.B-C](#)).

La [figure 27.C](#) illustre les cellules composant l'épithélium sensoriel. Les cellules ciliées de type I et II sont distribuées sur toute la surface de la crête ampullaire et sont séparées entre elles par des cellules de soutien. Les cellules ciliées de type I (CC I) sont identifiables par leur forme en amphore, tandis que les cellules ciliées de type II (CC II) le sont par leur forme en bâtonnet. Les cellules de soutien (CSo), reposant directement sur la lame basale, comportent un noyau en position basale. Du tissu conjonctif (TCo), mis en évidence par leur structure lâche et la présence de cellules fusiformes, est observé en dessous des cellules de soutien.

La [figure 27.D-E](#) illustre les aires sécrétrices de chaque côté de la crête ampullaire. Ces zones sont composées de cellules transitionnelles (TC), identifiables par leur forme allongée, et des cellules sombres (CS) cubiques avec un noyau en position basale.

La [figure 27.E](#) montre la partie de la zone des cellules canalaire qui recouvre entièrement la crête ampullaire. La forme allongée et leur noyau en position centrale sont caractéristiques des cellules canalaire.



**Figure 27 : Composition cellulaire de culture 3D d'ampoules - Microscopie optique.**

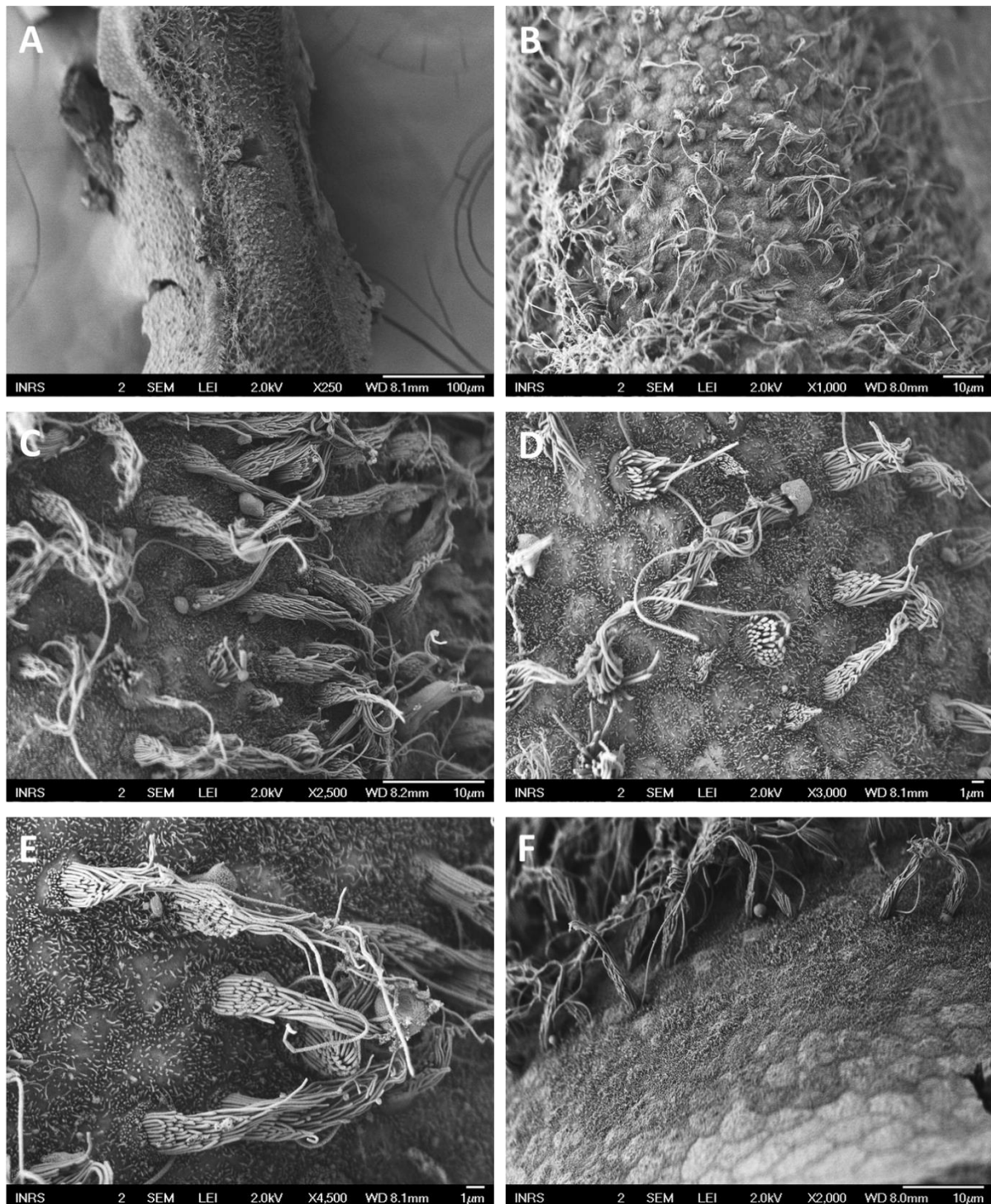
(A) Structure close comprenant une zone sensorielle (orange) flanquée de deux aires sécrétrices (vert) et d'une zone de cellules canalaies (jaune). (B) Zones sécrétrices localisées de part et d'autre de l'épithélium sensoriel. (C) Épithélium sensoriel comprenant des cellules ciliées de type I et II (CC I et CC II) ainsi que des cellules de soutien (CSo). TCo : tissu conjonctif (D - E) Cellules transitionnelles (CT) cellules sombres (CS) composant les aires sécrétrices. (F) La zone de cellules canalaies recouvrant entièrement l'épithélium sensoriel. Barre d'échelle = 200  $\mu\text{m}$  (A), 100  $\mu\text{m}$  (B) et 40  $\mu\text{m}$  (C - F).

### 2.2.2. Surface apicale de la crête ampullaire

La surface apicale de la crête ampullaire des cultures 3D d'ampoules (P3J7) a été observée au MEB (Figure 28). La figure 28.A-B montre que la surface de la crête ampullaire est incurvée et coiffée de touffes ciliaires. Après 7 jours de culture, les cellules ciliées sont polarisées et délimitées par des cellules de soutien exprimant des microvillosités au niveau de leur pôle apical (Figure 28. B).

La figure 28.C-E montre les touffes ciliaires sur les cellules ciliées composées de stéréocils ordonnés par taille croissante et surmontés d'une protubérance plus longue que les autres, appelée kinocil.

La figure 28.F montre une large zone coiffée de microvillosités qui s'étend au niveau des flancs de la crête ampullaire. Cette zone, qui jouxte l'épithélium sensoriel, est identifiée comme la partie d'une aire sécrétrice constituée principalement de cellules transitionnelles.



**Figure 28 : Crêtes ampullaires des cultures 3D - MEB.**

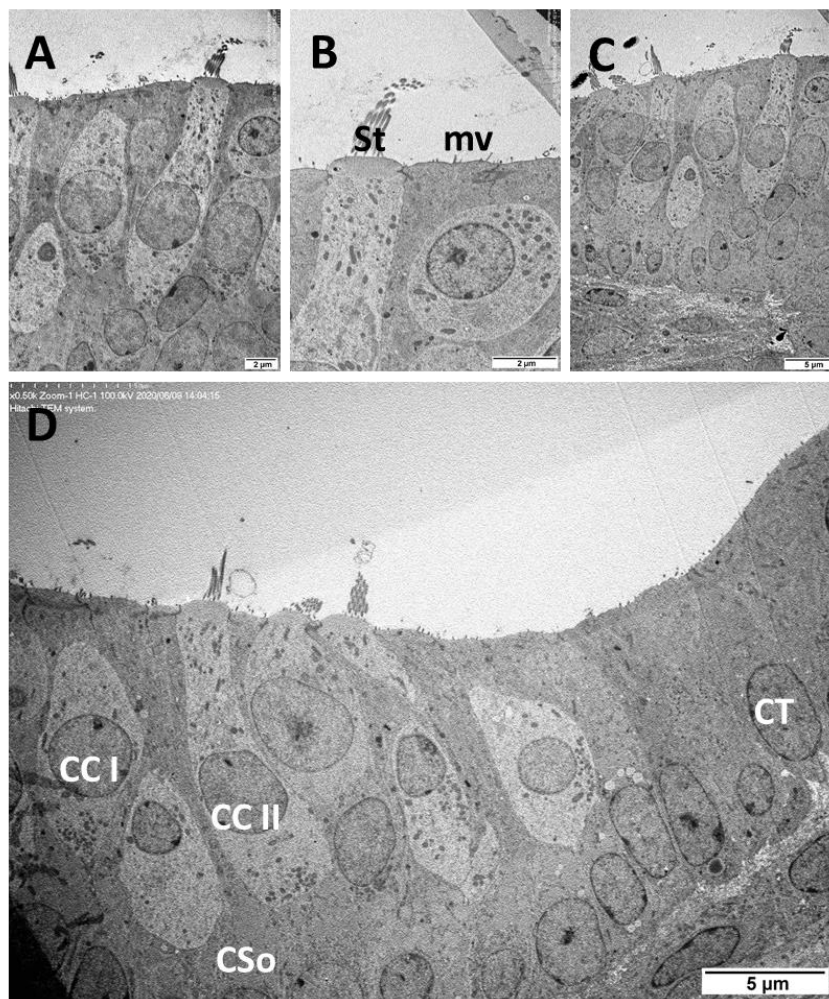
(A) Crête ampullaire de forme incurvée et coiffée de touffes ciliaires (B). (C - D) Touffes ciliaires entourées de microvillosités. (E) Touffes ciliaires composées de stéréocils ordonnés par taille croissante et surmontés d'un kinocil. (F) Cellules transitionnelles revêtues de microvillosités jouxtant la zone coiffée de touffes ciliaires. Barre d'échelle = 100  $\mu\text{m}$  (A), 10  $\mu\text{m}$  (B, C et F) et 1  $\mu\text{m}$  (D et E).



### 2.2.3. Ultrastructure cellulaire des cultures 3D ampullaires

Comme pour les cultures 3D utriculaires, l'ultrastructure des cultures 3D ampullaires (P1J7) a été observée en MET (Figures 29 et 30).

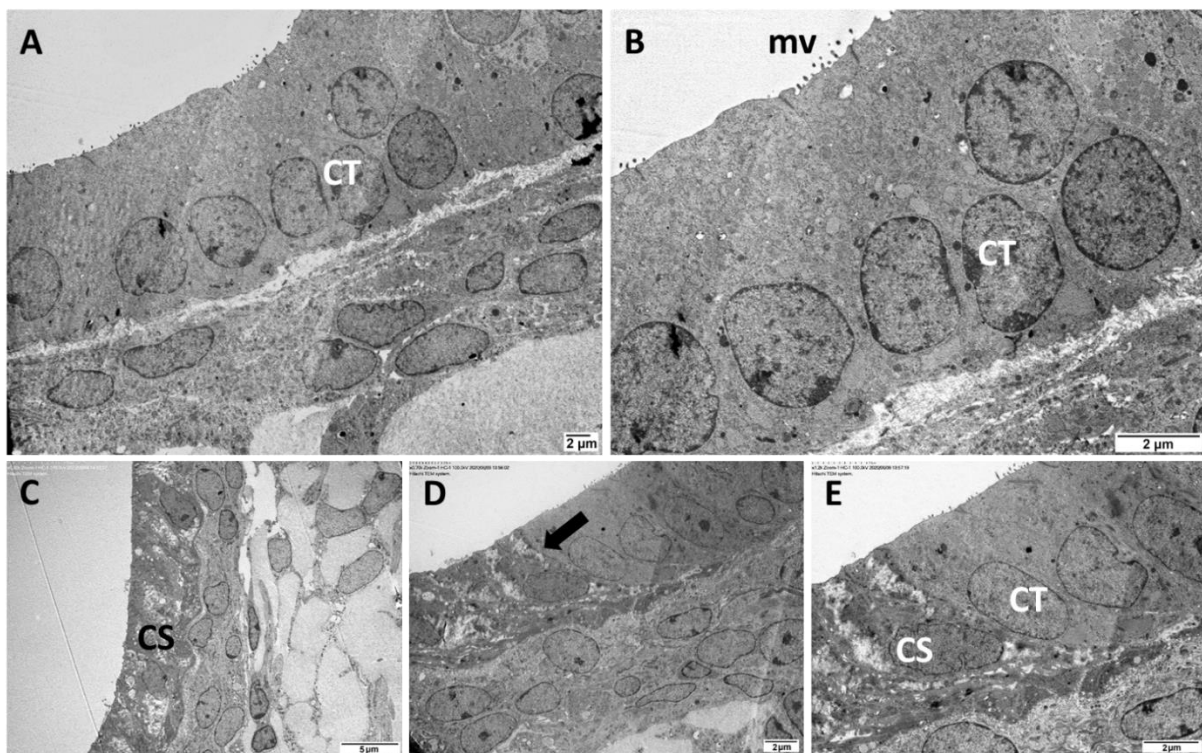
La figure 29 montre que l'épithélium sensoriel est aussi composé des deux types de cellules ciliées (I et II) qui s'intercalent entre des cellules de soutien. Seules les cellules de soutien sont en contact avec la lame basale. Les touffes ciliaires sont facilement visibles au niveau de la partie apicale alors que les cellules de soutien sont revêtues de microvillosités.



**Figure 29 : Ultrastructure cellulaire de l'épithélium sensoriel ampullaire - MET.**

(A - D) Deux types de cellules ciliées : de type I (CC I) et de type II (CC II) coiffées de stéréocils (St) (B). Les cellules de soutien (CSo) sont intercalées entre les CC et revêtues de microvillosités (mv). (D) Cellules transitionnelles (CT) prolongeant la zone sensorielle. Les cellules transitionnelles de forme allongée sont aussi revêtues de microvillosités. Barre d'échelle = 2 µm (A et B) et 5 µm (C et D).

Les figures 29.D et 30.A-B montrent l'aspect allongé des cellules transitionnelles qui bordent la zone sensorielle. Leur pôle apical est coiffé de microvillosités, de la même manière que celui des cellules de soutien. La figure 30.C montre les cellules sombres, qui ont les mêmes caractéristiques que celles des cultures 3D utriculaires. Des invaginations de leur membrane plasmique sont visibles aussi bien au niveau basal qu'au niveau de leur noyau cellulaire. Ces invaginations sont typiques des cellules sombres. La figure 30.D-E montre la délimitation entre la zone de cellules sombres et celle des cellules transitionnelles. Le cytoplasme très vacuolisé représente une caractéristique des cellules sombres qui les différencie des cellules transitionnelles.



**Figure 30 : Ultrastructure cellulaire de la zone sécrétrice ampullaire –MET.**

(A - B) Cellules transitionnelles de forme allongée avec microvillosités au niveau du pôle apical. (C) Cellules sombres très vacuolisées comportant un noyau invaginé en position basale. De nombreuses invaginations de la membrane plasmique sont visibles au niveau du pôle basal. (D - E) Délimitation entre cellules sombres et cellules transitionnelles (flèche noire). Barre d'échelle = 2  $\mu\text{m}$  (A-B et D-E) et 5  $\mu\text{m}$  (C).

### 3. Validation de la fonctionnalité des transporteurs potassiques

Rappelons que les voies d'entrée du potassium dans le compartiment endolymphatique peuvent être perturbées par des inhibiteurs : la bumétanide est un inhibiteur de NKCC1, tandis que l'ouabaïne inhibe la Na/K-ATPase.

Le gadolinium et la gentamicine bloquent de façon réversible les canaux de TME des stéréocils, ce qui inhibe les voies de sortie du K<sup>+</sup>.

#### 3.1. Effets des inhibiteurs d'influx de K<sup>+</sup> sur la concentration endolymphatique

Les effets de l'ouabaïne et de la bumétanide ont été étudiés pour comprendre les mécanismes d'influx de K<sup>+</sup> des cultures 3D d'utricules et d'ampoules (Figure 31). Les cultures (P0-4 J7) ont été traitées durant 2 heures avec 3 concentrations d'ouabaïne (0,15, 0,5 et 1 mM).

Les histogrammes A et B de la figure 31 indiquent que l'ouabaïne baisse de façon significative [utricules :  $F(3, 33) = 16,94$  ;  $p < 0,001$  – ampoules :  $F(3, 28) = 11,16$  ;  $p < 0,001$ ] la concentration en K<sup>+</sup> du compartiment endolymphatique ; l'amplitude de la baisse dépend de la concentration d'ouabaïne.

Pour les cultures 3D d'utricules, une baisse de 26 % est mesurée après un traitement avec 0,15 mM d'ouabaïne ( $59,6 \pm 5,9$  mM ;  $p = 0,008$ ), de 40 % avec 0,5 mM ( $48,2 \pm 6,3$  mM ;  $p < 0,001$ ) et de 63 % avec 1 mM ( $29,8 \pm 5,5$  mM ;  $p < 0,001$ ), par rapport au groupe témoin ( $81,7 \pm 5,0$  mM) (Figure 31.A).

Pour les cultures d'ampoules, une baisse de 24 % est mesurée avec 0,15 mM ( $66,7 \pm 7,4$  mM ;  $p = 0,041$ ), de 41 % avec 0,5 mM ( $51,6 \pm 6,9$  mM ;  $p = 0,001$ ) et de 60 % avec 1 mM ( $34,3 \pm 7,0$  mM ;  $p < 0,001$ ), par rapport au groupe témoin ( $87,9 \pm 3,8$  mM) (Figure 31.B).

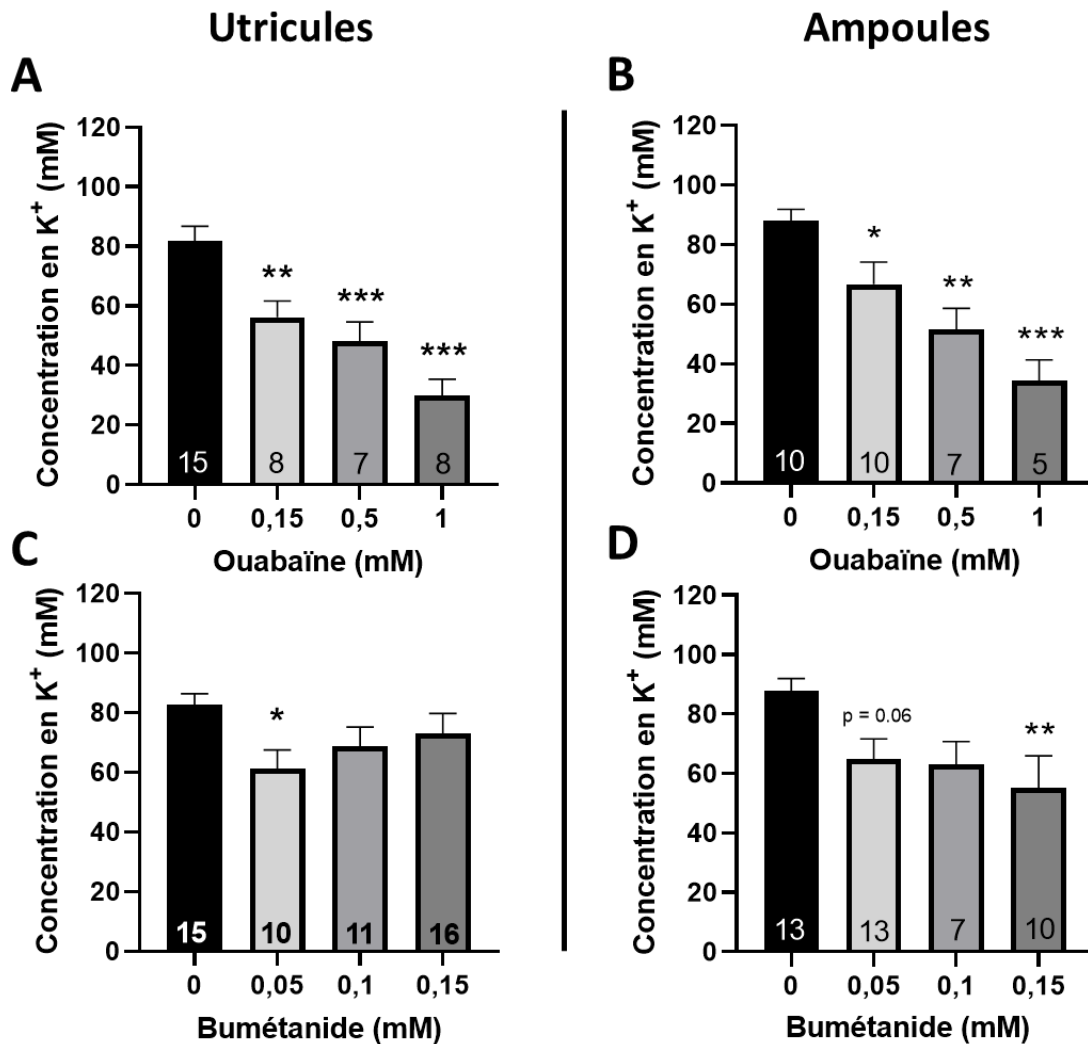
Les cultures 3D (P0-4 J7) ont été traitées durant 30 minutes avec 3 concentrations de bumétanide (0,05, 0,1 et 0,15 mM).

La [figure 31.C-D](#) indique que la bumétanide entraîne une légère baisse de la concentration  $K^+$  du compartiment endolymphatique, quelle que soit la concentration.

Pour les cultures 3D d'utricules, seule la plus faible concentration de bumétanide (0,05 mM) baisse de 26 % la concentration potassique du groupe traité ( $61,1 \pm 6,2$  mM ;  $p = 0,047$ ) par rapport au groupe témoin ( $82,7 \pm 3,5$  mM). Les concentrations de 0,1 et de 0,15 mM de bumétanide n'entraînent pas de baisse significative de la concentration potassique (groupe « bumétanide 0,1 mM » :  $68,6 \pm 6,4$  mM ; groupe « bumétanide 0,15 mM » :  $72,9 \pm 6,8$  mM). Même si la baisse de la concentration en  $K^+$  est significative après un traitement à 0,05 mM, le taux de variation est relativement faible et assez proche de celui obtenu après un traitement avec 0,1 et 0,15 mM. Donc, quelle que soit la concentration testée, la bumétanide entraîne une légère baisse de la concentration en  $K^+$  ([Figure 31.C](#)).

Pour les cultures 3D d'ampoules, une diminution de la concentration potassique est mesurée après traitement à la bumétanide [ $F(3, 39) = 3,88$  ;  $p = 0,016$ ]. Les taux de variation de la concentration potassique entre les témoins et ceux traités avec les 3 concentrations de bumétanide testées sont semblables, seule la plus forte concentration (0,15 mM) entraîne une baisse significative. Une baisse de la concentration potassique de 25 % est mesurée après un traitement avec 0,05 mM de bumétanide ( $64,9 \pm 6,9$  mM ;  $p = 0,060$ ), de 28 % avec 0,1 mM de bumétanide ( $62,9 \pm 7,8$  mM ;  $p = 0,095$ ) et de 37 % avec 0,15 mM de bumétanide ( $55,1 \pm 10,7$  mM ;  $p = 0,008$ ). Quelle que soit la concentration testée, la bumétanide entraîne une variation de la concentration potassique de faible amplitude ([Figure 31.D](#)).

L'ouabaïne et la bumétanide perturbent les voies d'entrée du potassium (influx de  $K^+$ ) dans le compartiment endolymphatique des cultures d'utricules et d'ampoules. Si l'ouabaïne entraîne une forte baisse de la concentration en  $K^+$  dont l'amplitude est fonction de la dose appliquée, en revanche la bumétanide induit une légère baisse de la concentration en  $K^+$  et cela, quelle que soit la concentration appliquée.



**Figure 31 : Effets des inhibiteurs de la Na/K-ATPase et de NKCC1 sur la concentration potassique endolymphatique.**

Concentration en K<sup>+</sup> de cultures 3D d'explants utriculaires (P0-P4 J7) (**A et C**), d'explants ampullaires (P0-P4 J7) (**B et D**) - Ouabaïne 0,15, 0,5 ou 1 mM durant 2 h (**A - B**) - Bumétanide 0,05 ; 0,1 ou 0,15 mM durant 30 min (**C - D**). Témoins : même durée avec leur véhicule correspondant. Moyenne ± écart-type à la moyenne. Le nombre d'échantillons par groupe est indiqué en dessous de chaque barre d'histogramme. Test de Dunnett : \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001.

### 3.2. Effets des inhibiteurs d'efflux de $K^+$ sur la concentration endolymphatique

Les effets du gadolinium et de la gentamicine ont permis d'étudier les mécanismes d'efflux de  $K^+$  des cultures 3D d'utricules et d'ampoules (Figure 32). Rappelons que les cultures 3D (P0-4 J7) ont été traitées durant 2 heures avec 3 concentrations de gadolinium (0,1, 0,5 et 1 mM).

La figure 32.A-B montre que le gadolinium augmente significativement [utricules :  $F(3, 38) = 6,156$  ;  $p = 0,001$  – ampoules :  $F(3, 56) = 2,618$  ;  $p = 0,059$ ] la concentration potassique.

Pour les cultures 3D d'utricules, seule la plus faible concentration de 0,1 mM de gadolinium augmente de 21 %, de façon significative ( $p = 0,012$ ), la concentration en  $K^+$  (groupe témoin :  $85,2 \pm 3,9$  mM ; groupe traité :  $103,8 \pm 5,1$  mM). La concentration de 0,3 mM n'entraîne pas de variation de  $K^+$  ( $79,2 \pm 6,7$  mM) et la concentration de 1 mM augmente non significativement ( $96,0 \pm 2,9$  mM ;  $p = 0,147$ ) la concentration en  $K^+$  (Figure 32.A). Contrairement aux cultures d'utricules, seule la concentration de 1 mM de gadolinium entraîne une augmentation significative de 25 % ( $p = 0,028$ ) de la concentration en  $K^+$  dans les cultures 3D d'ampoules (groupe témoin :  $81,4 \pm 4,9$  mM ; groupe traité :  $102,2 \pm 3,1$  mM). La concentration de  $K^+$  ne varie pas de façon significative après un traitement avec 0,1 mM ( $93,4 \pm 5,2$  mM) ou 0,3 mM de gadolinium ( $87,0 \pm 6,9$  mM) (Figure 32.B).

Les cultures 3D d'utricules (P0-4 J7) ont été traitées durant 2 heures avec 1 ou 3 mM de gentamicine et les cultures 3D d'ampoules (P0-4 J7) avec 1, 3 ou 5 mM de gentamicine.

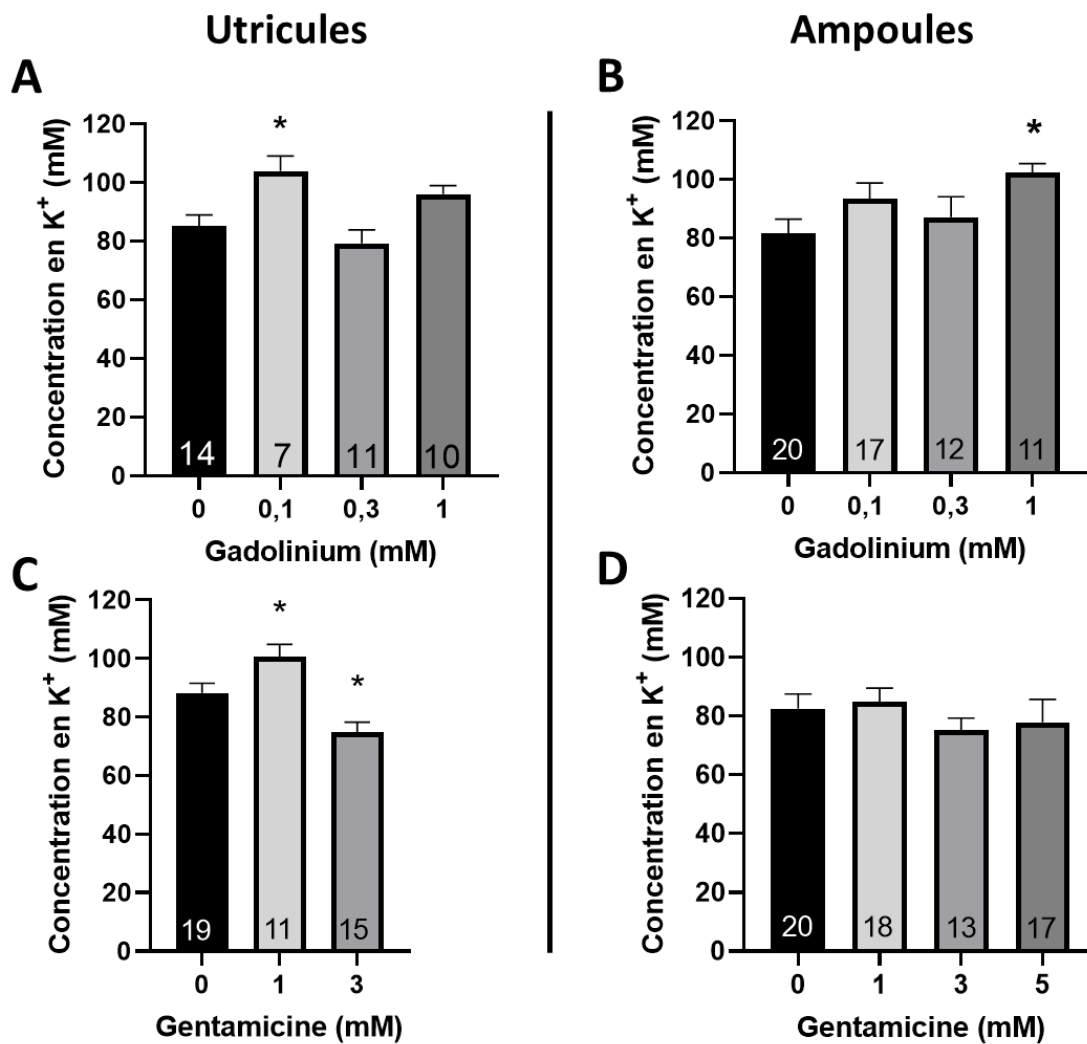
La figure 32.C-D montre que la gentamicine entraîne des variations de la concentration en  $K^+$  endolymphatique dans les cultures d'utricules mais pas dans les cultures d'ampoules [utricules :  $F(2, 42) = 11,15$  ;  $p < 0,001$  – ampoules :  $F(3, 64) = 0,536$  ;  $p = 0,658$ ].

Pour les cultures 3D d'utricules, le traitement à la gentamicine a un effet bi-phasique sur la concentration de  $K^+$ .

La concentration de gentamicine de 1 mM entraîne une augmentation significative ( $p = 0,043$ ) du  $K^+$  de 14 % ( $100,6 \pm 4,1$  mM), tandis que la concentration de gentamicine de 3 mM entraîne une baisse significative ( $p = 0,015$ ) de  $K^+$  de 15 % ( $74,8 \pm 3,4$  mM) par rapport au groupe témoin ( $88,2 \pm 3,2$  mM) (Figure 32.C).

À l'inverse, la gentamicine n'a aucun effet sur la concentration de  $K^+$  des cultures d'ampoules, quelle que soit la concentration testée (groupe témoin :  $82,5 \pm 5,0$  mM ; groupe traité « 1 mM » :  $84,9 \pm 4,6$  mM ; groupe traité « 3 mM » :  $75,3 \pm 4,0$  mM ; groupe traité « 5 mM » :  $77,9 \pm 7,7$  mM) (Figure 32.D).

En résumé, le gadolinium inhibe les voies de sortie du potassium (efflux de  $K^+$ ) dans les cultures 3D d'utricules (0,1 mM) et les cultures 3D d'ampoules (1 mM). Que ce soit pour les cultures 3D d'utricules ou d'ampoules, il n'y a pas eu d'effet dépendant de la concentration de gadolinium sur la concentration en  $K^+$ . La gentamicine inhibe aussi les efflux potassiques dans les cultures 3D d'utricules après un traitement de 1 mM mais n'a aucun effet sur la concentration en  $K^+$  dans les cultures 3D d'ampoules.



**Figure 32 : Effets des inhibiteurs des canaux de transduction mécano-électrique sur la concentration potassique endolymphatique.**

Concentration en K<sup>+</sup> de cultures 3D d'explants utriculaires (P0-P4 J7) (**A et C**), d'explants ampullaires (P0-P4 J7) (**B et D**) - Gadolinium 0,1 ; 0,3 ou 1 mM durant 2 h (**A - B**) - Gentamicine 1 ; 3 ou 5 mM durant 2 h (**C - D**). Témoins : 2 h avec leur véhicule correspondant. Moyenne ± écart-type à la moyenne. Le nombre d'échantillons par groupe est indiqué en dessous de chaque barre d'histogramme. Test de Dunnett : \*p < 0,05.



## 4. Effets des solvants aromatiques

### 4.1. Sur les cultures 3D d'utricules

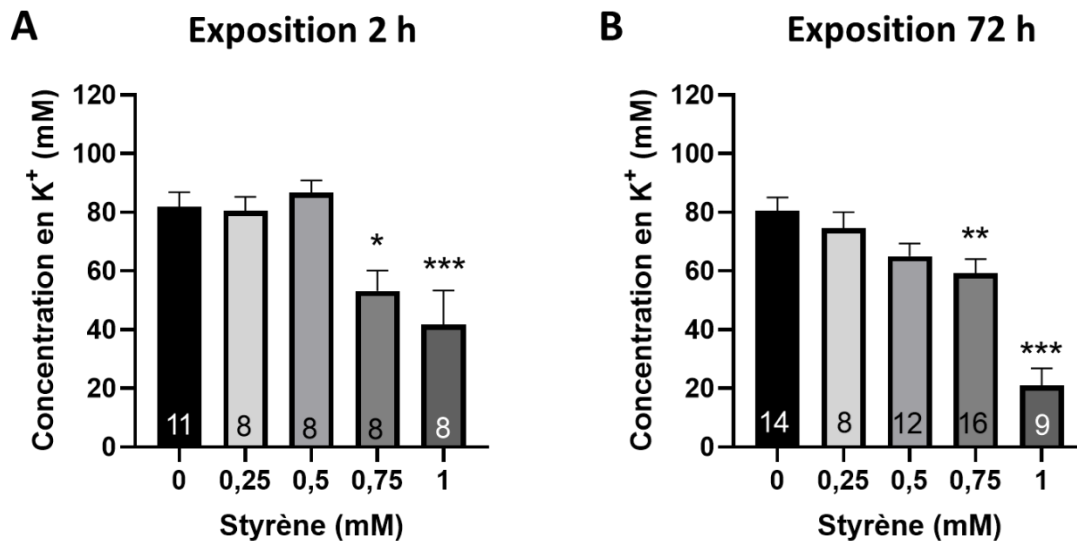
#### 4.1.1. Effet du styrène

##### 4.1.1.1. Sur la concentration en K<sup>+</sup>

Pour évaluer l'effet du styrène sur la concentration potassique endolymphatique, des cultures 3D d'utricules ont été exposées à 0,25, 0,5, 0,75 ou 1 mM de styrène pendant 2 h ou 72 h. Pour les cultures exposées au styrène durant 2 h, l'exposition et la mesure ont été réalisées à J7, et pour celles exposées durant 72 h, l'exposition a débuté à J4 pour que la mesure soit réalisée à J7. Cette période d'exposition a été choisie en raison de la stabilité de K<sup>+</sup> entre J4 et J7 (Figure 22.B).

Une exposition de 2 h ou de 72 h au styrène baisse significativement [2 h :  $F(4, 38) = 8,43$ ;  $p < 0,001$  – 72 h :  $F(4, 54) = 17,99$ ;  $p < 0,001$ ] la concentration en K<sup>+</sup> et la baisse dépend de la concentration de solvant (Figure 33).

La figure 33.A indique qu'après 2 h d'exposition, une baisse significative ( $p = 0,012$ ) de 35% de la concentration en K<sup>+</sup> est mesurée avec 0,75 mM ( $53,1 \pm 6,9$  mM) et une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de 49 % avec 1 mM ( $41,7 \pm 11,6$  mM) de styrène par rapport au groupe témoin ( $81,9 \pm 4,8$  mM). La figure 33.B indique qu'après 72 h d'exposition, une baisse significative ( $p = 0,004$ ) de 26 % est mesurée avec 0,75 mM de styrène ( $59,1 \pm 4,9$  mM) et une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de 73 % avec 1 mM de styrène ( $20,9 \pm 5,8$  mM) par rapport au groupe témoin ( $80,5 \pm 4,4$  mM).



**Figure 33 : Effets du styrène sur la concentration potassique endolymphatique des cultures 3D d'utricules.**

Concentration en K<sup>+</sup> de cultures 3D d'utricules (P0-4 J7) exposées à 0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ou 1 mM de styrène durant 2 h (A) ou 72 h (B). Moyenne ± écart-type à la moyenne. Le nombre d'échantillons par groupe est indiqué en dessous de chaque barre d'histogramme. Test de Dunnett : \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 ; \*\*\*p < 0,001.

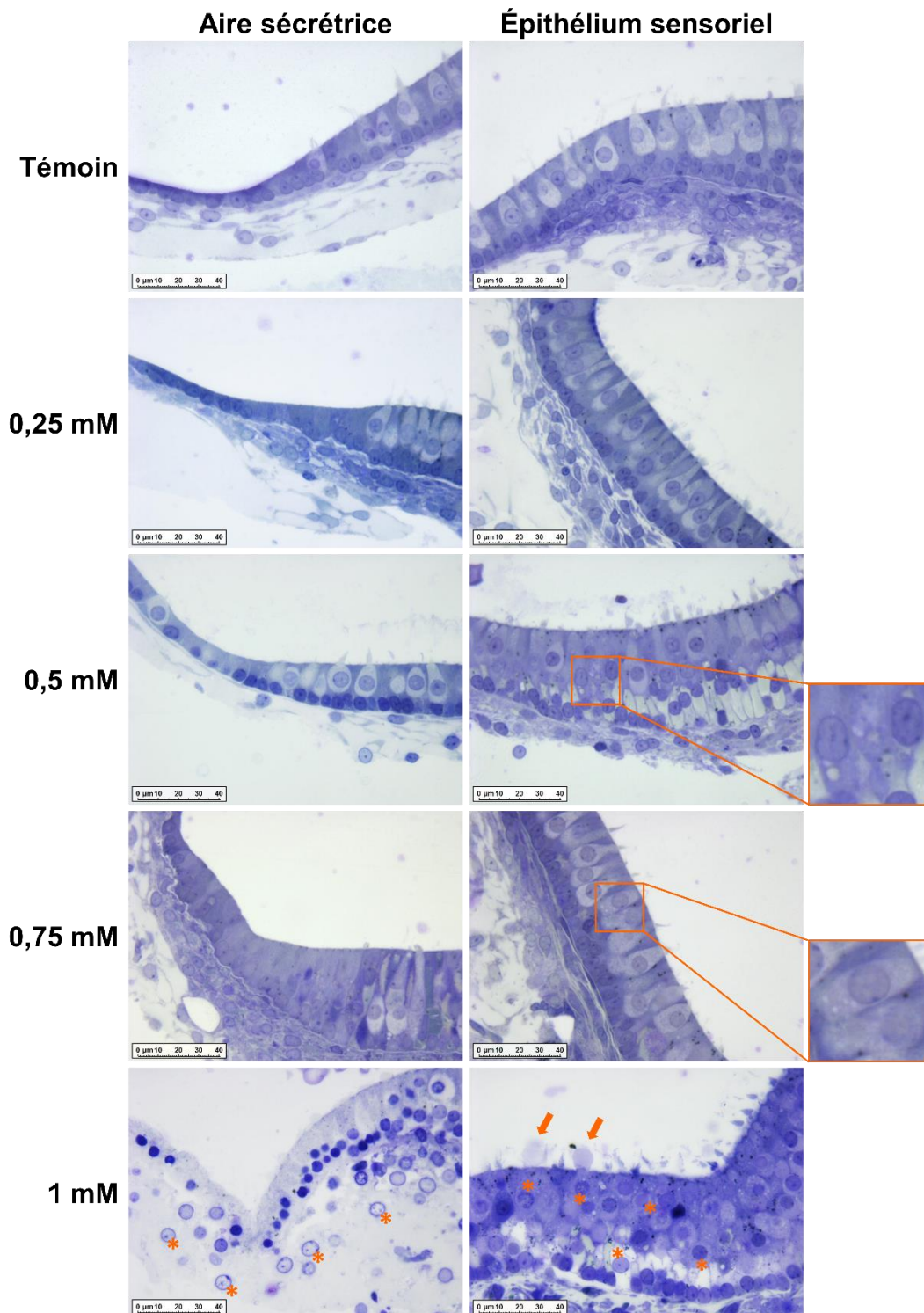
#### 4.1.1.2. Analyses histologiques

Les cellules des cultures d'utricules, exposées à 0, 0,25, 0,5, 0,75 ou 1 mM de styrène durant 2 h ou 72 h, ont été observées en microscopie optique (Figures 34 et 35).

Les cultures 3D utriculaires du groupe témoin (2 h ou 72 h) présentent une morphologie normale, comme décrit ci-dessus dans le paragraphe 2. Histologie des cultures d'explants vestibulaires.

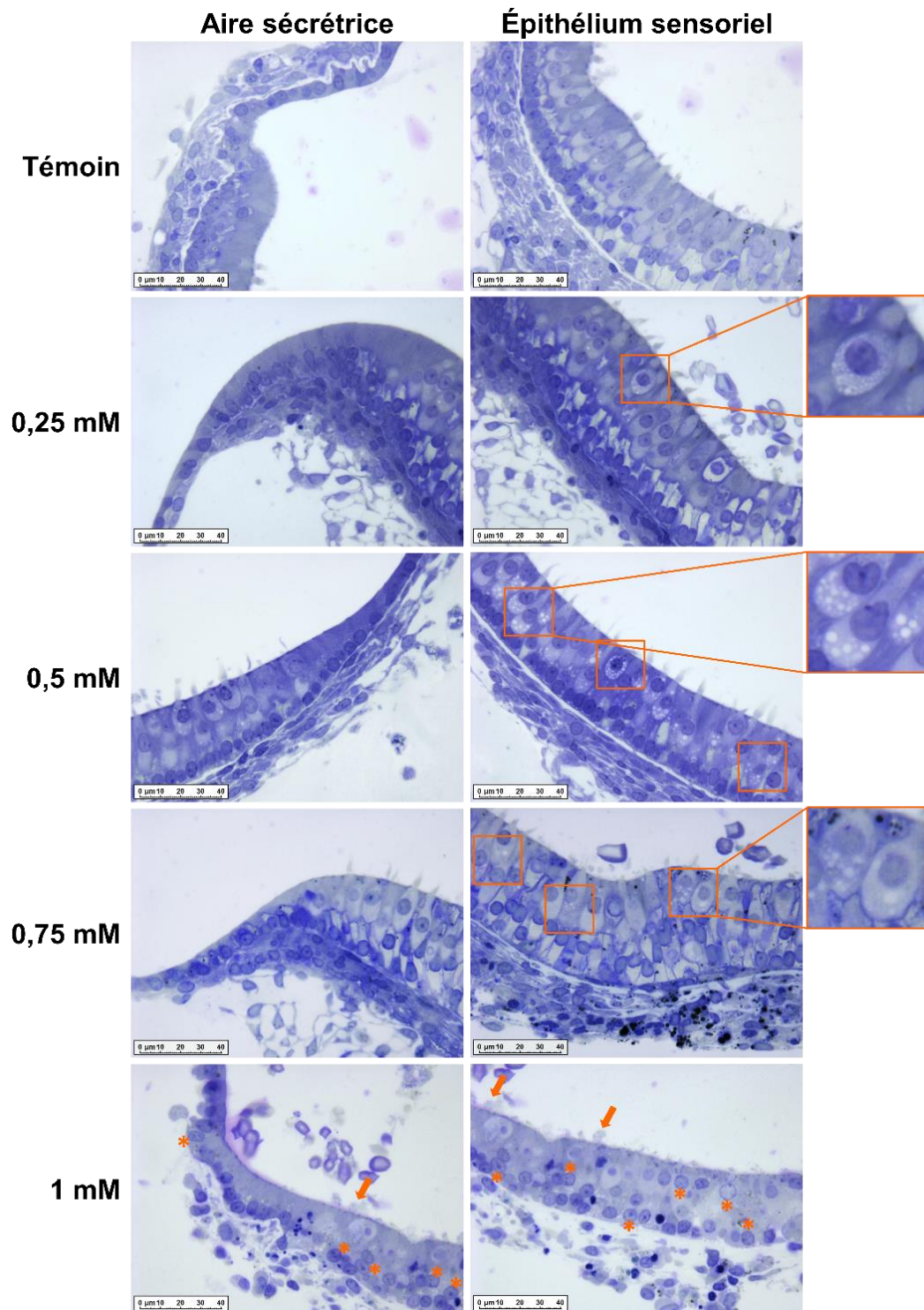
Les cultures 3D utriculaires exposées 2 h ou 72 h à 1 mM de styrène présentent des signes histopathologiques : noyaux gonflés, faible densité cytoplasmique et présence de vacuoles dans le cytoplasme. Ces caractéristiques sont retrouvées dans les cellules sensorielles, de soutien et sécrétrices. Même si la plupart des touffes ciliaires sont encore présentes, quelques cellules ciliées sont extrudées de la plaque cuticulaire (Figures 34 et 35).

Les échantillons exposés 2 h à 0,25 mM de styrène présentent des cellules d'aspect normal. Les cellules sécrétrices ou sensorielles des cultures exposées à 0,5 et 0,75 mM de styrène contiennent quelques vacuoles cytoplasmiques (Figure 34). Ces mêmes vacuoles sont aussi présentes dans le cytoplasme cellulaire des cultures 3D d'utricules exposées pendant 72 h à 0,25, 0,5 et 0,75 mM de styrène (Figure 35). À l'exception des vacuoles cytoplasmiques présentes dans quelques cellules de l'épithélium sensoriel ou des zones sécrétrices, aucune autre manifestation de lésion cellulaire n'est mise en évidence.



**Figure 34 : Cultures 3D d'utricules après 2 h d'exposition à différentes concentrations de styrène – microscopie optique.**

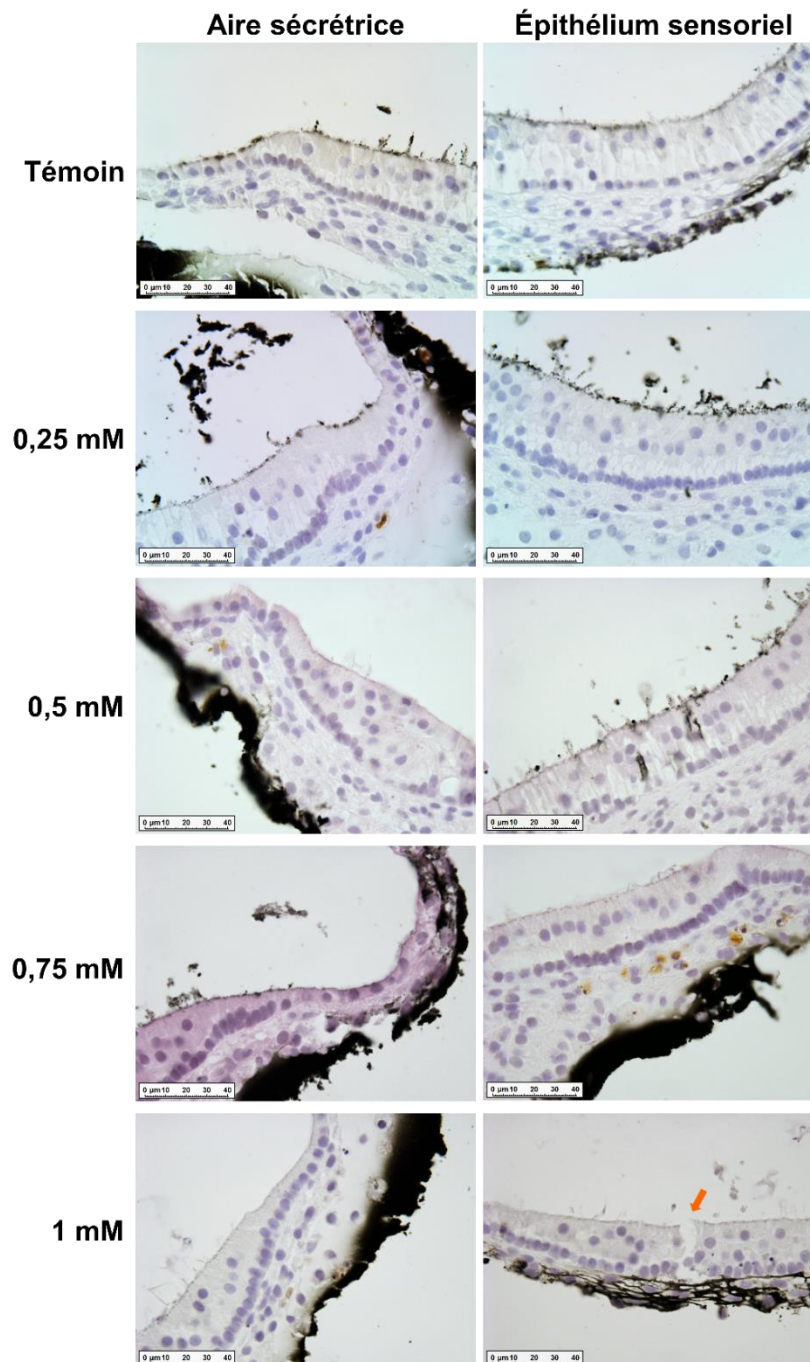
Cultures d'utricules (P1-4 ; J7) exposées 2 h à 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ou 1 mM de styrène. Colonne de gauche : aire sécrétrice ; colonne de droite : épithélium sensoriel. Vacuoles cytoplasmiques agrandies dans l'encadré rouge. Les extrusions cellulaires sont indiquées avec des flèches et les noyaux gonflés par des astérisques. Barre d'échelle = 40  $\mu\text{m}$ .



**Figure 35 : Cultures 3D d'utricules après 72 h d'exposition à différentes concentrations de styrène – microscopie optique.**

Cultures 3D d'utricules (P1-4 ; J7) exposées 72 h à 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ou 1 mM de styrène. Colonne de gauche : aire sécrétrice ; colonne de droite : épithélium sensoriel. Vacuoles cytoplasmiques agrandies dans l'encadré rouge. Les extrusions cellulaires sont indiquées avec des flèches et les noyaux gonflés par des astérisques. Barre d'échelle = 40  $\mu\text{m}$ .

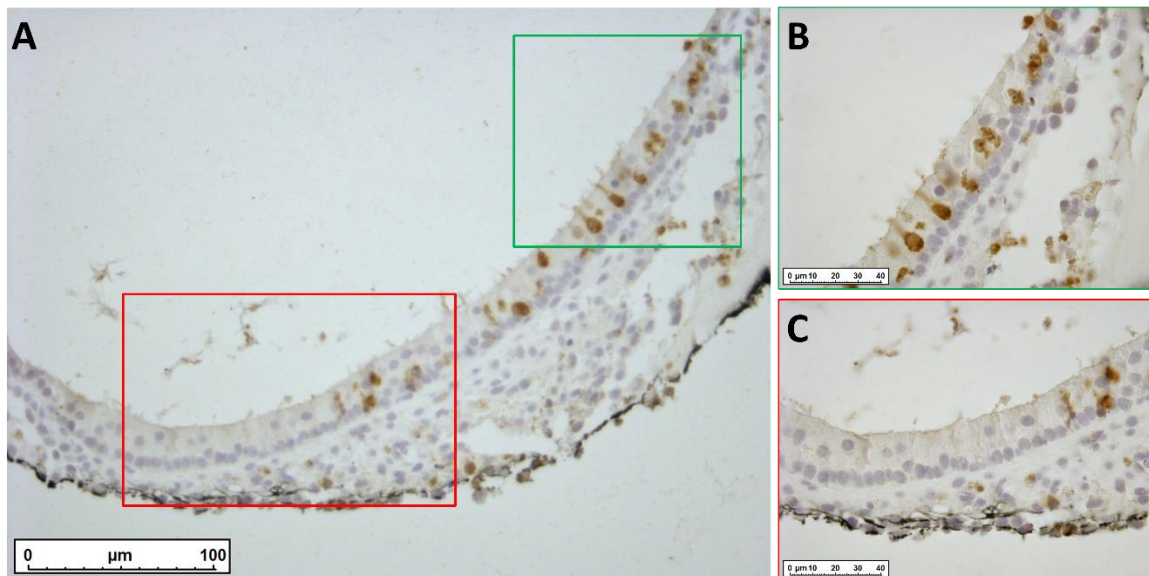
Les analyses immuno-histochimiques ne révèlent pas d'activation de la caspase-3 dans la zone sécrétrice ni dans l'épithélium sensoriel, quelle que soit la concentration de styrène testée. Seules des lésions au niveau de l'épithélium sensoriel sont visibles sur les échantillons exposés à 1 mM de styrène (Figure 36).



**Figure 36 :** Caspase-3 clivée des cultures 3D d'utricules exposées 72 h à différentes concentrations de styrène.

Immuno-histologie de la caspase-3 clivée (marquage marron) des cultures 3D d'utricules (P1-4 ; J7) exposées à 0,25, 0,5, 0,75 ou 1 mM de styrène. Colonne de gauche : aire sécrétrice ; colonne de droite : épithélium sensoriel. La flèche indique une lésion de l'épithélium sensoriel. Barre d'échelle = 40  $\mu\text{m}$ .

Bien que la plupart des cultures 3D d'utricules exposées 72 h à 1 mM de styrène ne soient pas immuno-marquées, un échantillon parmi les cinq exprime la caspase-3 clivée (Figure 37). Ces observations immuno-histochimiques indiquent donc une faible proportion d'expression de la caspase-3 clivée ; cette enzyme est exprimée dans les cultures 3D d'utricules exposées 72 h à 1 mM de styrène de manière très limitée.



**Figure 37 : Caspase-3 clivée d'une culture 3D d'utricule exposée 72 h à 1 mM de styrène.** (A) Immuno-histologie de la caspase-3 clivée (marquage marron) d'une culture 3D d'utricule (P4 J7) exposée 72 h à 1 mM de styrène. L'encart en vert (B) montre une partie de l'épithélium fortement marquée et l'encart en rouge (C) montre une partie moins marquée. Barre d'échelle = 100 μm (A) et 40 μm (B et C).

#### 4.1.2. Effet des autres solvants aromatiques

Les solvants aromatiques, dont les propriétés cochléotoxiques sont connues, ont été testés sur les cultures 3D d'utricules.

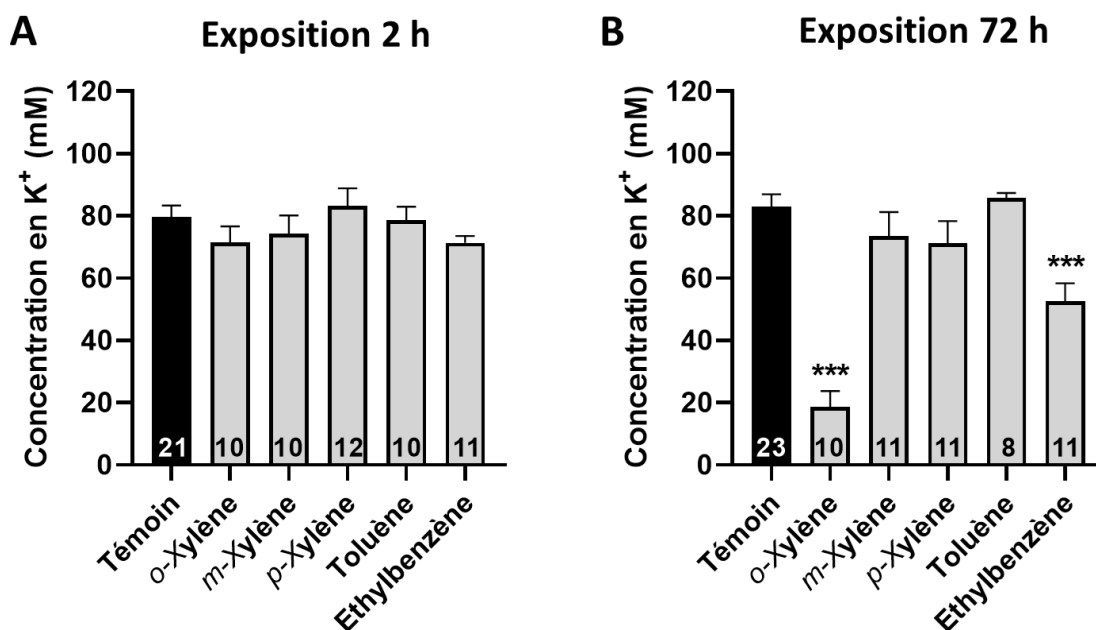
Les mesures de la concentration en  $K^+$  (Figure 33) et les analyses histologiques (Figures 34 et 35) des cultures 3D d'utricules exposées 2 h ou 72 h à différentes concentrations de styrène montrent qu'une exposition à 0,75 mM entraîne une baisse significative de la concentration en  $K^+$  sans lésion cellulaire.

Dans le but d'évaluer le potentiel vestibulotoxique d'autres solvants aromatiques, les cultures utriculaires ont été exposées 2 h ou 72 h à 0,75 mM de toluène, d'éthylbenzène, de *o*-xylène, de *p*-xylène ou de *m*-xylène.

#### 4.1.2.1. Concentration en K<sup>+</sup>

La concentration potassique des cultures 3D d'utriculaires a été mesurée après exposition de 2 h ou 72 h à 0,75 mM de solvants (Figure 38).

La figure 38.A indique aucune différence significative [ $F(5, 68) = 1,015$  ;  $p = 0,415$ ] entre les groupes après une exposition de 2 h. En revanche, la figure 38.B montre que les solvants aromatiques provoquent une variation de la concentration potassique après 72 h d'exposition [ $F(5, 68) = 17,97$  ;  $p < 0,001$ ]. Une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de la concentration en K<sup>+</sup> de 77 % est mesurée après 72 h d'exposition à l'*o*-xylène ( $18,6 \pm 5,0$  mM) et de 36 % ( $p < 0,001$ ) après 72 h d'exposition à l'éthylbenzène ( $52,5 \pm 5,8$  mM) par rapport au groupe non exposé ( $83,0 \pm 3,9$  mM). Les autres solvants aromatiques n'entraînent pas de variation de la concentration en K<sup>+</sup> ; toluène ( $85,7 \pm 1,6$  mM), *m*-xylène ( $71,1 \pm 7,1$  mM) et *p*-xylène ( $73,4 \pm 7,7$  mM).



**Figure 38** : Effets des solvants aromatiques sur la concentration en K<sup>+</sup> des cultures d'utricules.

Concentration en K<sup>+</sup> de culture 3D d'utricules (P0-P4 ; J7) après 2 h (A) ou 72 h (B) d'exposition à 0,75 mM d'*o*-xylène, de *m*-xylène, de *p*-xylène, de toluène ou d'éthylbenzène. Moyenne  $\pm$  écart-type à la moyenne. Le nombre d'échantillons par groupe est indiqué en dessous de chaque barre d'histogramme. Test de Dunnett : \*\*\* $p < 0,001$ .

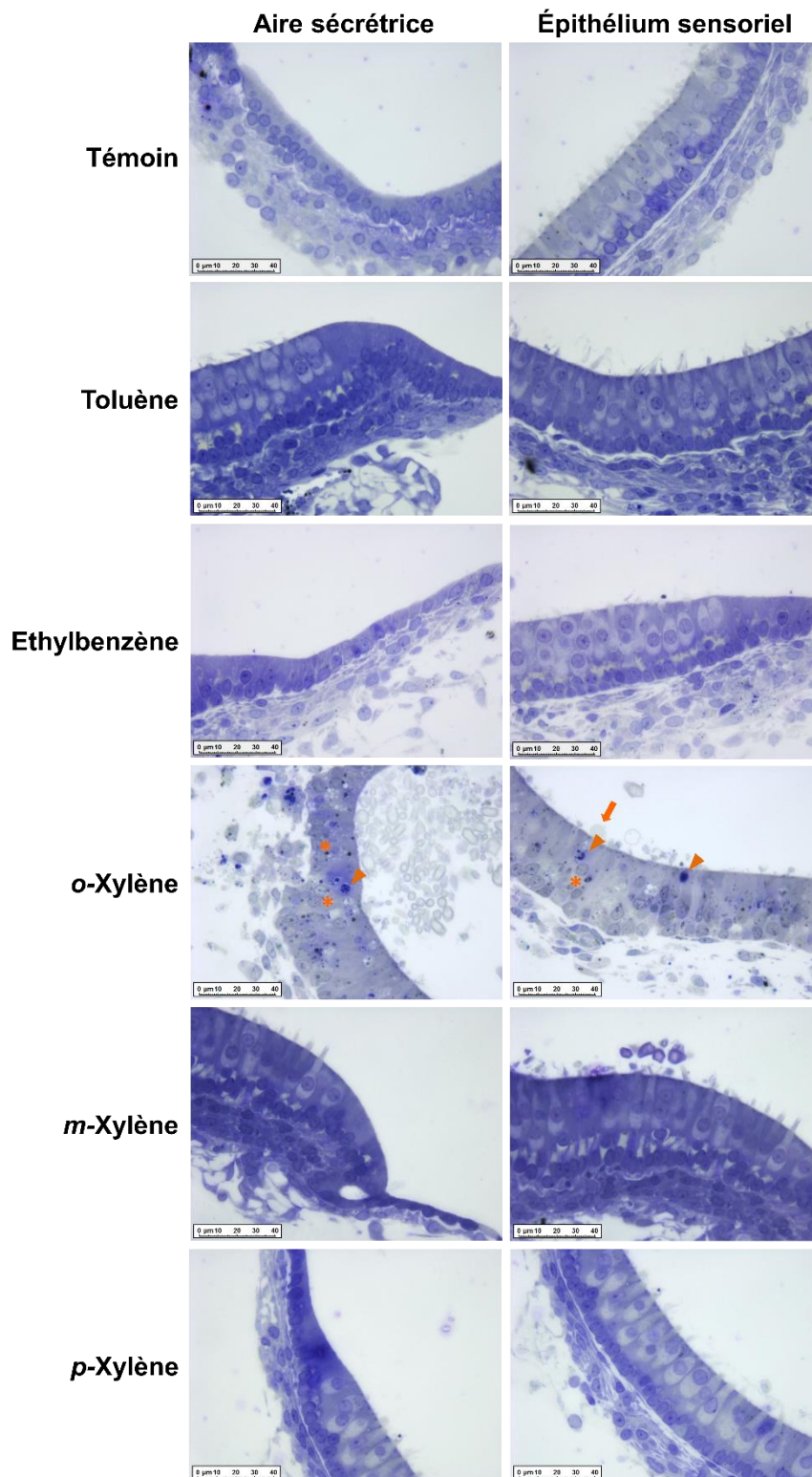


#### 4.1.2.2. Analyses histologiques

Etant donné qu'aucune variation de la concentration en  $K^+$  n'a été mesurée après 2 h d'exposition aux différents solvants aromatiques (Figure 38.A), seules les cultures 3D d'utricules exposées durant 72 h ont été analysées en microscopie optique (Figure 39).

Les cellules des cultures d'utricules non exposées ont un aspect normal. L'épithélium sensoriel est composé de cellules ciliées de type I piriforme et de type II en forme de bâtonnet coiffées de touffes ciliaires et de cellules de soutien. Les aires sécrétrices sont composées de cellules sombres cubiques et des cellules transitionnelles qui bordent l'épithélium sensoriel. Du tissu conjonctif est visible en dessous des cellules épithéliales.

Les cellules des aires sécrétrices et de l'épithélium sensoriel des cultures 3D d'utricules exposées au toluène, *p*-xylène et *m*-xylène, ont un aspect normal et ressemblent à celles des échantillons témoins. De manière surprenante, les coupes histologiques des cultures exposées à l'éthylbenzène ne montrent aucun signe de souffrance cellulaire. A l'inverse, de nombreuses manifestations histopathologiques sont visibles dans les échantillons exposés à l'*o*-xylène. En effet, des noyaux condensés mais aussi gonflés, une faible densité cytoplasmique et des extrusions cellulaires sont relevées au niveau des aires sécrétrices et de l'épithélium sensoriel. Cependant, les touffes ciliaires sont conservées malgré les altérations des cellules ciliées.

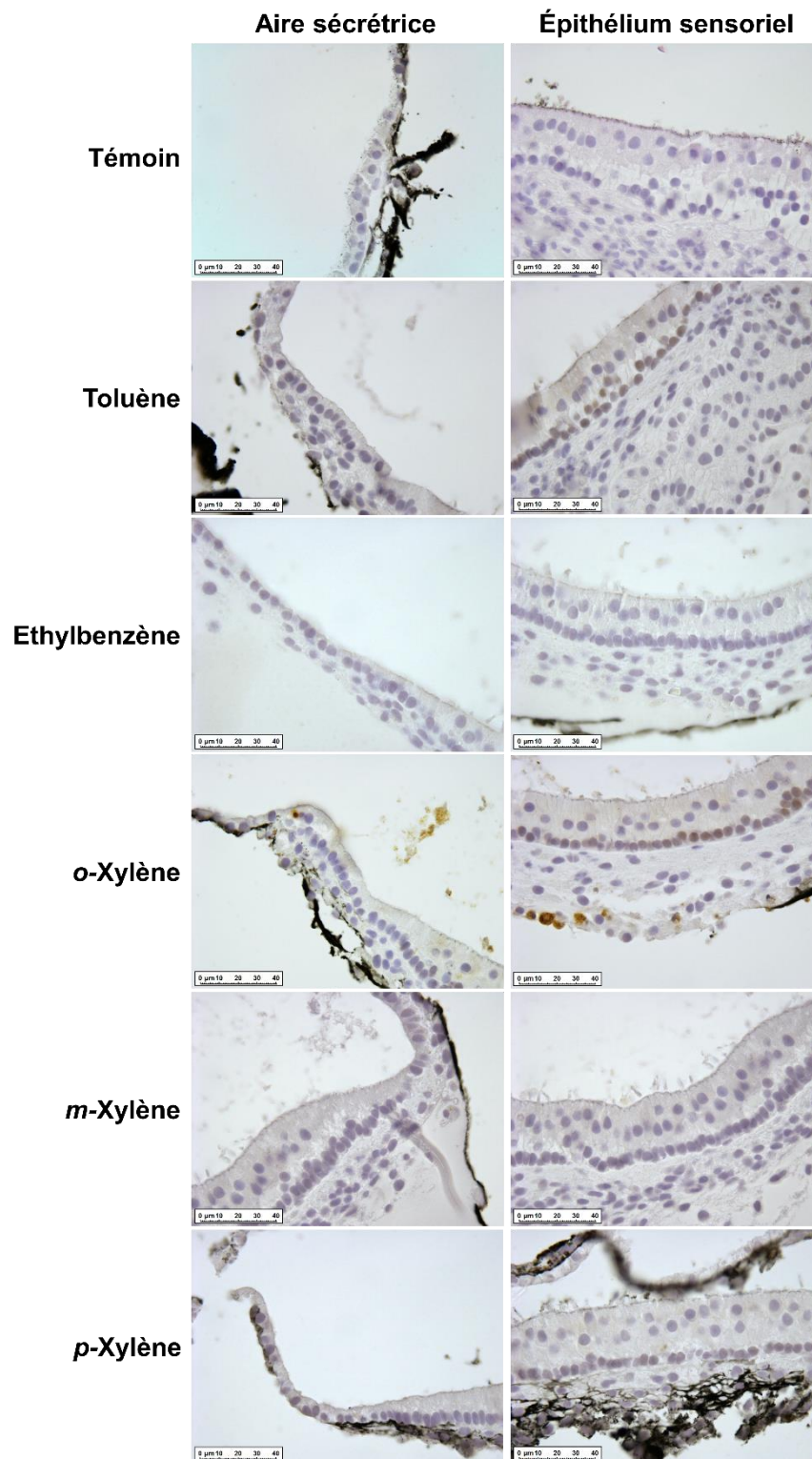


**Figure 39 : Cultures 3D d'utricules après 72 h d'exposition aux solvants aromatiques – microscopie optique.**

Cultures 3D d'utricules (P2-P4 ; J7) exposées 72 h à 0,75 mM de toluène, éthylbenzène, *o*-xylène, *m*-xylène ou *p*-xylène. Colonne de gauche : aire sécrétrice ; colonne de droite : épithélium sensoriel. Les extrusions cellulaires sont indiquées avec des flèches, les noyaux condensés par des triangles et les noyaux gonflés par des astérisques. Barre d'échelle = 40  $\mu$ m.

Comme pour les expositions au styrène, des analyses immuno-histochimiques de l'expression de la caspase-3 clivée ont été réalisées sur les cultures 3D d'utricules exposées aux différents solvants aromatiques (Figures 40 et 41).

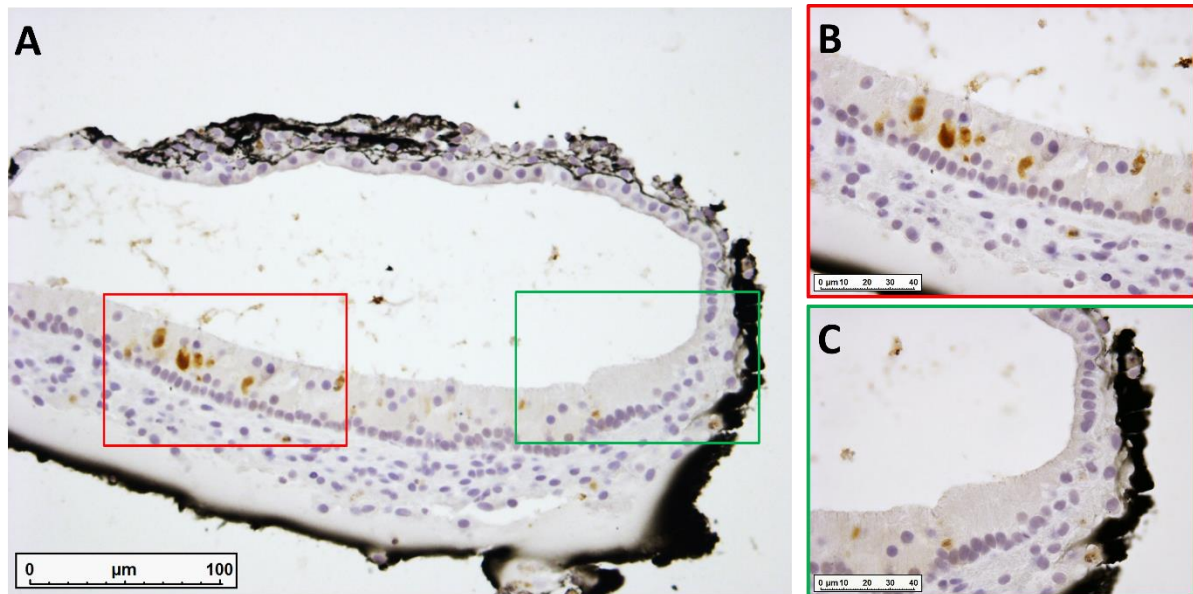
L'immuno-marquage de la caspase-3 clivée n'a pas révélé d'activation de la caspase-3 (pas de marquage marron) sur les coupes d'échantillons exposés 72 h au toluène, à l'éthylbenzène, au *p*-xylène et au *m*-xylène (Figure 40).



**Figure 40** : Caspase-3 clivée des cultures 3D d'utricules exposées 72 h aux solvants aromatiques.

Immuno-histologie de la caspase-3 clivée (marquage marron) des cultures 3D d'utricules (P2-4 ; J7) exposées 72 h à 0,75 mM de toluène, éthylbenzène, *o*-xylène, *m*-xylène et *p*-xylène. Colonne de gauche : aire sécrétrice ; colonne de droite : épithélium sensoriel. Barre d'échelle = 40  $\mu$ m.

Quelques cellules de l'épithélium sensoriel des cultures 3D d'utricules exposées 72 h à 0,75 mM d'*o*-xylène ont été immuno-marquées avec la caspase-3 clivée (Figure 41). Cependant, ce marquage a été révélé seulement sur un échantillon parmi les six exposés à l'*o*-xylène. Les analyses immuno-histochimiques indiquent que la caspase-3 peut être activée après une exposition des cultures 3D d'utricules à l'*o*-xylène mais de manière très limitée.

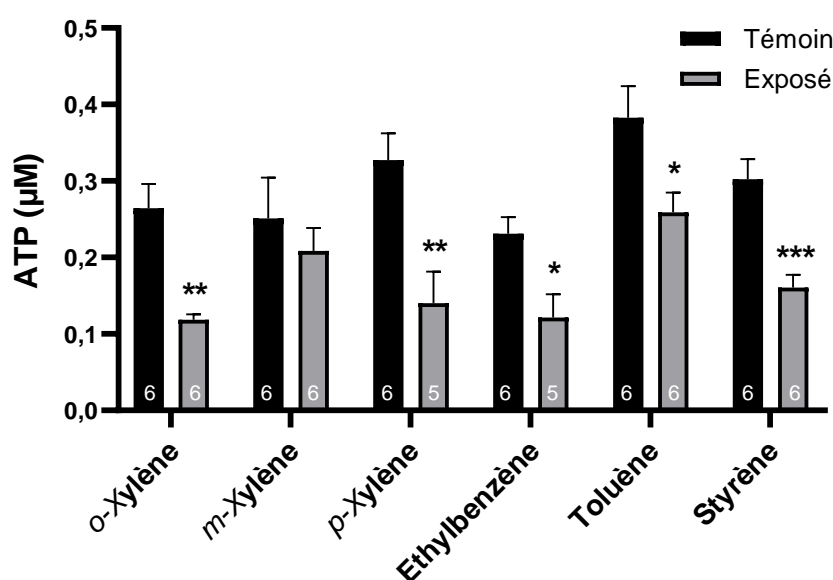


**Figure 41 : Caspase-3 clivée des cultures 3D d'utricules exposées 72 h à l'*o*-xylène.** (A) Immuno-histologie de la caspase-3 clivée (marquage marron) des cultures 3D d'utricules (P2-4 ; J7) exposées 72 h à 0,75 mM d'*o*-xylène. L'épithélium sensoriel est agrandi dans un encart rouge (B) et une partie de la zone sécrétrice dans un encart vert (C). Barre d'échelle = 100 μm (A) et 40 μm (B et C).

#### 4.1.2.3. Quantification de l'ATP

La quantité d'ATP intracellulaire est un paramètre permettant de déterminer le type de mort cellulaire. En effet, lorsque qu'un agent physique ou chimique entraîne un effondrement de l'ATP intracellulaire, la cellule ne parvient plus à déclencher l'apoptose et se réoriente généralement vers une mort cellulaire de type nécrotique.

La quantité totale d'ATP des cultures 3D d'utricules exposées 72 h à 0,75 mM de toluène, éthylbenzène, *o*-xylène, *m*-xylène, *p*-xylène ou de styrène a été mesurée par bioluminescence. La figure 42 montre que la majorité des solvants aromatiques testés ont baissé le niveau intracellulaire d'ATP. L'*o*-xylène, le *p*-xylène, l'éthylbenzène et le styrène ont respectivement provoqué une baisse de 55 % ( $p = 0,001$ ), de 57 % ( $p = 0,007$ ), de 47 % ( $p = 0,014$ ) et de 46 % ( $p = 0,001$ ) du niveau d'ATP. Le toluène a diminué de 32 % ( $p = 0,029$ ) la quantité d'ATP. Seule la baisse d'ATP causée par le *m*-xylène n'a pas été significative.



**Figure 42 : Effets des solvants aromatiques sur la quantité d'ATP totale des cultures d'utricules exposées 72 h.**

Quantification de l'ATP total des cultures 3D utriculaires (P2-4 ; J7) exposées 72 h à 0,75 mM de toluène, d'éthylbenzène, d'*o*-xylène, de *m*-xylène, de *p*-xylène ou de styrène. Moyenne  $\pm$  l'écart-type à la moyenne. Le nombre d'échantillons par groupe est indiqué en dessous de chaque barre d'histogramme. Test de Student : \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 4.2. Effets du styrène sur les cultures 3D d'ampoules

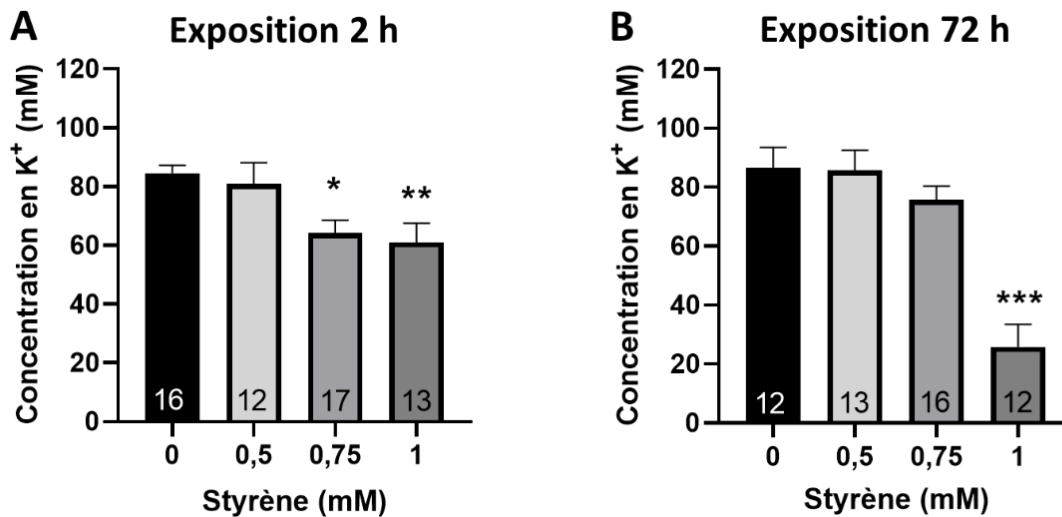
Comme avec les cultures 3D d'utricules, les effets du styrène ont été observés sur les cultures 3D d'ampoules. La mesure de la concentration potassique du compartiment endolymphatique et la quantification de l'ATP ont été réalisées après exposition au styrène.

### 4.2.1. Concentration en K<sup>+</sup>

La concentration en K<sup>+</sup> dans le compartiment endolymphatique a été mesurée dans des cultures 3D ampullaires (P0-P4, J7) exposées à 0,5, 0,75 et 1 mM de styrène durant 2 h et 72 h. De la même manière qu'avec les cultures 3D d'utricule, les cultures ampullaires ont été exposées à J7 pour les expositions de 2 h et à partir de J4 pour les expositions de 72 h.

La [figure 23.B](#) indique que la concentration potassique des cultures ampullaires 3D est stable de J4 à J7, évitant ainsi d'avoir un effet du styrène sur le développement de la culture. Les histogrammes de la [figure 43](#) montrent des variations de la concentration en K<sup>+</sup> après une exposition de styrène durant 2 h et 72 h [2 h :  $F(3, 54) = 5,364$  ;  $p = 0,002$  – 72 h :  $F(3, 49) = 18,78$  ;  $p < 0,001$ ].

Après 2 h d'exposition, la concentration en K<sup>+</sup> baisse significativement avec 0,75 mM ( $64,2 \pm 4,3$  mM ;  $p = 0,011$  ; pourcentage de baisse : 24 %) et 1 mM de styrène ( $61,0 \pm 6,4$  mM ;  $p = 0,005$  ; pourcentage de baisse : 27 %) par rapport au groupe témoin ( $84,5 \pm 2,7$  mM) ([Figure 43.A](#)). Après 72 h d'exposition, une forte baisse de la concentration en K<sup>+</sup> est mesurée avec 1 mM de styrène (groupe témoin :  $86,6 \pm 6,8$  mM – groupe traité :  $25,8 \pm 7,6$  mM ;  $p < 0,001$  ; pourcentage de baisse : 70 %). De façon surprenante, la concentration en K<sup>+</sup> ne varie pas de manière significative par rapport au groupe témoin après une exposition à 0,75 mM de styrène durant 72 h ( $75,7 \pm 4,5$  mM) ([Figure 43.B](#)).



**Figure 43 : Effets du styrène sur la concentration potassique endolymphatique des cultures 3D d'ampoule.**

Concentration en K<sup>+</sup> de cultures 3D ampullaires (P0-4 ; J7) exposées 2 h (A) ou 72 h (B) à 0, 0,5, 0,75 ou 1 mM de styrène. Moyenne  $\pm$  l'écart-type à la moyenne. Le nombre d'échantillons est indiqué en dessous de chaque barre d'histogramme. Test de Dunnett : \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 ; \*\*\*p < 0,001.

#### 4.2.2. Analyses histologiques

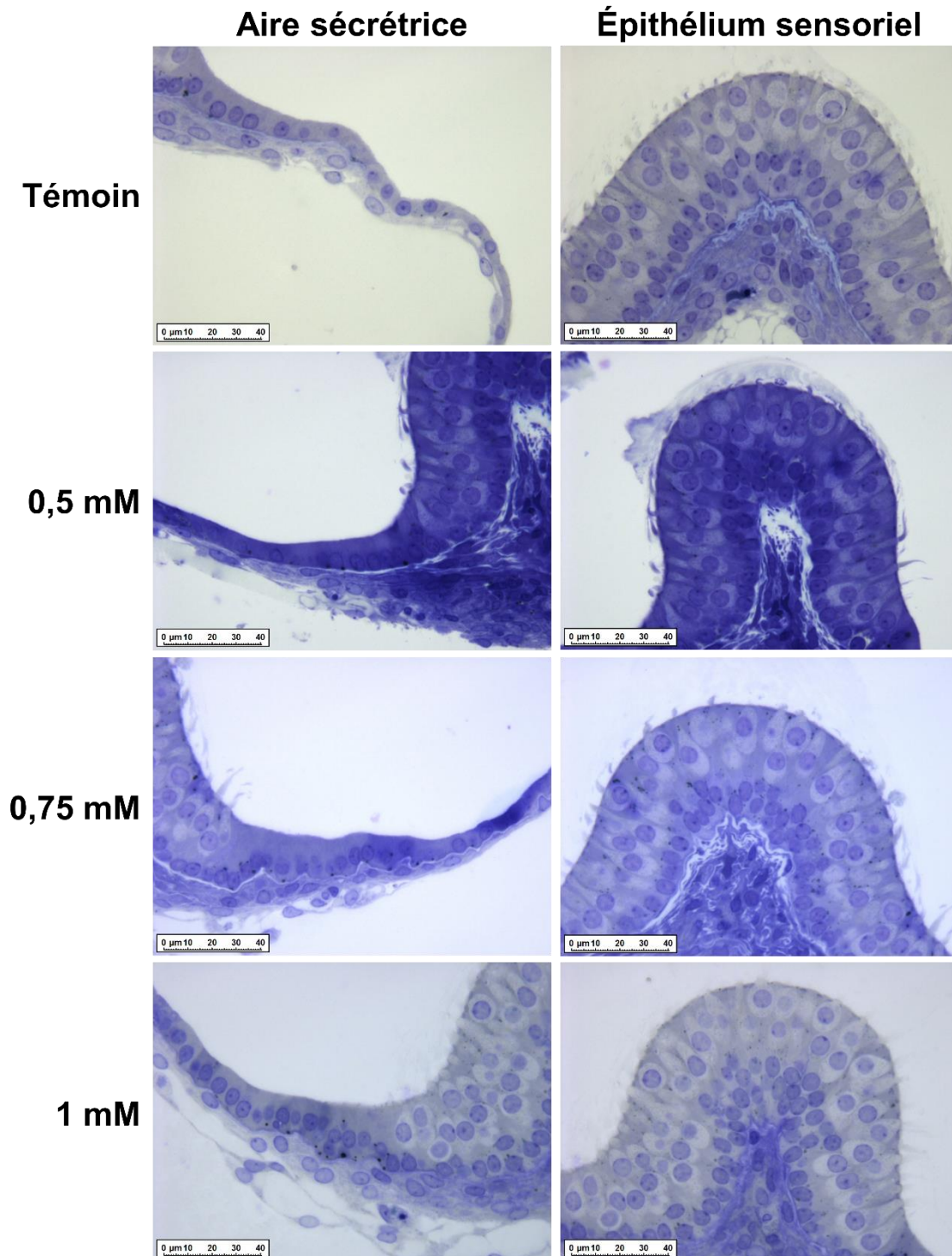
Les cultures 3D d'ampoules exposées 2 h (Figure 44) et 72 h (Figure 45) à 0,5, 0,75 ou 1 mM de styrène ont été analysées en microscopie optique.

Les cellules des cultures 3D d'ampoules non exposées (2 h et 72 h) présentent une morphologie normale. Rappelons que la crête ampullaire est composée de cellules ciliées de type I, piriforme, et de type II, en bâtonnet et de cellules de soutien s'intercalant entre chacune d'elles. Les aires sécrétrices sont composées de cellules transitionnelles, de forme allongée et localisées à la base de la crête ampullaire, et de cellules sombres de forme cubiques.

Quelle que soit la concentration de styrène testée, les cellules des cultures 3D d'ampoules exposées 2 h ont un aspect normal et ressemblent à celles des échantillons témoins (Figure 44).

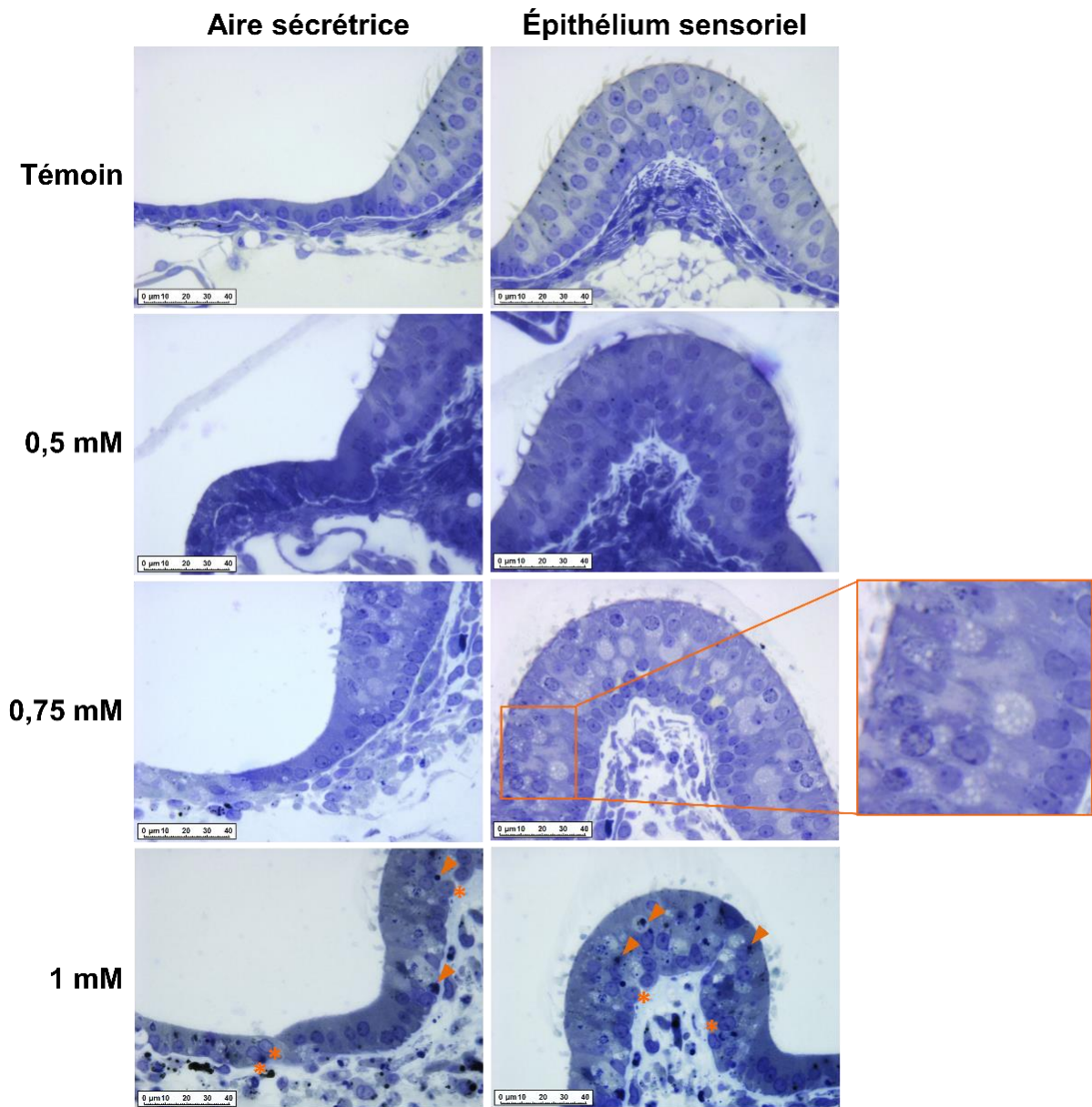


Après 72 h de traitement, les cultures 3D exposées à 0,75 mM de styrène présentent des cellules contenant des vacuoles cytoplasmiques, que ce soit au niveau des aires sécrétrices, dans les cellules sombres et transitionnelles, que dans l'épithélium sensoriel, dans les cellules ciliées et de soutien (Figure 45). Mise à part ces vacuoles cytoplasmiques, aucun autre signe de lésions cellulaires n'est observé. Les échantillons exposés à 1 mM de styrène présentent des signes histopathologiques notoires : noyaux gonflés et condensés, absence de délimitation cellulaire et vacuoles. Ces caractéristiques pathologiques se retrouvent dans toutes les cellules des zones sécrétrices et de l'épithélium sensoriel. Malgré les signes de souffrance cellulaire observés, les touffes ciliaires sont intactes.



**Figure 44 : Cultures 3D d'ampoules après 2 h d'exposition à différentes concentrations de styrène – microscopie optique.**

Cultures 3D d'ampoules (P0-3 ; J7) exposées 2 h à 0,5, 0,75 ou 1 mM de styrène. Colonne de gauche : aire sécrétrice ; colonne de droite : épithélium sensoriel (crête ampullaire). Barre d'échelle = 40 µm



**Figure 45 : Cultures 3D d'ampoules après 72 h d'exposition à différentes concentrations de styrène – microscopie optique.**

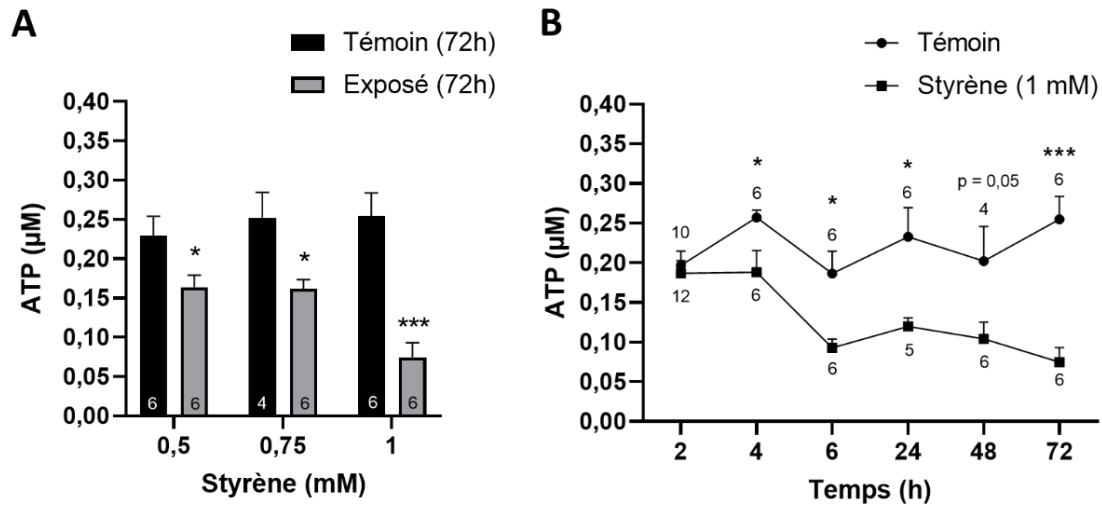
Cultures 3D d'ampoules (P2-4 ; J7) exposées 72 h à 0,5 ; 0,75 ou 1 mM de styrène. Colonne de gauche : aire sécrétrice ; colonne de droite : épithélium sensoriel (crête ampullaire). Encadré rouge : vacuoles cytoplasmiques. Les noyaux condensés sont indiqués par des triangles et les noyaux gonflés par des astérisques. Barre d'échelle = 40  $\mu$ m.

### 4.2.3. Quantification de l'ATP

La [figure 46.A](#) montre la quantité totale d'ATP dans les cultures 3D d'ampoules exposées durant 72 h à différentes concentrations de styrène (0,5, 0,75 et 1 mM).

Après une exposition à 1 mM de styrène, une importante baisse du niveau d'ATP est mesurée (pourcentage de baisse : 70 % ;  $p < 0,001$ ). La baisse du niveau d'ATP mesurée après une exposition à 0,5 mM ou 0,75 mM est moins prononcée qu'après une exposition à 1 mM. Les pourcentages de baisse après une exposition à 0,5 mM ou 0,75 mM sont comparables : baisse de 28 % ( $p = 0,039$ ) avec 0,5 mM et de 35 % ( $p = 0,010$ ) avec 0,75 mM de styrène.

La [figure 46.B](#) montre la quantité totale d'ATP totale des cultures 3D d'ampoules exposées à 1 mM de styrène à différents temps d'exposition (2, 4, 6, 24, 48 et 72 h). Après 2 h d'exposition, il n'y a pas de différence du niveau d'ATP entre les cultures témoins et les cultures traitées. A partir de 4 h d'exposition, une baisse d'ATP de 26 % est mesurée ( $p = 0,037$ ). Le niveau de baisse d'ATP atteint une stabilité à partir de 6 h jusque 48 h d'exposition (6 h : baisse de 50 %,  $p = 0,010$  ; 24 h : baisse de 48 %,  $p = 0,023$  ; 48 h : baisse de 48 %,  $p = 0,054$ ). Après 72 h d'exposition, la diminution du niveau d'ATP s'intensifie (baisse de 70 %,  $p < 0,001$ ).



**Figure 46 : Effets du styrène sur la quantité d'ATP totale des cultures 3D d'ampoules.** (A) Quantification de l'ATP total des cultures 3D ampullaires (P2-4 J7) exposées 72 h à 0,5 ; 0,75 ou 1 mM de styrène. (B) Quantification de l'ATP total des cultures 3D (P2-4 J7) exposées à 1 mM à différents temps d'exposition (2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h et 72 h). Moyenne  $\pm$  l'écart-type à la moyenne. Le nombre d'échantillons par groupe est indiqué en dessous de chaque barre d'histogramme (A) ou en-dessous de chaque symbole carré pour les groupes exposés, et au-dessus de chaque symbole rond pour les groupes témoins (B). Test de Student : \* $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$ .

# **CHAPITRE IV.**

## **DISCUSSION**

Rappelons que si les effets des solvants aromatiques sur le contrôle postural et les voies vestibulaires sont connus (Aylott and Prasher, 2002; Hodgkinson and Prasher, 2006), leurs effets sur le labyrinthe vestibulaire localisé dans l'oreille interne restent méconnus. C'est pourquoi l'objectif principal de ce projet était d'évaluer le potentiel vestibulotoxique des solvants aromatiques les plus utilisés dans le secteur industriel à l'aide d'un modèle 3D d'explants vestibulaires. Alors que les cultures 3D d'explants d'utricules ont été développées par Bartolami *et al.* (2011) et Gaboyard *et al.* (2005) pour étudier la formation du compartiment endolymphatique lors du développement postnatal, les cultures 3D d'ampoules ont été développées avec succès, pour la première fois durant cette étude. Par ailleurs, rappelons que la physiologie des cellules sensorielles du récepteur vestibulaire dépend de la concentration potassique endolymphatique qui est maintenue par diverses cellules vestibulaires (voir chapitre 1.2.4) dont les états ont été évalués à l'aide d'une microélectrode remplie d'une membrane échangeuse d'ions potassiques. Les mesures électrophysiologiques ont été complétées par des analyses histologiques et des mesures de la concentration d'ATP totale pour comprendre le mécanisme d'action des solvants.

C'est seulement après avoir décrit la morphologie et la physiologie des modèles, que les cultures d'explants d'utricules et d'ampoules ont été exposées aux solvants aromatiques pour évaluer leur potentiel vestibulotoxique et comprendre les mécanismes toxiques enclenchés. Les cultures 3D ont d'abord été exposées à différentes concentrations de styrène, dont les propriétés ototoxiques sont bien décrites dans la littérature. Les premiers résultats obtenus ont permis de déterminer les doses et la durée d'exposition requises pour évaluer et comparer le potentiel vestibulotoxique de 5 solvants aromatiques dont les propriétés cochléotoxiques sont connues : toluène, éthylbenzène, et les 3 isomères du xylène. Les résultats des mesures de la concentration en  $K^+$ , les analyses histologiques et la quantification d'ATP totale ont permis d'établir un parallèle entre cochléotoxicité et vestibulotoxicité périphériques, mais aussi d'étudier les mécanismes toxiques impliqués.

## 1. Développement des explants vestibulaires

### 1.1. Création du compartiment endolymphatique

Que ce soit pour les cultures 3D d'utricules ou celles d'ampoules, les changements morphologiques et les mesures électrophysiologiques au cours du temps démontrent une maturation progressive de ces modèles (Figures 22 et 23).

Après 2 jours de culture pour les explants d'utricule, et dès le premier jour de culture pour les explants d'ampoule, une petite vésicule apparaît. Il est probable qu'entre 24 et 48 h après la mise en culture des explants, des cellules épithéliales prolifèrent pour refermer la structure et former ainsi un compartiment endolymphatique. La durée qui a été requise dans cette étude pour la formation de cystes à partir d'explants utriculaires de rats nouveau-nés Long-Evans correspond à celle reportée par Gaboyard *et al.* (2005) chez le rat Wistar. Le Matrigel® a donc fourni un environnement 3D propice à la prolifération cellulaire (Gnedeva *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 1997) et à la formation de la structure 3D. En plus des propriétés mécaniques du Matrigel® et de la présence de facteurs de croissance, il a été montré que la prolifération cellulaire maximale, en réponse aux facteurs de croissance, se produit entre la naissance (P0) et le 5<sup>ème</sup> jour postnatal (Gu *et al.*, 2007) dans les utricules de rats. Cette fenêtre temporelle correspond à celle utilisée dans ce travail de thèse pour prélever et mettre en culture les utricules et les ampoules.

Que ce soit pour les cultures 3D d'utricules ou celles d'ampoules, la concentration de K<sup>+</sup> (Figures 22.B et 23.B) dans le compartiment endolymphatique semble être directement liée à la taille de la structure. Une vésicule, qui apparaît dès le premier jour de culture dans les ampoules et au 2<sup>ème</sup> jour dans les utricules, gonfle jusqu'à atteindre sa taille maximale, qui est d'environ 1 mm au 5<sup>ème</sup> jour de culture. Une fois la taille maximale atteinte, la concentration en K<sup>+</sup> se stabilise autour de 80 mM. La concentration en K<sup>+</sup> aura quasiment doublé entre J2 et J4.



Ces mesures et observations suggèrent que le gonflement des cultures 3D utriculaires et ampullaires serait dû à l'augmentation de la concentration en ions  $K^+$  dans le compartiment endolympatique, ce qui déclenche un flux osmotique entrant tout en augmentant la pression hydrostatique (Gaboyard *et al.*, 2005).

### 1.2. Evolution de la concentration en $K^+$ dans le compartiment endolympatique

Le compartiment endolympatique des cultures 3D d'ampoules et d'utricules renferme un liquide de composition chimique proche de celle de l'endolymphe, c'est-à-dire qu'il est fortement concentré en ions potassiques (ampoules :  $85,3 \pm 3,0$  mM – utricules :  $85,8 \pm 4,8$  mM à J7 ; [Figures 22 et 23](#)). Bien que les cultures 3D aient été obtenues à partir de rat Long Evans, les concentrations en  $K^+$  sont comparables à celles mesurées par Bartolami *et al.*, 2011 dans des cultures d'utricules obtenues à partir de rat nouveau-né Wistar. En revanche, les valeurs de concentration en  $K^+$  obtenues dans cette étude *in vitro* sont plus faibles que celles mesurées dans l'endolymphe d'animaux adultes [144,4 mM chez le cobaye d'après Smith *et al.* (1954) ; 142 mM d'après Citron et Exley (1957) ;  $107,6 \pm 8,8$  mM chez la souris d'après Royaux *et al.* (2003) et 118 mM d'après Dravis *et al.* (2007)]. Une telle différence entre les concentrations potassiques du compartiment endolympatique mesurées *in vivo* et *in vitro* n'est pas surprenante puisqu'elle avait déjà été mentionnée par Masetto et collaborateurs, en 2005, dans des ampoules de poulet. Le fait que les mesures relèvent d'une expérimentation *in vivo* et *in vitro* suffisent à expliquer les différences de concentration en potassium.

L'endolymphe est principalement produite par les cellules sombres qui sécrètent les ions  $K^+$  à partir de la périlymphe. D'ailleurs, la maturation morphologique et physiologique postnatale des cellules sombres qui contiennent des pompes et canaux potassiques, semble coïncider avec l'évolution de la composition chimique de l'endolymphe.

Bien que, dès le premier jour postnatal (P1), la pompe Na/K-ATPase soit localisée au niveau basal (Peters *et al.*, 2001), le canal KCNQ1/KCNE1 au niveau apical (Nicolas *et al.*, 2001), et que la structure cellulaire semble mature, le nombre d'invaginations de la membrane au niveau basal augmente entre le 1<sup>er</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour postnatal (Anniko, 1980a, 1980b; Anniko and Nordemar, 1980). Les invaginations membranaires du pôle basal (Figures 26 et 30) témoignent d'une activité sécrétrice intense de la cellule sombre ; l'augmentation de leur nombre entre P1 et P4 suggère que ces cellules ne sont pas complètement fonctionnelles durant cette période. D'ailleurs, cette fenêtre temporelle correspond à l'évolution de la composition chimique de l'endolymphe puisque la concentration en K<sup>+</sup> double entre J2 et J4 (Figure 22).

L'augmentation progressive de la concentration en K<sup>+</sup> mesurée dans le compartiment endolymphatique entre J2 et J4 des cultures 3D d'utricules et d'ampoules pourrait donc s'expliquer par la maturation des cellules sombres qui, d'après les mesures de concentration potassique, serait atteinte dès J4.

Le modèle 3D utilisé dans cette étude montre que la concentration de K<sup>+</sup> est stable à partir de J4 jusqu'à J7.

### 1.3. Caractéristiques cellulaires des cultures 3D

Les cultures 3D d'utricules et celles d'ampoules sont composées de cellules de morphologie différente impliquées dans la formation du compartiment endolymphatique et la maturation de la composition chimique de l'endolymphe. Les cellules canalisaires recouvrent entièrement l'épithélium sensoriel de l'explant et créent la lumière de la structure (Figures 27.F, 26.G et 24.D). Ces cellules et leur noyau sont de forme allongée et leur morphologie est semblable à celle décrite par Gaboyard *et al.* (2005).

Les cellules sécrétrices, les cellules transitionnelles et sombres, bordent l'épithélium sensoriel dans les deux types de cultures 3D (Figures 24.C, 26.D-F, 27.D-E, 28.F, 29.D et 30).

Les cellules transitionnelles sont localisées entre les cellules ciliées et les cellules sombres. Igarashi a montré, en 1989, que les cellules transitionnelles se distinguent des cellules sombres par leur corps cellulaire mince sans invagination de la membrane plasmique au niveau du pôle basal. Bien que ces cellules n'aient pas de stéréocils au niveau apical, quelques microvillosités y sont visibles. La morphologie des cellules transitionnelles des cultures 3D d'utricules et d'ampoules (Figures 24.C, 26.F, 27.D-E, 29.D et 30.A-B) est en accord avec les caractéristiques décrites par Igarashi (1989) et Gaboyard *et al.* (2005).

Les cellules sombres des cultures 3D sont identifiables à leur forme cubique, leur noyau irrégulier, l'accumulation de vacuoles cytoplasmiques, et à l'absence de microvillosités au niveau du pôle apical. Ces caractéristiques sont similaires à celles décrites dans les cellules sombres du labyrinthe vestibulaire humain ou de rongeurs (Igarashi, 1989; Masuda *et al.*, 1994, 1995).

L'ultrastructure des cellules sombres des cultures 3D d'utricules et d'ampoules (Figures 26.D-E et 30.C-E) montre que la membrane plasmique du pôle basal est fortement invaginée, ce qui traduit une forte activité sécrétrice (Coppens *et al.*, 2004). Bien qu'à la naissance, la configuration morphologique des cellules sombres soit déjà mature, le nombre d'invaginations membranaires au niveau du pôle basal augmente jusqu'à P4. Par conséquent, il est raisonnable de penser que les cellules sombres des explants utriculaires et ampullaires de cette étude aient acquis les caractéristiques d'une cellule mature durant les 4 premiers jours de culture. Il était donc fondamental de commencer les expositions au 4<sup>ème</sup> jour de culture.

Les analyses en MEB de l'épithélium sensoriel des explants vestibulaires cultivés *in vitro* durant 7 jours révèlent que la macula est concave (Figure 25.A) tandis que la crête ampullaire est incurvée (Figure 28.A). Ces mêmes observations avaient déjà été décrites chez des rats Wistar chez lesquels Dechesne *et al.* (1986) avaient prélevé la macula de l'utricule et la crête ampullaire au 7<sup>ème</sup> jour post-natal. L'épithélium sensoriel de l'explant cultivé *in vitro* a donc des caractéristiques semblables à celles de rat (P7) provenant d'expérimentations *in vivo*.

Le MEB a aussi permis de montrer la polarisation des cellules ciliées des cultures 3D (Figures 25.B-D et 38.B-E). Les touffes ciliaires contiennent des stéréocils ordonnés de taille croissante dans les crêtes ampullaires et macula. Un jour après la naissance, les touffes ciliaires sont de petite taille. Leur taille augmentera jusqu'à atteindre leur maturité à partir du 1<sup>er</sup> mois post-natal (Dechesne *et al.*, 1986; Wubbels *et al.*, 2002).

À J7, deux types de cellules ciliées sont identifiables par leur morphologie : les cellules ciliées de type I, elles sont piriformes, et les cellules de type II en bâtonnet (Figures 24.B, 26.A-B, 27.C-D et 29). Il a été reporté par Sans et Chat (1982) et Zheng et Gao (1997), que 70 % des cellules ciliées étaient différenciées en type I ou II dès le 19<sup>ème</sup> jour de gestation dans les utricules de rats. D'après Meza *et al.* (1996), une telle différenciation peut être mise en évidence dès le 4<sup>ème</sup> jour postnatal pour les crêtes ampullaires de rat. De ce fait, il est raisonnable de penser que les cellules ciliées de nos cultures sont morphologiquement matures à J7.

En résumé, la comparaison des données morphologiques puisées dans la littérature avec celles obtenues dans cette étude indique qu'à J7, notre modèle peut être considéré comme morphologiquement mature.

#### 1.4. Propriétés physiologiques des cellules des cultures 3D

La Na/K-ATPase et le co-transporteur NKCC1 des cellules sombres et transitionnelles permettent l'influx du K<sup>+</sup>, tandis que les efflux de K<sup>+</sup> sont régulés au niveau apical des stéréocils des cellules ciliées par les canaux de TME. Dans le but de montrer que ces mécanismes de régulation sont fonctionnels, les cultures 3D d'utricules et d'ampoules ont été traitées avec des inhibiteurs d'efflux ou d'influx du K<sup>+</sup> (Figures 31 et 32). Rappelons que le gadolinium et la gentamicine bloquent les canaux de TME (Kim *et al.*, 2013; Kimitsuki *et al.*, 1996), tandis que la bumétanide et l'ouabaïne inhibent le co-transporteur NKCC1 et la pompe Na/K-ATPase (Marcus *et al.*, 1994; Marcus and Shipley, 1994).

### 1.4.1. Cellules ciliées

D'une manière générale, le gadolinium augmente à J7 la concentration de  $K^+$  dans les cultures 3D. L'augmentation de la concentration en  $K^+$  n'est significative ( $p < 0,05$ ) qu'à partir d'un traitement de 0,1 mM de gadolinium pour les cultures d'utricules (21 %) et de 1 mM pour les cultures d'ampoules (25 %) (Figure 32.A-B). L'effet produit par le gadolinium semble être un effet seuil puisque les concentrations de gadolinium de 0,3 et 1 mM n'augmentent pas davantage la concentration potassique des cultures d'utricules ; il en est de même pour les cultures d'ampoules puisqu'il n'y a pas d'augmentation de la concentration de  $K^+$  avec des concentrations de 0,1 et 0,3 mM de gadolinium.

L'effet seuil pourrait s'expliquer par une modulation de l'activité sécrétrice des cellules sombres, activité régulée par les concentrations ioniques du compartiment endolymphatique (Marcus *et al.*, 1994 ; Wangemann *et al.*, 1996). En effet, l'augmentation de la concentration de  $K^+$  dans l'endolymphe, provoquée par l'inhibition des canaux de TME due au gadolinium, pourrait moduler l'activité des cellules sombres qui baisseraient alors la sécrétion de  $K^+$ . Par conséquent, la modulation de l'activité des cellules sombres pourrait expliquer le fait que l'augmentation modérée de la concentration en  $K^+$  de l'endolymphe soit indépendante de la dose de gadolinium administrée.

Bien que les augmentations de la concentration potassique mesurées soient modérées, les traitements avec le gadolinium ont permis de montrer que les canaux de TME des stéréocils des cellules ciliées étaient fonctionnels dans les cultures 3D d'utricules et d'ampoules.

Les traitements de 2 h des cultures d'utricules avec 1 mM de gentamicine montrent une augmentation significative de 14% et une baisse significative de 15 % après un traitement de 3 mM. L'effet gentamicine est donc opposé en fonction de la dose administrée (Figure 32.C). De tels effets avaient déjà été reportés à propos des aminoglycosides, dont fait partie la gentamicine. De faibles doses bloquent les canaux de TME, tandis que des doses plus élevées entraînent la mort cellulaire après accumulation de la gentamicine dans la cellule ciliée (Forge and Schacht, 2000).

Dans cette étude, l'augmentation de la concentration en  $K^+$  après un traitement à 1 mM serait donc la conséquence d'une inhibition des canaux de TME, tandis que la forte dose de gentamicine (3 mM) aurait un effet cytotoxique entraînant une baisse de la concentration potassique.

En ce qui concerne les cultures d'ampoules, la gentamicine n'a eu aucun effet sur la concentration potassique, et cela quelle que soit la dose administrée (Figure 32.D). Une telle différence entre utricules et ampoules pourrait s'expliquer par le nombre de cellules ciliées. En effet, le nombre de cellules ciliées est de l'ordre de 2500 dans les crêtes ampullaires alors qu'il peut atteindre 3500 dans les maculas (Desai *et al.*, 2005a, 2005b). Plus de 1000 cellules ciliées de différence expliqueraient les variations des mesures de la concentration potassique.

En fait, la gentamicine, qui cible préférentiellement les cellules ciliées, pourrait avoir un effet sur la concentration potassique des explants ampullaires sans que l'on puisse le mesurer avec la technique utilisée dans cette étude.

Bartolami *et al.* (2011) a montré que les traitements de 1 mM de gentamicine et de 0,1 mM de gadolinium sur des cultures 3D d'utricules de souris nouveau-nés (P2-3) augmentaient de 38,6 % et de 56,1 % respectivement la concentration en  $K^+$  du compartiment endolymphatique. Il y a donc une différence notable entre les mesures de la concentration en  $K^+$  réalisées dans cette étude et celles de Bartolami *et al.* (2011). Cette différence pourrait être due à l'espèce utilisée. En outre, les canaux de TME de cellules ciliées de rats pourraient ne pas être complètement fonctionnels à J7. De plus, la densité de cellules ciliées chez les rats nouveau-nés (P1) est plus faible que celle de fœtus de souris (19<sup>ème</sup> jour de gestation) (Dechesne *et al.*, 1986; Mbiene *et al.*, 1984; Mbiene and Sans, 1986; Wubbels *et al.*, 2002).

En résumé, les cellules ciliées des cultures d'explants vestibulaires de cette étude seraient physiologiquement assez matures pour participer pleinement au cycle du potassium.

### 1.4.2. Les cellules sécrétrices

Pour les cultures 3D d'ampoules et d'utricules, la bumétanide a diminué la concentration en  $K^+$ . Cette baisse est significative ( $p < 0,05$ ) dans les deux modèles mais les concentrations requises sont différentes : 0,05 mM de bumétanide est nécessaire pour les cultures d'utricules, tandis que 0,15 mM est requis pour les cultures d'ampoules (Figure 31.C-D). Cette fois encore, une telle différence de concentration de bumétanide pourrait s'expliquer par des structures morphologiques différentes pour les cultures d'utricules par rapport à celles d'ampoules. Les effets de la bumétanide sur la concentration potassique endolymphatique ne sont pas dépendants de la dose administrée, comme l'avait rapporté Marcus (1986). En effet, les auteurs ont montré que deux concentrations de bumétanide variant d'un facteur 10 (0,01 et 0,1 mM) diminuent la sécrétion de  $K^+$  des cellules sombres de la même amplitude.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent seulement une légère baisse de la concentration potassique alors que d'autres montraient une diminution bien plus marquée de la sécrétion de  $K^+$  (Marcus *et al.*, 1994; Marcus and Shipley, 1994). Cette différence peut s'expliquer par un changement d'expression du co-transporteur NKCC1 en fonction de l'âge de l'animal. En effet, le co-transporteur NKCC1 est exprimé au niveau des cellules sombres et transitionnelles chez des rongeurs adultes, tandis qu'il n'est exprimé que dans les cellules transitionnelles chez les nouveau-nés (P10) (Bartolami *et al.*, 2011; Young Choi *et al.*, 2005). Un tel constat pourrait expliquer la faible réduction de la concentration potassique dans le compartiment endolymphatique après un traitement à la bumétanide.

Contrairement à la bumétanide, l'ouabaïne provoque une baisse significative de la concentration en  $K^+$  dans les cultures 3D d'utricules et d'ampoules, baisse qui dépend de la dose administrée (Figure 31.A-B). En effet, la concentration d'ouabaïne de 1 mM diminue de 63 % la concentration de  $K^+$  dans les cultures d'explants utriculaires et de 60 % dans les cultures d'explants ampullaires.

Il est donc évident que l'inhibition des pompes actives (Na/K-ATPase) impacte davantage la concentration potassique du compartiment endolymphatique dans le modèle étudié que celle des transporteurs passifs (NKCC1). Pour être plus précis, la baisse de  $K^+$  provoquée par l'inhibition des pompes Na/K-ATPase est trois fois supérieure à celle engendrée par l'inhibition des canaux NKCC1.

La pompe Na/K-ATPase est présente au niveau basal des cellules sombres et transitionnelles aussi bien au stade de développement postnatal qu'au stade adulte (Bartolami *et al.*, 2011; McGuirt and Schulte, 1994; Schulte and Steel, 1994). La pompe Na/K-ATPase permet l'entrée de 2 ions  $K^+$  dans le cytosol et la sortie de 3 ions  $Na^+$  dans le milieu extra-cellulaire (Schwartz *et al.*, 1972), ce qui crée un gradient  $Na^+$  pour l'activité du co-transporteur NKCC1 (Wangemann, 1995). Par conséquent, une inhibition par l'ouabaïne de la pompe Na/K-ATPase des cellules sombres et transitionnelles, impacte également l'activité de NKCC1 des cellules transitionnelles. La pompe Na/K-ATPase joue donc un rôle clé dans la régulation de la concentration potassique de l'endolymphe des cultures 3D d'utricules et d'ampoules.

L'ensemble des résultats obtenus avec les inhibiteurs démontre que, à J7, les principaux canaux et pompes potassiques, impliqués dans le cycle du  $K^+$ , sont fonctionnels dans le modèle de cultures utilisé dans cette étude.

## 2. Toxicité vestibulaire des solvants aromatiques

Après avoir étudié le modèle 3D d'un point de vue morphologique et physiologique, les cultures ont été exposées aux solvants aromatiques pour évaluer leur potentiel vestibulotoxique et comprendre les mécanismes toxiques. Pour ce faire, les cultures ont été exposées à différents solvants : styrène, toluène, éthylbenzène et les 3 isomères du xylène. Les propriétés physico-chimiques des solvants aromatiques nous ont amenés à utiliser une méthode d'exposition directe et statique (Bakand and Hayes, 2010) ; le solvant, dont la concentration maximale utilisée était inférieure à celle que le seuil de solubilité aurait permis, a directement été ajouté dans le milieu de culture contenu dans les flacons chimiques scellés (McDermott *et al.*, 2007).



Pour évaluer le potentiel vestibulotoxique des solvants aromatiques, les cultures 3D d'utricules et d'ampoules ont été exposées durant 2 h et 72 h. Rappelons que l'exposition brève de 2 h a été choisie pour étudier les effets *pharmacologiques*, tandis que l'exposition prolongée de 72 h était plus adaptée à l'étude des effets cytotoxiques des solvants aromatiques. L'exposition de 72 h a été réalisée entre J4 et J7, lorsque la concentration en K<sup>+</sup> était stable (Figures 22 et 23), de sorte que le développement normal de la culture 3D n'interfère pas avec les effets des solvants aromatiques.

## 2.1. Exposition au styrène

Considéré comme un solvant de référence en raison de sa cochléotoxicité bien connue et des nombreuses études réalisées au sein du laboratoire (Campo *et al.*, 1999, 2001; Gagnaire and Langlais, 2005; Loquet *et al.*, 1999), le styrène a été le premier solvant aromatique testé dans cette étude.

Que ce soit après une exposition brève de 2 h, ou prolongée de 72 h, un effet du styrène dépendant de la concentration a été mis en évidence dans les cultures 3D d'utricules et d'ampoules (Figures 33 et 43). Une baisse significative de la concentration en K<sup>+</sup> a été mesurée à partir de 0,75 mM pour les cultures 3D d'ampoules et utricules exposés 2 h.

Les analyses histologiques, réalisées sur les cultures d'utricules après exposition à 1 mM durant 2 h et 72 h et sur les cultures d'ampoules après exposition à 1 mM durant 72 h, montrent une atteinte histopathologique des cellules épithéliales (Figures 34, 35 et 45). Les effets du styrène ne sont pas spécifiques à un type cellulaire, en effet les cellules sensorielles sont autant affectées que les cellules sécrétrices. En revanche, les cultures 3D d'ampoules exposées 2 h à 1 mM ne présentent pas de lésions cellulaires ; il se pourrait donc que les cultures ampullaires soient moins sensibles au styrène que les cultures utriculaires (Figure 44).

Quoi qu'il en soit, des vacuoles cytoplasmiques apparaissent dans les cellules de l'épithélium sensoriel et dans les aires sécrétrices des cultures 3D d'utricules exposées à 0,25, 0,5 et 0,75 mM durant 72 h et dans les cultures 3D d'ampoules exposées à 0,75 mM durant 72 h. Etant donné que des vacuoles apparaissent à des concentrations ne donnant pas lieu à des modifications de  $K^+$ , il paraît difficile de mettre en relation ces indices histopathologiques avec une baisse de la concentration en  $K^+$ . La présence de vacuoles ne semble pas être un indicateur robuste de la toxicité du styrène dans notre modèle d'étude. Cependant, même si la vacuolisation n'est pas un signe de mort cellulaire en soi, elle peut être considérée comme le signe précoce d'un stress cellulaire provoqué par l'action d'un agent cytotoxique (Shubin *et al.*, 2016).

Que ce soit des cystes utriculaire ou ampullaire, l'exposition à 1 mM de styrène pendant 72 h entraîne des variations de  $K^+$  et des dommages histopathologiques similaires (Figures 35 et 45). En effet, des baisses de concentration en  $K^+$  de 73 % dans les utricules et de 70 % dans les ampoules ont été mesurées (Figures 33.B et 43.B).

Par conséquent, les cultures 3D d'utricules et d'ampoules manifestent les mêmes effets après 72 h d'exposition à 1 mM de styrène. Les observations des dommages cellulaires engendrés par une exposition au styrène dans le modèle de cette étude nous ont amenées à nous interroger sur la nature de ces effets histopathologiques : apoptose ou nécrose ?

Pour étudier les mécanismes de mort cellulaire des cultures 3D exposées au styrène, des marquages immuno-histochimiques avec la caspase-3 clivée ont été analysés. La caspase-3 clivée a été choisie car des études *in vitro* sur des cultures d'utricules de poulet ont montré qu'elle pouvait être détectée après seulement 6 heures de traitement avec un agent ototoxique, comme la néomycine (Matsui *et al.*, 2004). Par conséquent, les analyses de la caspase-3 clivée ont été réalisées sur les cultures 3D exposées durant 72 h, en d'autres termes bien au-delà des 6 h nécessaires à l'activation de la caspase-3. La faible expression de la caspase-3 clivée dans les cultures 3D d'utricules exposées à 1 mM de styrène indique que le styrène n'induit probablement pas d'apoptose dans les conditions expérimentales de cette étude (Figures 36 et 37).

Le styrène déclencherait plutôt un mécanisme nécrotique qu'apoptotique en raison des caractéristiques histopathologiques observées : une faible densité cytoplasmique, des noyaux gonflés et l'absence de l'expression de caspase-3 dans les explants 3D d'utricules exposés à 1 mM durant 2 h et 72 h (Figures 34 et 35) et dans les explants 3D d'ampoules exposés à 1 mM durant 72 h (Figure 45). De plus, la plupart des études *in vitro* montrent que le styrène déclenche des phénomènes de nécrose cellulaire (Diodovich *et al.*, 2004).

Un autre moyen pour étudier les mécanismes de mort cellulaire est de quantifier l'ATP intracellulaire. En effet, lors du déclenchement de la nécrose, la quantité d'ATP intracellulaire chute, tandis qu'aucune modification de l'ATP n'est constatée lors de l'apoptose (Eguchi *et al.*, 1997; Leist *et al.*, 1997; Leist and Nicotera, 1997).

Une baisse du niveau d'ATP dans les cultures 3D d'ampoules exposées 72 h au styrène a été mesurée dès 0,5 mM, sans pour autant que le traitement n'ait induit une baisse significative de la concentration de K<sup>+</sup> (Figure 46.A). Nous pouvons donc en déduire que la concentration en K<sup>+</sup> du compartiment endolymphatique n'est pas directement corrélée à la quantité d'ATP mesurée dans le modèle entier. D'ailleurs, la baisse d'ATP des explants ampullaires exposés à 1 mM a été mesurée à partir de 4 h suggérant ainsi le déclenchement des programmes de mort cellulaire (Figure 46.B). En tout état de cause, la baisse de la concentration potassique après 2 h d'exposition à 1 mM du styrène est plus précoce que la baisse du niveau d'ATP. De plus, aucune lésion cellulaire n'a été observée après 2 h d'exposition à 1 mM de styrène (Figure 44). En conséquence, il n'est pas irraisonnable de penser que le styrène pourrait également avoir un effet pharmacologique précoce sur les explants 3D d'ampoules. D'ailleurs, de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont montré que des expositions de 30 secondes à 1 h à des solvants aromatiques pouvaient moduler l'activité des récepteurs NMDA et nicotiques, de la pompe Na/K-ATPase et celle des canaux calciques dépendants du voltage (Bale *et al.*, 2002, 2005; Calderón-Guzmán *et al.*, 2005a, 2005b; Cruz *et al.*, 1998, 2000; Lebel and Schatz, 1990; Maguin *et al.*, 2009; Vaalavirta and Tähti, 1995a, 1995b).

Que la baisse de concentration en  $K^+$  suite à une exposition au styrène soit due à un effet pharmacologique ou cytotoxique, la question reste entière. Les concentrations de styrène utilisées dans cette étude *in vitro* sont comprises entre 0,25 mM et 1 mM. Or, les concentrations de styrène utilisées dans d'autres études *in vitro* se situent entre 0,1 et 10 mM pour des expositions allant de 1 à 96 h ; ces expositions ont été investiguées pour évaluer la toxicité du styrène sur différentes cellules, telles que des cellules de sang de cordon ombilical humain, des cellules épithéliales pulmonaires ou des cultures primaires de neurones (Diodovich *et al.*, 2004; Harvilchuck *et al.*, 2009; Harvilchuck and Carlson, 2006; Kohn *et al.*, 1995). Les concentrations utilisées dans les expérimentations *in vitro* sont donc comparables à celles que nous avons testés dans cette étude. En revanche, il est indéniable que les concentrations utilisées avec nos explants sont plus élevées que celles retrouvées dans le sang après exposition de styrène par inhalation ou par gavage de rats.

Néanmoins, un modèle PBPK (*Physiologically Based Pharmacokinetic*) prédit que, chez le rat, après 6 h d'exposition à 1200 ppm de styrène, le sang contiendrait environ 0,8 mM de styrène et 0,25 mM après une exposition à 600 ppm (Sarangapani *et al.*, 2002). Par ailleurs, après 10 h d'exposition à 1750 ppm de styrène, le sang contient 0,382 mM de styrène (Campo *et al.*, 1999) et après 6 h d'exposition à 1000 ppm de styrène chez le rat, le sang contient 0,232 mM de styrène (Lataye *et al.*, 2003). Chen *et al.* (2007) ont montré qu'après gavage de styrène à une dose de 800 mg/kg, une concentration de 0,21 mM de styrène était mesurée et stable dans le sang pendant 6 h.

A la lecture de tous les résultats reportés ci-dessus, il apparaît que la concentration en styrène utilisée avec notre modèle sont plus élevées que celles rencontrées dans les expérimentations par inhalation ou par gavage, mais elles restent du même ordre de grandeur. La raison de cette différence pourrait être que le sang, riche en lipides, est une matrice ayant une meilleure affinité pour le styrène que le milieu de culture utilisé dans cette étude.

De plus, la méthode d'exposition *in vitro* de styrène est une méthode d'exposition statique, alors que l'activité cardiaque permet une exposition dynamique.

En résumé, l'ensemble de ces résultats indique que les concentrations de styrène utilisées dans cette étude sont comparables à celles utilisées dans la littérature et elles entraînent une baisse de la concentration potassique dans le compartiment endolymphatique dans les deux modèles 3D d'explant vestibulaire.

## 2.2. Exposition aux solvants aromatiques

Pour évaluer et comparer les effets des solvants aromatiques sur le modèle d'étude, cinq solvants : le toluène, l'éthylbenzène, le *p*-xylène, le *m*-xylène et l'*o*-xylène, dont les effets cochléotoxiques, ou non cochléotoxiques, sont connus ont été testés sur les cultures 3D d'utricules durant 2 h et 72 h à une concentration de 0,75 mM (Gagnaire and Langlais, 2005).

Cette concentration a été choisie en raison des résultats obtenus après 2 h ou 72 h d'exposition à 0,75 mM de styrène : une baisse de la concentration en  $K^+$  dans le compartiment endolymphatique qui n'induit pas de mort cellulaire (Figures 33, 34 et 35). Cette concentration apparaît donc comme la concentration idéale pour comparer les effets des solvants aromatiques sur les explants utriculaires.

Contrairement au styrène, tous les autres solvants aromatiques testés avec ce modèle n'ont pas modifié la concentration en  $K^+$  après 2 h d'exposition (Figure 38.A). En revanche, après 72 h d'exposition, une baisse de 78 % de la concentration en  $K^+$  a été mesurée avec l'*o*-xylène et une baisse de 37 % avec l'éthylbenzène (Figure 38.B). A l'inverse, le toluène, le *p*-xylène et le *m*-xylène n'ont pas modifié la concentration en  $K^+$ .

Les résultats histologiques des cultures 3D exposées 72 h aux solvants montrent que seul l'*o*-xylène, dont l'effet sur la concentration de  $K^+$  est le plus marqué, induit une mort cellulaire aussi bien dans l'épithélium sensoriel que dans l'épithélium sécréteur (Figure 42).

Les signes histopathologiques observés incluent une faible densité cytoplasmique, des extrusions cellulaires, un changement morphologique du noyau et laissent supposer que ces effets sont irréversibles : ce sont les mêmes signes histopathologiques que ceux observés après 72 h d'exposition à 1 mM de styrène (Figure 35).

Tout comme ce qui avait été constaté avec le styrène, la comparaison entre les données électrophysiologiques et histologiques montrent que la variation de la concentration de  $K^+$  est un événement précoce par rapport aux modifications histopathologiques. Par exemple, aucun signe histopathologique n'est visible après une exposition à l'éthylbenzène alors que ce dernier a entraîné une baisse de  $K^+$  de 37 % (Figures 38.B et 39). Pour évaluer la toxicité des solvants aromatiques, la variation de  $K^+$  peut être utilisée comme indicateur biologique, car elle est plus précoce que l'apparition des signes histopathologiques.

De la même manière qu'avec le styrène, les mécanismes de mort cellulaire après une exposition aux solvants aromatiques, ont été étudiés. Cette fois encore, les analyses de la caspase-3 clivée des cultures 3D d'utricules exposés aux solvants aromatiques indiquent qu'il n'y a pas eu, ou très peu, de déclenchement d'apoptose (Figure 40). Ces résultats sont en accord avec ceux de Diodovich *et al.* (2004, 2006) qui ont montré que le styrène déclenchait un processus nécrotique plutôt qu'apoptotique dans des cultures primaires d'hépatocytes ou de sang de cordon.

Bien que ce marquage ait été observé sur un échantillon exposé à l'*o*-xylène durant 72 h, il est probable que l'apoptose ne soit pas la voie de mort cellulaire majeure (Figure 41) et que l'*o*-xylène puisse déclencher en même temps des mécanismes apoptotiques et nécrotiques. Ces résultats ne sont pas surprenants dans le sens où les événements apoptotiques et nécrotiques coexistent dans de nombreuses situations pathologiques (Leist and Nicotera, 1997).

Comme précédemment, l'ATP total des explants utriculaires a été quantifiée après exposition aux différents solvants aromatiques (Figure 42). À l'exception du *m*-xylène, la majorité des solvants aromatiques ont induit une baisse significative du niveau d'ATP.

L'absence de corrélation entre les baisses de concentrations de  $K^+$ , et du niveau d'ATP total se confirme donc, cela renforce l'idée que la quantification de l'ATP ne permet pas d'évaluer spécifiquement le potentiel vestibulotoxique des solvants aromatiques avec ces modèles d'étude. En fait, la quantification de l'ATP reflète l'ensemble de l'activité métabolique des cellules des cultures 3D alors que les mesures de la concentration en  $K^+$  ne reflètent que le fonctionnement des cellules impliquées dans le cycle du potassium. La quantification d'ATP ne permet pas dans ce contexte, d'évaluer l'impact des solvants sur les cellules impliquées dans le cycle du potassium.

Les mesures de la concentration de  $K^+$  des cultures utriculaires suggèrent que la moitié des six solvants testés ont des propriétés vestibulotoxiques et qu'il est possible de les classer en fonction de leur potentiel vestibulotoxique : l'*o*-xylène est très vestibulotoxique, le styrène et l'éthylbenzène ont des effets vestibulotoxiques modérés, tandis que le toluène, le *p*-xylène et le *m*-xylène ne sont pas vestibulotoxiques dans nos conditions expérimentales (Tableau 7). Or, chaque solvant aromatique testé possède des propriétés physico-chimiques spécifiques.


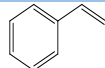
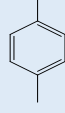

C'est pour cette raison que nous avons cherché un lien entre l'effet toxique et les propriétés physico-chimiques des différents solvants testés. Vaalavirta et Tähti (1995b) ont démontré que les solvants aromatiques diminuaient l'activité de la Na/K-ATPase dans des cultures primaires d'astrocytes de rat et que cet effet était lié à la lipophilie de ces agents chimiques. Cependant, les données présentées dans notre étude ne soutiennent pas cette hypothèse puisque les solvants, ayant des coefficients de partage octanol / eau ( $\log P$ ) proches, ont des effets très différents sur les concentrations de  $K^+$ . Par exemple, le *m*-xylène et le *p*-xylène ont peu d'effets sur la concentration de  $K^+$ , tandis que l'*o*-xylène et l'éthylbenzène entraînent une baisse significative. Par conséquent, les propriétés lipophiles des solvants ne peuvent à elles seules expliquer les effets vestibulotoxiques.

En revanche, la structure chimique des solvants aromatiques, en particulier l'encombrement stérique, pourrait expliquer les différences de toxicité observées. Par exemple, le nombre de carbones et la nature des liaisons de la chaîne latérale du cycle aromatique pourraient jouer un rôle dans le pouvoir vestibulotoxique de ces molécules. En effet, l'éthylbenzène et le styrène ont chacun deux carbones sur la chaîne latérale, et ces deux molécules entraînent des variations importantes de la concentration en  $K^+$ . Pour étudier une éventuelle relation entre la structure chimique du solvant et sa toxicité, il serait intéressant de tester d'autres molécules, en l'occurrence des molécules ayant un nombre d'atomes de carbone supérieur à 2 dans la chaîne latérale. Mais le nombre de carbone de la chaîne latérale ne suffit pas pour expliquer la toxicité des solvants aromatiques avec notre modèle puisque l'*o*-xylène s'est révélé très vestibulotoxique bien qu'il ne possède par de chaîne latérale à 2 carbones.

En fait, la position des groupes méthyle autour du cycle benzénique pourrait jouer un rôle dans l'ototoxicité de ces molécules. Si l'on se réfère aux études de cochléotoxicité, l'hypothèse d'une relation structure / effet toxique des solvants aromatiques avait été soulevée suite à des expositions de xylène chez le rat (Gagnaire *et al.*, 2001, 2007a, 2007b ; Maguin *et al.*, 2006). Les résultats de ces études ont montré que le *p*-xylène est plus cochléotoxique que l'*o*-xylène, ce qui contraste avec les résultats obtenus avec notre modèle *in vitro*. Cette différence pourrait s'expliquer par de multiples facteurs et il est difficile d'établir des parallèles entre la vestibulotoxicité *in vitro* et la cochléotoxicité *in vivo*. De même, des études sur l'ototoxicité des aminoglycosides ont mis en exergue des différences entre la vestibulotoxicité et la cochléotoxicité (Freeman *et al.*, 2001; Kitasato *et al.*, 1990; Nakashima *et al.*, 2000). Ainsi, la toxicité des agents ototoxiques pourrait dépendre de la sensibilité sélective des cellules cochléaires et vestibulaires.



Tableau 7 : Comparaison entre les effets cochléotoxiques et vestibulotoxiques des solvants aromatiques.

Solvant aromatique	Vestibulotoxité (variation de K <sup>+</sup> )	Vestibulotoxité (dommages cellulaires)	Vestibulotoxité (baisse du niveau d' ATP)	Cochléotoxité (pertes de cellules ciliées)	LogP	Structure
<b>o-Xylène</b>	++	++	++	-	3,12	
<b>Styrène</b>	+	+	++	++	2,95	
<b>Éthylbenzène</b>	+	-	++	++	3,15	
<b>Toluène</b>	-	-	++	+	2,73	
<b>p-Xylène</b>	-	-	++	+	3,15	
<b>m-Xylène</b>	-	-	+/-	-	3,2	

La structure et la lipophilie (coefficient de partage octanol / eau) de chaque solvant sont indiquées. Les propriétés cochléotoxiques de chaque solvant ont été rapportées de (Gagnaire and Langlais, 2005), les effets vestibulotoxiques (variation K<sup>+</sup>, dommages cellulaires et baisse du niveau d'ATP) correspondent aux résultats de la présente étude. Les effets sont classés comme suivant: « ++ » pour fortement, « + » pour modéré et « - » pour non actif.

## CONCLUSIONS

Les modèles *in vitro* développés dans cette étude permettent d'évaluer le fonctionnement physiologique des cellules vestibulaires et plus particulièrement l'impact de molécules testées sur le cycle du potassium. Ils permettent également d'étudier l'impact histopathologique des solvants aromatiques sur le récepteur vestibulaire.

Parmi les différents solvants aromatiques testés dans cette étude, les cultures 3D d'utricules permettent de classer les solvants selon les modifications de concentration en  $K^+$  qu'ils provoquent : l'*o*-xylène est le plus impactant, le styrène et l'éthylbenzène sont modérément impactants, tandis que le toluène, le *p*-xylène et le *m*-xylène n'ont aucun effet mesurable sur la concentration en  $K^+$ . La structure moléculaire détermine donc le pouvoir vestibulotoxique dans ce modèle *in vitro*.

De plus, les résultats de cette étude montrent que les variations de la concentration en  $K^+$  apparaissent avant les dommages histologiques. La variation de la concentration potassique peut donc être utilisée comme marqueur précoce de la vestibulotoxicité des agents chimiques pour distinguer les composés vestibulotoxiques des non vestibulotoxiques.

Les résultats de notre étude obtenus avec les modèles de culture d'explants vestibulaires suggèrent que les solvants aromatiques n'auraient pas les mêmes effets sur la cochlée que sur le vestibule. Un solvant cochléotoxique ne serait pas nécessairement vestibulotoxique et *vice et versa*. Reste encore à comparer ces toxicités avec des approches expérimentales similaires qui seront évoquées dans les perspectives.

## PERSPECTIVES

Bien que les mesures de la concentration en  $K^+$  dans le compartiment endolymphatique des cultures 3D d'utricules et d'ampoules permettent d'évaluer le pouvoir vestibulotoxique des solvants aromatiques utilisés dans le secteur industriel, elles ont leurs limites. En effet, comme tout modèle *in vitro*, les cultures 3D d'explants vestibulaires ne prennent pas en compte la complexité de la physiologie d'un organisme entier. Dans un modèle *in vivo*, il pourrait y avoir des interactions entre les facteurs impliqués dans le cycle du potassium (Milhaud *et al.*, 2002; Wangemann *et al.*, 1999) et les agents chimiques testés, ce qui n'existe pas dans un système *in vitro*. De plus, le modèle utilisé dans cette étude se résume à un organe isolé en culture qui ne permet pas d'intégrer la métabolisation des molécules testées. L'absence de circulation sanguine peut entraîner un biais dans les cultures d'explants vestibulaires.

Dans un premier temps, il sera nécessaire, de valider les résultats obtenus avec le modèle de cultures 3D d'explants vestibulaires par des approches expérimentales *in vivo*. Une panoplie de tests permettant d'évaluer la fonction vestibulaire d'animaux exposés aux solvants aromatiques pourrait être réalisée. Les enregistrements des mouvements ou de la position des yeux (par électroystagmographie ou électrooculographie) après différents stimuli permettront d'évaluer la fonction des canaux semi-circulaires (Brandt and Strupp, 2005). En plus des enregistrements des mouvements des yeux, d'autres méthodes électrophysiologiques tels que les potentiels évoqués vestibulaires myogéniques oculaires (PEVMo) et cervicales (PEVMc) permettraient d'évaluer respectivement les fonctions utriculaire et sacculaire (Murofushi *et al.*, 1995; Young, 2018). Des batteries de tests comportementaux peuvent aussi être réalisées pour évaluer semi-quantitativement des dysfonctionnements vestibulaires, telles que les observations de comportement spontané et de réflexes anti-gravité (Martins-Lopes *et al.*, 2019). Associées aux tests fonctionnels, des analyses histologiques du récepteur vestibulaire peuvent aussi être envisagées pour localiser les dommages cellulaires.

Par exemple, des études expérimentales sur des modèles animaux exposés à des agents vestibulotoxiques ont montré que les dysfonctionnements vestibulaires sont associés à des lésions des épithéliums neurosensoriels du récepteur vestibulaire (Callejo *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2013; Llorens *et al.*, 1993). Des expérimentations *in vivo* permettraient de valider la pertinence des mesures de variations de  $K^+$  du compartiment endolymphatique réalisées dans les cultures 3D et de crédibiliser ce paramètre comme un marqueur prédictif de la vestibulotoxicité.

Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'étendre la liste des solvants aromatiques à tester sur les cultures 3D d'utricules et d'ampoules. L'évaluation des effets avec des molécules dont la structure est plus complexe devrait permettre d'établir un lien entre la structure chimique et la toxicité vestibulaire.

Enfin, le développement d'un modèle *in vitro* pour évaluer la toxicité vestibulaire des agents chimiques ouvre la voie à de nouvelles investigations. Ce modèle permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la toxicité vestibulaire et facilitera les études mécanistiques. D'autres techniques électrophysiologiques (patch clamp par exemple), des méthodes histologiques plus diversifiées ou des techniques de biologie moléculaire (RT-PCR, western blot, tests ELISA...) pourraient être réalisées pour analyser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la toxicité des agents chimiques sur le récepteur vestibulaire.

## INTERETS POUR LA PREVENTION

L'intérêt de ces travaux en prévention relève essentiellement dans la possibilité d'utiliser ce test comme un modèle de criblage. En effet, il existe une multitude de substances chimiques, et de mélanges, qui sont utilisés quotidiennement dans le secteur industriel. Il est donc impossible de mener des expérimentations complètes sur chacune de ces substances avec une approche *in vivo*. Ce modèle *in vitro* pourra donc être mis à disposition des chercheurs pour prioriser les molécules nécessitant des expérimentations plus approfondies avec des modèles d'étude *in vivo*.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbate, C., Giorgianni, C., Munaò, F., Brecciaroli, R., 1993. Neurotoxicity induced by exposure to toluene. An electrophysiologic study. *Int Arch Occup Environ Health* 64, 389–392. <https://doi.org/10.1007/BF00517943>
- Agrawal, Y., Carey, J.P., Della Santina, C.C., Schubert, M.C., Minor, L.B., 2009. Disorders of balance and vestibular function in US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001-2004. *Arch. Intern. Med.* 169, 938–944. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2009.66>
- Agrawal, Y., Ward, B.K., Minor, L.B., 2013. Vestibular dysfunction: prevalence, impact and need for targeted treatment. *J Vestib Res* 23, 113–117. <https://doi.org/10.3233/VES-130498>
- Anniko, M., 1980a. The post-natal mammalian labyrinthine secretory epithelium in vitro. *Acta Oto-Laryngologica* 90, 237–243. <https://doi.org/10.3109/00016488009131720>
- Anniko, M., 1980b. Embryologic development in vivo and in vitro of the dark cell region of the mammalian crista ampullaris. *Acta Otolaryngol.* 90, 106–114. <https://doi.org/10.3109/00016488009131705>
- Anniko, M., Nordemar, H., 1980. Embryogenesis of the inner ear. IV. Post-natal maturation of the secretory epithelia of the inner ear in correlation with the elemental composition in the endolymphatic space. *Arch Otorhinolaryngol* 229, 281–288.
- Arlie-Søborg, P., Zilstorff, K., Grandjean, B., Milling Pedersen, L., 1981. Vestibular dysfunction in occupational chronic solvent intoxication. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 6, 285–290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2273.1981.tb01549.x>
- Aschan, G., Bunnfors, I., Hydén, D., Larsby, B., Odkvist, L.M., Tham, R., 1977. Electronystagmographic and gaschromatographic studies in rabbits. *Acta Otolaryngol.* 84, 370–376. <https://doi.org/10.3109/00016487709123979>
- Aylott, S., Prasher, D., 2002. Solvents impair balance in Man. *Noise Health* 4, 63–71.
- Bakand, S., Hayes, A., 2010. Troubleshooting methods for toxicity testing of airborne chemicals in vitro. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 61, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.01.010>
- Bale, A.S., Meacham, C.A., Benignus, V.A., Bushnell, P.J., Shafer, T.J., 2005. Volatile organic compounds inhibit human and rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205, 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.011>
- 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. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704874>
- Bao, H., Wong, W.H., Goldberg, J.M., Eatock, R.A., 2003. Voltage-gated calcium channel currents in type I and type II hair cells isolated from the rat crista. *J. Neurophysiol.* 90, 155–164. <https://doi.org/10.1152/jn.00244.2003>
- Barmack, N.H., 2003. Central vestibular system: vestibular nuclei and posterior cerebellum. *Brain Research Bulletin* 60, 511–541. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(03\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(03)00055-8)
- Bartolami, S., Gaboyard, S., Quentin, J., Travo, C., Cavalier, M., Barhanin, J., Chabbert, C., 2011. Critical Roles of Transitional Cells and Na/K-ATPase in the Formation of Vestibular Endolymph. *Journal of Neuroscience* 31, 16541–16549. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2430-11.2011>

- Bergamaschi, E., Smargiassi, A., Mutti, A., Cavazzini, S., Vettori, M.V., Alinovi, R., Franchini, I., Mergler, D., 1997. Peripheral markers of catecholaminergic dysfunction and symptoms of neurotoxicity among styrene-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 69, 209–214.
- Boyer, C., Lehouelleur, J., Sans, A., 1998. Potassium depolarization of mammalian vestibular sensory cells increases  $[Ca^{2+}]_i$  through voltage-sensitive calcium channels. *Eur. J. Neurosci.* 10, 971–975. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00107.x>
- Brandt, T., Strupp, M., 2005. General vestibular testing. *Clin Neurophysiol* 116, 406–426. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2004.08.009>
- Brandt-Lassen, R., Lund, S.P., Jepsen, G.B., 2000. Rats exposed to Toluene and Noise may develop Loss of Auditory Sensitivity due to Synergistic Interaction. *Noise Health* 3, 33–44.
- Britton, Z., Arshad, Q., 2019. Vestibular and Multi-Sensory Influences Upon Self-Motion Perception and the Consequences for Human Behavior. *Front Neurol* 10, 63. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00063>
- Calabrese, G., Martini, A., Sessa, G., Cellini, M., Bartolucci, G.B., Marcuzzo, G., De Rosa, E., 1996. Otoneurological study in workers exposed to styrene in the fiberglass industry. *Int Arch Occup Environ Health* 68, 219–223.
- Calderón-Guzmán, D., Espitia-Vázquez, I., López-Domínguez, A., Hernández-García, E., Huerta-Gertrudis, B., Coballase-Urritia, E., Juárez-Olguín, H., García-Fernández, B., 2005a. Effect of toluene and nutritional status on serotonin, lipid peroxidation levels and  $NA^+/K^+-ATPase$  in adult rat brain. *Neurochem. Res.* 30, 619–624. <https://doi.org/10.1007/s11064-005-2749-2>
- Calderón-Guzmán, D., Hernández-Islas, J.L., Espitia Vázquez, I.R., Barragán-Mejía, G., Hernández-García, E., Del Angel, D.S., Juárez-Olguín, H., 2005b. Effect of toluene and cresols on  $Na^+,K^+-ATPase$ , and serotonin in rat brain. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 41, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2004.09.005>
- Callejo, A., Durochat, A., Bressieux, S., Saleur, A., Chabbert, C., Domènech Juan, I., Llorens, J., Gaboyard-Niay, S., 2017. Dose-dependent cochlear and vestibular toxicity of trans-tympanic cisplatin in the rat. *NeuroToxicology* 60, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.02.007>
- Campo, P., Lataye, R., Cossec, B., Placidi, V., 1997. Toluene-induced hearing loss: a mid-frequency location of the cochlear lesions. *Neurotoxicol Teratol* 19, 129–140. [https://doi.org/10.1016/s0892-0362\(96\)00214-0](https://doi.org/10.1016/s0892-0362(96)00214-0)
- Campo, P., Lataye, R., Loquet, G., Bonnet, P., 2001. Styrene-induced hearing loss: a membrane insult. *Hear. Res.* 154, 170–180.
- Campo, P., Loquet, G., Blachère, V., Roure, M., 1999. Toluene and styrene intoxication route in the rat cochlea. *Neurotoxicol Teratol* 21, 427–434.
- Campo, P., Loquet, G., Morel, G., Lataye, R., 2005. Combined effects of noise and styrene on hearing: Comparison between active and sedentary rats. *Noise Health* 7, 49. <https://doi.org/10.4103/1463-1741.31633>
- Campo, P., Maguin, K., 2007. Solvent-induced hearing loss: mechanisms and prevention strategy. *Int J Occup Med Environ Health* 20, 265–270. <https://doi.org/10.2478/v10001-007-0031-3>
- Campo, P., Morata, T.C., Hong, O., 2013a. Chemical exposure and hearing loss. *Disease-a-Month* 59, 119–138. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2013.01.003>

- Campo, P., Venet, T., Thomas, A., Cour, C., Castel, B., Nunge, H., Cosnier, F., 2013b. Inhaled toluene can modulate the effects of anesthetics on the middle-ear acoustic reflex. *Neurotoxicol Teratol* 35, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.11.002>
- Campo, P., Waniusiow, D., Cossec, B., Lataye, R., Rieger, B., Cosnier, F., Burgart, M., 2008. Toluene-induced hearing loss in phenobarbital treated rats. *Neurotoxicol Teratol* 30, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2007.10.001>
- Cappaert, N.L., Klis, S.F., Baretta, A.B., Muijser, H., Smoorenburg, G.F., 2000. Ethyl benzene-induced ototoxicity in rats: a dose-dependent mid-frequency hearing loss. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 1, 292–299. <https://doi.org/10.1007/s101620010050>
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(99\)00141-0](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(99)00141-0)
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(01\)00373-2](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(01)00373-2)
- Cappaert, N.L.M., Klis, S.F.L., Muijser, H., Kulig, B.M., Ravensberg, L.C., Smoorenburg, G.F., 2002. Differential susceptibility of rats and guinea pigs to the ototoxic effects of ethyl benzene. *Neurotoxicol Teratol* 24, 503–510. [https://doi.org/10.1016/s0892-0362\(02\)00208-8](https://doi.org/10.1016/s0892-0362(02)00208-8)
- Carini, F., Mazzola, M., Fici, C., Palmeri, S., Messina, M., Damiani, P., Tomasello, G., 2017. Posture and posturology, anatomical and physiological profiles: overview and current state of art. *Acta Biomed* 88, 11–16. <https://doi.org/10.23750/abm.v88i1.5309>
- Casale, J., Gupta, G., 2020. Physiology, Vestibular System, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Casimiro, M.C., Knollmann, B.C., Ebert, S.N., Vary, J.C., Greene, A.E., Franz, M.R., Grinberg, A., Huang, S.P., Pfeifer, K., 2001. Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 2526–2531. <https://doi.org/10.1073/pnas.041398998>
- Chang, S.-J., Chen, C.-J., Lien, C.-H., Sung, F.-C., 2006. Hearing loss in workers exposed to toluene and noise. *Environ. Health Perspect.* 114, 1283–1286. <https://doi.org/10.1289/ehp.8959>
- Chen, G.-D., Chi, L.-H., Kostyniak, P.J., Henderson, D., 2007. Styrene induced alterations in biomarkers of exposure and effects in the cochlea: mechanisms of hearing loss. *Toxicol. Sci.* 98, 167–177. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm078>
- Chen, G.-D., Henderson, D., 2009. Cochlear injuries induced by the combined exposure to noise and styrene. *Hear. Res.* 254, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2009.04.005>
- Chen, G.-D., Tanaka, C., Henderson, D., 2008. Relation between outer hair cell loss and hearing loss in rats exposed to styrene. *Hear. Res.* 243, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2008.05.008>
- Citron, L., Exley, D., 1957. Recent work on the biochemistry of the labyrinthine fluids. *Proc. R. Soc. Med.* 50, 697–701.
- Ciuman, R.R., 2009. Stria vascularis and vestibular dark cells: characterisation of main structures responsible for inner-ear homeostasis, and their pathophysiological relations. *The Journal of Laryngology & Otology* 123, 151. <https://doi.org/10.1017/S0022215108002624>



- Coppens, A.G., Salmon, I., Heizmann, C.W., Poncelet, L., 2004. Dark-cell areas in the dog vestibular endorgans: an immunohistochemical study. *Histol. Histopathol.* 19, 1227–1235. <https://doi.org/10.14670/HH-19.1227>
- Correia, M.J., Lang, D.G., 1990. An electrophysiological comparison of solitary type I and type II vestibular hair cells. *Neurosci. Lett.* 116, 106–111. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90394-o](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90394-o)
- Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S., 1994. Solvent-induced ototoxicity in rats: an atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.* 80, 25–30. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0378-5955(94)90005-1)
- Crouch, J.J., Sakaguchi, N., Lytle, C., Schulte, B.A., 1997. Immunohistochemical localization of the Na-K-Cl co-transporter (NKCC1) in the gerbil inner ear. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 773–778. <https://doi.org/10.1177/002215549704500601>
- 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. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703666>
- 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.
- Cullen, K.E., 2012. The vestibular system: multimodal integration and encoding of self-motion for motor control. *Trends Neurosci.* 35, 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.12.001>
- Day, B.L., Fitzpatrick, R.C., 2005. The vestibular system. *Curr. Biol.* 15, R583–586. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.053>
- Dechesne, C., Mbiene, J.P., Sans, A., 1986. Postnatal development of vestibular receptor surfaces in the rat. *Acta Otolaryngol.* 101, 11–18. <https://doi.org/10.3109/00016488609108602>
- Deliagina, T.G., Orlovsky, G.N., Zelenin, P.V., Beloozerova, I.N., 2006. Neural bases of postural control. *Physiology (Bethesda)* 21, 216–225. <https://doi.org/10.1152/physiol.00001.2006>
- Delpire, E., Lu, J., England, R., Dull, C., Thorne, T., 1999. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat. Genet.* 22, 192–195. <https://doi.org/10.1038/9713>
- Desai, S.S., Ali, H., Lysakowski, A., 2005a. Comparative morphology of rodent vestibular periphery. II. Cristae ampullares. *J. Neurophysiol.* 93, 267–280. <https://doi.org/10.1152/jn.00747.2003>
- Desai, S.S., Zeh, C., Lysakowski, A., 2005b. Comparative morphology of rodent vestibular periphery. I. Saccular and utricular maculae. *J. Neurophysiol.* 93, 251–266. <https://doi.org/10.1152/jn.00746.2003>
- Dick, F.D., 2006. Solvent neurotoxicity. *Occup Environ Med* 63, 221–226, 179. <https://doi.org/10.1136/oem.2005.022400>
- Diodovich, C., Bianchi, M.G., Bowe, G., Acquati, F., Taramelli, R., Parent-Massin, D., Gribaldo, L., 2004. Response of human cord blood cells to styrene exposure: evaluation of its effects on apoptosis and gene expression by genomic technology. *Toxicology* 200, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.03.021>
- Diodovich, C., Urani, C., Maurici, D., Malerba, I., Melchiorretto, P., Orlandi, M., Zoia, L., Campi, V., Carfi, M., Pellizzer, C., Gribaldo, L., 2006. Modulation of different stress pathways after styrene and styrene-7,8-oxide exposure in HepG2 cell line and normal human hepatocytes. *J Appl Toxicol* 26, 317–325. <https://doi.org/10.1002/jat.1142>

- Dravis, C., Wu, T., Chumley, M.J., Yokoyama, N., Wei, S., Wu, D.K., Marcus, D.C., Henkemeyer, M., 2007. EphB2 and ephrin-B2 regulate the ionic homeostasis of vestibular endolymph. *Hearing Research* 223, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2006.10.007>
- Eatock, R.A., Hurley, K.M., Vollrath, M.A., 2002. Mechanoelectrical and voltage-gated ion channels in mammalian vestibular hair cells. *Audiol. Neurootol.* 7, 31–35. <https://doi.org/10.1159/000046860>
- Eatock, R.A., Rüschi, A., Lysakowski, A., Saeki, M., 1998. Hair cells in mammalian utricles. *Otolaryngol Head Neck Surg* 119, 172–181. [https://doi.org/10.1016/S0194-5998\(98\)70052-X](https://doi.org/10.1016/S0194-5998(98)70052-X)
- Eatock, R.A., Songer, J.E., 2011. Vestibular hair cells and afferents: two channels for head motion signals. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 501–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113710>
- Eguchi, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 57, 1835–1840.
- Estévez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhäger, R., Otto, E., Hildebrandt, F., Jentsch, T.J., 2001. Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel beta-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature* 414, 558–561. <https://doi.org/10.1038/35107099>
- Fahlke, C., Fischer, M., 2010. Physiology and pathophysiology of Cl<sup>-</sup>-K<sup>+</sup>/barttin channels. *Front Physiol* 1, 155. <https://doi.org/10.3389/fphys.2010.00155>
- Fechter, L.D., 1993. Effects of acute styrene and simultaneous noise exposure on auditory function in the guinea pig. *Neurotoxicol Teratol* 15, 151–155. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(93\)90010-l](https://doi.org/10.1016/0892-0362(93)90010-l)
- Fechter, L.D., Gearhart, C., Fulton, S., Campbell, J., Fisher, J., Na, K., Cocker, D., Nelson-Miller, A., Moon, P., Pouyatos, B., 2007. Promotion of noise-induced cochlear injury by toluene and ethylbenzene in the rat. *Toxicol. Sci.* 98, 542–551. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm109>
- Ferrary, E., Bernard, C., Oudar, O., Sterkers, O., Amiel, C., 1992. Secretion of endolymph by the isolated frog semicircular canal. *Acta Otolaryngol.* 112, 294–298. <https://doi.org/10.1080/00016489.1992.11665421>
- Ferrary, E., Couloigner, V., Sterkers, O., 2007. Physiologie des liquides labyrinthiques. *EMC - Oto-rhino-laryngologie* 2, 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0246-0351\(07\)41887-6](https://doi.org/10.1016/S0246-0351(07)41887-6)
- Ferrary, E., Sterkers, O., 1998. Mechanisms of endolymph secretion. *Kidney Int. Suppl.* 65, S98-103.
- Fetoni, A.R., Rolesi, R., Paciello, F., Eramo, S.L.M., Grassi, C., Troiani, D., Paludetti, G., 2016. Styrene enhances the noise induced oxidative stress in the cochlea and affects differently mechanosensory and supporting cells. *Free Radic. Biol. Med.* 101, 211–225. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.014>
- Fina, M., Ryan, A., 1994. Expression of mRNAs encoding alpha and beta subunit isoforms of Na,K-ATPase in the vestibular labyrinth and endolymphatic sac of the rat. *Mol. Cell. Neurosci.* 5, 604–613. <https://doi.org/10.1006/mcne.1994.1074>
- Fischer, C.S., Bayer, O., Strupp, M., 2014. Transient bilateral vestibular dysfunction caused by intoxication with low doses of styrene. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271, 619–623. <https://doi.org/10.1007/s00405-013-2819-z>
- Forge, A., Schacht, J., 2000. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurootol* 5, 3–22. <https://doi.org/10.1159/000013861>

- Freeman, S., Priner, R., Elidan, J., Sohmer, H., 2001. Objective method for differentiating between drug-induced vestibulotoxicity and cochleotoxicity. *Otol. Neurotol.* 22, 70–75. <https://doi.org/10.1097/00129492-200101000-00014>
- Gaboyard, S., Chabbert, C., Travo, C., Bancel, F., Lehouelleur, J., Yamauchi, D., Marcus, D.C., Sans, A., 2005. Three-dimensional culture of newborn rat utricle using an extracellular matrix promotes formation of a cyst. *Neuroscience* 133, 253–265. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.02.011>
- Gagnaire, F., Langlais, C., 2005. Relative ototoxicity of 21 aromatic solvents. *Archives of Toxicology* 79, 346–354. <https://doi.org/10.1007/s00204-004-0636-2>
- Gagnaire, F., Langlais, C., Grossmann, S., Wild, P., 2007a. Ototoxicity in rats exposed to ethylbenzene and to two technical xylene vapours for 13 weeks. *Arch. Toxicol.* 81, 127–143. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0124-y>
- Gagnaire, F., Marignac, B., Blachère, V., Grossmann, S., Langlais, C., 2007b. The role of toxicokinetics in xylene-induced ototoxicity in the rat and guinea pig. *Toxicology* 231, 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.075>
- Gagnaire, F., Marignac, B., Langlais, C., Bonnet, P., 2001. Ototoxicity in rats exposed to ortho-, meta- and para-xylene vapours for 13 weeks. *Pharmacol. Toxicol.* 89, 6–14. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2001.d01-129.x>
- Gans, R.E., Rauterkus, G., Research Associate 1, 2019. Vestibular Toxicity: Causes, Evaluation Protocols, Intervention, and Management. *Semin Hear* 40, 144–153. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1684043>
- Géléoc, G.S.G., Holt, J.R., 2003. Developmental acquisition of sensory transduction in hair cells of the mouse inner ear. *Nat. Neurosci.* 6, 1019–1020. <https://doi.org/10.1038/nn1120>
- Gillespie, P.G., 1995. Molecular machinery of auditory and vestibular transduction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 449–455. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80004-2](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80004-2)
- Gillespie, P.G., Müller, U., 2009. Mechanotransduction by hair cells: models, molecules, and mechanisms. *Cell* 139, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.010>
- Gillespie, P.G., Walker, R.G., 2001. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature* 413, 194–202. <https://doi.org/10.1038/35093011>
- Gnedeva, K., Jacobo, A., Salvi, J.D., Petelski, A.A., Hudspeth, A.J., 2017. Elastic force restricts growth of the murine utricle. *Elife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.25681>
- Gradogna, A., Pusch, M., 2010. Molecular Pharmacology of Kidney and Inner Ear CLC-K Chloride Channels. *Front Pharmacol* 1, 130. <https://doi.org/10.3389/fphar.2010.00130>
- Gu, R., Montcouquiol, M., Marchionni, M., Corwin, J.T., 2007. Proliferative responses to growth factors decline rapidly during postnatal maturation of mammalian hair cell epithelia. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1363–1372. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05414.x>
- Hackney, C.M., Furness, D.N., 2013. The composition and role of cross links in mechano-electrical transduction in vertebrate sensory hair cells. *J. Cell. Sci.* 126, 1721–1731. <https://doi.org/10.1242/jcs.106120>
- Harvilchuck, J.A., Carlson, G.P., 2006. Comparison of styrene and its metabolites styrene oxide and 4-vinylphenol on cytotoxicity and glutathione depletion in Clara cells of mice and rats. *Toxicology* 227, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.08.001>
- Harvilchuck, J.A., Pu, X., Klaunig, J.E., Carlson, G.P., 2009. Indicators of oxidative stress and apoptosis in mouse whole lung and Clara cells following exposure to styrene and its metabolites. *Toxicology* 264, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.08.001>

- Herpin, G., Gargouri, I., Gauchard, G.C., Nisse, C., Khadhraoui, M., Elleuch, B., Zmirou-Navier, D., Perrin, P.P., 2009. Effect of chronic and subchronic organic solvents exposure on balance control of workers in plant manufacturing adhesive materials. *Neurotox Res* 15, 179–186. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9018-0>
- Herpin, G., Gauchard, G.C., Vouriot, A., Hannhart, B., Barot, A., Mur, J.-M., Zmirou-Navier, D., Perrin, P.P., 2008. Impaired neuromotor functions in hospital laboratory workers exposed to low levels of organic solvents. *Neurotox Res* 13, 185–196. <https://doi.org/10.1007/BF03033502>
- Hibino, H., Kurachi, Y., 2006. Molecular and Physiological Bases of the K<sup>+</sup> Circulation in the Mammalian Inner Ear. *Physiology* 21, 336–345. <https://doi.org/10.1152/physiol.00023.2006>
- Hibino, H., Nin, F., Tsuzuki, C., Kurachi, Y., 2010. How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflugers Arch.* 459, 521–533. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0754-z>
- Hodgkinson, L., Prasher, D., 2006. Effects of industrial solvents on hearing and balance: a review. *Noise Health* 8, 114–133.
- Hoet, P., Lison, D., 2008. Ototoxicity of toluene and styrene: state of current knowledge. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 127–170. <https://doi.org/10.1080/10408440701845443>
- Horak, F.B., 2006. Postural orientation and equilibrium: what do we need to know about neural control of balance to prevent falls? *Age Ageing* 35 Suppl 2, ii7–ii11. <https://doi.org/10.1093/ageing/af1077>
- Howard, J., Roberts, W.M., Hudspeth, A.J., 1988. Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Annu Rev Biophys Chem* 17, 99–124. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.17.060188.000531>
- Hudspeth, A.J., 1989. How the ear's works work. *Nature* 341, 397–404. <https://doi.org/10.1038/341397a0>
- Hughes, H., Hunting, K.L., 2013. Evaluation of the effects of exposure to organic solvents and hazardous noise among US Air Force Reserve personnel. *Noise Health* 15, 379–387. <https://doi.org/10.4103/1463-1741.121224>
- Hunting, K.L., Matanoski, G.M., Larson, M., Wolford, R., 1991. Solvent exposure and the risk of slips, trips, and falls among painters. *Am. J. Ind. Med.* 20, 353–370. <https://doi.org/10.1002/ajim.4700200308>
- Hurley, K.M., Gaboyard, S., Zhong, M., Price, S.D., Woollorton, J.R.A., Lysakowski, A., Eatock, R.A., 2006. M-like K<sup>+</sup> currents in type I hair cells and calyx afferent endings of the developing rat utricle. *J. Neurosci.* 26, 10253–10269. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2596-06.2006>
- Hydén, D., Larsby, B., Andersson, H., Odkvist, L.M., Liedgren, S.R., Tham, R., 1983. Impairment of visuo-vestibular interaction in humans exposed to toluene. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 45, 262–269. <https://doi.org/10.1159/000275653>
- Igarashi, Y., 1989. Submicroscopic study of the vestibular dark cell area in human fetuses. *Acta Otolaryngol* 107, 29–38. <https://doi.org/10.3109/00016488909127476>
- Iwata, T., Mori, H., Dakeishi, M., Onozaki, I., Murata, K., 2005. Effects of mixed organic solvents on neuromotor functions among workers in Buddhist altar manufacturing factories. *J Occup Health* 47, 143–148. <https://doi.org/10.1539/joh.47.143>
- Johnson, A.C., Canlon, B., 1994. Toluene exposure affects the functional activity of the outer hair cells. *Hear. Res.* 72, 189–196. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(94\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0378-5955(94)90218-6)

- Kawasaki, K., Yamamoto, A., Omori, K., Iwano, T., Kumazawa, T., Tashiro, Y., 1992. Quantitative immunoelectron microscopic localization of Na, K-ATPase alpha-subunit in the epithelial cells of rat vestibular apparatus. *Hear. Res.* 60, 64–72. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(92\)90059-v](https://doi.org/10.1016/0378-5955(92)90059-v)
- Kharkovets, T., Hardelin, J.P., Safieddine, S., Schweizer, M., El-Amraoui, A., Petit, C., Jentsch, T.J., 2000. KCNQ4, a K<sup>+</sup> channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4333–4338. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.8.4333>
- Kim, H.J., Lee, J.O., Koo, J.W., Kim, J.-S., Ban, J., 2013. Gentamicin-induced bilateral vestibulopathy in rabbits: vestibular dysfunction and histopathology. *Laryngoscope* 123, E51–58. <https://doi.org/10.1002/lary.24106>
- Kim, S.H., Marcus, D.C., 2011. Regulation of sodium transport in the inner ear. *Hearing Research* 280, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.05.003>
- Kim, S.H., Marcus, D.C., 2009. Endolymphatic sodium homeostasis by extramacular epithelium of the saccule. *J. Neurosci.* 29, 15851–15858. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3044-09.2009>
- Kimitsuki, T., Nakagawa, T., Hisashi, K., Komune, S., Komiyama, S., 1996. Gadolinium blocks mechano-electric transducer current in chick cochlear hair cells. *Hearing Research* 101, 75–80. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(96\)00134-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(96)00134-7)
- Kishi, R., Tozaki, S., Gong, Y.Y., 2000. Impairment of neurobehavioral function and color vision loss among workers exposed to low concentration of styrene--a review of literatures. *Ind Health* 38, 120–126.
- Kitasato, I., Yokota, M., Inouye, S., Igarashi, M., 1990. Comparative ototoxicity of ribostamycin, dactimicin, dibekacin, kanamycin, amikacin, tobramycin, gentamicin, sisomicin and netilmicin in the inner ear of guinea pigs. *Chemotherapy* 36, 155–168. <https://doi.org/10.1159/000238762>
- Kobayashi, H., Ohashi, N., Watanabe, Y., Mizukoshi, K., 1987. Clinical Features of Cisplatin Vestibulotoxicity and Hearing Loss. *ORL* 49, 67–72. <https://doi.org/10.1159/000275909>
- Kohn, J., Minotti, S., Durham, H., 1995. Assessment of the neurotoxicity of styrene, styrene oxide, and styrene glycol in primary cultures of motor and sensory neurons. *Toxicol. Lett.* 75, 29–37. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(94\)03153-x](https://doi.org/10.1016/0378-4274(94)03153-x)
- Köpl, C., Wilms, V., Russell, I.J., Nothwang, H.G., 2018. Evolution of Endolymph Secretion and Endolymphatic Potential Generation in the Vertebrate Inner Ear. *Brain Behav Evol* 92, 1–31. <https://doi.org/10.1159/000494050>
- Korsak, Z., Sokal, J.A., Wasiela, T., Swiercz, R., 1990. Toxic effects of acute exposure to particular xylene isomers in animals. *Pol J Occup Med* 3, 221–226.
- Kroese, A.B., Das, A., Hudspeth, A.J., 1989. Blockage of the transduction channels of hair cells in the bullfrog's sacculus by aminoglycoside antibiotics. *Hear. Res.* 37, 203–217.
- Lang, F., Vallon, V., Knipper, M., Wangemann, P., 2007. Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 293, C1187–C1208. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00024.2007>
- Larsby, B., Tham, R., Eriksson, B., Odkvist, L.M., 1986. The effect of toluene on the vestibulo- and opto-oculomotor system in rats. A computerized nystagmographic study. *Acta Otolaryngol.* 101, 422–428. <https://doi.org/10.3109/00016488609108627>
- Larsby, B., Tham, R., Odkvist, L.M., Hydén, D., Bunnfors, I., Aschan, G., 1978. Exposure of rabbits to styrene. Electronystagmographic findings correlated to the styrene level in blood and cerebrospinal fluid. *Scand J Work Environ Health* 4, 60–65.

- Lataye, R., Campo, P., Barthelemy, C., Loquet, G., Bonnet, P., 2001. Cochlear pathology induced by styrene. *Neurotoxicol Teratol* 23, 71–79.
- Lataye, R., Campo, P., Loquet, G., 2000. Combined effects of noise and styrene exposure on hearing function in the rat. *Hearing Research* 139, 86–96. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(99\)00174-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(99)00174-4)
- Lataye, R., Campo, P., Pouyatos, B., Cossec, B., Blachère, V., Morel, G., 2003. Solvent ototoxicity in the rat and guinea pig. *Neurotoxicol Teratol* 25, 39–50.
- Lebel, C.P., Schatz, R.A., 1990. Altered synaptosomal phospholipid metabolism after toluene: possible relationship with membrane fluidity, Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-adenosine triphosphatase and phospholipid methylation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 1189–1197.
- Ledin, T., Odkvist, L.M., Möller, C., 1989. Posturography findings in workers exposed to industrial solvents. *Acta Otolaryngol.* 107, 357–361. <https://doi.org/10.3109/00016488909127521>
- Lee, J.H., Chiba, T., Marcus, D.C., 2001. P2X<sub>2</sub> receptor mediates stimulation of parasensory cation absorption by cochlear outer sulcus cells and vestibular transitional cells. *J. Neurosci.* 21, 9168–9174.
- Lee, J.H., Marcus, D.C., 2008. Purinergic signaling in the inner ear. *Hear. Res.* 235, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2007.09.006>
- Lee, S.-K., Boron, W., Parker, M., 2013. Monitoring Ion Activities In and Around Cells Using Ion-Selective Liquid-Membrane Microelectrodes. *Sensors* 13, 984–1003. <https://doi.org/10.3390/s130100984>
- Leist, M., Nicotera, P., 1997. The shape of cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 1–9. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6890>
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kühnle, S., Nicotera, P., 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 185, 1481–1486. <https://doi.org/10.1084/jem.185.8.1481>
- Li, H., Steyger, P.S., 2011. Systemic aminoglycosides are trafficked via endolymph into cochlear hair cells. *Sci Rep* 1, 159. <https://doi.org/10.1038/srep00159>
- Lim, R., Brichta, A.M., 2016. Anatomical and physiological development of the human inner ear. *Hear. Res.* 338, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.02.004>
- Liu, J., Kozakura, K., Marcus, D.C., 1995. Evidence for Purinergic Receptors in Vestibular Dark Cell and Strial Marginal Cell Epithelia of Gerbil. *Aud. Neurosci.* 1, 331–340.
- Liu, J., Marcus, D.C., Kobayashi, T., 1996. Inhibitory effect of erythromycin on ion transport by stria vascularis and vestibular dark cells. *Acta Otolaryngol.* 116, 572–575. <https://doi.org/10.3109/00016489609137891>
- Llorens, J., Demêmes, D., Sans, A., 1993. The behavioral syndrome caused by 3,3'-iminodipropionitrile and related nitriles in the rat is associated with degeneration of the vestibular sensory hair cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 123, 199–210. <https://doi.org/10.1006/taap.1993.1238>
- Loquet, G., Campo, P., Lataye, R., 1999. Comparison of toluene-induced and styrene-induced hearing losses. *Neurotoxicol Teratol* 21, 689–697.
- Loquet, G., Campo, P., Lataye, R., Cossec, B., Bonnet, P., 2000. Combined effects of exposure to styrene and ethanol on the auditory function in the rat. *Hear. Res.* 148, 173–180. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(00\)00151-9](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(00)00151-9)
- Lund, S.P., Kristiansen, G.B., 2008. Hazards to hearing from combined exposure to toluene and noise in rats. *Int J Occup Med Environ Health* 21, 47–57. <https://doi.org/10.2478/v10001-008-0008-x>

- Lysakowski, A., Goldberg, J.M., 1997. A regional ultrastructural analysis of the cellular and synaptic architecture in the chinchilla cristae ampullares. *J. Comp. Neurol.* 389, 419–443. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19971222\)389:3<419::aid-cne5>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19971222)389:3<419::aid-cne5>3.0.co;2-3)
- Magnusson, A.K., Sulaiman, M.R., Dutia, M.B., Tham, R., 1998. Effects of toluene on tonic firing and membrane properties of rat medial vestibular nucleus neurones in vitro. *Brain Res.* 779, 334–337. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)01233-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)01233-x)
- Maguin, K., Campo, P., Parietti-Winkler, C., 2009. Toluene can perturb the neuronal voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels involved in the middle-ear reflex. *Toxicol. Sci.* 107, 473–481. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2006.08.007>
- Mäkitie, A., Pirvola, U., Pyykkö, I., Sakakibara, H., Riihimäki, V., Ylikoski, J., 2002. Functional and morphological effects of styrene on the auditory system of the rat. *Arch Toxicol* 76, 40–47. <https://doi.org/10.1007/s00204-001-0316-4>
- Mäkitie, A.A., Pirvola, U., Pyykkö, I., Sakakibara, H., Riihimäki, V., Ylikoski, J., 2003. The ototoxic interaction of styrene and noise. *Hearing Research* 179, 9–20. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(03\)00066-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(03)00066-2)
- Marcus, D.C., 1996. Vibrating probes: new technology for investigation of endolymph homeostasis. *Keio J Med* 45, 301–305. <https://doi.org/10.2302/kjm.45.301>
- Marcus, D.C., 1986. Transepithelial electrical potential of nonsensory region of gerbil utricle in vitro. *Am. J. Physiol.* 251, C662–670. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1986.251.5.C662>
- Marcus, D.C., Liu, J., Wangemann, P., 1994. Transepithelial voltage and resistance of vestibular dark cell epithelium from the gerbil ampulla. *Hear. Res.* 73, 101–108. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(94\)90287-9](https://doi.org/10.1016/0378-5955(94)90287-9)
- Marcus, D.C., Scofield, M.A., 2001. Apical P2Y<sub>4</sub> purinergic receptor controls K<sup>+</sup> secretion by vestibular dark cell epithelium. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 281, C282–289. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.1.C282>
- Marcus, D.C., Shen, Z., 1994. Slowly activating voltage-dependent K<sup>+</sup> conductance is apical pathway for K<sup>+</sup> secretion in vestibular dark cells. *Am. J. Physiol.* 267, C857–864. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.267.3.C857>
- Marcus, D.C., Shipley, A.M., 1994. Potassium secretion by vestibular dark cell epithelium demonstrated by vibrating probe. *Biophys. J.* 66, 1939–1942. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80987-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80987-7)
- Marcus, D.C., Sunose, H., Liu, J., Shen, Z., Scofield, M.A., 1997. P2U purinergic receptor inhibits apical *IsK/KvLQT1* channel via protein kinase C in vestibular dark cells. *Am. J. Physiol.* 273, C2022–2029. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.6.C2022>
- Marcus, D.C., Takeuchi, S., Wangemann, P., 1993. Two types of chloride channel in the basolateral membrane of vestibular dark cells. *Hear. Res.* 69, 124–132. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(93\)90100-f](https://doi.org/10.1016/0378-5955(93)90100-f)
- Marcus, N.Y., Marcus, D.C., 1990. Transepithelial electrical responses to sodium and potassium of nonsensory region of gerbil utricle. *Hear. Res.* 44, 13–23. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(90\)90018-k](https://doi.org/10.1016/0378-5955(90)90018-k)
- Marcus, N.Y., Marcus, D.C., 1987. Potassium secretion by nonsensory region of gerbil utricle in vitro. *Am. J. Physiol.* 253, F613–621. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1987.253.4.F613>

- Marcus, N.Y., Marcus, D.C., 1985. Transepithelial cation movements in gerbil utricles. *Am J Otolaryngol* 6, 268–274. [https://doi.org/10.1016/s0196-0709\(85\)80054-5](https://doi.org/10.1016/s0196-0709(85)80054-5)
- Martins-Lopes, V., Bellmunt, A., Greguske, E.A., Maroto, A.F., Boadas-Vaello, P., Llorens, J., 2019. Quantitative Assessment of Anti-Gravity Reflexes to Evaluate Vestibular Dysfunction in Rats. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 20, 553–563. <https://doi.org/10.1007/s10162-019-00730-6>
- Masetto, S., Zucca, G., Bottà, L., Valli, P., 2005. Endolymphatic potassium of the chicken vestibule during embryonic development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23, 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2005.05.002>
- Masuda, M., Yamazaki, K., Kanzaki, J., Hosoda, Y., 1995. Ultrastructural evidence of cell communication between epithelial dark cells and melanocytes in vestibular organs of the human inner ear. *Anat. Rec.* 242, 267–277. <https://doi.org/10.1002/ar.1092420217>
- Masuda, M., Yamazaki, K., Kanzaki, J., Hosoda, Y., 1994. Ultrastructure of melanocytes in the dark cell area of human vestibular organs: Functional implications of gap junctions, isolated cilia, and annulate lamellae. *Anat. Rec.* 240, 481–491. <https://doi.org/10.1002/ar.1092400406>
- Matsui, J.I., Gale, J.E., Warchol, M.E., 2004. Critical signaling events during the aminoglycoside-induced death of sensory hair cells in vitro. *J. Neurobiol.* 61, 250–266. <https://doi.org/10.1002/neu.20054>
- Mbiene, J.P., Favre, D., Sans, A., 1984. The pattern of ciliary development in fetal mouse vestibular receptors. A qualitative and quantitative SEM study. *Anat. Embryol.* 170, 229–238. <https://doi.org/10.1007/bf00318726>
- Mbiene, J.P., Sans, A., 1986. Differentiation and maturation of the sensory hair bundles in the fetal and postnatal vestibular receptors of the mouse: a scanning electron microscopy study. *J Comp Neurol* 254, 271–278. <https://doi.org/10.1002/cne.902540210>
- McDermott, C., Allshire, A., van Pelt, F.N.A.M., Heffron, J.J.A., 2007. Validation of a method for acute and subchronic exposure of cells in vitro to volatile organic solvents. *Toxicol In Vitro* 21, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.08.002>
- McGuirt, J.P., Schulte, B.A., 1994. Distribution of immunoreactive alpha- and beta-subunit isoforms of Na,K-ATPase in the gerbil inner ear. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 843–853. <https://doi.org/10.1177/42.7.8014467>
- Meza, G., Acuña, D., Gutiérrez, A., Merchan, J.M., Rueda, J., 1996. Development of vestibular function: biochemical, morphological and electronystagmographical assessment in the rat. *Int J Dev Neurosci* 14, 507–513. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(95\)00099-2](https://doi.org/10.1016/0736-5748(95)00099-2)
- Milhaud, P.G., Pondugula, S.R., Lee, J.H., Herzog, M., Lehouelleur, J., Wangemann, P., Sans, A., Marcus, D.C., 2002. Chloride secretion by semicircular canal duct epithelium is stimulated via beta 2-adrenergic receptors. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 283, C1752–1760. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2002>
- Miller, R.R., Newhook, R., Poole, A., 1994. Styrene Production, Use, and Human Exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 24, S1–S10. <https://doi.org/10.3109/10408449409020137>
- Minor, L.B., 1998. Physiological principles of vestibular function on earth and in space. *Otolaryngol Head Neck Surg* 118, S5-15. [https://doi.org/10.1016/s0194-5998\(98\)70002-6](https://doi.org/10.1016/s0194-5998(98)70002-6)
- Möller, C., Odqvist, L., Larsby, B., Tham, R., Ledin, T., Bergholtz, L., 1990. Otoneurological findings in workers exposed to styrene. *Scand J Work Environ Health* 16, 189–194.



- 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. <https://doi.org/10.5271/sjweh.1477>
- Morata, T.C., Nylén, P., Johnson, A.C., Dunn, D.E., 1995. Auditory and vestibular functions after single or combined exposure to toluene: a review. *Arch. Toxicol.* 69, 431–443. <https://doi.org/10.1007/s002040050196>
- Moser, V.C., Coggeshall, E.M., Balster, R.L., 1985. Effects of xylene isomers on operant responding and motor performance in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 80, 293–298. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(85\)90086-9](https://doi.org/10.1016/0041-008x(85)90086-9)
- Murofushi, T., Curthoys, I.S., Topple, A.N., Colebatch, J.G., Halmagyi, G.M., 1995. Responses of guinea pig primary vestibular neurons to clicks. *Exp Brain Res* 103, 174–178. <https://doi.org/10.1007/BF00241975>
- Nakashima, T., Teranishi, M., Hibi, T., Kobayashi, M., Umemura, M., 2000. Vestibular and cochlear toxicity of aminoglycosides—a review. *Acta Otolaryngol.* 120, 904–911. <https://doi.org/10.1080/00016480050218627>
- Nicolas, M., Demêmes, D., Martin, A., Kupersmidt, S., Barhanin, J., 2001. KCNQ1/KCNE1 potassium channels in mammalian vestibular dark cells. *Hear. Res.* 153, 132–145. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(00\)00268-9](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(00)00268-9)
- Nicolas, M.T., Barhanin, J., Reyes, R., Demêmes, D., 2003. Cellular localization of TWIK-1, a two-pore-domain potassium channel in the rodent inner ear. *Hear. Res.* 181, 20–26. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(03\)00162-x](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(03)00162-x)
- Nicolas, M.-T., Lesage, F., Reyes, R., Barhanin, J., Demêmes, D., 2004. Localization of TREK-1, a two-pore-domain K<sup>+</sup> channel in the peripheral vestibular system of mouse and rat. *Brain Res.* 1017, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.012>
- Nies, E., 2012. Ototoxic substances at the workplace: a brief update. *Arh Hig Rada Toksikol* 63, 147–152. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2199>
- Niklasson, M., Möller, C., Odkvist, L.M., Ekberg, K., Flodin, U., Dige, N., Sköldestig, A., 1997. Are deficits in the equilibrium system relevant to the clinical investigation of solvent-induced neurotoxicity? *Scand J Work Environ Health* 23, 206–213. <https://doi.org/10.5271/sjweh.200>
- Niklasson, M., Stengård, K., Tham, R., 1995. Are the effects of toluene on the vestibulo and opto-ocular motor system inhibited by the action of GABAB antagonist CGP 35348? *Neurotoxicol Teratol* 17, 351–357. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(94\)00075-o](https://doi.org/10.1016/0892-0362(94)00075-o)
- Niklasson, M., Tham, R., Larsby, B., Eriksson, B., 1993a. Effects of toluene, styrene, trichloroethylene, and trichloroethane on the vestibulo-and opto-ocular motor system in rats. *Neurotoxicol Teratol* 15, 327–334. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(93\)90034-l](https://doi.org/10.1016/0892-0362(93)90034-l)
- Nylén, P., Hagman, M., 1994. Function of the auditory and visual systems, and of peripheral nerve, in rats after long-term combined exposure to n-hexane and methylated benzene derivatives. II. Xylene. *Pharmacol. Toxicol.* 74, 124–129. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1994.tb01086.x>
- Nylén, P., Larsby, B., Johnson, A.C., Eriksson, B., Höglund, G., Tham, R., 1991. Vestibular-oculomotor, opto-oculomotor and visual function in the rat after long-term inhalation exposure to toluene. *Acta Otolaryngol.* 111, 36–43. <https://doi.org/10.3109/00016489109137352>
- Odkvist, L., Larsby, B., Tham, R., Hydén, D., 1983. Vestibulo-oculomotor disturbances caused by industrial solvents. *Otolaryngol Head Neck Surg* 91, 537–539. <https://doi.org/10.1177/019459988309100512>

- Odkvist, L.M., Larsby, B., Tham, R., Ahlfeldt, H., Andersson, B., Eriksson, B., Liedgren, S.R., 1982. Vestibulo-oculomotor disturbances in humans exposed to styrene. *Acta Otolaryngol.* 94, 487–493. <https://doi.org/10.3109/00016488209128939>
- Odkvist, L.M., Larsby, B., Tham, R., Aschan, G., 1979. On the mechanism of vestibular disturbances caused by industrial solvents. *Adv. Otorhinolaryngol.* 25, 167–172. <https://doi.org/10.1159/000402937>
- Pascual, J., Morón, L., Zárate, J., Gutiérrez, A., Churruca, I., Echevarría, E., 2004. Toluene alters p75NTR expression in the rat brainstem. *Ind Health* 42, 75–78. <https://doi.org/10.2486/indhealth.42.75>
- Peterka, R.J., 2002. Sensorimotor integration in human postural control. *J. Neurophysiol.* 88, 1097–1118. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.88.3.1097>
- Peters, T.A., Kuijpers, W., Curfs, J.H., 2001. Occurrence of NaK-ATPase isoforms during rat inner ear development and functional implications. *European archives of oto-rhino-laryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 258, 67–73. <https://doi.org/10.1007/s004050000304>
- Pitovski, D.Z., Kerr, T.P., 2002. Sodium- and potassium-activated ATPase in the mammalian vestibular system. *Hear. Res.* 171, 51–65. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(02\)00352-0](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(02)00352-0)
- Pondugula, S.R., Kampalli, S.B., Wu, T., De Lisle, R.C., Raveendran, N.N., Harbidge, D.G., Marcus, D.C., 2013. cAMP-stimulated Cl<sup>-</sup> secretion is increased by glucocorticoids and inhibited by bumetanide in semicircular canal duct epithelium. *BMC Physiol.* 13, 6. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-13-6>
- Pondugula, S.R., Raveendran, N.N., Ergonul, Z., Deng, Y., Chen, J., Sanneman, J.D., Palmer, L.G., Marcus, D.C., 2006. Glucocorticoid regulation of genes in the amiloride-sensitive sodium transport pathway by semicircular canal duct epithelium of neonatal rat. *Physiol. Genomics* 24, 114–123. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00006.2005>
- Pondugula, S.R., Sanneman, J.D., Wangemann, P., Milhaud, P.G., Marcus, D.C., 2004. Glucocorticoids stimulate cation absorption by semicircular canal duct epithelium via epithelial sodium channel. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F1127–F1135. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00387.2003>
- Popper, P., Winkler, J., Erbe, C.B., Lerch-Gaggl, A., Siebeneich, W., Wackym, P.A., 2008. Distribution of two-pore-domain potassium channels in the adult rat vestibular periphery. *Hear. Res.* 246, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2008.09.004>
- Pouyatos, B., Campo, P., Lataye, R., 2005. Influence of age on noise- and styrene-induced hearing loss in the Long–Evans rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19, 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.12.020>
- Pouyatos, B., Campo, P., Lataye, R., 2002. Use of DPOAEs for assessing hearing loss caused by styrene in the rat. *Hear. Res.* 165, 156–164. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(02\)00298-8](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(02)00298-8)
- Pouyatos, B., Morel, G., Lambert-Xolin, A.-M., Maguin, K., Campo, P., 2004. Consequences of noise- or styrene-induced cochlear damages on glutamate decarboxylase levels in the rat inferior colliculus. *Hearing Research* 189, 83–91. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(03\)00394-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(03)00394-0)
- Pryor, G.T., Rebert, C.S., 1992. Interactive effects of toluene and hexane on behavior and neurophysiologic responses in Fischer-344 rats. *Neurotoxicology* 13, 225–234.
- Pryor, G.T., Rebert, C.S., Dickinson, J., Feeney, E.M., 1984. Factors affecting toluene-induced ototoxicity in rats. *Neurobehav Toxicol Teratol* 6, 223–238.

- Pryor, G.T., Rebert, C.S., Howd, R.A., 1987. Hearing loss in rats caused by inhalation of mixed xylenes and styrene. *J Appl Toxicol* 7, 55–61. <https://doi.org/10.1002/jat.2550070110>
- Qiu, X., Müller, U., 2018. Mechanically Gated Ion Channels in Mammalian Hair Cells. *Front Cell Neurosci* 12, 100. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00100>
- Rebert, C.S., Boyes, W.K., Pryor, G.T., Svensgaard, D.J., Kassay, K.M., Gordon, G.R., Shinsky, N., 1993. Combined effects of solvents on the rat's auditory system: styrene and trichloroethylene. *Int J Psychophysiol* 14, 49–59. [https://doi.org/10.1016/0167-8760\(93\)90083-2](https://doi.org/10.1016/0167-8760(93)90083-2)
- Reid, B., Zhao, M., 2011. Ion-selective self-referencing probes for measuring specific ion flux. *Commun Integr Biol* 4, 524–527. <https://doi.org/10.4161/cib.4.5.16182>
- Rennie, K.J., Ashmore, J.F., 1991. Ionic currents in isolated vestibular hair cells from the guinea-pig crista ampullaris. *Hear. Res.* 51, 279–291. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(91\)90044-a](https://doi.org/10.1016/0378-5955(91)90044-a)
- Rennie, K.J., Correia, M.J., 1994. Potassium currents in mammalian and avian isolated type I semicircular canal hair cells. *J. Neurophysiol.* 71, 317–329. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.71.1.317>
- Rennie, K.J., Weng, T., Correia, M.J., 2001. Effects of KCNQ channel blockers on K(+) currents in vestibular hair cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 280, C473–480. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.3.C473>
- Ricci, A.J., Rennie, K.J., Correia, M.J., 1996. The delayed rectifier, IK1, is the major conductance in type I vestibular hair cells across vestibular end organs. *Pflugers Arch.* 432, 34–42. <https://doi.org/10.1007/s004240050102>
- Rickheit, G., Maier, H., Strenzke, N., Andreescu, C.E., De Zeeuw, C.I., Muenscher, A., Zdebik, A.A., Jentsch, T.J., 2008. Endocochlear potential depends on Cl<sup>-</sup> channels: mechanism underlying deafness in Bartter syndrome IV. *EMBO J.* 27, 2907–2917. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.203>
- Roberts, W.M., Howard, J., Hudspeth, A.J., 1988. Hair cells: transduction, tuning, and transmission in the inner ear. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 63–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.04.110188.000431>
- Royaux, I.E., Belyantseva, I.A., Wu, T., Kachar, B., Everett, L.A., Marcus, D.C., Green, E.D., 2003. Localization and Functional Studies of Pendrin in the Mouse Inner Ear Provide Insight About the Etiology of Deafness in Pendred Syndrome. *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 4, 394–404. <https://doi.org/10.1007/s10162-002-3052-4>
- Rumeau, C., Campo, P., Venet, T., Thomas, A., Cour, C., Parietti-Winkler, C., 2011. Toluene effect on the olivocochlear reflex. *Toxicol. Sci.* 121, 140–145. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr025>
- Rutka, J., 2019. Aminoglycoside Vestibulotoxicity. *Adv. Otorhinolaryngol.* 82, 101–110. <https://doi.org/10.1159/000490277>
- Sage, C.L., Marcus, D.C., 2001. Immunolocalization of ClC-K chloride channel in strial marginal cells and vestibular dark cells. *Hear. Res.* 160, 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(01\)00308-2](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(01)00308-2)
- Sakka, L., Vitte, E., 2004. [Anatomy and physiology of the vestibular system: review of the literature]. *Morphologie* 88, 117–126. [https://doi.org/10.1016/s1286-0115\(04\)98134-9](https://doi.org/10.1016/s1286-0115(04)98134-9)
- Sans, A., Chat, M., 1982. Analysis of temporal and spatial patterns of rat vestibular hair cell differentiation by tritiated thymidine radioautography. *J Comp Neurol* 206, 1–8. <https://doi.org/10.1002/cne.902060102>

- Sarah, K., Richard, C., 2013. Anatomy of the vestibular system: A review. *NeuroRehabilitation* 437–443. <https://doi.org/10.3233/NRE-130866>
- Sarangapani, R., Teeguarden, J.G., Cruzan, G., Clewell, H.J., Andersen, M.E., 2002. Physiologically based pharmacokinetic modeling of styrene and styrene oxide respiratory-tract dosimetry in rodents and humans. *Inhal Toxicol* 14, 789–834. <https://doi.org/10.1080/08958370290084647>
- Savolainen, K., Linnavuo, M., 1979. Effects of m-xylene on human equilibrium measured with a quantitative method. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 44, 315–318. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1979.tb02336.x>
- Savolainen, K., Riihimäki, V., Luukkonen, R., Muona, O., 1985a. Changes in the sense of balance correlate with concentrations of m-xylene in venous blood. *Br J Ind Med* 42, 765–769. <https://doi.org/10.1136/oem.42.11.765>
- Savolainen, K., Riihimäki, V., Muona, O., Kekoni, J., Luukkonen, R., Laine, A., 1985b. Conversely exposure-related effects between atmospheric m-xylene concentrations and human body sense of balance. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 57, 67–71. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1985.tb00012.x>
- Savolainen, K., Riihimäki, V., Vaheri, E., Linnoila, M., 1980. Effects of xylene and alcohol on vestibular and visual functions in man. *Scand J Work Environ Health* 6, 94–103. <https://doi.org/10.5271/sjweh.2628>
- Schulte, B.A., Steel, K.P., 1994. Expression of alpha and beta subunit isoforms of Na,K-ATPase in the mouse inner ear and changes with mutations at the *Wv* or *Sld* loci. *Hear. Res.* 78, 65–76. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(94\)90045-0](https://doi.org/10.1016/0378-5955(94)90045-0)
- Schwartz, A., Lindenmayer, G.E., Allen, J.C., 1972. The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Membrane Transport System: Importance in Cellular Function, in: *Current Topics in Membranes and Transport*. Elsevier, pp. 1–82. [https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)61057-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)61057-6)
- Sedó-Cabezón, L., Boadas-Vaello, P., Soler-Martín, C., Llorens, J., 2014. Vestibular damage in chronic ototoxicity: A mini-review. *NeuroToxicology* 43, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.11.009>
- Sellick, P.M., Johnstone, B.M., 1972. The electrophysiology of the saccule. *Pflugers Arch.* 336, 28–34. <https://doi.org/10.1007/BF00589139>
- Sellick, P.M., Johnstone, J.R., Johnstone, B.M., 1972. The electrophysiology of the utricle. *Pflugers Arch.* 336, 21–27. <https://doi.org/10.1007/BF00589138>
- Shen, Z., Liu, J., Marcus, D.C., Shiga, N., Wangemann, P., 1995. DIDS increases K<sup>+</sup> secretion through an *IsK* channel in apical membrane of vestibular dark cell epithelium of gerbil. *J. Membr. Biol.* 146, 283–291. <https://doi.org/10.1007/BF00233948>
- Shen, Z., Marcus, D.C., Sunose, H., Chiba, T., Wangemann, P., 1997. *I(sK)* Channel in Strial Marginal Cells. Voltage-Dependence, Ion-Selectivity, Inhibition by 293B and Sensitivity to Clofilium. *Aud. Neurosci.* 3, 215–230.
- Shiga, N., Wangemann, P., 1995. Ion selectivity of volume regulatory mechanisms present during a hypoosmotic challenge in vestibular dark cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1240, 48–54. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00175-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00175-1)
- Shubin, A.V., Demidyuk, I.V., Komissarov, A.A., Rafieva, L.M., Kostrov, S.V., 2016. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget* 7, 55863–55889. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10150>
- Sliwiska-Kowalska, M., Zamysłowska-Szmytke, 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.* 19, 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.12.018>

- Smith, C.A., Lowry, O.H., Wu, M.L., 1954. The electrolytes of the labyrinthine fluids. *Laryngoscope* 64, 141–153. <https://doi.org/10.1288/00005537-195403000-00001>
- Smith, L.B., Bhattacharya, A., Lemasters, G., Succop, P., Puhala, E., Medvedovic, M., Joyce, J., 1997. Effect of chronic low-level exposure to jet fuel on postural balance of US Air Force personnel. *J. Occup. Environ. Med.* 39, 623–632. <https://doi.org/10.1097/00043764-199707000-00007>
- Spicer, S.S., Schulte, B.A., 1998. Evidence for a medial K<sup>+</sup> recycling pathway from inner hair cells. *Hear. Res.* 118, 1–12.
- Spicer, S.S., Schulte, B.A., Adams, J.C., 1990. Immunolocalization of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase and carbonic anhydrase in the gerbil's vestibular system. *Hear. Res.* 43, 205–217. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(90\)90229-i](https://doi.org/10.1016/0378-5955(90)90229-i)
- Sułkowski, W.J., Kowalska, S., Matyja, W., Guzek, W., Wesółowski, W., Szymczak, W., Kostrzewski, P., 2002. Effects of occupational exposure to a mixture of solvents on the inner ear: a field study. *Int J Occup Med Environ Health* 15, 247–256.
- Sullivan, M.J., Rarey, K.E., Conolly, R.B., 1988. Ototoxicity of toluene in rats. *Neurotoxicol Teratol* 10, 525–530. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(88\)90088-8](https://doi.org/10.1016/0892-0362(88)90088-8)
- Swenson, R.S., 2017. The Vestibular System, in: *Conn's Translational Neuroscience*. Elsevier, pp. 167–183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802381-5.00014-2>
- Takumida, M., 2001. Functional morphology of the crista ampullaris: with special interests in sensory hairs and cupula: a review. *Biol. Sci. Space* 15, 356–358. <https://doi.org/10.2187/bss.15.356>
- Ten Cate, W.J., Curtis, L.M., Rarey, K.E., 1994. Na,K-ATPase alpha and beta subunit isoform distribution in the rat cochlear and vestibular tissues. *Hear. Res.* 75, 151–160. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(94\)90066-3](https://doi.org/10.1016/0378-5955(94)90066-3)
- Tham, R., Bunnfors, I., Eriksson, B., Larsby, B., Lindgren, S., Odkvist, L.M., 1984. Vestibulo-ocular disturbances in rats exposed to organic solvents. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 54, 58–63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1984.tb01895.x>
- Tham, R., Larsby, B., Eriksson, B., Bunnfors, I., Odkvist, L., Liedgren, C., 1982. Electronystagmographic findings in rats exposed to styrene or toluene. *Acta Otolaryngol.* 93, 107–112. <https://doi.org/10.3109/00016488209130859>
- Tham, R., Larsby, B., Eriksson, B., Niklasson, M., 1990. The effect of toluene on the vestibulo- and opto-oculomotor system in rats, pretreated with GABAergic drugs. *Neurotoxicol Teratol* 12, 307–311. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(90\)90048-h](https://doi.org/10.1016/0892-0362(90)90048-h)
- Toppila, E., Forsman, P., Pyykkö, I., Starck, J., Tossavainen, T., Uitti, J., Oksa, P., 2006. Effect of styrene on postural stability among reinforced plastic boat plant workers in Finland. *J. Occup. Environ. Med.* 48, 175–180. <https://doi.org/10.1097/01.jom.0000199510.80882.7b>
- Unlu, I., Kesici, G.G., Basturk, A., Kos, M., Yılmaz, O.H., 2014. A comparison of the effects of solvent and noise exposure on hearing, together and separately. *Noise Health* 16, 410–415. <https://doi.org/10.4103/1463-1741.144422>
- Vaalavirta, L., Tähti, H., 1995a. Astrocyte membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase and Mg<sup>(2+)</sup>-ATPase as targets of organic solvent impact. *Life Sci.* 57, 2223–2230. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)02214-4](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02214-4)
- Vaalavirta, L., Tähti, H., 1995b. Effects of selected organic solvents on the astrocyte membrane ATPase in vitro. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22, 293–294. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1995.tb01999.x>

- Valli, P., Zucca, G., Botta, L., 1990. Perilymphatic potassium changes and potassium homeostasis in isolated semicircular canals of the frog. *J. Physiol. (Lond.)* 430, 585–594. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp018308>
- Venet, T., Rumeau, C., Campo, P., Rieger, B., Thomas, A., Cour, C., 2011. Neuronal circuits involved in the middle-ear acoustic reflex. *Toxicol. Sci.* 119, 146–155. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq312>
- Vouriot, A., Hannhart, B., Gauchard, G.C., Barot, A., Ledin, T., Mur, J.-M., Perrin, P.P., 2005. Long-term exposure to solvents impairs vigilance and postural control in serigraphy workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 78, 510–515. <https://doi.org/10.1007/s00420-005-0609-7>
- Vyskocil, A., Leroux, T., Truchon, G., Lemay, F., Gendron, M., Gagnon, F., El Majidi, N., Viau, C., 2008. Ethyl benzene should be considered ototoxic at occupationally relevant exposure concentrations. *Toxicol Ind Health* 24, 241–246. <https://doi.org/10.1177/0748233708094097>
- Vyskocil, A., Truchon, G., Leroux, T., Lemay, F., Gendron, M., Gagnon, F., Majidi, N.E., Boudjerida, A., Lim, S., Emond, C., Viau, C., 2012. A weight of evidence approach for the assessment of the ototoxic potential of industrial chemicals. *Toxicol Ind Health* 28, 796–819. <https://doi.org/10.1177/0748233711425067>
- Wangemann, P., 2002a. K<sup>+</sup> cycling and the endocochlear potential. *Hearing Research* 165, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(02\)00279-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(02)00279-4)
- Wangemann, P., 2002b. K<sup>(+)</sup> cycling and its regulation in the cochlea and the vestibular labyrinth. *Audiol. Neurootol.* 7, 199–205. <https://doi.org/10.1159/000063736>
- Wangemann, P., 1995. Comparison of ion transport mechanisms between vestibular dark cells and strial marginal cells. *Hear. Res.* 90, 149–157. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(95\)00157-2](https://doi.org/10.1016/0378-5955(95)00157-2)
- Wangemann, P., Liu, J., Marcus, D.C., 1995a. Ion transport mechanisms responsible for K<sup>+</sup> secretion and the transepithelial voltage across marginal cells of stria vascularis in vitro. *Hear. Res.* 84, 19–29. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(95\)00009-s](https://doi.org/10.1016/0378-5955(95)00009-s)
- Wangemann, P., Liu, J., Shen, Z., Shipley, A., Marcus, D.C., 1995b. Hypo-osmotic challenge stimulates transepithelial K<sup>+</sup> secretion and activates apical *IsK* channel in vestibular dark cells. *J. Membr. Biol.* 147, 263–273. <https://doi.org/10.1007/BF00234524>
- Wangemann, P., Liu, J., Shiga, N., 1995c. The pH-sensitivity of transepithelial K<sup>+</sup> transport in vestibular dark cells. *J. Membr. Biol.* 147, 255–262. <https://doi.org/10.1007/BF00234523>
- Wangemann, P., Liu, J., Shimozone, M., Scofield, M.A., 1999. Beta1-adrenergic receptors but not beta2-adrenergic or vasopressin receptors regulate K<sup>+</sup> secretion in vestibular dark cells of the inner ear. *J. Membr. Biol.* 170, 67–77. <https://doi.org/10.1007/s002329900538>
- Wangemann, P., Marcus, D.C., 1992. The membrane potential of vestibular dark cells is controlled by a large Cl<sup>-</sup> conductance. *Hear. Res.* 62, 149–156. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(92\)90180-u](https://doi.org/10.1016/0378-5955(92)90180-u)
- Wangemann, P., Marcus, D.C., 1990. K<sup>(+)</sup>-induced swelling of vestibular dark cells is dependent on Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> and inhibited by piretanide. *Pflugers Arch.* 416, 262–269. <https://doi.org/10.1007/BF00392062>
- Wangemann, P., Marcus, D.C., 1989. Membrane potential measurements of transitional cells from the crista ampullaris of the gerbil. Effects of barium, quinidine, quinine, tetraethylammonium, cesium, ammonium, thallium and ouabain. *Pflugers Arch.* 414, 656–662. <https://doi.org/10.1007/BF00582132>

- Wangemann, P., Shen, Z., Liu, J., 1996. K(+)-induced stimulation of K<sup>+</sup> secretion involves activation of the Isk channel in vestibular dark cells. *Hear. Res.* 100, 201–210. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(96\)00127-x](https://doi.org/10.1016/0378-5955(96)00127-x)
- Wangemann, P., Shiga, N., 1994. Cell volume control in vestibular dark cells during and after a hyposmotic challenge. *Am. J. Physiol.* 266, C1046-1060. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.4.C1046>
- Wangemann, P., Shiga, N., Welch, C., Marcus, D.C., 1992. Evidence for the involvement of a K<sup>+</sup> channel in isosmotic cell shrinking in vestibular dark cells. *Am. J. Physiol.* 263, C616-622. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1992.263.3.C616>
- Waniusiow, D., Campo, P., Cossec, B., Cosnier, F., Grossman, S., Ferrari, L., 2008. Toluene-induced hearing loss in acivicin-treated rats. *Neurotoxicol Teratol* 30, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2008.02.006>
- Ward, B.K., Agrawal, Y., Hoffman, H.J., Carey, J.P., Della Santina, C.C., 2013. Prevalence and impact of bilateral vestibular hypofunction: results from the 2008 US National Health Interview Survey. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 139, 803–810. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2013.3913>
- Warth, R., Barhanin, J., 2002. The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282, R639-648. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00649.2001>
- Werner, M., Van De Water, T.R., Andersson, T., Arnoldsson, G., Berggren, D., 2012. Morphological and morphometric characteristics of vestibular hair cells and support cells in long term cultures of rat utricle explants. *Hearing Research* 283, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.11.003>
- Wilson, V.J., Peterson, B.W., 1978. Peripheral and central substrates of vestibulospinal reflexes. *Physiol. Rev.* 58, 80–105. <https://doi.org/10.1152/physrev.1978.58.1.80>
- Winbo, A., Rydberg, A., 2015. Vestibular dysfunction is a clinical feature of the Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Scand. Cardiovasc. J.* 49, 7–13. <https://doi.org/10.3109/14017431.2014.988172>
- Wong, W.H., Hurley, K.M., Eatock, R.A., 2004. Differences between the negatively activating potassium conductances of Mammalian cochlear and vestibular hair cells. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 5, 270–284. <https://doi.org/10.1007/s10162-004-4051-4>
- Wubbels, R.J., de Jong, H. a. A., van Marle, J., 2002. Morphometric analysis of the vestibular sensory epithelia of young adult rat. *J Vestib Res* 12, 145–154.
- Yang, W.P., Hu, B.H., Chen, G.D., Bielefeld, E.C., Henderson, D., 2009. Protective effect of N-acetyl-L-cysteine (L-NAC) against styrene-induced cochlear injuries. *Acta Otolaryngol.* 129, 1036–1043. <https://doi.org/10.1080/00016480802566261>
- Yokoyama, K., Araki, S., Murata, K., Nishikitani, M., Nakaaki, K., Yokota, J., Ito, A., Sakata, E., 1997. Postural sway frequency analysis in workers exposed to n-hexane, xylene, and toluene: assessment of subclinical cerebellar dysfunction. *Environ. Res.* 74, 110–115. <https://doi.org/10.1006/enrs.1997.3769>
- Young Choi, J., Ho Jung, S., Namkung, W., Lee, J.-H., Jin Son, E., Wook Shin, J., Park, H.Y., Sang Lee, W., Kim, H.N., 2005. Vestibular malformation in mice lacking Na-K-2Cl cotransporter 1 and expression of Na-K-2Cl cotransporter 1 in human vestibular end organs. *Acta Otolaryngol.* 125, 1252–1257. <https://doi.org/10.1080/00016480510012309>
- Young, Y.-H., 2018. Inner ear test battery in guinea pig models - a review. *Acta Otolaryngol.* 138, 519–529. <https://doi.org/10.1080/00016489.2017.1419576>

- Zamysłowska-Szmytke, E., Politanski, P., Sliwiska-Kowalska, M., 2011a. Balance system assessment in workers exposed to organic solvent mixture. *J. Occup. Environ. Med.* 53, 441–447. <https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e3182143f46>
- Zamysłowska-Szmytke, E., Sliwiska-Kowalska, M., 2011b. Vestibular and balance findings in nonsymptomatic workers exposed to styrene and dichloromethane. *Int J Audiol* 50, 815–822. <https://doi.org/10.3109/14992027.2011.599872>
- Zenner, H.-P., Gummer, A.W., 1996. The Vestibular System, in: Greger, R., Windhorst, U. (Eds.), *Comprehensive Human Physiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 697–709. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-60946-6\\_35](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60946-6_35)
- Zheng, J.L., Gao, W.Q., 1997. Analysis of rat vestibular hair cell development and regeneration using calretinin as an early marker. *J Neurosci* 17, 8270–8282.
- Zheng, J.L., Helbig, C., Gao, W.Q., 1997. Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin-like growth factors in pure rat inner ear epithelial cell cultures. *J. Neurosci.* 17, 216–226.



## VALORISATIONS

### o Articles scientifiques à comité de lecture

**Tallandier V.**, Merlen L., Boucard S., Thomas A., Venet T., Chalansonnet M., Gauchard G., Campo P., Pouyatos B., 2020. Styrene alters potassium endolymphatic concentration in a model of cultured utricle explants. *Toxicology in Vitro* 104915. (Annexe)

**Tallandier V.**, Chalansonnet M., Merlen L., Boucard S., Thomas A., Campo P., Pouyatos B., 2021. An *in vitro* model to assess the peripheral vestibulotoxicity of aromatic solvents. *Neurotoxicology* S0161813X21000255 (Annexe)

### o Communication affichée

**Tallandier V.**, Thomas A., Merlen L., Boucard S., Venet T., Chalansonnet M., Campo P., Pouyatos B., Assessment of the vestibulotoxicity of aromatic solvents on cultured utricle explants. 29 Septembre – 3 Octobre 2019. 17<sup>th</sup> International Neurotoxicology Association (INA) Meeting. Dusseldorf, Allemagne (Poster) – Prix du Poster (Award Poster).

### o Communications orales

**Tallandier V.**, Merlen L., Boucard S., Thomas A., Venet T., Chalansonnet M., Pouyatos B. et Campo P., Etude des variations de la concentration potassique d'explants d'utricule exposés à des solvants. 17 Janvier 2018. Présentation de l'état d'avancement de l'étude lors de la réunion de direction des études et des recherches du département Biométrie Toxicologie. Institut National de Recherche et de Sécurité, Nancy, France (communication orale).

**Tallandier V.**, Merlen L., Boucard S., Thomas A., Venet T., Chalansonnet M., Pouyatos B. et Campo P., « Buller pour garder l'équilibre ». Journée Des Doctorants. 27 Mars 2018. Institut National de Recherche et de Sécurité, Nancy, France (communication orale format « Ma Thèse en 180 secondes »).

**Tallandier V.**, Merlen L., Boucard S., Thomas A., Venet T., Chalansonnet M., Pouyatos B. et Campo P., Etude des variations de la concentration potassique d'explants d'utricule exposés à des solvants. 26 Juin 2018. Présentation de l'état d'avancement de l'étude lors de la réunion de direction des études et des recherches du département Biométrie Toxicologie. Institut National de Recherche et de Sécurité, Nancy, France (communication orale).

**Tallandier V.**, Merlen L., Boucard S., Thomas A., Venet T., Chalansonnet M., Pouyatos B. et Campo P., Etude des variations de la concentration potassique d'explants d'utricule exposés à des solvants. 26 Juin 2018. Présentation de l'état d'avancement de l'étude lors de la réunion des membres du groupe de suivi scientifique des études et des recherches du département Biométrie Toxicologie. Institut National de Recherche et de Sécurité, Nancy, France (communication orale).

**Tallandier V.**, Merlen L., Boucard S., Thomas A., Venet T., Chalansonnet M., Gauchard G., Pouyatos B. et Campo P., Study of the vestibulotoxicity of volatile aromatic compounds by an *in vitro* approach. 7 Novembre 2018. Journée de l'école Doctorale BioSE. Nancy, France (communication orale format « Ma Thèse en 180 secondes »).

**Tallandier V.**, Merlen L., Boucard S., Thomas A., Venet T., Chalansonnet M., Gauchard G., Pouyatos B. et Campo P., Etude de la vestibulotoxicité des composés organiques volatils par une approche *in vitro*. 3 Mars 2019. Réunion plénière laboratoire DevAH. Vandoeuvre-lès-Nancy, France (communication orale).

**Tallandier V. / Kirsch A.**, Développement d'un modèle expérimental pour étudier l'impact des polluants industriels sur le vestibule / Transformation des cellules Bhas 42, certaines nanoparticules de silices entraînent une dérégulation de l'expression de 12 gènes. 26 Mars 2019. Journée des doctorants. Institut National de Recherche et de Sécurité, Nancy, France (communication orale format « présentations croisées des deux projets de thèse »).

**Tallandier V.**, Merlen L., Boucard S., Thomas A., Venet T., Chalansonnet M., Gauchard G., Pouyatos B. et Campo P., Study of the vestibulotoxicity of volatile aromatic compounds by an *in vitro* approach. 12 Novembre 2020. Journée de l'école Doctorale BioSE. Nancy, France (communication orale).



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxinvit](http://www.elsevier.com/locate/toxinvit)

## Styrene alters potassium endolymphatic concentration in a model of cultured utricle explants

V. Tallandier<sup>a,b</sup>, L. Merlen<sup>a</sup>, S. Boucard<sup>a</sup>, A. Thomas<sup>a</sup>, T. Venet<sup>a,b</sup>, M. Chalansonnet<sup>a,\*</sup>,  
G. Gauchard<sup>b</sup>, P. Campo<sup>a,b</sup>, B. Pouyatos<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institut National de Recherche et de Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, F-54519 Vandœuvre, Cedex, France

<sup>b</sup> DevAH EA 3450 – Développement, Adaptation et Handicap, Régulations cardio-respiratoires et de la motricité-Université de Lorraine, F-54500 Vandœuvre, France



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Styrene  
Vestibular explants  
Potassium  
Endolymph  
Rat  
Organotypic culture

### ABSTRACT

Despite well-documented neurotoxic and ototoxic properties, styrene remains commonly used in industry. Its effects on the cochlea have been extensively studied in animals, and epidemiological and animal evidence indicates an impact on balance. However, its influence on the peripheral vestibular receptor has yet to be investigated. Here, we assessed the vestibulotoxicity of styrene using an *in vitro* model, consisting of three-dimensional cultured newborn rat utricles filled with a high-potassium ( $K^+$ ) endolymph-like fluid, called “cysts”.  $K^+$  entry in the cyst (“influx”) and its exit (“efflux”) are controlled by secretory cells and hair cells, respectively. The vestibular epithelium’s functionality is thus linked to  $K^+$  concentration, measured using a microelectrode.

Known inhibitors of  $K^+$  efflux and influx validated the model. Cysts were subsequently exposed to styrene (0.25; 0.5; 0.75 and 1 mM) for 2 h or 72 h. The decrease in  $K^+$  concentration measured after both exposure durations was dose-dependent, and significant from 0.75 mM styrene. Vacuoles were visible in the cytoplasm of epithelial cells from 0.5 mM after 2 h and from 0.25 mM after 72 h.

The results presented here are the first evidence that styrene may deregulate  $K^+$  homeostasis in the endolymphatic space, thereby altering the functionality of the vestibular receptor.

### 1. Introduction

Aromatic solvents have many applications in industry, and long-term exposure to some of them has been shown to impair vigilance and postural stability (Vouriot et al., 2005). Consequently, exposure to solvents may increase the risks of occupational accidents and affect the quality of life of workers. Styrene is one of the most extensively used industrial solvents, mainly as a precursor of polymers and copolymers. Styrene is used in boat, automobile, aircrafts construction and their highest potential exposure to this chemical is reported in occupational setting for the production of glass-reinforced plastics (Miller et al., 1994). In addition to neurotoxic effects described in humans (Bergamaschi et al., 1997; Kishi et al., 2000), several animal and epidemiological studies indicate that styrene has deleterious effects on hearing (Hoet and Lison, 2008; Johnson, 2007; Loquet et al., 1999; Pleban et al., 2017) and balance (Calabrese et al., 1996; Larsby et al., 1978; Möller et al., 1990; Niklasson et al., 1993; Toppila et al., 2006).

These studies show that styrene may cause elevation of the auditory threshold and alter postural performances and vestibular reflexes. Most of the reports relating to styrene-induced balance impairments assumed the vestibular system to be affected. However, no clear demonstration of the precise mechanism – whether through an effect on the peripheral end-organ or an impact on central structures and pathways – has yet been provided (for review, see Gans et al., 2019).

In contrast, the effect of styrene on the cochlea is well described: electrophysiological measurements in rats exposed to styrene vapors showed an auditory deficit related to dose-dependent loss of cochlear outer hair cells (OHC) (Lataye et al., 2001). An *in vivo* study comparing level of OHC losses of 21 aromatic solvents showed that styrene is one of the most ototoxic agents among these tested chemicals (Gagnaire and Langlais, 2005). Because of its high lipophilicity styrene is assumed to reach the OHCs through the membranes of the cells constituting the outer sulcus within the organ of Corti, and not through the liquids contained in the inner ear. Campo et al. (1999) suggested that styrene

**Abbreviations:** 3D, three-dimensional; DC, Dark Cells; DIV, Days *in vitro*; DMEM-F12, Dulbecco’s Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12; HC, Hair Cells;  $K^+$ , Potassium ion; MET, mechano-electrical transduction; Na/K-ATPase, Sodium-Potassium Adenosine Triphosphate pump; NKCC1, Na-K-Cl co-transporter 1; OHC, Outer Hair Cells; P, Post-natal day; PBS, Phosphate-Buffered Saline; TC, Transitional Cells

\* Corresponding author.

E-mail address: [monique.chalansonnet@inrs.fr](mailto:monique.chalansonnet@inrs.fr) (M. Chalansonnet).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104915>

Received 27 January 2020; Received in revised form 2 June 2020; Accepted 11 June 2020

Available online 12 June 2020

0887-2333/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

reaches the cochlea through the stria vascularis, from where it can access the organ of Corti and thus the OHCs. Several authors have shown that Deiters' cells may be damaged by solvents at doses that do not induce OHC loss (Campo et al., 2001; Chen et al., 2007; Fetoni et al., 2016). Since Deiters' cells are involved in  $K^+$  re-uptake from OHCs (Hibino and Kurachi, 2006; Spicer and Schulte, 1998), some authors have suggested that styrene exposure affects the  $K^+$  cycle (Campo et al., 2001; Fetoni et al., 2016). Although this hypothesis has never been experimentally confirmed, it is reasonable to assume that ototoxicity is not limited to disruption of the OHC, but also perturbs ionic balance in inner ear fluids.

To our knowledge, no study has yet demonstrated the impact of an aromatic solvent, such as styrene, on the vestibular receptor. Both auditory and vestibular receptors are composed of sensory hair cells and secretory cells – stria marginal cells and vestibular dark cells – involved in inner ear fluid homeostasis. Moreover, cochlear and vestibular endolymph both exhibit a high  $K^+$  concentration required to permit mechano-electrical transduction (MET) at the level of the sensorial hair cells (Ciúman, 2009; Hibino et al., 2010). Given these similarities, in addition to its cochleotoxic effect, we hypothesize that styrene may be vestibulotoxic. In support of this hypothesis, other ototoxic agents – such as cisplatin, gentamicin, or nitriles – have been linked to balance disorders related to disruption of the neurosensory epithelium within the vestibular receptor (Callejo et al., 2017; Kim et al., 2013; Llorens et al., 1993).

Given the number of unknowns surrounding the vestibulotoxic properties of aromatic solvents and the time-consuming *in vivo* studies that would be needed to investigate the ototoxic mechanisms of these chemicals, a fast and reliable *in vitro* method is required to assess the functional and histological consequences of solvent exposure on the vestibular end-organ.

Here, we used newborn rat utricles cultured in three-dimensional (3D) medium as a model to assess the potency vestibulotoxic of styrene (Bartolami et al., 2011; Gaboyard et al., 2005). This *in vitro* model, initially developed to investigate endolymph formation in immature vestibule consists in a sphere, called “cyst”, which forms when the harvested utricle is placed in the 3D medium. After a few days in culture, the volume of the cyst increases as it fills with an endolymph-like fluid. All utricular cell types (hair cells, transitional and dark cells) and their associated proteins involved in  $K^+$  cycling (MET channels, Na/K-ATPase and Na-K-2Cl co-transporter 1 (NKCC1)) are preserved in the “cysts” and contribute to endolymph production (Bartolami et al., 2011; Gaboyard et al., 2005). Acquisition of hair cells sensory transduction at embryonic state (Géléoc and Holt, 2003) and complete maturation of vestibular dark cells observed around the 4th day post-partum (Anniko and Nordemar, 1980), are in line with the production of an endolymph-like fluid in the lumen of the cyst.

The biochemical composition of endolymph therefore depends on the functionality of utricular cells. For this study, the potential vestibulotoxicity of styrene was investigated by measuring its effect on the endolymphatic  $K^+$  concentration using an electrochemical method, and by observing its histopathological consequences on the vestibular sensory epithelium.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Pregnant Long-Evans female rats were purchased from Janvier Laboratories and were housed in individual cages (surface: 1032 cm<sup>2</sup>; height: 20 cm) from the 15th day of pregnancy until birth under a 12 h light / 12 h dark cycle. In the animal facilities, temperature was maintained at 22 ± 2 °C and relative humidity at 55 ± 15%. Food and water were available *ad libitum*. Animals were weighed upon arrival at the facility and just before giving birth to monitor weight gain during the third week of pregnancy. Birth was natural, and newborns

aged between 0 (P0) and 4 post-natal days (P4) were used in experiments. All investigations involving animals were performed in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals promulgated by the European parliament and council (EUROPEAN DIRECTIVE 2010/63/EU, 22 September 2010). The animal facilities are accredited by the French Ministry of Agriculture (Authorisation N° D 54–547-10).

### 2.2. Three-dimensional culture of utricle explants

The utricle explants were cultured using a technique described in previous studies (Bartolami et al., 2011; Gaboyard et al., 2005). Newborn rats (P0-P4) were decapitated and the head was hemisectioned. The temporal bones were harvested and placed in Leibovitz's L-15 medium. Utricles were aseptically removed, taking care to conserve the epithelium covering the macula. The basal surface of the sensory epithelium was stripped of surrounding nervous tissue. Explants were then placed on 12-mm diameter glass coverslips previously coated with 10 µg/ml laminin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, U.S.A.) in 35-mm Petri dishes. Ten microliters of Matrigel® (Corning, NY, USA) was gently overlaid on the vestibular structures. To allow explants to grow, they were positioned so that the basal surface of the sensory epithelium faced the coverslips. Cultures were incubated at 37 °C for 30 min in a 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in a humidified incubator. Embedded utricular explants were then covered with culture medium Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 2% N-2 (Life Technologies, Carlsbad, California). Vestibular explants were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and half of the culture medium was renewed three times per week. After a few days *in vitro* (DIV), the utricular structures sealed themselves and formed a vesicle enclosing the endolymphatic compartment (“cyst”). Deflated cysts were excluded from the study.

### 2.3. Electrophysiological measurements

The potassium concentration inside the vesicle was determined using an ion-sensitive microelectrode. Borosilicate glass capillaries with filament (1B100F-4; WPI, Sarasota, FL, USA) were melted and pulled vertically using a PUL-100 Microprocessor-controlled micropipette Puller (WPI, Sarasota, FL, USA) before baking at 200 °C for 2 h to eliminate proteins contaminant among others. Microelectrodes were then silanized with dichlorodimethylsilane (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) vapors for 5 min to create a hydrophobic layer inside the microelectrode. Capillaries were dried by baking for 4 h at 200 °C. The microelectrode tip was backfilled with liquid membrane ion  $K^+$  exchanger (Potassium Ionophore I – Cocktail B, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and the barrel was filled with 150 mM KCl. Microelectrode impedance was determined using an ohmmeter (Omega TipZ, WPI, Sarasota, USA) to select microelectrodes with an impedance of less than 200 MΩ. Microelectrodes were connected, *via* a holder, to the headstage amplifier of a differential electrometer (HiZ-223 Warner Instruments, Hamden, USA). The reference electrode was immersed in the calibration solutions or the medium covering the sample to close the electrical circuit. The electrical signal was monitored with Pulse® software and a 3160-A-022 analyzer (Brüel & Kjær, Nærum, Denmark). Before recording the electrical potential of the cyst's endolymphatic compartment, the electrical signal of the microelectrode was calibrated with decreasing concentration of KCl solutions: 150, 100, 75, 50, 20 and 10 mM. All calibration solutions contained 150 mM cation, supplemented with NaCl as appropriate.

To measure the  $K^+$  concentration in the endolymphatic compartment, cysts were placed on the microscope stage and covered with medium. Before measuring the potassium concentration of the endolymphatic compartment, the microelectrode tip was immersed in the medium, which contained a known  $K^+$  concentration (about 4 mM KCl,

DMEM-F12, Thermo Fisher Scientific). Then, the ion-sensitive micro-electrode was inserted into the vesicle explants under optical control. Once inside the vesicle, the stabilization of the signal took few second and the duration of the  $K^+$  measurement never exceeded 30 s.

#### 2.4. Pharmacological treatment

Several pharmacological molecules known to alter the activity of ion channels and pumps were added to the culture medium to test their effects on the endolymphatic  $K^+$  concentration. Ouabain (a Na/K-ATPase inhibitor), bumetanide (a NKCC1 inhibitor disrupting potassium entry in the cyst), gentamicin and gadolinium (which both block mechano-electrical transduction channels at the top of stereocilia of hair cells), were tested in the present study. Ouabain, gadolinium chloride hexahydrate, gentamicin solution and bumetanide were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). At 7 DIV, cysts were incubated with gentamicin (1 mM, 2 h), gadolinium (0.1 mM, 2 h), ouabain (1 mM, 2 h) or bumetanide (0.05 mM, 0.5 h), and the effects of these pharmacological treatments were measured. In parallel, control cultures were incubated in the same conditions with the corresponding vehicle.

#### 2.5. Styrene exposure

Styrene (Acros Organics, Illkirch, France; 99%) was added directly to DMEM-F12 medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a volumetric flask to prepare the different stock solutions of styrene: 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mM. The styrene-medium solution and 2% N-2 were added to glass headspace vials (8 ml) which were then sealed with a Teflon-faced butyl rubber septum and an aluminum crimp cap to avoid solvent evaporation. Each vial was completely filled in order to have no gaseous phase, thus avoiding styrene stagnation in this compartment. The vial caps were removed to place cysts in contact with medium containing styrene before sealing once again. Cysts were maintained in these conditions for 2 h or 72 h, to observe acute and cytotoxic effects of styrene respectively, prior to measuring the  $K^+$  concentration at 7 DIV. For 2-h exposures, the treatment was performed at 7 DIV, whereas for 72-h exposures, cysts were maintained in culture with styrene from the 4th DIV to the 7th DIV. Control cysts were cultivated in medium without styrene in the same sealed chemical vials for 2 h or 72 h.

#### 2.6. Tissue section preparation for light microscopy

After culturing for 7 DIV, cysts were collected and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer for 24 h. Samples were rinsed in 0.2 M cacodylate buffer and post-fixed for 1 h with 1% osmium tetroxide in the dark. Cysts were dehydrated in graded ethanol concentrations up to 100% and then embedded in epoxy resin after soaking in incremental 50%/50% and 75%/25% resin / propylene oxide solutions. Following polymerization at 60 °C for 24 h, 2.5- $\mu$ m transversal sections were cut with a microtome (Leica, UC7), and stained with toluidine blue (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Sections were observed with an optical microscope (BX41, Olympus, Tokyo, Japan).

#### 2.7. Immunohistochemical analysis of cleaved caspase-3

The embedded Matrigel® was removed and cysts were fixed with 4% formaldehyde buffered at pH 6.9 for 24 h. After rinsing with Phosphate-Buffered Saline (PBS), cysts were dehydrated in graded ethanol concentrations up to 100%. After a clearing step in xylene, samples were embedded in paraffin. Transversal sections (4  $\mu$ m) were cut with a microtome (Microm, HM 340E). Slices were dewaxed in xylene and rehydrated. A heat-induced antigen retrieval step was performed in citrate buffer (10 mM, pH 6) for 5 min. To reduce nonspecific staining,

endogenous peroxidase activity was blocked with 3%  $H_2O_2$  for 5 min, and nonspecific antibody binding sites were blocked with 5% of normal goat serum for 1 h at room temperature. Sections were incubated with the cleaved anti-caspase 3 monoclonal rabbit antibody (dilution 1/800, Cell Signaling, MA, USA) overnight at 4 °C. After rinsing in TBST-1 $\times$ , sections were incubated with the detection reagent containing peroxidase enzyme (SignalStain® Boost Detection Reagent, Cell Signaling) for 30 min at room temperature. The immunoreaction was visualized with 3,3'-diaminobenzidine (DAB), and sections were counterstained with Mayer Haemalum. Sections were mounted and observed under the optical microscope.

#### 2.8. Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The difference between experimental groups was determined using one-way ANOVA. Statistical results were expressed as follows: F (dfb, dfr) = F-ratio; p = p value, where dfb is the number of degrees of freedom between groups, and dfr is the number of residual degrees of freedom. A post-hoc least-significant difference test (LSD) was run to compare variations between "DIV" groups, and Dunnett's method was used to compare variations between control and the various styrene concentration groups. Student's *t*-test was applied to compare two experimental conditions. The threshold for statistical significance was set at  $p = .05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Endolymphatic compartment development in utricle explants

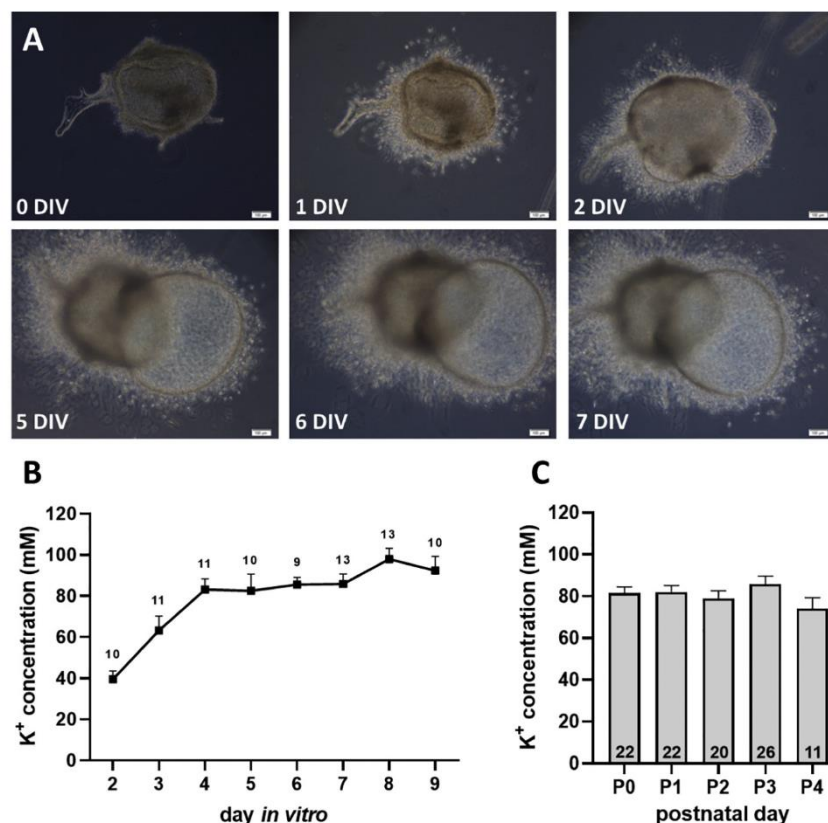
Utricles were dissected from P2 rats, and the morphological development of utricle explants was monitored from the day the tissue was placed in culture (0 DIV) until the 7th DIV (Fig. 1.A). After 1 DIV in the extracellular matrix, the utricle explants were surrounded by growing fusiform cells, possibly fibroblasts. At 2 DIV, the utricle explants appeared swollen and a small vesicle was observable. At 5 DIV, the vesicles had reached their maximum size, which remained unchanged until 7 DIV.

The endolymphatic  $K^+$  concentration was monitored from 2 to 9 DIV (Fig. 1.B). A progressive accumulation of  $K^+$  was measured between 2 DIV ( $39.6 \pm 4.0$  mM) and 4 DIV ( $83.1 \pm 5.2$  mM), at which time it reached a plateau which was maintained until 7 DIV ( $85.8 \pm 4.8$  mM). These differences in  $K^+$  concentration were significant [F (7, 79) = 10.33;  $p < .001$ ]. Post-hoc comparisons between groups show that the  $K^+$  concentrations measured at 2 and 3 DIV were significantly lower ( $p < .05$ ) than those measured between 4 and 9 DIV. Potassium concentrations were not significantly different between 4 and 9 DIV ( $p > .05$ ).

The endolymphatic  $K^+$  concentration was measured in 7-DIV cysts obtained from newborn rat utricles harvested at different postnatal days (Fig. 1.C). The one-way ANOVA does not reveal any difference between groups [F (4, 96) = 1.13;  $p = 0.346$ ], indicating that culture development is not dependent on the day of utricle was dissected.

#### 3.2. Effects of $K^+$ "influx" or "efflux" inhibitors on endolymphatic concentration

Secretory cells (transitional and dark cells) are responsible of the  $K^+$  "influx", the term "influx" being defined as the passage of  $K^+$  ions from the culture medium to the endolymphatic space (Fig. 2). Na/K-ATPase and NKCC1 expressed at their basolateral pole control the  $K^+$  uptake (Bartolami et al., 2011). Potassium ions are released in endolymphatic compartment though the complex KCNQ1/KCNE1 expressed at the apical side of dark cells and the two-pore-domain  $K^+$  channels ( $K_{2P}$ ) expressed in the apical membrane of dark and transitional cells (Nicolas et al., 2001, 2004; Popper et al., 2008). Conversely,  $K^+$  "efflux", i.e. the



**Fig. 1.** Morphological and functional developments of 3D utricle explants. (A) Newborn rat utricles were dissected at post-natal day 2 (P2) and maintained for 7 days *in vitro* (DIV). Light microscopy pictures show morphological evolution and cyst formation of cultured utricles from 0 to 7 DIV. Scale bar = 100  $\mu$ m. (B) Endolymphatic potassium accumulation in cysts from P0-P4 newborn rats was measured from 2 to 9 DIV. (C) Endolymphatic K<sup>+</sup> concentration of 7-DIV cysts obtained from newborn rat utricles was measured as function of postnatal day. Mean  $\pm$  SEM; the number of samples are indicated above each symbol (B) or in each bar of the histogram (C).

movement of the K<sup>+</sup> ions from the endolymphatic space to the culture medium, is performed by sensory hair cells involved in mechano-electrical transduction. Endolymphatic K<sup>+</sup> enters the hair cells through the MET channels, a phenomenon which depolarizes the cells and results in the excitation of the afferent neurons. Recovery of the resting membrane potential is then dependent on the K<sup>+</sup> exit across the basolateral membrane of the hair cells mainly through voltage-gated K<sup>+</sup> channels, whose molecular identity remains unclear (Meredith and Rennie, 2016).

Fig. 3 shows that gentamicin and gadolinium, both of which reversibly block the MET channels in hair cell's stereocilia, significantly increased the K<sup>+</sup> concentration in 7 DIV cysts. K<sup>+</sup> concentration was increased by 14% after exposure to gentamicin (treated group: 100.75  $\pm$  3.2 mM vs. control group: 88.2  $\pm$  3.3 mM;  $p = .028$ ) and by 20% upon incubation with gadolinium (treated group: 103.9  $\pm$  5.1 mM vs. control group: 86.8  $\pm$  4.7 mM;  $p = .028$ ). Conversely, ouabain and bumetanide significantly decreased the K<sup>+</sup> concentration: ouabain treatment (1 mM, 2 h) caused a drastic 65% reduction in K<sup>+</sup> (treated group: 29.8  $\pm$  5.5 mM vs. control group: 84.4  $\pm$  5.7 mM;  $p < .001$ ), whereas bumetanide (0.05 mM, 0.5 h) triggered a 22% decrease in K<sup>+</sup> concentration in 7 DIV cysts (treated group: 61.2  $\pm$  6.3 mM vs. control group: 78.7  $\pm$  2.82 mM;  $p = .014$ ). A one-way ANOVA comparing the different control groups showed no significant difference [F (3, 49) = 1.06;  $p = .373$ ].

### 3.3. Effect of styrene on endolymphatic K<sup>+</sup> concentration

Cysts were maintained in contact with varying styrene concentrations (0.25; 0.5; 0.75 and 1 mM) for either 2 or 72 h (Fig. 4.A,B). For the 72-h condition, utricle explants were treated from the 4th DIV to 7th DIV, when the K<sup>+</sup> concentration is the most stable (Fig. 1.B).

Exposure to styrene for 2 or 72 h caused dose-dependent decreases

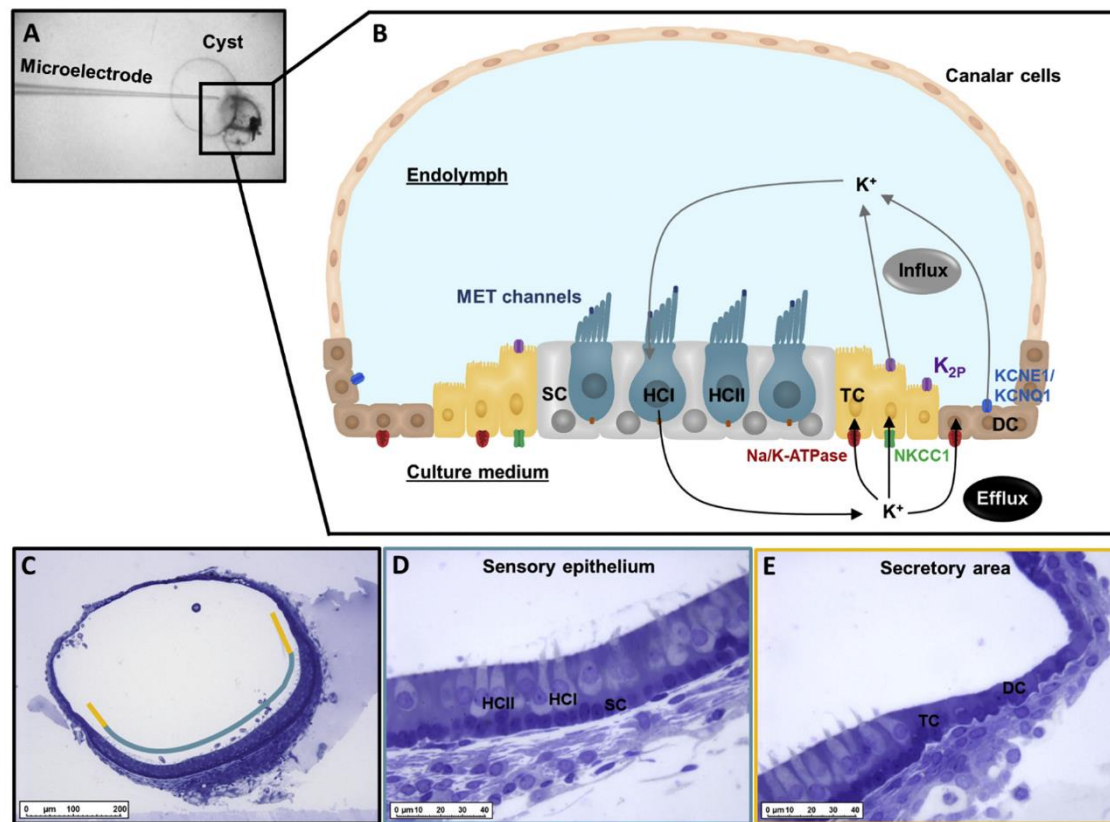
in K<sup>+</sup> concentrations [2 h: F (4, 38) = 8.43;  $p = .0001$ –72 h: F (4, 54) = 17.99;  $p < .0001$ ].

After exposure to styrene for 2 h, K<sup>+</sup> concentration decreased significantly compared to control group (82.0  $\pm$  4.8 mM) for cysts exposed to 0.75 mM (53.2  $\pm$  7.0 mM;  $p = .014$ ) and 1 mM styrene (41.7  $\pm$  11.6 mM;  $p < .001$ ). The decline in concentration was 35.12% and 49.13%, respectively. Exposure for 72 h also triggered a significant decrease in K<sup>+</sup> concentration compared to the control group (80.6  $\pm$  4.5 mM) in the 0.75 mM (59.1  $\pm$  4.9 mM;  $p = .004$ ) and 1 mM (21.0  $\pm$  5.9 mM;  $p < .001$ ) groups. The reductions measured were 22.75% and 73.97%, respectively.

### 3.4. Histological analysis

To determine if styrene induced an apoptotic pathway mechanism, cleaved caspase-3 was immuno-stained. Antibody-staining revealed no caspase-3 activation in cysts exposed to styrene for 72 h, whatever the concentration assessed (data not shown).

The gross morphologies of epithelial cells (P1–4, 7 DIV) in cysts exposed to styrene (0; 0.25; 0.5; 0.75 and 1 mM) for 2 or 72 h were observed under light microscopy (Figs. 5 and 6). In control samples, type I (pyriform shape) and type II (column-shaped) hair cells and intercalated supporting cells could be clearly distinguished in the sensory epithelium. No obvious morphological alterations to epithelial cells were observed, with no vacuoles visible in the cytoplasm, and normal-looking nuclei. A layer of secretory cells bordering the sensory epithelium was identifiable. It consisted of cuboidal dark cells and transitional cells, the latter of which are in contact with sensory cells. Cysts exposed to 1 mM of styrene for 2 h or 72 h contained cells with condensed and/or swollen nuclei, low-density cytoplasm, and displayed vacuolization. This effect was visible in all cell types in the sensory and secretory epithelia. Some hair cells were extruded from the cuticular plate, but



**Fig. 2.** Description of the 7 DIV cyst: (A) Photograph an ion-sensitive microelectrode penetrating a cyst during the recording of the  $K^+$  concentration. (B) Schematic representation of a 7-DIV cyst. The cyst is an enclosed structure filled with a high- $K^+$  endolymph-like fluid, which contains sensory and secretory cells participating in the  $K^+$  cycle. Transitional cells (TC) and dark cells (DC) are involved in  $K^+$  “influx”, i.e. the passage of  $K^+$  ions from the culture medium to the endolymphatic compartment. These cells absorb  $K^+$  ions from the culture medium via Na/K-ATPase and NKCC1 channels expressed at their basolateral membrane and release them in the endolymphatic compartment at their apical side through KCNE1/KCNQ1 and  $K_{2P}$  channels.  $K^+$  “efflux”, i.e. the movement of  $K^+$  ions from the endolymphatic compartment to the culture medium is ensured by sensory hair cells. Mechano-electrical transducer (MET) channels expressed in the hair cell stereocilia allow the passage of  $K^+$  ions into the cytosol, which in turn triggers depolarization and the release of  $K^+$  ions in the culture medium through voltage-gated  $K^+$  channels expressed in basolateral membrane (C) Semi-thin sections of 7-DIV obtained from P2 newborn rat utricle were observed in light microscopy. The sensory epithelium is indicated in green and secretory area in yellow. (D) The sensory epithelium is composed of supporting cells (SC) and 2 types of hair cells expressed ciliary bundles at their apical surface; pyriform-shaped type I hair cell (HCI) and column-shaped type II hair cell (HCII). (E) The secretory area is composed of transitional cells (TC) neighbored cubic-shaped dark cells (DC). Scale bar = 200  $\mu m$  in C and 40  $\mu m$  in D, E. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

most stereocilia remained present. Small numbers of vacuoles were visible in epithelial cells of cysts exposed to 0.5 and 0.75 mM of styrene for 2 h, whereas no sign of cellular damage was observed in cysts exposed to 0.25 mM styrene. After 72 h exposure, cytoplasmic vacuoles were observed in all epithelial cell types in cysts exposed to styrene at a concentration exceeding 0.25 mM. Apart from cytoplasmic vacuoles observed in the various sensory and secretory epithelial cells in cysts, no other obvious features of cell injury were noted.

#### 4. Discussion

For this study, the adverse effects of styrene on the vestibular receptor were investigated using an *in vitro* model adapted from Bartolami et al., (2011) and Gaboyard et al., (2005). This model consisted in a 3D utricular explant from newborn rats, and was compatible with the assessment of both functional and morphological consequences of styrene exposure on utricular cells.

Morphological changes and electrophysiological recordings over time demonstrated a progressive maturation of this model (Fig. 1). After two days in culture, the 3D utricular explant displayed a small vesicle. We assumed that epithelial cells would proliferate to produce a

closed utricular explant. Indeed, Gnedeva et al. (2017) demonstrated that utricles cultured in a low-stiffness extracellular matrix – close to our conditions – provides a conducive environment in which supporting cells can reenter their cell cycle and therefore extend the macular area. Moreover, the extracellular matrix and the N-2 supplement used in this study contain several growth factors, including EGF, bFGF and IGF-1, that should contribute to the proliferation of utricular cells and the emergence of surrounding fibroblast-like cells at 1 DIV (Zheng et al., 1997). In addition to the mechanical properties of the extracellular matrix and the use of growth factors promoting cell expansion, the maximal proliferative response of rat sensory epithelia to some growth factors has been shown to occur between birth and the 5th day postpartum (Gu et al., 2007). This time window seems to be in accordance with our observation of the development of cysts in explants from newborn rats harvested between P0 and P4. The  $K^+$  concentration in the endolymphatic compartment (Fig. 1.B) appears to be related to the size of the vesicle. Indeed, 2-DIV cysts display a small vesicle and have a low endolymphatic  $K^+$  concentration, whereas in 4- to 7-DIV cysts, the  $K^+$  concentration plateaus when the vesicles reach their maximal size. This result suggests that the swelling of the cysts is triggered by the accumulation of  $K^+$  ions, and the resulting osmotic water influx.

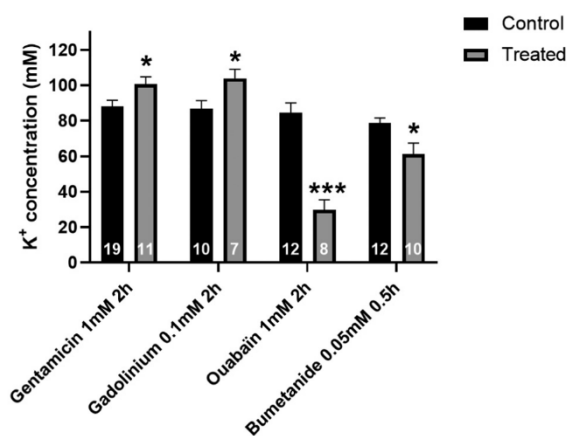


Fig. 3. Effects of inhibitors of MET channels, Na/K-ATPase and NKCC1 on endolymphatic K<sup>+</sup> concentration: 7 DIV cysts obtained from P0-P4 newborn rats were treated with gentamicin (1 mM, 2 h), gadolinium (0.1 mM, 2 h), ouabain (1 mM, 2 h) or bumetanide (0.05 mM, 0.5 h). Control cysts were treated with the corresponding vehicle. Each histogram represents the mean  $\pm$  SEM; the number of samples for each group is indicated in each bar of the histogram. Student's t-test: \* $p < .05$  and \*\*\* $p < .001$ .

The cyst encloses an endolymph-like fluid with a high K<sup>+</sup> concentration ( $85.8 \pm 4.8$  mM at 7 DIV, Fig. 1.B), slightly below *in vivo* values (between approximately 100 and 120 mM). Endolymph is mainly produced by secretory dark cells, which transport K<sup>+</sup> from perilymph to endolymph. Even though rodent dark cells appear morphologically mature at birth, the composition of endolymph only matures 6–8 days after birth (Anniko, 1980; Anniko and Nordemar, 1980). Vestibular dark cells in P0-P4 newborn rats may not yet be fully functional, which could explain why the K<sup>+</sup> concentration in our model was lower than *in vivo* values. K<sup>+</sup> concentrations measured in organotypic cultures of chicken embryos were also reported to be lower than *in vivo* values (Masetto et al., 2005). The K<sup>+</sup> concentrations and their progression profile obtained in the current study (Fig. 1.B) are in good agreement with those reported by Bartolami et al. (2011) who described an increase in K<sup>+</sup> concentration between 2 and 5 DIV, and a plateau between 5 and 8 DIV.

The endolymphatic K<sup>+</sup> concentration is maintained by an active equilibrium between influx and efflux of K<sup>+</sup>. This equilibrium is regulated by dark and transitional cells, which secrete K<sup>+</sup> into the endolymph through the action of the Na/K-ATPase pump and the NKCC1 channel expressed at their basolateral pole, and by sensory hair cells, which release K<sup>+</sup> to the perilymph through transduction channels

expressed in the hair cell's stereocilia. Ouabain, a Na/K-ATPase inhibitor, and bumetanide, a NKCC1 inhibitor, both cause the K<sup>+</sup> concentration to decrease, proving that the model is sensitive to the inhibition of K<sup>+</sup> influx. These data are in line with those presented by Bartolami et al. (2011) using cysts obtained from P2-P3 mice: when treated with 1 mM ouabain for 1 h, the K<sup>+</sup> concentration in cysts decreased by 85%; 0.05 mM bumetanide treatment for 15 min, the transient decrease was more moderate at 28%.

The involvement of sensory cells in K<sup>+</sup> efflux was revealed using 2-h treatments with gentamicin and gadolinium, both of which block hair cell stretch-activated channels (Kimitsuki et al., 1996; Kroese et al., 1989). Gentamicin and gadolinium led to 14% and 20% increases in the K<sup>+</sup> concentration, respectively. These percent changes are lower than those reported by Bartolami et al., (2011) with P2-P3 newborn mice cysts – at 38.6% and 56.1% increases in K<sup>+</sup> after gentamicin and gadolinium treatments, respectively. The acquisition of sensory transduction during embryonic stages is well described for mouse utricles (Géléoc and Holt, 2003), but no information is available for rats. MET in rat utricle hair cells may not be fully functional during the first days after birth. In addition, the fact that utricle hair cell density in newborn rat (P1) is lower than in mice (19th gestation day) (Dechesne et al., 1986; Mbiene et al., 1984; Wubbels et al., 2002) may enhance the difference between the data reported by Bartolami et al. (2011) and the results presented here. Nevertheless, taken together the results obtained with the different pharmacological treatments confirm that all cell types involved in K<sup>+</sup> cycle are functional in the present model.

To assess the vestibulotoxic potential of styrene, cysts were exposed to varying concentrations for either 2 h or 72 h. The 2-h exposure was chosen to study the pharmacological effects of styrene. Infact, several *in vivo* and *in vitro* studies showed that short exposures (30 s to 1 h) to aromatic solvents can modulate the function of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and nicotinic receptors as well as Na/K-ATPase and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels (VDCC) (Bale et al., 2005; Bale et al., 2002; Calderón-Guzmán et al., 2005b; Calderón-Guzmán et al., 2005a; Cruz et al., 2000; Cruz et al., 1998; Lebel and Schatz, 1990; Maguin et al., 2009; Vaalavirta and Tähti, 1995a, 1995b). The 72-h exposure-time was used to investigate the cytotoxic effects of styrene. A similar duration has previously been used to assess the effect of aromatic solvents *in vitro* on human cord blood cells (Diodovich et al., 2004), primary cortical astrocytes (Lin et al., 2002) and primary cultures of motor and sensory neurons (Kohn et al., 1995). The 72-h exposure condition was centered on the 4- to 7-DIV period, when the K<sup>+</sup> concentration was stable (Fig. 1.B), so that normal cyst development would not interfere with the styrene effect.

As aromatic solvents can interact with the polystyrene walls of culture flasks, glass headspace vials were used for styrene exposure experiments (Crouté et al., 2002). One major problem with experiments

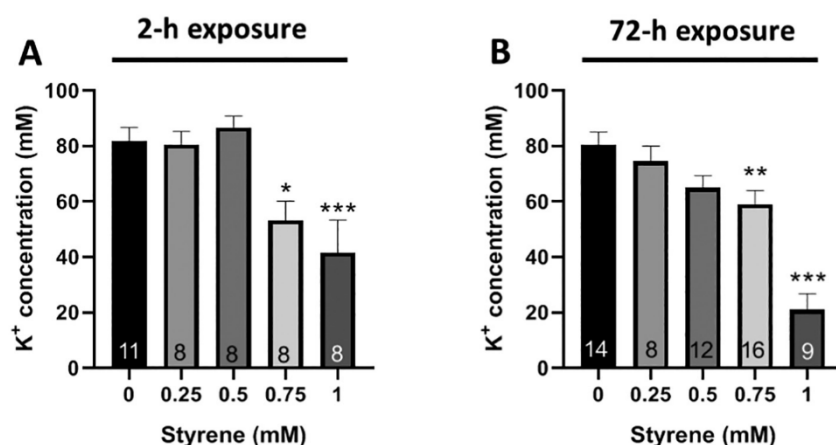
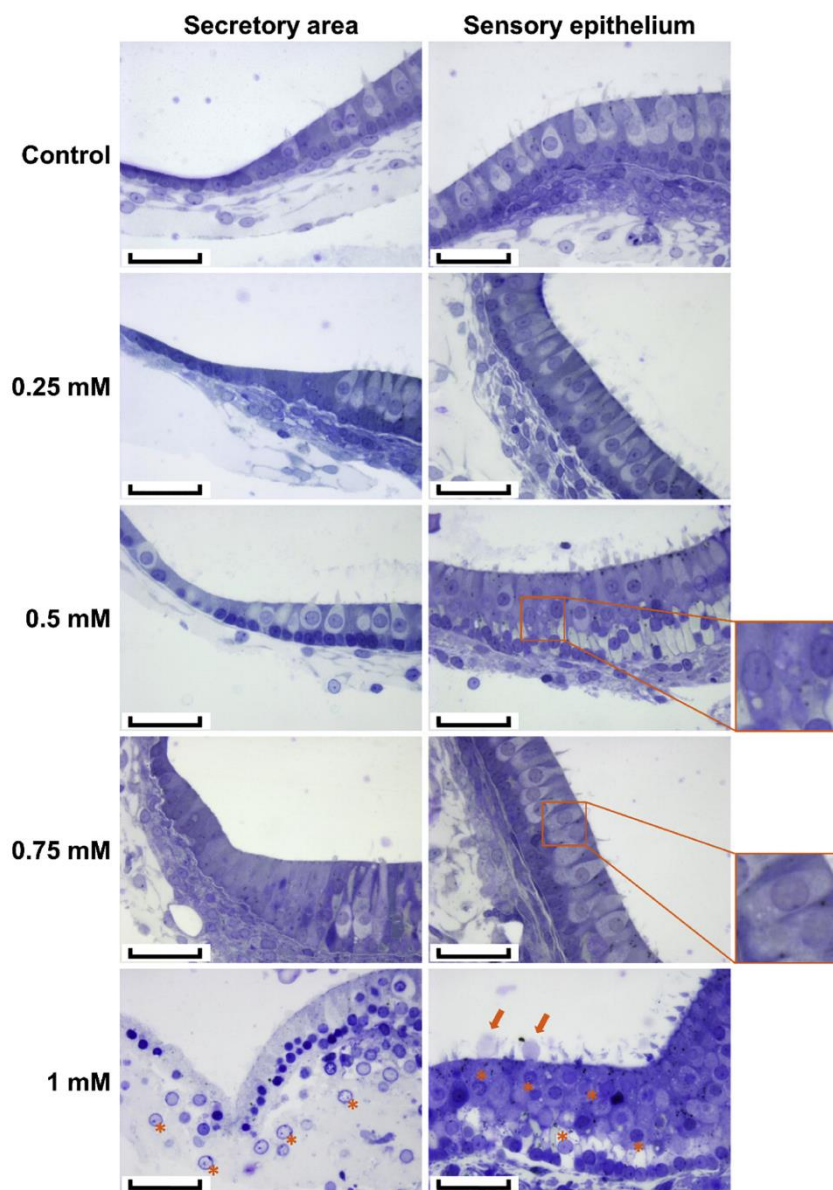


Fig. 4. Exposure to styrene decreases the endolymphatic K<sup>+</sup> concentration. Cysts were obtained from P0-P4 newborn rats and measurements were performed at 7 DIV. Utricle explants were exposed to varying styrene concentrations (0.25; 0.5; 0.75 and 1 mM) for 2 h (A) or 72 h (B). Two-hour exposures were performed at 7DIV and 72-h exposures between 4 DIV and 7 DIV. Control samples were cultured in sealed vials for the corresponding exposure-time. Each histogram represents the mean  $\pm$  SEM. The number of samples is indicated in each bar of the histogram. Dunnett: \* $p < .05$ ; \*\* $p < .01$  and \*\*\* $p < .001$ .



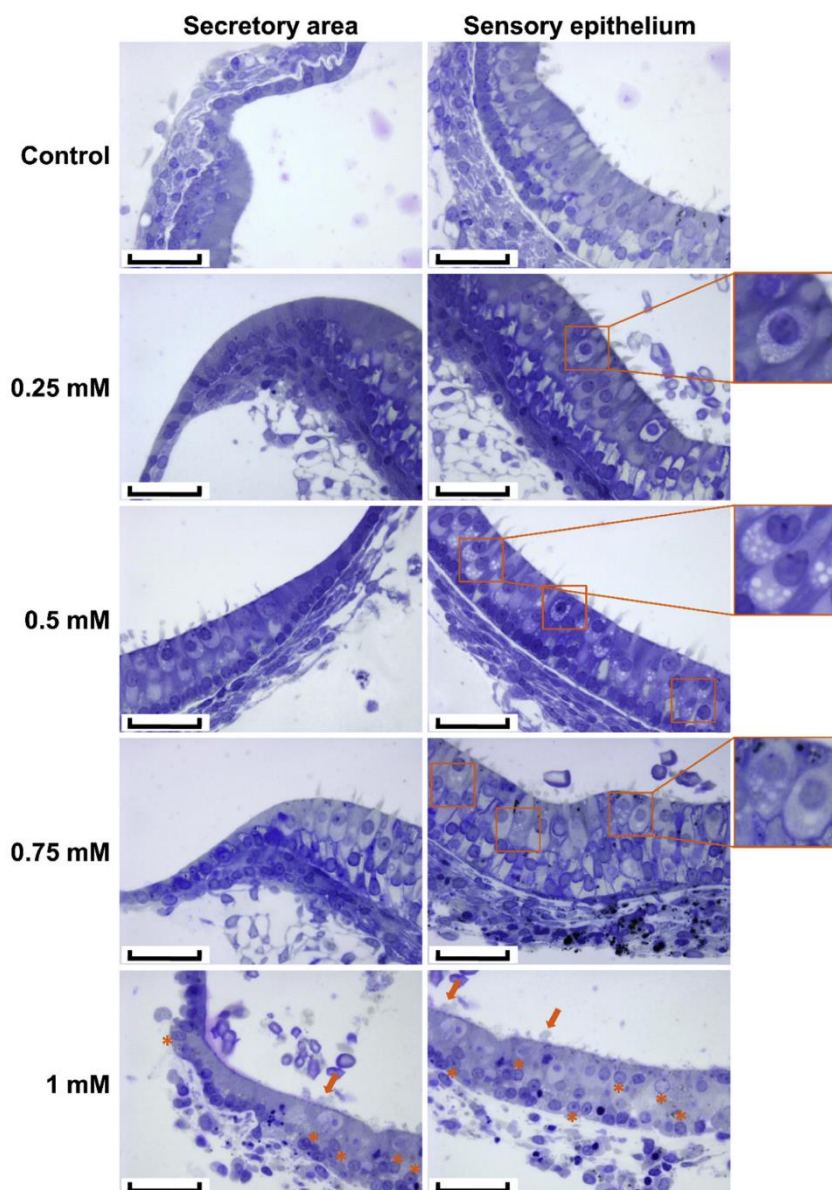


**Fig. 5.** Histological sections of cysts after exposure to varying styrene concentrations for 2 h. 7-DIV cysts obtained from P1-P4 newborn rats were observed under light microscopy after styrene exposure. Styrene concentrations are indicated to the left of the figure. For each condition, pictures in the left panel display part of the sensory epithelium; the right panel shows images of the secretory cell area. Cytoplasmic vacuoles were further magnified (insets). Extrusions are indicated with arrows, and condensed nuclei by asterisks. Scale bar = 40  $\mu$ m.

involving aromatic solvents is their high volatility. In unsealed containers, 25% of the solvent content is reported to evaporate within 30 min, and 90% within 4 h (Cruz et al., 1998, 2000; Rogers et al., 2004). This level of evaporation would necessarily lead to an underestimation of the toxic potency of solvents. To avoid this type of bias in our experiments, cysts were exposed to styrene in sealed vials, thus limiting evaporation and allowing a stable concentration to be maintained. This method was demonstrated to maintain more than 90% of the initial concentration of volatile organic compounds (Rogers et al., 2004).

The styrene concentrations used in this study were comprised between 0.25 and 1 mM. These concentrations were selected as they are close to styrene concentrations predicted or determined in animal blood *in vivo* after exposure. For example, the PBPK models developed by

Sarangapani et al. (2002) to predict the concentration of styrene in rodent blood indicate that after 6 h of exposure to 1200 ppm styrene, the blood concentration would be approximately 0.8 mM, and 0.25 mM after exposure to 600 ppm. Similarly, *in vivo* studies reported 0.382 mM and 0.232 mM of styrene in rat blood after inhalation exposure to 1750 ppm for 10 h and 1000 ppm for 6 h, respectively (Lataye et al., 2003; Loquet et al., 1999). Results from another study with rats exposed to styrene by oral gavage at 800 mg / kg / day indicated a blood concentration of styrene that quickly reaches a plateau at approximately 0.20 mM; this level is maintained for at least 6 h (Chen et al., 2007). In addition, the concentrations of styrene used here are of the same order of magnitude as those used in other *in vitro* studies evaluating the toxic effects of styrene in dimethyl sulfoxide (DMSO) or not (ranging from 0.1 to 10 mM for 1 to 96 h) (Diodovich et al., 2004;



**Fig. 6.** Histological sections of cysts after exposure to varying styrene concentrations for 72 h. 7-DIV cysts obtained from P1–4 newborn rats were observed under light microscopy after styrene exposure. Styrene concentration is indicated to the left of the images. For each condition, the left panel displays part of the sensory epithelium; the right panel shows images of the secretory cell area. Cytoplasmic vacuoles were further magnified (insets). Extrusions are indicated with arrows, and condensed nuclei by asterisks. Scale bar = 40  $\mu$ M.

Harvilchuck et al., 2009; Harvilchuck and Carlson, 2006; Kohn et al., 1995).

Our findings from this *in vitro* study indicate that styrene decreases  $K^+$  concentration from a solvent concentration as low as 0.75 mM after both 2- and 72-h exposure (Fig. 4). Styrene exposure induced dying cell after 2- and 72-h exposure to 1 mM and cellular suffering features from 0.5 mM after 2-h and from 0.25 mM after 72-h exposure. Indeed, histological analysis highlighted pathological features such as extrusions, low-density cytoplasm and condensed and swollen nucleus in both secretory and sensory epithelia after exposure to 1-mM styrene for 2 and 72 h. Cytoplasmic vacuoles were visible from 0.25 mM in the 72-h exposure condition. Unexpectedly, vacuoles were also observed after just 2 h exposure, but only at concentrations exceeding 0.5 mM. Based on these observations, the effects of styrene are not specific to a cell

type, and both secretory and sensory cells can be affected (Figs. 5 and 6).

The absence of cleaved caspase-3 in cysts exposed to styrene, at any concentration or duration of exposure (data not shown), indicates that styrene probably does not induce apoptotic mechanisms under the experimental conditions tested here. Indeed, the low-density cytoplasm, swollen nuclei and the absence of caspase-3 expression in cysts exposed to 1 mM of styrene for 2 h and 72 h suggest that this concentration rather induced necrosis. Diodovich et al., (2004) reported similar findings with human cord blood cells, where *in vitro* exposure to 0.8 mM of styrene for 24 h and 48 h induced necrosis and down-regulated the pro-apoptotic protein Bax. In contrast, *in vivo* studies have indicated that styrene exposure induced cochlear cell death mainly through an apoptotic pathway, and lower levels of necrosis (Chen et al.,

- oxide and 4-vinylphenol on cytotoxicity and glutathione depletion in Clara cells of mice and rats. *Toxicology* 227, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.08.001>.
- Harvilchuck, J.A., Pu, X., Klaunig, J.E., Carlson, G.P., 2009. Indicators of oxidative stress and apoptosis in mouse whole lung and Clara cells following exposure to styrene and its metabolites. *Toxicology* 264, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.08.001>.
- Hibino, H., Kurachi, Y., 2006. Molecular and physiological bases of the K<sup>+</sup> circulation in the mammalian inner ear. *Physiology* 21, 336–345. <https://doi.org/10.1152/physiol.00023.2006>.
- Hibino, H., Nin, F., Tsuzuki, C., Kurachi, Y., 2010. How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflügers Arch.* 459, 521–533. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0754-z>.
- Hoet, P., Lison, D., 2008. Ototoxicity of toluene and styrene: state of current knowledge. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 127–170. <https://doi.org/10.1080/10408440701845443>.
- Johnson, A.-C., 2007. Relationship between styrene exposure and hearing loss: review of human studies. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 20, 315–325. <https://doi.org/10.2478/v10001-007-0040-2>.
- Kim, H.J., Lee, J.O., Koo, J.W., Kim, J.-S., Ban, J., 2013. Gentamicin-induced bilateral vestibulopathy in rabbits: vestibular dysfunction and histopathology. *Laryngoscope* 123, E51–E58. <https://doi.org/10.1002/lary.24106>.
- Kimitsuki, T., Nakagawa, T., Hisashi, K., Komune, S., Komiya, S., 1996. Gadolinium blocks mechano-electric transducer current in chick cochlear hair cells. *Hear. Res.* 101, 75–80. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(96\)00134-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(96)00134-7).
- Kishi, R., Tozaki, S., Gong, Y.Y., 2000. Impairment of neurobehavioral function and color vision loss among workers exposed to low concentration of styrene—a review of literatures. *Ind. Health* 38, 120–126.
- Kohn, J., Minotti, S., Durham, H., 1995. Assessment of the neurotoxicity of styrene, styrene oxide, and styrene glycol in primary cultures of motor and sensory neurons. *Toxicol. Lett.* 75, 29–37. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(94\)03153-x](https://doi.org/10.1016/0378-4274(94)03153-x).
- Kroese, A.B., Das, A., Hudspeth, A.J., 1989. Blockage of the transduction channels of hair cells in the bullfrog's sacculus by aminoglycoside antibiotics. *Hear. Res.* 37, 203–217.
- Larsby, B., Tham, R., Odqvist, L.M., Hydén, D., Bunnfors, L., Aschan, G., 1978. Exposure of rabbits to styrene. Electronystagmographic findings correlated to the styrene level in blood and cerebrospinal fluid. *Scand. J. Work Environ. Health* 4, 60–65.
- Lataye, R., Campo, P., Barthelemy, C., Loquet, G., Bonnet, P., 2001. Cochlear pathology induced by styrene. *Neurotoxicol. Teratol.* 23, 71–79.
- Lataye, R., Campo, P., Pouyatos, B., Cossec, B., Blachère, V., Morel, G., 2003. Solvent ototoxicity in the rat and Guinea pig. *Neurotoxicol. Teratol.* 25, 39–50.
- Lebel, C.P., Schatz, R.A., 1990. Altered synaptosomal phospholipid metabolism after toluene: possible relationship with membrane fluidity, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase and phospholipid methylation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 1189–1197.
- Lin, H.J., Shaffer, K.M., Chang, Y.H., Barker, J.L., Pancrazio, J.J., Stenger, D.A., Ma, W., 2002. Acute exposure of toluene transiently potentiates p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity in cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci. Lett.* 332, 103–106. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00930-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00930-8).
- Llorens, J., Demêmes, D., Sans, A., 1993. The behavioral syndrome caused by 3,3'-iminodipropionitrile and related nitriles in the rat is associated with degeneration of the vestibular sensory hair cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 123, 199–210. <https://doi.org/10.1006/taap.1993.1238>.
- Loquet, G., Campo, P., Lataye, R., 1999. Comparison of toluene-induced and styrene-induced hearing losses. *Neurotoxicol. Teratol.* 21, 689–697.
- Maguin, K., Campo, P., Parietti-Winkler, C., 2009. Toluene can perturb the neuronal voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels involved in the middle-ear reflex. *Toxicol. Sci.* 107, 473–481. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn242>.
- Masetto, S., Zucca, G., Bottà, L., Valli, P., 2005. Endolymphatic potassium of the chicken vestibule during embryonic development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23, 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2005.05.002>.
- Mbiene, J.P., Favre, D., Sans, A., 1984. The pattern of ciliary development in fetal mouse vestibular receptors. A qualitative and quantitative SEM study. *Anat. Embryol.* 170, 229–238. <https://doi.org/10.1007/bf00318726>.
- Merchant, S.N., Adams, J.C., Nadol, J.B., 2005. Pathophysiology of Meniere's syndrome: are symptoms caused by endolymphatic hydrops? *Otol. Neurotol.* 26, 74–81.
- Meredith, F.L., Rennie, K.J., 2016. Channeling your inner ear potassium: K(+) channels in vestibular hair cells. *Hear. Res.* 338, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.01.015>.
- Miller, R.R., Newhook, R., Poole, A., 1994. Styrene production, use, and human exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 24, S1–S10. <https://doi.org/10.3109/10408449409020137>.
- Möller, C., Odqvist, L., Larsby, B., Tham, R., Ledin, T., Bergholtz, L., 1990. Otoneurological findings in workers exposed to styrene. *Scand. J. Work Environ. Health* 16, 189–194.
- Nicolas, M., Demêmes, D., Martin, A., Kupersmidt, S., Barhanin, J., 2001. KCNQ1/KCNE1 potassium channels in mammalian vestibular dark cells. *Hear. Res.* 153, 132–145. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(00\)00268-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(00)00268-9).
- Nicolas, M.-T., Lesage, F., Reyes, R., Barhanin, J., Demêmes, D., 2004. Localization of TREK-1, a two-pore-domain K<sup>+</sup> channel in the peripheral vestibular system of mouse and rat. *Brain Res.* 1017, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.012>.
- Niklasson, M., Tham, R., Larsby, B., Eriksson, B., 1993. Effects of toluene, styrene, trichloroethylene, and trichloroethane on the vestibulo- and opto-oculo motor system in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 15, 327–334.
- Pleban, F.T., Oketope, O., Shrestha, L., 2017. Occupational styrene exposure on auditory function among adults: a systematic review of selected workers. *Saf. Health Work* 8, 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2017.01.002>.
- Popper, P., Winkler, J., Erbe, C.B., Lerch-Gaggl, A., Stebeneich, W., Wackym, P.A., 2008. Distribution of two-pore-domain potassium channels in the adult rat vestibular periphery. *Hear. Res.* 246, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2008.09.004>.
- Rogers, J.V., Siegel, G.L., Pollard, D.L., Rooney, A.D., McDougal, J.N., 2004. The cytotoxicity of volatile JP-8 jet fuel components in keratinocytes. *Toxicology* 197, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.12.011>.
- Sarangapani, R., Teeguarden, J.G., Cruzan, G., Clewell, H.J., Andersen, M.E., 2002. Physiologically based pharmacokinetic modeling of styrene and styrene oxide respiratory-tract dosimetry in rodents and humans. *Inhal. Toxicol.* 14, 789–834. <https://doi.org/10.1080/08958370290084647>.
- Shubin, A.V., Demidyuk, I.V., Komissarov, A.A., Rafieva, L.M., Kostrov, S.V., 2016. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget* 7, 55863–55889. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10150>.
- Spicer, S.S., Schulte, B.A., 1998. Evidence for a medial K<sup>+</sup> recycling pathway from inner hair cells. *Hear. Res.* 118, 1–12.
- Toppila, E., Forsman, P., Pyykkö, I., Starck, J., Tossavainen, T., Uitti, J., Oksa, P., 2006. Effect of styrene on postural stability among reinforced plastic boat plant workers in Finland. *J. Occup. Environ. Med.* 48, 175–180. <https://doi.org/10.1097/01.jom.0000199510.80882.7b>.
- Vaalavirta, L., Tähti, H., 1995a. Astrocyte membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and mg(2+) -ATPase as targets of organic solvent impact. *Life Sci.* 57, 2223–2230. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)02214-4](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02214-4).
- Vaalavirta, L., Tähti, H., 1995b. Effects of selected organic solvents on the astrocyte membrane ATPase in vitro. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22, 293–294. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1995.tb01999.x>.
- Vouriot, A., Hannhart, B., Gauchard, G.C., Barot, A., Ledin, T., Mur, J.-M., Perrin, P.P., 2005. Long-term exposure to solvents impairs vigilance and postural control in serigraphy workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 78, 510–515. <https://doi.org/10.1007/s00420-005-0609-7>.
- Winbo, A., Rydberg, A., 2015. Vestibular dysfunction is a clinical feature of the Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Scand. Cardiovasc. J.* 49, 7–13. <https://doi.org/10.3109/14017431.2014.988172>.
- Wubbels, R.J., de Jong, H., van Marle, J., 2002. Morphometric analysis of the vestibular sensory epithelia of young adult rat. *J. Vestib. Res.* 12, 145–154.
- Yang, W.P., Hu, B.H., Chen, G.D., Bielefeld, E.C., Henderson, D., 2009. Protective effect of N-acetyl-L-cysteine (L-NAC) against styrene-induced cochlear injuries. *Acta Otolaryngol.* 129, 1036–1043. <https://doi.org/10.1080/00016480802566261>.
- Zheng, J.L., Heibig, C., Gao, W.Q., 1997. Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin-like growth factors in pure rat inner ear epithelial cell cultures. *J. Neurosci.* 17, 216–226.

transit from the *stria vascularis* to the sensory hair cells of the organ of Corti through the cellular membranes of the outer sulcus. This potential route of access is supported by studies which demonstrating that non-sensory supporting cells surrounding hair cells, such as Deiters' cells, are more vulnerable to styrene than sensory hair cells (Campo et al., 2001; Chen et al., 2007; Fetoni et al., 2016). As Deiters' cells play a determinant role in potassium re-uptake and recirculation (Hibino and Kurachi, 2006; Spicer and Schulte, 1998), it was suggested that styrene also affects the K<sup>+</sup> cycle in cochlea (Campo and Maguin, 2007; Chen et al., 2007; Fetoni et al., 2016), although this suggestion was never objectively tested.

In addition to impairing hearing, solvents have been shown to disrupt balance. Solvents have a negative impact on the sensory-motor integration of postural stability regulation and vestibular pathways (Calabrese et al., 1996; Niklasson et al., 1993; Tham et al., 1990). However, the precise mechanism through which aromatic solvents affect the vestibular system remains elusive. Thus, we still do not know whether the solvents affect the brain structures regulating balance or the vestibular labyrinth localized in the inner ear (Gans et al., 2019).

Both auditory and vestibular sensory organs are localized in the inner ear and share many features. They are both composed of sensory hair cells, which transform the mechanical stimuli into electrical signals. Moreover, they are both filled with a K<sup>+</sup>-rich fluid, the endolymph, which allows the potassium entry permitting mechano-electrical transduction (MET). The high endolymphatic potassium concentration is the result of ion movements controlled by active and passive pumps, and channels in the so-called secretory cells (strial marginal cells in the cochlea, and dark cells in the vestibule) (Ciuman, 2009; Hibino et al., 2010; Lang et al., 2007). These strong similarities led us to hypothesize that cochleotoxic aromatic solvents may also be vestibulotoxic, and might cause K<sup>+</sup> imbalances in the vestibular receptor.

To test the vestibular toxicity of solvents, we chose the *in vitro* "cyst" model initially developed by Gaboyard et al. (2005). The "cyst" is an inflated three-dimensional culture of newborn rat utricle, naturally filled with a high-K<sup>+</sup> endolymph-like fluid. "Cysts" preserve the key utricular cells types – sensory cells (hair cells) and secretory cells (transitional and dark cells) – and their associated proteins required for K<sup>+</sup> homeostasis (MET channels, Na/K-ATPase and Na-K-2Cl co-transporter 1 (NKCC1)). After a few days in a 3D matrix, the utricular explant seals itself to form an endolymphatic compartment filled with high-K<sup>+</sup> fluid. The K<sup>+</sup> concentration in this fluid therefore depends on the functionality of utricular cells. Our previous study indicated that styrene, an aromatic solvent with potent cochleotoxic properties, induced a dose-dependent decrease in K<sup>+</sup> concentration (Tallandier et al., 2020) with a noticeable effect from 0.75 mM without causing histological damages. Histopathological damage was only observed after a 1 mM exposure.

In the present study, the "cyst" model was used to assess the vestibulotoxicity of five aromatic solvents and compare it to that of styrene. All solvents were applied at the same concentration (0.75 mM). Toluene, ethylbenzene and three isomers of xylene were chosen because they are widely used in industrial settings, and have different cochleotoxic properties. Indeed, Gagnaire and Langlais (2005) showed that styrene and ethylbenzene are highly cochleotoxic, that toluene and *p*-xylene are moderately cochleotoxic, and that *m*-xylene and *o*-xylene are not cochleotoxic. The potential vestibulotoxicity of these aromatic solvents was determined by measuring their effects on the endolymphatic K<sup>+</sup> concentration in cysts, and by histological observations of utricular tissue. This approach allowed us to rank the solvents from most to least vestibulotoxic, and to investigate the relation between cochleotoxicity and vestibulotoxicity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

The animal facility where the rats were housed was fully accredited by the French Ministry of Agriculture (Authorization N° D 54–547-10). Investigators performing animal experiments adhered to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals promulgated by the European parliament and council (EUROPEAN DIRECTIVE 2010/63/EU, 22 September 2010). Pregnant Long-Evans female rats were purchased from Janvier Laboratories and were housed in individual cages (1032 cm<sup>2</sup> x 20 cm) from the 15th day of pregnancy until they gave birth, under a 12 h light / 12 h dark cycle. Temperature was maintained at 22 ± 2 °C, the relative humidity was 55 ± 15 %, and food and water were available *ad libitum*. To monitor weight gain during the pregnancy, animals were weighted at their arrival and just before parturition. Birth was natural, and newborns were used within four days of birth (P0-P4).

### 2.2. Cyst culture

Newborn rats (P0-P4) were decapitated before harvesting the temporal bones and placing them in Leibovitz's L-15 medium. Then utricles were then aseptically removed. The basal surface of the macula was stripped of nervous tissue, taking care to conserve the membrane covering the sensory epithelium. Explants were embedded in 10 µL of Matrigel® (Corning, NY, USA) on laminin-coated (10 µg / ml; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, U.S.A.) 12-mm diameter glass coverslips. Utricles were positioned so that the basal surface of the sensory epithelium faced the coverslips, and preparations were then incubated at 37 °C for 30 min in a 95 % O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at saturating humidity to solidify the matrix. Embedded utricular explants were then cultivated in Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 2% N-2 (Life Technologies, Carlsbad, California). Explants were maintained at 37 °C under a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Half of the culture medium was renewed 3 times per week. After a few days *in vitro* (DIV), utricular structures sealed themselves, enclosing some fluid. The sealed utricular explant was called a "cyst".

### 2.3. Electrophysiological recordings

Ion-sensitive microelectrodes were used to record the K<sup>+</sup> concentration in the endolymphatic compartment of "cysts". Borosilicate glass capillaries with filament (1B100F-4; WPI, Sarasota, FL, USA) were melted and pulled using a vertical electrode puller (PUL-100 Microprocessor-controlled micropipette Puller, WPI, Sarasota, FL, USA) and baked at 200 °C for 2 h. The inside of the microelectrode was silanized with dichlorodimethylsilane vapors (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 5 min at 100 °C. Microelectrodes were then baked once again for 4 h at 200 °C to eliminate all traces of moisture. The microelectrode tip was backfilled with a short column of membrane liquid K<sup>+</sup> ion exchanger (Potassium Ionophore I – Cocktail B, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), and the barrel was filled with 150 mM KCl. Microelectrodes with impedances of less than 70 MΩ or greater than 200 MΩ were discarded. Microelectrodes with satisfying impedances were connected to the input of a differential electrometer amplifier (HiZ-223 Warner Instruments, Hamden, USA). The electrical circuit was closed when the reference electrode was immersed in the calibrating solutions or culture medium. The electrical signal was monitored using a data-acquisition system (Pulse® software and a 3160-A-022 analyzer, Brüel & Kjær, Nærum, Denmark) connected to the amplifier output. Before recording the K<sup>+</sup> concentration of each sample, the microelectrode was calibrated with KCl solutions at the following concentrations: 150, 100, 75, 50, 20 and 10 mM. Each of these solutions was supplemented with the appropriate amount of NaCl to provide a final cation concentration of 150 mM. Just after the end of

exposure, cysts were taken off the vials and placed on the microscope stage to measure the  $K^+$  concentration. Cysts were covered with some culture medium taken from the exposure vial, which contained a known  $K^+$  concentration (4.15 mM KCl, DMEM-F12, Thermo Fisher Scientific). The  $K^+$  measurement in the culture medium was used as a control recording. The ion-sensitive microelectrode was then inserted into the endolymphatic compartment of the “cyst” under the light microscope. After microelectrode insertion, the electrical signal took a few seconds to stabilize. Once stabilized, the voltage was registered. The total duration of the cyst measurement never exceeded 30 s (Fig. 1). The  $K^+$  concentration was inferred using the calibration curve established previously. Deflated cysts were excluded from the study.

#### 2.4. Aromatic solvent exposure

Toluene (99.9 %) and *o*-xylene (99.5 %) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), and ethylbenzene (99.8 %), *p*-xylene (99 %), *m*-xylene ( $\geq 99$  %) and styrene (99.9 %) from Acros Organics (Illkirch, France). The solvent was mixed with culture medium (DMEM-F12, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a volumetric flask to obtain a final concentration of 0.75 mM. This concentration was selected based on the results of the tests carried out in a previous publication (Tallandier et al., 2020). The same method was used to prepare the different stock solutions (0.25, 0.5 and 0.75 mM) for *o*-xylene, ethylbenzene and styrene exposures. Then, the solvent-enriched medium was supplemented with N-2 (2%, v/v) before pouring into glass headspace vials (8 mL), in which the “cyst” was placed. The vial was immediately sealed with a Teflon-faced butyl rubber septum and an aluminum crimp cap to minimize solvent evaporation. Vials were completely filled to avoid gas-phase solvent stagnation. “Cysts” were cultured in these conditions for 2 h or 72 h, to observe acute and cytotoxic effects of solvents respectively, and  $K^+$  concentrations were measured at 7 DIV. Exposures were performed at 7 DIV for the 2-h exposures. For the 72-h exposures, “cysts” were cultured in solvent-enriched medium from the 4th to the 7th DIV. Control “cysts”

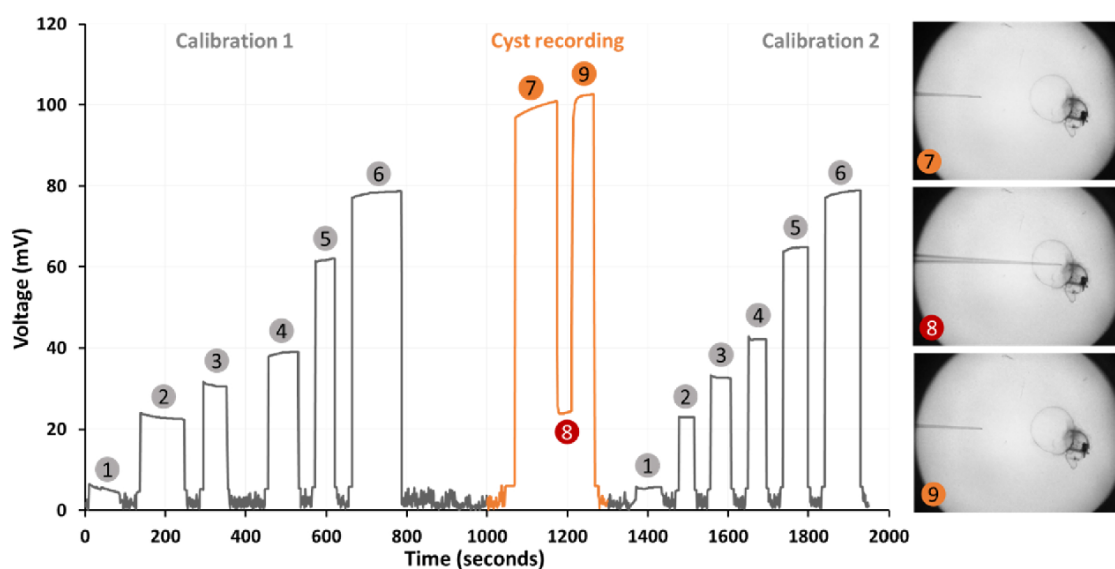
were placed in vials filled with solvent-free medium for 2 h or 72 h.

#### 2.5. Preparation of tissue sections for light microscopy

Just after  $K^+$  measurement, “cysts” were immersed in a fixative solution (glutaraldehyde 2.5 % in 0.2 M cacodylate buffer) for 24 h. After rinsing with 0.2 M cacodylate buffer, samples were post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1 h. Samples were dehydrated in graded concentrations of ethanol up to 100 %. “Cysts” were then soaked in incremental 50 % / 50 % and 75 % / 25 % resin / propylene oxide solutions before embedding them in pure epoxy resin. After polymerization at 60 °C for 24 h, transversal semi-thin sections (2.5  $\mu$ m) were cut with a microtome (Leica, UC7) and stained with toluidine blue (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Observations were performed under an optical microscope (BX41, Olympus, Tokyo, Japan).

#### 2.6. Immunohistochemical analysis of cleaved caspase-3

“Cysts” were fixed in 4% formaldehyde (pH 6.9) for 24 h. Samples were then rinsed in Phosphate-Buffered Saline (PBS) and dehydrated in graded ethanol concentrations up to 100 % before embedding in paraffin. Embedded cysts were cut into 4- $\mu$ m transversal sections with a microtome (Microm, HM 340E). Sections were dipped in xylene to remove paraffin and rehydrated using a decreasing ethanol gradient. Heat-induced antigen retrieval was conducted with 10 mM citrate buffer (pH 6) for 5 min. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3%  $H_2O_2$  for 5 min, and non-specific sites were blocked with 10 % of normal goat serum for 1 h at room temperature. Sections were then incubated with rabbit primary monoclonal antibody directed against cleaved caspase 3 (dilution 1/800, Cell Signaling, MA, USA) overnight at 4 °C. Experimental controls were not exposed to a primary antibody. Sections were then rinsed in TBST-1X and incubated with the peroxidase-containing detection reagent enzyme (SignalStain® Boost Detection Reagent, Cell Signaling) at room temperature for 30 min. Samples were incubated with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) to observe specific



**Fig. 1.** Example of time course of a  $K^+$ -ion sensitive microelectrode recording before, during and following penetration of cyst. A 7-DIV control cyst was used to represent the measurement progress over time. The y-axis represents the voltage read by the differential amplifier (mV) and the x-axis represents the time (seconds). The values 1 to 6 represent the microelectrode calibration with 6 different KCl solutions: 150 (1); 100 (2); 75 (3); 50 (4); 20 (5) and 10 mM (6). The voltage was recorded in the culture medium before (7) and after (9) the impalement of cyst (8). The electrical potential change was immediate once the microelectrode tip penetrated inside the lumen of cyst (8). The stabilization of the electrical signal took about 5 to 10 s. The voltage was then manually registered. The duration of the cyst measurement never exceeded 30 s. Once the microelectrode was removed from the cyst lumen, the electrical potential (9) jumped back up to its initial level (7). The  $K^+$  concentration was inferred using the average calibration obtained from the two calibrations performed before and after cyst measurement.

antibody localization, and counterstained with Mayer Haemalum. Finally, sections were mounted and observed under an optical microscope (BX41, Olympus, Tokyo, Japan).

### 2.7. Statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). One-way ANOVAs were performed to analyze differences between experimental and control groups. Statistical results were expressed as follows:  $F(\text{dfb}, \text{dfr}) = F\text{-ratio}$ ;  $p = p$  value, where  $\text{dfb}$  is the number of degrees of freedom between groups, and  $\text{dfr}$  is the number of residual degrees of freedom. Dunnett's post-hoc tests were used to compare variations between pairs of experimental groups. The threshold for statistical significance was set at  $p = 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Aromatic solvents have distinct effects on endolymphatic $K^+$ concentration

To assess the effects of different aromatic solvents on  $K^+$  concentration in the endolymphatic compartment, "cysts" were exposed to the same concentration (0.75 mM) of *o*-xylene, *m*-xylene, *p*-xylene, toluene, ethylbenzene, or styrene for 2 h or 72 h (Fig. 2). In these experiments, the 2-h solvent exposure had a significant [ $F(6, 75) = 3.285$ ;  $p < 0.01$ ] effect on the  $K^+$  concentration. However, only styrene, which induced a 33 % reduction, significantly decreased the  $K^+$  concentration (exposed group:  $53.1 \pm 6.9$  mM vs. control group:  $79.5 \pm 3.7$  mM;  $p = 0.001$ ) (Fig. 2.A). In the 72-h exposure condition, significant differences were found between groups [ $F(6, 87) = 13.46$ ;  $p < 0.001$ ]. *O*-xylene caused the most extensive decline in  $K^+$  concentration, with a 76 % reduction ( $18.6 \pm 5.0$  mM;  $p < 0.001$ ) compared to the control group ( $79.2 \pm 4.1$  mM). Smaller decreases (-33 % and -25 %, respectively, relative to controls) were measured following exposure to ethylbenzene ( $52.5 \pm 5.9$  mM;  $p < 0.002$ ) and styrene ( $59.1 \pm 4.9$  mM;  $p = 0.014$ ). No

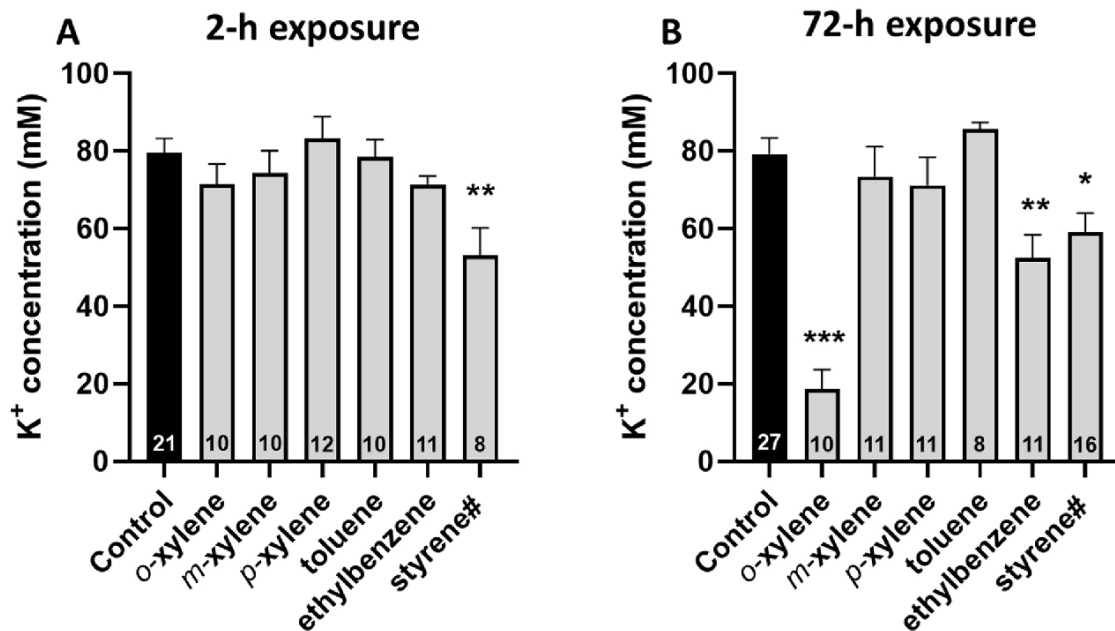
significant variations in  $K^+$  concentration were measured following exposure to *p*-xylene ( $73.4 \pm 7.8$  mM), *m*-xylene ( $71.2 \pm 7.2$  mM), or toluene ( $85.8 \pm 1.6$  mM) (Fig. 2.B).

Given the potent effects of *o*-xylene and ethylbenzene on the  $K^+$  concentrations, "cysts" were exposed for 72 h to intermediate *o*-xylene and ethylbenzene concentrations (0.25 and 0.5 mM) in order to better understand the progression of the toxicity with increasing doses of solvents (Fig. 3.A,B). These dose-effect relationships were compared to that of our positive control (Tallandier et al., 2020), styrene (Fig. 3.C). Dose-dependent decreases in  $K^+$  concentration were measured after *o*-xylene [ $F(3, 49) = 19.02$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 3.A], ethylbenzene [ $F(3, 49) = 5.94$ ;  $p = 0.001$ ; Fig. 3.B] and styrene [ $F(3, 46) = 4.38$ ;  $p = 0.008$ ; Fig. 3.C] exposures. The lowest concentration of *o*-xylene and ethylbenzene leading to a significant decrease of the  $K^+$  concentration was 0.5 mM, with 40 % ( $p = 0.002$ ) and 28 % ( $p = 0.023$ ) decreases compared to controls, respectively (control:  $79.2 \pm 4.1$  mM; *o*-xylene:  $47.6 \pm 11.3$  mM; ethylbenzene:  $56.9 \pm 8.1$  mM). By contrast, the decrease of  $K^+$  concentration caused by the exposure to 0.5-mM styrene was not significant (from control level  $80.5 \pm 4.4$  mM to  $65.0 \pm 4.3$  mM;  $p = 0.068$ ; Fig. 3.C).

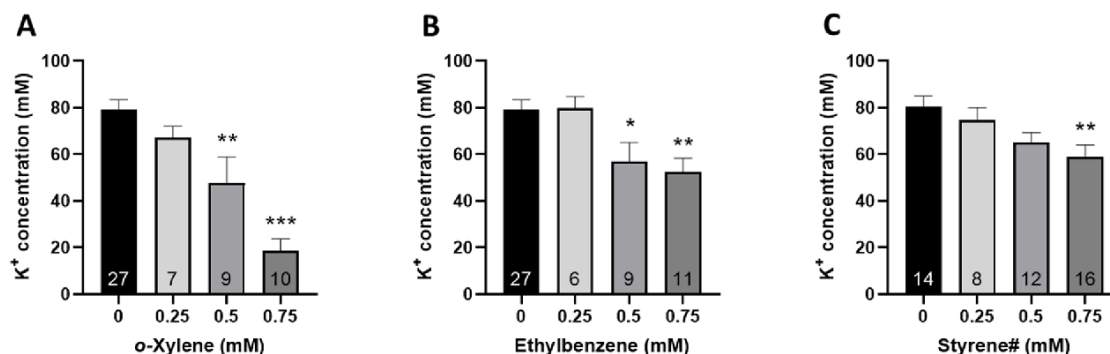
### 3.2. Only *o*-xylene and styrene induce histological defects

The gross morphologies of control 7-DIV cysts and cysts exposed to aromatic solvents (0.75 mM) for 72 h were observed under light microscopy (Figs. 4 and 5). In control samples, the sensory epithelium displayed healthy-looking type I and II hair cells, with an intact cell membrane and ciliary bundle on their apical surface, as well as a normal nucleus and cytoplasm. Supporting cells were intercalated between hair cells and their nucleus was localized at the basal surface. The secretory area, composed of cuboidal dark cells and transitional cells, was characterized by darker cytoplasm compared to hair cells when stained with toluidine blue. Connective tissue could be observed under both sensory and secretory epithelia (Fig. 4 et 5).

"Cysts" exposed to 0.75 mM toluene, *m*-xylene and *p*-xylene



**Fig. 2.** Aromatic solvents alter endolymphatic  $K^+$  concentrations in "cysts": "Cysts" were obtained from newborn rats (P0-P4) and  $K^+$  concentrations were measured at 7 DIV. Utricle explants were exposed to 0.75 mM *o*-xylene, *m*-xylene, *p*-xylene, toluene, or ethylbenzene for 2 h (A) or 72 h (B). Control "cysts" were maintained in sealed vials for 2 or 72 h. Each histogram represents the mean  $\pm$  SEM, the number corresponds to the number of samples used in each experiment. Asterisks highlight significant differences between solvent-exposed and control data (post-hoc Dunnett: \*\*\* $p < 0.001$ ). #: styrene data were previously published in Tallandier et al. (2020). Experiments involving styrene were performed in the same conditions as the other treatments.



**Fig. 3.** *o*-Xylene, ethylbenzene and styrene cause a dose-dependent decrease of endolymphatic K<sup>+</sup> concentration in “cysts”: “Cysts” were obtained from newborn rats (P2-P4) and K<sup>+</sup> concentrations were measured at 7 DIV. Utricle explants were exposed for 72 h to increasing concentrations (0.25; 0.5 and 0.75 mM) of *o*-xylene (A), ethylbenzene (B) or styrene (C). Control samples were maintained in sealed vials without solvents for 72 h. Each histogram represents the mean ± SEM and the number of samples used in each experiment is indicated at the bottom of each bar of the histogram. Asterisks highlight significant differences between solvent-exposed and control data (Dunnett’s post-hoc test: \*p < 0.05; \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001). #: styrene data were previously published in Tallandier et al. (2020). Experiments involving styrene were performed in the same conditions and as the other treatments.

displayed normal cells in both epithelia and connective tissue (Fig. 4). Histological features were identical to untreated “cysts”. Even though “cysts” exposed to 0.75 mM ethylbenzene for 72 h displayed a significant drop in K<sup>+</sup> concentration (Fig. 2), no sign of cellular stress was observed in these samples. As reported in Tallandier et al. (2020), exposure to 0.75 mM styrene for 72 h provoked the formation of cytoplasmic vacuoles in all epithelial cell types, but no other obvious features of cell injury were noted in these conditions. Conversely, numerous pathological features, such as swollen and condensed nuclei, low-density cytoplasm, and cellular extrusions through the cuticular plate were observed in histological sections of “cysts” exposed to *o*-xylene. These features indicate damage to cells in both sensory and secretory areas. Despite this damage to both the sensory and the secretory epithelium, stereocilia were still present (Fig. 5).

Apoptotic processes were studied by the means of the immunohistochemical staining of cleaved caspase-3 on paraffin sections of cysts exposed to the different solvents for 72 h. Whatever the solvent considered, sections of exposed cysts revealed no positive staining (data not shown), suggesting that the majority of cell death occurred by a non-apoptotic mechanism.

#### 4. Discussion

This study compared the vestibulotoxic effects of six aromatic solvents - chosen for their well-known cochleotoxic properties - using an *in vitro* model (Bartolami et al., 2011; Gaboyard et al., 2005; Gagnaire and Langlais, 2005). The “cyst” model can be used to assess both functional and morphological consequences of exposure to aromatic solvents on the vestibular receptor. Tests involved measuring variations in the endolymphatic K<sup>+</sup> concentration using an electrochemical technique, and performing histological analyses of the vestibular epithelium.

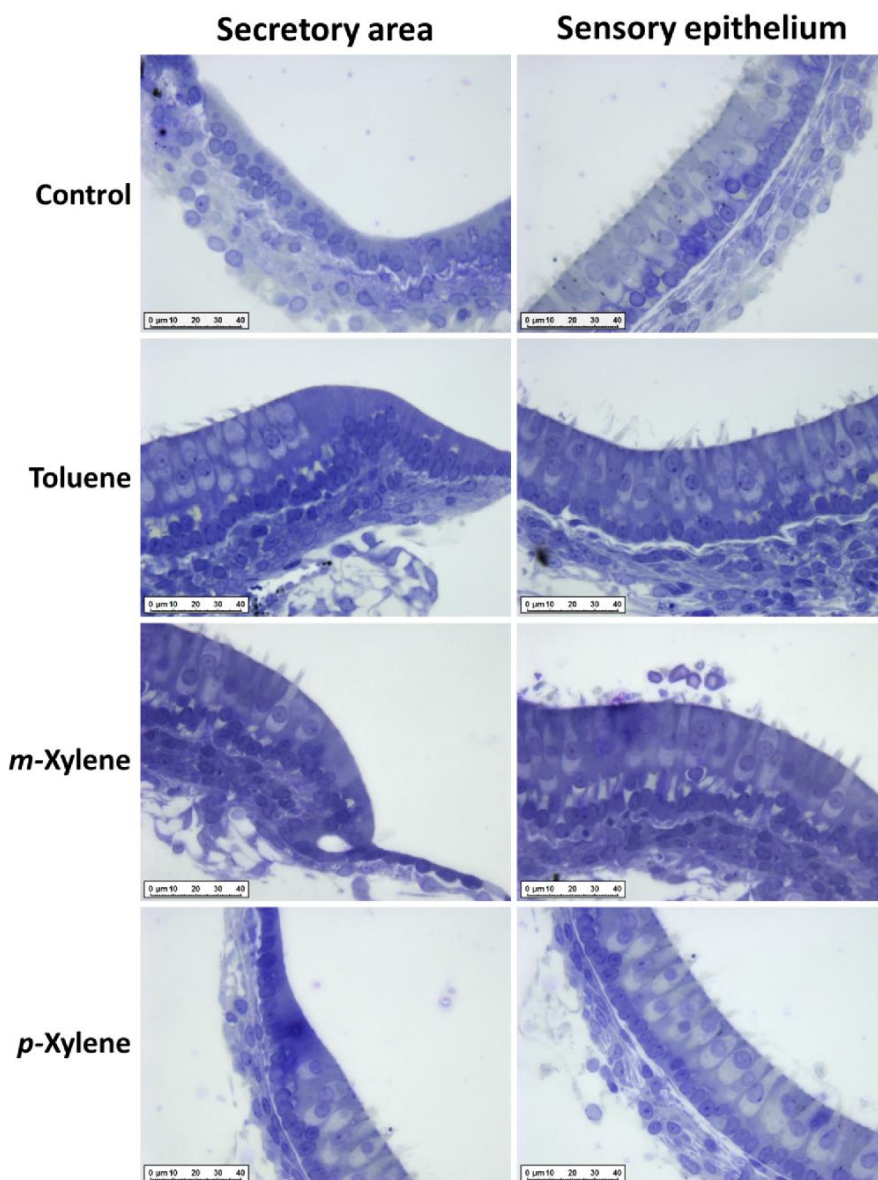
To evaluate and compare the vestibulotoxic potential of aromatic solvents, “cysts” were exposed to the same concentration (0.75 mM) of styrene, ethylbenzene, toluene, *p*-xylene, *m*-xylene, or *o*-xylene for either 2 h or 72 h. The exposure durations were initially chosen as they distinguished pharmacological and cytotoxic effects induced by styrene (Tallandier et al., 2020). The concentration was chosen because this previous study showed that both 2-h and 72-h exposures to 0.75 mM styrene caused a decrease of K<sup>+</sup> concentration with no sign of cell death in secretory or sensory epithelia. However, cytoplasmic vacuoles were visible in secretory and sensory cells after just 2 h exposure to styrene (0.75 mM). Even if vacuolization is not a sign of dying cells *per se*, it can be an early symptom of cellular stress caused by the action of a cytotoxic inducer (Shubin et al., 2016), and might thus ultimately lead to cell

death. With regard to cell death, the results presented here showed that death mainly occurs by a non-apoptotic pathway, as no immunohistochemical staining of cleaved caspase-3 was detected in “cysts” for any of the solvents studied. This result is in accordance with those obtained by Diodovich et al. (2006, 2004), who exposed human hepatocytes and human cord blood cells to styrene at comparable concentrations and for similar durations. They reported that exposure to styrene at 0.5, 0.8 or 1 mM for 24 h or 72 h did not induce apoptotic pathways, but mainly elicited necrosis.

In addition, numerous studies have demonstrated that aromatic solvents can modulate ion channels, such as the acetylcholine and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor or the Na/K-ATPase (Bale et al., 2005; Calderón-Guzmán et al., 2005; Cruz et al., 2000; Vaalavirta and Tähti, 1995a). The variations of K<sup>+</sup> concentration measured after 2-h styrene exposure might therefore be the result of both a pharmacological modulation of ion channels and a toxic effect on other targets.

Unlike styrene, the other solvents tested in the present study did not induce changes in the K<sup>+</sup> concentration after 2 h exposure. However, we observed 78 % and 37 % decreases in the K<sup>+</sup> concentration for *o*-xylene and ethylbenzene, respectively, after 72 h exposure to 0.75 mM. For comparison, exposure to styrene for 72 h resulted in a 28 % drop in K<sup>+</sup> concentration. In contrast, the other three aromatic solvents – toluene, *p*-xylene and *m*-xylene – had no measurable effect on the K<sup>+</sup> concentration even after 72 h (Fig. 2). A dose-dependent decrease of endolymphatic K<sup>+</sup> concentration was measured in “cysts” exposed to *o*-xylene, ethylbenzene and styrene for 72 h (Fig. 3). Our findings indicate that *o*-xylene and ethylbenzene decrease K<sup>+</sup> concentration at 0.5 mM and above after 72-h exposure. However, for styrene, the decrease of K<sup>+</sup> concentration was only significant from 0.75 mM. These results allow us to evaluate and compare the toxicity level on the vestibular receptor of these aromatic solvents. Based on the K<sup>+</sup> concentration variation, a ranking of aromatic solvent according to their degree of toxicity may be proposed: *o*-xylene > ethylbenzene > styrene. The histological results presented in Figs. 4 and 5 show that only the solvent with the strongest effect on K<sup>+</sup> concentrations, *o*-xylene, induced obvious cell death in the vestibular secretory and sensory epithelia. Pathological features included low-density cytoplasm, cellular extrusions from cuticular plate, and morphological changes to the nucleus (condensed and swollen). These features are most likely indicative of irreversible damage.

Comparison between electrophysiological and histological data suggests that K<sup>+</sup> concentration (after 72 h exposure) is a more sensitive endpoint than tissue histology when assessing the toxicity of aromatic solvents. Indeed, no sign of histological injury was visible after exposure to ethylbenzene, and only discreet signs were detected after exposure to



**Fig. 4.** Lack of histological impact on “cysts” exposed to toluene, *m*-xylene, or *p*-xylene for 72 h. “Cysts” (7 DIV) obtained from P2-P4 newborn rats were observed under a light microscope after 72-h exposure to toluene, *m*-xylene, or *p*-xylene at 0.75 mM. Left panels show part of the secretory area, whereas right panels show part of the sensory epithelium. No distinguishing histopathological features were observed after exposure to toluene, *m*-xylene, or *p*-xylene exposure. Scale bar = 40  $\mu$ m.

styrene for 72 h, while these solvents decreased the  $K^+$  concentrations by 37 and 28 %, respectively. Interestingly, in Tallandier et al. (2020), “cysts” exposed to 1 mM styrene displayed the same histological damage and impact on  $K^+$  levels as those exposed to 0.75 mM *o*-xylene here, with an exposure duration of 72 h in both cases. In summary, the “cyst” model provides a graded and selective response reflecting the vestibulotoxicity of aromatic solvents.

Thus, the  $K^+$  measurements in “cysts” suggest that half of the six solvents tested could have vestibulotoxic properties. If we classify these aromatic solvents according to their vestibulotoxic potency, the following ranking is obtained: *o*-xylene is highly vestibulotoxic, styrene and ethylbenzene have moderate vestibulotoxic effects, and finally toluene, *p*-xylene and *m*-xylene are not vestibulotoxic (Table 1). As for cochleotoxicity, vestibulotoxicity is closely linked to the chemical formula of the aromatic solvent considered. However, based on our data we were unable to infer a possible mechanism. Nevertheless, we can attempt to relate the toxic effect to chemical properties of the different

solvent species tested here. Aromatic solvents have been demonstrated to decrease Na/K-ATPase activities in primary cultures of rat astrocytes in a dose-dependent manner, and this effect was linked to their lipophilic properties (Vaalavirta and Tähti, 1995b). However, the data presented here do not support this statement. Indeed, solvents with similar octanol/water partition coefficients ( $\log K_{ow}$ ) had very different effects on  $K^+$  concentrations. For instance, *m*-xylene and *p*-xylene did not affect  $K^+$  concentration, whereas *o*-xylene and ethylbenzene strongly reduced it (Table 1). Consequently, the lipophilic properties of the solvents cannot explain the extent of their vestibulotoxic effects.

An alternative possibility is that differences in the chemical structure of solvents, and in particular steric hindrance, could explain the differences in toxicity observed. For instance, the number of carbons on the side chain of the aromatic ring could play a role in the vestibulotoxic process. Indeed, ethylbenzene and styrene each have two carbons on their side chains, and generated significant variations in the  $K^+$  concentration in the endolymph. To further study the link between the



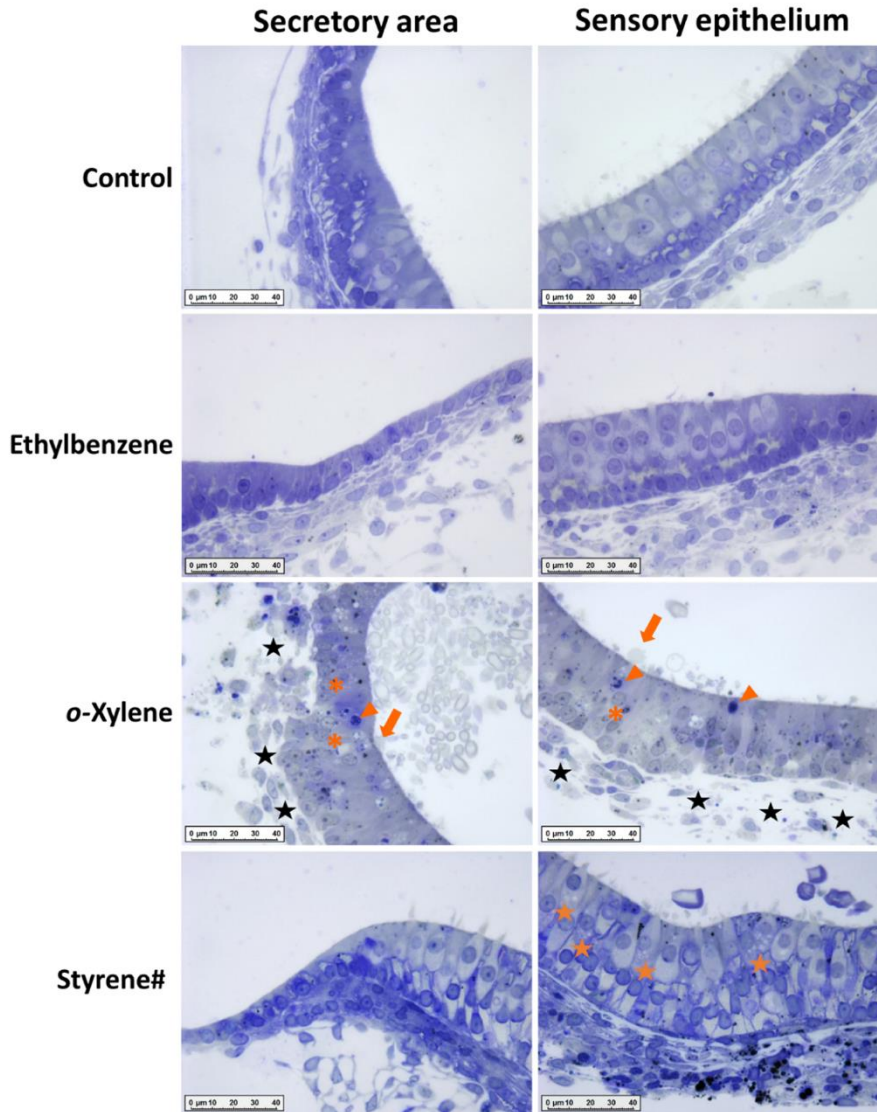


Fig. 5. Deleterious histological impact of 72 h exposure to *o*-xylene and styrene, but not ethylbenzene on “cysts”. Cysts (7 DIV) obtained from P2-P4 newborn rats were observed under light microscopy after 72-h exposure to ethylbenzene, *o*-xylene or styrene at 0.75 mM. Images of cysts exposed to styrene (#) for 72 h were previously published in Tallandier et al. (2020). Left panels display part of the secretory area, whereas right panels show part of the sensory epithelium. Major damage (swollen and condensed nuclei, low-density cytoplasm and cellular extrusions) was observed in “cysts” exposed to *o*-xylene; styrene-exposed “cysts” contained cytoplasmic vacuoles but no other visible cellular damage. Extrusions are indicated by arrows, condensed nuclei by arrowheads, swollen nuclei by asterisks, cytoplasmic vacuoles by orange stars, and damaged connective tissue by black stars. Scale bar =40  $\mu$ m.

Table 1  
Comparison between cochleotoxic and vestibulotoxic effects for each aromatic solvent.

Aromatic solvent	Vestibulotoxicity ( $K^+$ variation)	Vestibulotoxicity (cellular damage)	Cochleotoxicity (hair cell loss)	Lipophilicity ( $\log K_{ow}$ )	Structure
<i>o</i> -xylene	++	++	-	3.12	<chem>Cc1cc(C)cc1</chem>
styrene	+	+	++	2.95	<chem>C=Cc1ccccc1</chem>
ethylbenzene	+	-	++	3.15	<chem>CCc1ccccc1</chem>
toluene	-	-	+	2.73	<chem>Cc1ccccc1</chem>
<i>p</i> -xylene	-	-	+	3.15	<chem>Cc1ccc(C)cc1</chem>
<i>m</i> -xylene	-	-	-	3.2	<chem>Cc1cc(C)cc1</chem>

chemical structure of the solvent studied and its toxicity in the “cyst” model, it would be interesting to test other molecules, for example molecules with more carbon atoms in their side chains, such as with studies modelled on the comparison made by Gagnaire and Langlais (2005) in their *in vivo* study of the cochleotoxicity of 21 aromatic solvents.

Furthermore, with regard to the xylene isomers, the position of the two-methyl groups on the benzene ring appears to play a determinant role. The *in vivo* study of the cochleotoxicity of xylenes led to similar structure-function hypotheses (Gagnaire et al., 2001, 2007a, 2007b; Gagnaire and Langlais, 2005; Maguin et al., 2006). However, the results of these previous studies showed that *p*-xylene is more cochleotoxic than the *o*-xylene, which contrasts with the *in vitro* results presented here. Obviously, this apparent discrepancy could be explained by multiple factors, and it is inherently difficult to draw parallels between *in vitro* vestibulotoxicity and *in vivo* cochleotoxicity.

Similarly, studies of the ototoxicity of aminoglycosides, which are hydrophilic compounds, also noted discrepancies between vestibulotoxicity and cochleotoxicity (Freeman et al., 2001; Kitasato et al., 1990; Nakashima et al., 2000). Thus, susceptibility would rather depend on the selective sensitivity of cochlear and vestibular cells, than on the route of intoxication within the inner ear.

Structure and lipophilicity (octanol / water partition coefficient) of each solvent tested in this study. Cochleotoxic properties of each solvent were taken from Gagnaire and Langlais (2005), and vestibulotoxic effects ( $K^+$  variation and cellular damage) correspond to results from the present study. The strength of the effects are classified as follows: “++” for strongly, “+” for moderate or “-” for non-active.

## 5. Conclusion

To our knowledge, this is the first study to focus on the impact of aromatic solvents on the vestibular receptor. Indeed, previous studies examining the effects of solvents on the vestibular system could not discriminate between central and peripheral effects. “Cysts” can be used to measure the endolymphatic  $K^+$  concentration, which reflects the functionality of vestibular cells. In addition, variations in  $K^+$  concentrations appear to be an earlier indicator than histological damage. Among the aromatic solvents tested in this study, the “cyst” model ranked the strength of the vestibulotoxicity as follows: *o*-xylene appears to be the most vestibulotoxic, whereas styrene and ethylbenzene are moderately vestibulotoxic, and toluene, *p*-xylene and *m*-xylene have no effect. It seems that molecular structure determines vestibulotoxicity. These first results encourage us to extend our study to other solvents with more complex structures, to establish the link between chemical structure and toxicity, and to undertake chronic *in vivo* studies to validate the predictive value of the “cyst” model.

## Author contributions

VT, PC, MC and BP conceived and designed experiments. VT and LM performed cysts culture, aromatic solvent exposition and electrophysiological recordings. AT and SB performed histological analysis. VT realized data acquisition and analyses. VT drafted the manuscript. BP, MC and PC revised the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript for submission.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Laurine Douteau and Marie-Joseph

Décret for their help with animal husbandry, Aurélie Remy for statistical analysis and Thomas Venet for his invaluable knowledge on the acquisition of electrophysiological data.

## References

- Bale, A.S., Meacham, C.A., Benignus, V.A., Bushnell, P.J., Shafer, T.J., 2005. Volatile organic compounds inhibit human and rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205, 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.011>.
- Bartolami, S., Gaboyard, S., Quentin, J., Travo, C., Cavalier, M., Barhanin, J., Chabbert, C., 2011. Critical roles of transitional cells and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase in the formation of vestibular endolymph. *J. Neurosci.* 31, 16541–16549. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2430-11.2011>.
- Calabrese, G., Martini, A., Sessa, G., Cellini, M., Bartolucci, G.B., Marcuzzo, G., De Rosa, E., 1996. Otoneurological study in workers exposed to styrene in the fiberglass industry. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 68, 219–223.
- Calderón-Guzmán, D., Hernández-Islas, J.L., Espitia Vázquez, I.R., Barragán-Mejía, G., Hernández-García, E., Del Angel, D.S., Juárez-Olguín, H., 2005. Effect of toluene and cresols on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, and serotonin in rat brain. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 41, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2004.09.005>.
- Campo, P., Maguin, K., 2007. Solvent-induced hearing loss: mechanisms and prevention strategy. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 20, 265–270. <https://doi.org/10.2478/v10001-007-0031-3>.
- Campo, P., Loquet, G., Blachère, V., Roure, M., 1999. Toluene and styrene intoxication route in the rat cochlea. *Neurotoxicol. Teratol.* 21, 427–434.
- Campo, P., Lataye, R., Loquet, G., Bonnet, P., 2001. Styrene-induced hearing loss: a membrane insult. *Hear. Res.* 154, 170–180.
- Cappaert, N.L., Klis, S.F., Baretta, A.B., Muijser, H., Smoorenburg, G.F., 2000. Ethyl benzene-induced ototoxicity in rats: a dose-dependent mid-frequency hearing loss. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 1, 292–299. <https://doi.org/10.1007/s101620010050>.
- Chen, G.-D., Chi, L.-H., Kostyniak, P.J., Henderson, D., 2007. Styrene induced alterations in biomarkers of exposure and effects in the cochlea: mechanisms of hearing loss. *Toxicol. Sci.* 98, 167–177. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm078>.
- Ciunan, R.R., 2009. Stria vascularis and vestibular dark cells: characterisation of main structures responsible for inner-ear homeostasis, and their pathophysiological relations. *J. Laryngol. Otol.* 123, 151. <https://doi.org/10.1017/S0022215108002624>.
- 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. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703666>.
- Diek, F.D., 2006. Solvent neurotoxicity. *Occup. Environ. Med.* 63, 221–226. <https://doi.org/10.1136/oem.2005.022400>, 179.
- Diodovich, C., Bianchi, M.G., Bowe, G., Acquati, F., Taramelli, R., Parent-Massin, D., Gribaldo, L., 2004. Response of human cord blood cells to styrene exposure: evaluation of its effects on apoptosis and gene expression by genomic technology. *Toxicology* 200, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.03.021>.
- Diodovich, C., Urani, C., Maurici, D., Malerba, I., Melchiorretto, P., Orlandi, M., Zoia, L., Campi, V., Carfi, M., Pellizzer, C., Gribaldo, L., 2006. Modulation of different stress pathways after styrene and styrene-7,8-oxide exposure in HepG2 cell line and normal human hepatocytes. *J. Appl. Toxicol.* 26, 317–325. <https://doi.org/10.1002/jat.1142>.
- Fetoni, A.R., Rolesi, R., Paciello, F., Eramo, S.L.M., Grassi, C., Troiani, D., Paludetti, G., 2016. Styrene enhances the noise induced oxidative stress in the cochlea and affects differently mechanosensory and supporting cells. *Free Radic. Biol. Med.* 101, 211–225. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.014>.
- Freeman, S., Priner, R., Elidan, J., Sohmer, H., 2001. Objective method for differentiating between drug-induced vestibulotoxicity and cochleotoxicity. *Otol. Neurotol.* 22, 70–75. <https://doi.org/10.1097/00129492-200101000-00014>.
- Gaboyard, S., Chabbert, C., Travo, C., Bancel, F., Lehouelleur, J., Yamauchi, D., Marcus, D.C., Sans, A., 2005. Three-dimensional culture of newborn rat utricle using an extracellular matrix promotes formation of a cyst. *Neuroscience* 133, 253–265. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.02.011>.
- Gagnaire, F., Langlais, C., 2005. Relative ototoxicity of 21 aromatic solvents. *Arch. Toxicol.* 79, 346–354. <https://doi.org/10.1007/s00204-004-0636-2>.
- Gagnaire, F., Marignac, B., Langlais, C., Bonnet, P., 2001. Ototoxicity in rats exposed to ortho-, meta- and para-xylene vapours for 13 weeks. *Pharmacol. Toxicol.* 89, 6–14. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2001.d01-129.x>.
- Gagnaire, François, Langlais, C., Grossmann, S., Wild, P., 2007a. Ototoxicity in rats exposed to ethylbenzene and to two technical xylene vapours for 13 weeks. *Arch. Toxicol.* 81, 127–143. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0124-y>.
- Gagnaire, F., Marignac, B., Blachère, V., Grossmann, S., Langlais, C., 2007b. The role of toxicokinetics in xylene-induced ototoxicity in the rat and guinea pig. *Toxicology* 231, 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.075>.
- Gans, R.E., Rauterkus, G., Research Associate, I., 2019. Vestibular toxicity: causes, evaluation protocols, intervention, and management. *Semin. Hear.* 40, 144–153. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1684043>.
- Hibino, H., Kurachi, Y., 2006. Molecular and physiological bases of the  $K^+$  circulation in the mammalian inner ear. *Physiology* 21, 336–345. <https://doi.org/10.1152/physiol.00023.2006>.
- Hibino, H., Nin, F., Tsuzuki, C., Kurachi, Y., 2010. How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflügers Arch.* 459, 521–533. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0754-z>.

- Hodgkinson, L., Prasher, D., 2006. Effects of industrial solvents on hearing and balance: a review. *Noise Health* 8, 114–133.
- Kitasato, I., Yokota, M., Inouye, S., Igarashi, M., 1990. Comparative ototoxicity of ribostamycin, dactimicin, dibekacin, kanamycin, amikacin, tobramycin, gentamicin, sisomicin and netilmicin in the inner ear of guinea pigs. *Chemotherapy* 36, 155–168. <https://doi.org/10.1159/000238762>.
- Lang, F., Vallon, V., Knipper, M., Wangemann, P., 2007. Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293, C1187–C1208. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00024.2007>.
- Loquet, G., Campo, P., Lataye, R., 1999. Comparison of toluene-induced and styrene-induced hearing losses. *Neurotoxicol. Teratol.* 21, 689–697.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2006.08.007>.
- Nakashima, T., Teranishi, M., Hibi, T., Kobayashi, M., Umemura, M., 2000. Vestibular and cochlear toxicity of aminoglycosides—a review. *Acta Otolaryngol.* 120, 904–911. <https://doi.org/10.1080/00016480050218627>.
- Niklasson, M., Tham, R., Larsby, B., Eriksson, B., 1993. Effects of toluene, styrene, trichloroethylene, and trichloroethane on the vestibulo- and opto-oculo motor system in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 15, 327–334.
- Shubin, A.V., Demidyuk, I.V., Komissarov, A.A., Rafieva, L.M., Kostrov, S.V., 2016. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget* 7, 55863–55889. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10150>.
- Spicer, S.S., Schulte, B.A., 1998. Evidence for a medial K<sup>+</sup> recycling pathway from inner hair cells. *Hear. Res.* 118, 1–12.
- Sułkowski, W.J., Kowalska, S., Matyja, W., Guzek, W., Wesolowski, W., Szymczak, W., Kostrzewski, P., 2002. Effects of occupational exposure to a mixture of solvents on the inner ear: a field study. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 15, 247–256.
- Tallandier, V., Merlen, L., Boucard, S., Thomas, A., Venet, T., Chalansonnet, M., Gauchard, G., Campo, P., Pouyatos, B., 2020. Styrene alters potassium endolymphatic concentration in a model of cultured utricle explants. *Toxicol. Vitr.* <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104915>, 104915.
- Tham, R., Larsby, B., Eriksson, B., Niklasson, M., 1990. The effect of toluene on the vestibulo- and opto-oculomotor system in rats, pretreated with GABAergic drugs. *Neurotoxicol. Teratol.* 12, 307–311. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(90\)90048-h](https://doi.org/10.1016/0892-0362(90)90048-h).
- Unlu, I., Kesici, G.G., Basturk, A., Kos, M., Yilmaz, O.H., 2014. A comparison of the effects of solvent and noise exposure on hearing, together and separately. *Noise Health* 16, 410–415. <https://doi.org/10.4103/1463-1741.144422>.
- Vaalavirta, L., Tähti, H., 1995a. Effects of selected organic solvents on the astrocyte membrane ATPase in vitro. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22, 293–294. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1995.tb01999.x>.
- Vaalavirta, L., Tähti, H., 1995b. Astrocyte membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase and Mg<sup>(2+)</sup>-ATPase as targets of organic solvent impact. *Life Sci.* 57, 2223–2230. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)02214-4](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02214-4).
- Vyskocil, A., Truchon, G., Leroux, T., Lemay, F., Gagnon, F., Majidi, N.E., Boudjerida, A., Lim, S., Emond, C., Viau, C., 2012. A weight of evidence approach for the assessment of the ototoxic potential of industrial chemicals. *Toxicol. Ind. Health* 28, 796–819. <https://doi.org/10.1177/0748233711425067>.

## RESUME

Les solvants aromatiques (SA) sont des produits chimiques très utilisés dans les secteurs industriels. Certains solvants peuvent engendrer des troubles de l'équilibre qui pourraient être à l'origine de chutes et d'accidents professionnels. Il est bien établi que les SA endommagent les cellules cochléaires mais leurs effets sur le récepteur vestibulaire, qui partage une homologie structurale avec la cochlée, restent à ce jour inconnus. Cette thèse a donc pour objectif d'évaluer la vestibulotoxicité de différents solvants aromatiques présents dans l'industrie à l'aide d'un modèle *in vitro*. Pour cela, des utricules et des ampoules sont prélevés chez des rats nouveau-nés puis cultivés dans une matrice gélatineuse. Durant la culture, les explants se referment et forment une sphère remplie d'un liquide dont la composition riche en potassium rappelle celle de l'endolymphe. Ces cultures 3D conservent toutes les cellules impliquées dans le cycle du  $K^+$  dont le rôle est déterminant dans la physiologie vestibulaire. La concentration en  $K^+$  est mesurée à l'aide d'une microélectrode remplie d'une membrane échangeuse d'ions avant analyses histologiques. Des agents pharmacologiques tels que l'ouabaïne, la bumétanide, la gentamicine et le gadolinium, capables d'inhiber les transporteurs potassiques impliqués dans le cycle du  $K^+$ , ont permis de valider leur fonctionnalité. Les cultures 3D d'utricule et d'ampoule ont été exposées de manière brève (2 h) ou prolongée (72 h) à différentes concentrations de styrène. Ces deux types d'exposition ont baissé la concentration en  $K^+$  et provoqué des dommages histologiques dans les épithéliums sensoriel et sécréteur. Les variations de la concentration en  $K^+$  semblent être un marqueur de toxicité plus sensible que les dommages histologiques. Ensuite, les potentiels vestibulotoxiques de l'éthylbenzène, du toluène ou des 3 isomères du xylène ont été comparés en exposant les cultures d'utricules à une concentration de 0,75 mM durant 2 h ou 72 h. Parmi les SA testés, seuls l'éthylbenzène et l'*o*-xylène ont entraîné une baisse de la concentration en  $K^+$  suite à l'exposition prolongée, mais seul l'*o*-xylène a provoqué des dommages histologiques. Les analyses immunohistologiques et les dosages d'ATP indiquent que les SA déclenchent un processus nécrotique plutôt qu'apoptotique. Par ailleurs, les résultats laissent supposer que la structure chimique serait un paramètre déterminant dans la toxicité des SA sur ce modèle. En conclusion, les résultats de cette thèse suggèrent que les cultures 3D d'utricules et d'ampoules permettraient de réduire le nombre d'animaux pour cribler les molécules potentiellement vestibulotoxiques, compte tenu des huit épithéliums disponibles dans chaque rat nouveau-né. Ce modèle facilite également l'étude des mécanismes toxiques sur le récepteur vestibulaire.

**Mots-clés :** vestibule, culture tridimensionnelle, potassium, solvants aromatiques

---

## SUMMARY

Aromatic solvents (AS) are chemicals widely used in many industrial sectors. Some solvents can cause balance disturbances, which could be the cause of falls and occupational accidents. It is now well established that AS can damage cochlear cells, but their effects on the vestibular receptor, which shares structural homology with the cochlea, remain unknown. The objective of this thesis is to evaluate the toxicity of various AS on the vestibular receptor using an *in vitro* model. For this, utricles and ampullas are harvested from newborn rats and cultured in a gelatinous matrix. In this environment, the explants close themselves, inflate and ultimately form a sphere filled with a high-potassium endolymph-like fluid. These 3D cultures conserve all the cells involved in the  $K^+$  cycle, the role of which is critical in vestibular physiology. The  $K^+$  concentration is measured using a microelectrode filled with an ion-exchange membrane before performing histological analyses. The functionality of different cell types was validated using pharmacological agents capable of inhibiting potassium transporters involved in the  $K^+$  cycle such as ouabain, bumetanide, gentamicin and gadolinium. The utricule and ampulla cultures were exposed to a range of styrene concentrations for either 2 h or 72 h. These two types of exposure led to a decrease in the  $K^+$  concentration and histological damage in the sensory and secretory epithelia. Changes in  $K^+$  concentration seem to be a more sensitive marker of toxicity than histological damage. Then the vestibulotoxic potentials of ethylbenzene, toluene or each of the three xylene isomers were assessed by exposing the utricule cultures to 0.75 mM for 2 h or 72 h. Among the tested solvents, only ethylbenzene and *o*-xylene caused a decrease in  $K^+$  concentration following prolonged exposure, but only *o*-xylene caused histological damage. Immunohistological analyzes and ATP assays both indicate that AS trigger a necrotic process, rather than an apoptotic sequence. These results show that the chemical structure would be a fundamental parameter in the toxicity of solvents on this model. In conclusion, we suggest that utricule and ampulla cultures could be used to screen many potentially vestibulotoxic molecules rapidly, while using few animals given the eight epithelia available in each newborn rat. This model also facilitates the study of toxic mechanisms on the vestibular receptor.

**Keywords:** vestibule, tridimensional culture, potassium, aromatic solvents.