

scientifique & technique
note
note scientifique
& technique
scientifique
technique

**Effet sur l'audition et l'équilibre
de co-exposition à un bruit
riche en basses fréquences
et au disulfure de carbone (CS₂)**

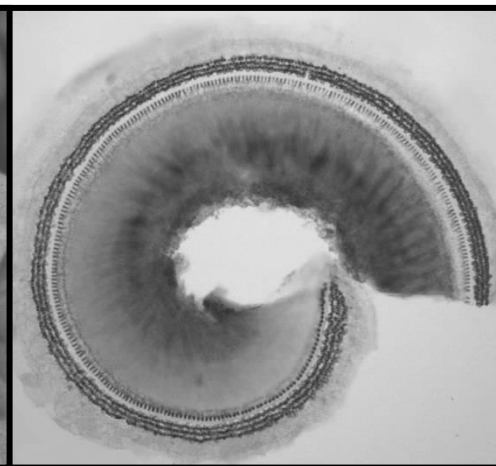
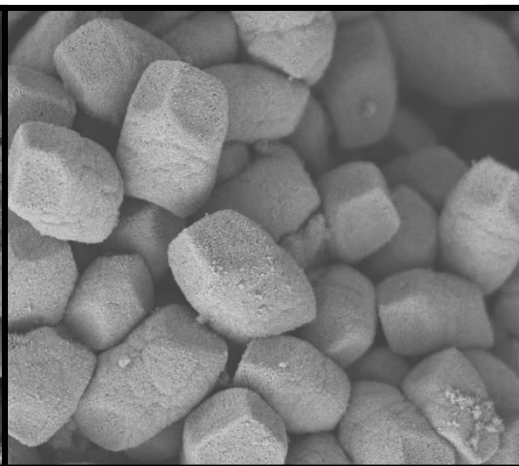
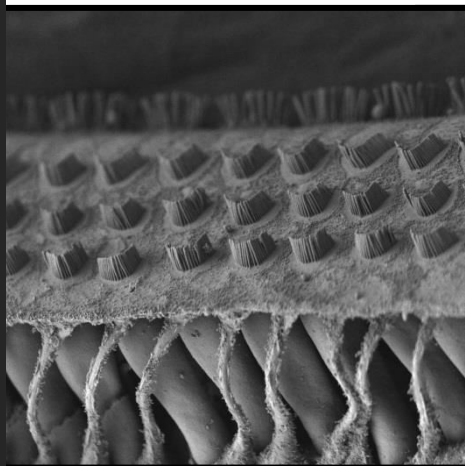
Effet sur l'audition et l'équilibre de co-exposition à un bruit riche en basses fréquences et au disulfure de carbone (CS₂)

Maria Carreres, Monique Chalansonnet

NS 362
juillet 2018

Effets sur l'audition et l'équilibre d'une co-exposition à un bruit riche en basses fréquences et au disulfure de carbone (CS_2)

Thèse Doctorale. Maria Carreres Pons



*“If we knew what it was we were doing,
it would not be called research, would it?”*

Albert Einstein

INDEX

1. ABREVIATIONS	1
2. INTRODUCTION	5
2.1. Systèmes sensoriels : généralités	7
2.2. Système auditif	8
2.2.1. Anatomie de l'oreille	8
2.2.2. La cochlée	9
2.2.3. Cellules ciliées cochléaires et innervation	11
2.2.3.1. Cellules ciliées internes	12
2.2.3.2. Cellules ciliées externes	13
2.2.3.3. Innervation des cellules ciliées cochléaires	14
2.2.4. Le son	14
2.2.5. Transduction du son	15
2.2.6. Voies auditives centrales	21
2.2.7. Réflexes auditifs	22
2.2.7.1. Réflexe de l'oreille interne	23
2.2.7.2. Réflexe de l'oreille moyenne	23
2.3. Système vestibulaire	25
2.3.1. Labyrinthe vestibulaire périphérique	25
2.3.2. Cellules ciliées vestibulaires et innervation	27
2.3.2.1. Types de cellules ciliées	27
2.3.2.2. Mécanisme de transduction	29
2.3.2.3. Innervation des cellules ciliées vestibulaires	30
2.3.3. Epithéliums vestibulaires	30
2.3.3.1. Canaux semi-circulaires	31
2.3.3.2. Organes otolithiques	33
2.3.4. Voies vestibulaires centrales	35
2.3.5. Réflexe vestibulo-oculaire	36
2.3.5.1. Nystagmus	38

2.4. Bruit	39
2.4.1. Bruit et audition	39
2.4.2. Bruit et vestibule	42
2.4.3. Bruits de basses fréquences	43
2.5. Ototoxicité	44
2.5.1. Substances ototoxiques	44
2.5.2. Mécanisme d'ototoxicité	45
2.5.3. Co-exposition : les agents ototoxiques accentuent le risque induit par le bruit	46
2.6. Disulfure de carbone	47
2.6.1. Production et utilisation du disulfure de carbone	47
2.6.2. Cinétique et métabolisme du disulfure de carbone	47
2.6.2.1. Absorption	48
2.6.2.2. Distribution	48
2.6.2.3. Métabolisme	48
2.6.2.4. Excrétion	49
2.6.3. Neurotoxicité du disulfure de carbone	50
2.6.4. Ototoxicité du disulfure de carbone	51
3. OBJECTIFS	52
4. MATERIELS ET METHODES	55
4.1. Animaux	57
4.2. Protocole expérimental	58
4.3. Exposition	62
2.4.1. Exposition au disulfure de carbone	62
2.4.1.1. Analyse de la concentration de CS ₂	63

4.3.2. Exposition au bruit	63
4.3.2.1. Bruit à 8 kHz	64
4.3.2.2. Bruit riche en basses fréquences	65
4.4. Mesures fonctionnelles	67
4.4.1. Produits de distorsion acoustique	67
4.4.1.1. Mesure des produits de distorsion acoustique	68
4.4.2. Réflexe vestibulo-oculaire	69
4.4.2.1. Chirurgie	70
4.4.2.2. Période d'habituation	70
4.4.2.3. Mesure du nystagmus post-rotatoire	71
4.5. Mesures du comportement	72
4.5.1. Evaluation du réflexe d'atterrissage	72
4.5.2. Evaluation du réflexe de retournement.....	73
4.5.3. Evaluation de la superficie que forment les pattes	74
4.5.4. Locotronic®	74
4.6. Techniques chimioanalytiques	75
4.6.1. Concentration de CS ₂ dans le sang	75
4.6.1.1. Prélèvement de sang veineux	75
4.6.1.2. Analyse de la concentration de CS ₂	75
4.6.2. Concentration de TTCA dans l'urine	76
4.6.2.1. Recueil d'urines	76
4.6.2.2. Analyse de la concentration de TTCA	76
4.6.3. Concentration de CS ₂ dans le cerveau	77
4.6.3.1. Dissection du cerveau	77
4.6.3.2. Analyse de la concentration de CS ₂	77
4.7. Techniques histologiques	78
4.7.1. Microscopie optique	78
4.7.1.1. Inclusion de la cochlée (organe de Corti et ganglion spiral)	78
4.7.1.2. Inclusion de l'épithélium vestibulaire (utricle, saccule et crêtes)	80
4.7.1.3. Inclusion du ganglion de Scarpa	80

4.7.1.4.Cochléogramme	81
4.7.2. Immunohistochimie et microscopie confocale à fluorescence	82
4.7.2.1.Immunohistochimie de la cochlée	82
4.7.2.2.Immunohistochimie de l'épithélium vestibulaire	83
4.7.3. Microscopie électronique à balayage (SEM)	85
4.7.3.1.SEM de la cochlée	85
4.7.3.2.SEM de l'épithélium vestibulaire	85
4.8. Techniques biomoléculaires (PCR)	87
4.8.1. Extraction des ARN totaux	87
4.8.2. Vérification de la qualité des ARN	87
4.8.3. Synthèse d'ADNc	88
4.8.4. Amplification PCR	88
4.8.4.1.Plaque neurotoxicité	88
4.8.4.2.PCR des gènes <i>cdkn1</i> , <i>cideb</i> et <i>trmp1</i>	89
4.8.4.3.Analyse des résultats de la PCR	89
4.9. Analyse statistique	90
5. RESULTATS	91
5.1. CHAPITRE I : EFFET DE LA CO-EXPOSITION AU BRUIT RICHE EN BASSES FREQUENCES ET AU CS₂	93
5.1.1. Santé générale des animaux	94
5.1.2. Effet sur le système auditif	96
5.1.2.1.Fonction auditive : produits de distorsion acoustique	96
5.1.2.2.Analyses histologiques	97
5.1.3. Effet sur le système vestibulaire	105
5.1.3.1.Fonction vestibulaire : nystagmus post-rotatoire	105
5.1.3.2.Comportement	107
5.1.3.3.Analyses histologiques	108
5.1.4. Effet sur le système nerveux central	111

5.2. CHAPITRE II: EFFET DOSE-REPONSE DU CS₂	112
5.2.1. Santé générale des animaux	114
5.2.2. Métabolisme	115
5.2.2.1. Concentration de CS ₂ : atmosphérique vs. sanguine	115
5.2.2.2. Concentration de disulfure de carbone atmosphérique vs. concentration de TTCA urinaire	115
5.2.3. Effet sur le système auditif	117
5.2.3.1. Fonction auditive : produits de distorsion acoustique	117
5.2.3.2. Analyses histologiques	120
5.2.4. Effet sur le système vestibulaire	123
5.2.4.1. Fonction vestibulaire : nystagmus post-rotatoire	123
5.2.4.2. Comportement	125
5.2.4.3. Analyses histologiques	126
5.3. CHAPITRE III : EXPOSITION AU CS₂: CONTINU VS. INTERMITTENT	128
5.3.1. Santé générale des animaux	130
5.3.2. Métabolisme	131
5.3.2.1. Concentration de CS ₂ sanguine et cérébrale lors d'exposition selon différents modes d'administration au CS ₂ à 250 ppm	131
5.3.2.2. Comparaison entre 63 ppm continu et 250 ppm intermittent (15min/h)	133
5.3.3. Effet sur le système auditif	134
5.3.3.1. Fonction auditive : produits de distorsion acoustique	134
5.3.3.2. Analyses histologiques	138
5.3.4. Effet sur le système vestibulaire	144
5.3.4.1. Fonction vestibulaire : nystagmus post-rotatoire	144
5.3.4.2. Comportement	147
5.3.4.3. Analyses histologiques	148
5.4. CHAPITRE IV : EFFET DU CS₂ SUR LE ROM	152
5.4.1. Santé générale des animaux	154
5.4.2. Fonction auditive	155
5.4.2.1. Exposition au CS ₂ et/ou bruit (continu ou impulsionnel)	155
5.4.2.2. Comparaison entre les différentes conditions expérimentales	157

5.4.3. Analyses histologiques	159
5.4.3.1. Microscopie électronique à balayage : état des stéréocils	159
5.4.3.2. Cochléogramme	161
6. DISCUSSION	167
6.1. Effet de la co-exposition au bruit riche en basses fréquences et au CS₂	170
6.2. Effet du CS₂ en fonction de la concentration testée.....	176
6.3. Exposition au CS₂ : continu vs. intermittent	178
6.4. Effet du CS₂ sur le réflexe de l'oreille moyenne	181
6.5. Valeurs limites d'exposition professionnelle	184
7. CONCLUSIONS	186
8. BIBLIOGRAPHIE	189
9. ANNEXE	216
9.1. Protocole de surveillance des animaux	218
9.2. Article 1	219
9.3. Article 2	229
9.4. Article 3	240
RESUME DE LA THESE EN FRANCAIS	270
RESUME DE LA THESE EN ANGLAIS.....	271

1. ABBREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique	NPR: nystagmus post-rotatoire
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire	PBS: <i>phosphate buffered saline</i>
ANOVA: analyse de la variance	PCR: réaction de polymérisation en chaîne
ARN: acide ribonucléique	PDA: produits de distorsion acoustique
ATP: adénosine triphosphate	ppm: partie par million
CCE: cellule ciliée externe	ROI: réflexe de l'oreille interne
CCI: cellule ciliée interne	ROM: réflexe de l'oreille moyenne
Cideb: <i>cell death-inducing DFFA-like effector B</i>	ROS: <i>reactive oxidative species</i> (dérivés réactifs de l'oxygène)
Cl⁻: ion chlorure	RVO: réflexe vestibulo-oculaire
COS: complexe olivaire supérieur	SDH: succinate déshydrogénase
CS₂: disulfure de carbone	SEM: erreur type d'une méthode d'estimation
dB: décibels	SEM: Microscopie électronique à balayage
DCM: chlorure de méthylène	SNC: system nerveux central
EPON: <i>epoxy embedding medium</i>	SPL: <i>sound pressure level</i>
GABA: acide γ -aminobutyrique	TA: température ambiante
Hz: hertz	Trpm1: <i>transient receptor potential cation channel subfamily M member 1</i>
i.p.: intrapéritonéal	TTCA: acide 2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-carboxylique
IHQ: immunohistochimie	VLEP: valeur limite d'exposition professionnelle
K⁺: ion potassium	VLEP_{8h}: valeur limite d'exposition professionnelle journalière
L_{EX,8h}: limite d'exposition journalière au bruit	VLEP_{CT}: valeur limite d'exposition professionnelle à court terme
MEK: méthyl-éthyl-cétone	
Na⁺: ion sodium	

2. INTRODUCTION

2.1 Systèmes sensoriels : généralités

La **perception** du monde qui nous entoure – ses textures, couleurs et sons, sa chaleur, odeurs et saveurs – est rendue possible grâce au fonctionnement des **systèmes sensoriels**. La **sensibilité** implique la capacité de transduction, de codification et enfin la perception analysée au niveau de l'encéphale à partir de l'information générée par les stimuli qui arrivent des milieux externe et interne.

Bien qu'il existe de grandes disparités entre les différents sens, certaines règles fondamentales gouvernent la manière dont le système nerveux traite chacune des informations.

Les informations du milieu ambiant et du milieu interne, c'est-à-dire les **stimuli**, arrivent aux **cellules réceptrices sensorielles**, des structures très spécialisées et sensibles à un type de stimulus. Ces récepteurs transforment l'information de l'environnement en signaux électriques qui sont transmis au **système nerveux central (SNC)** par les **fibres nerveuses afférentes** : c'est le phénomène de **transduction sensorielle**. Quand le récepteur est stimulé, celui-ci modifie la perméabilité de la membrane et permet la diffusion des ions et, par conséquent, génère un potentiel électrique appelé **potentiel récepteur**. Dans les récepteurs, il se produit un flux de courant qui se disperse tout le long de la fibre nerveuse et, si l'amplitude du potentiel est suffisante, il forme des potentiels d'action qui sont transmis vers le SNC.

Le **système vestibulaire** (sens de l'équilibre) et le **système auditif** (sens de l'ouïe) sont deux systèmes sensoriels qui partagent des similitudes mécaniques et structurelles.

La relation intime entre la **cochlée**, organe de l'audition, et le **labyrinthe vestibulaire**, organe de l'équilibre, va au-delà de leur origine embryonnaire commune. Les éléments périphériques de ces deux systèmes sont unis et partagent des composants du labyrinthe membraneux et du labyrinthe osseux, utilisent des cellules ciliées comme transducteurs mécaniques, et transmettent l'information au SNC par le nerf vestibulo-cochléaire, encore appelé nerf VIII. Cependant, le traitement par le SNC et les fonctions sensorielles de ces deux systèmes sont différents. La fonction du système auditif est de traduire les sons, alors que la fonction du système vestibulaire est de fournir des informations sur la position et les mouvements du corps dans l'espace.

2.2 Système auditif

Le **système auditif** désigne l'ensemble des structures impliquées dans le traitement du message auditif, du pavillon auditif jusqu'aux aires auditives corticales.

L'**audition** est le processus sensoriel spécifique avec lequel un être vivant reçoit et analyse les sons, c'est notre perception de l'énergie qui est transportée par des ondes sonores. Cette capacité nous permet de communiquer avec les autres êtres vivants et d'appréhender l'environnement.

2.2.1 Anatomie de l'oreille

Le récepteur périphérique de l'audition est l'**oreille**. L'oreille des mammifères est formée de trois parties (Fig. I1) : **oreille externe**, **oreille moyenne** et **oreille interne**. L'oreille interne est commune à tous les vertébrés, et se situe dans l'os temporal du crâne chez les mammifères.

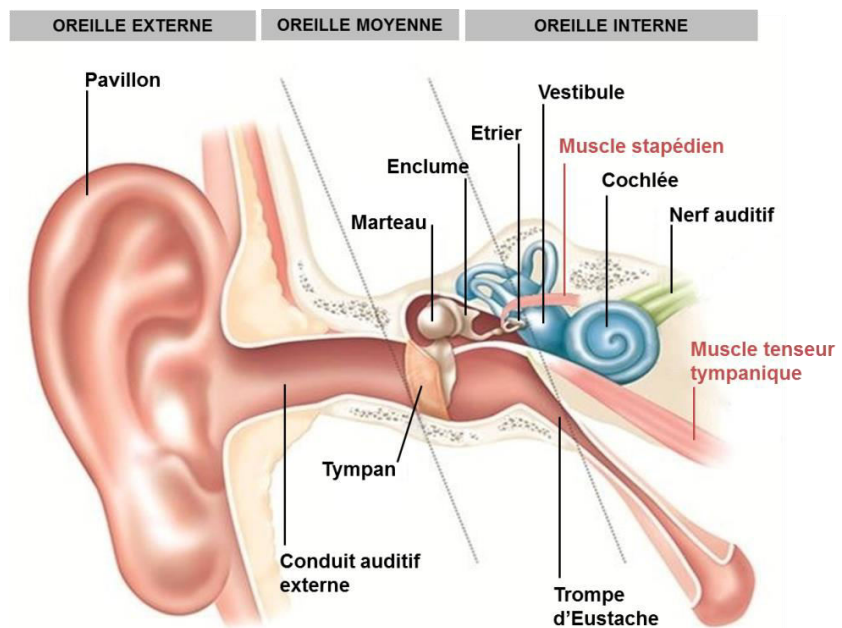


Figure I1. Anatomie de l'oreille. Principales structures de l'oreille externe, moyenne et interne. Source : INRS.

L'oreille externe est la partie visible de l'organe. Elle est formée du **pavillon auditif**, un tissu fibro-cartilagineux qui diffracte les ondes sonores, et du **conduit auditif externe** d'une longueur de 2,5 cm et de 0,6 cm de diamètre (Fig. I1). Le **tympan** est la membrane qui sépare le conduit auditif externe de la cavité de l'oreille moyenne.

L'oreille moyenne est connectée à la cavité buccale par la **trompe d'Eustache** (Fig. I1), qui permet d'égaliser la pression de l'air de chaque côté du tympan. La **fenêtre ovale**, sur laquelle appuie la platine de l'étrier, et la **fenêtre ronde** séparent l'oreille moyenne de l'interne. La chaîne d'osselets inclut le **marteau**, l'**enclume** et l'**étrier**.

L'oreille interne est formée de deux labyrinthes : le **labyrinthe osseux** et le **labyrinthe membraneux**. Le labyrinthe osseux constitue une coque qui accueille et protège les structures sensorielles ; il est formé de trois **canaux semi-circulaires**, la **cochlée** et le **vestibule**. A l'intérieur, on trouve un système fermé rempli de liquide, le labyrinthe membraneux, formé de sacs membraneux, lesquels contiennent l'épithélium sensoriel de l'audition, l'**organe de Corti** et de l'équilibre, l'**épithélium vestibulaire**.

2.2.2 La cochlée

La **cochlée** est l'organe qui réalise la **transduction du son en message auditif**. Elle est, par conséquent, une structure fondamentale du système auditif qui transforme les ondes sonores en impulsions nerveuses auditives et joue le rôle d'analyseur de fréquences.

La cochlée est un organe en forme de spirale qui se trouve dans l'os temporal du crâne (Fig. I2). Cet organe s'enroule autour d'un axe osseux, la **columelle**. Le labyrinthe osseux de la cochlée est divisé en plusieurs cavités spirales et parallèles. La rampe centrale s'appelle **canal cochléaire**. Il s'agit d'un tube en spirale, aux parois membraneuses, contenant l'organe de Corti, qui s'étend le long de la cochlée. Une des parois du canal cochléaire est formée de la **membrane basilaire**, de la **membrane de Reissner** et de la **strie vasculaire**. Au-dessus et en-dessous, on trouve respectivement les **rampes vestibulaire** et **tympanique** qui communiquent entre elles par l'**hélicotrème**, un trou situé au sommet de la cochlée, l'apex. La platine de l'étrier agit sur le liquide de la rampe vestibulaire au niveau de la **fenêtre ovale**. La membrane de la **fenêtre ronde** sépare le liquide de la rampe tympanique de la cavité de l'oreille moyenne.

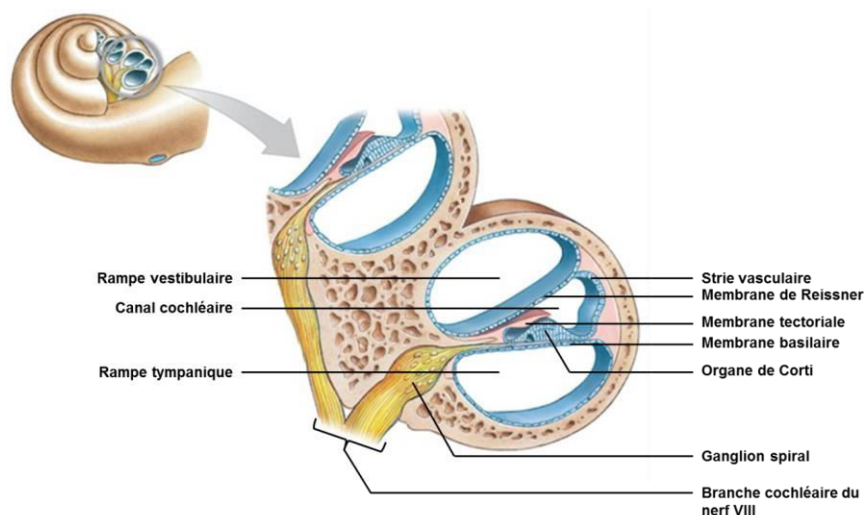


Figure I2. Anatomie de la cochlée et ses différents compartiments. Le labyrinthe membraneux se trouve à l'intérieur du labyrinthe osseux. Source : image adaptée de <http://droualb.faculty.mjc.edu>

Les compartiments internes de la cochlée sont remplis de deux liquides différents (Slepecky, 1996). Le liquide des rampes vestibulaire et tympanique est la **périmlympe**, avec une composition proche de celle d'un milieu extracellulaire, une forte concentration en ions sodium Na⁺ (environ 140 mM) et une faible concentration en ions potassium K⁺ (environ 5 mM). Le liquide dans le labyrinthe membraneux, qui comporte le canal cochléaire, est l'**endolymphe**. L'endolymphe contient une forte concentration en ions K⁺ (environ 145 mM) et une faible concentration en ions Na⁺ (environ 2 mM), soit une composition proche de celle du liquide intracellulaire. L'endolymphe est sécrétée de façon continue par la strie vasculaire, une structure épithéliale complexe composée de différents types cellulaires et vaisseaux sanguins. Les deux liquides contiennent une forte concentration en ions chlore Cl⁻. En conditions normales, les deux compartiments ne communiquent pas. Les deux liquides interviennent dans le fonctionnement normal du système et, souvent, les altérations de la distribution ou la composition ionique des liquides provoquent un trouble de l'audition.

Les liquides de la cochlée ont un rôle très important :

1. ils transmettent les vibrations de l'étrier ;
2. ils maintiennent la pression cochléaire afin d'assurer le fonctionnement du récepteur ;
3. ils apportent les nutriments et permettent d'éliminer les produits du catabolisme des cellules qui se trouvent en contact avec le sang ;
4. ils apportent l'environnement ionique nécessaire pour assurer les transductions énergétiques ;
5. ils assurent la formation du potentiel endocochléaire.

Le **potentiel endocochléaire** est un potentiel positif continu généré par la différence de composition ionique entre l'endolymphe et la périmlympe (+ 80 mV).

L'**organe de Corti** (Fig. I3), que se trouve dans le canal cochléaire, repose sur la membrane basilaire, formée essentiellement de fibres de collagène. Le récepteur auditif contient deux types de cellules réceptrices responsables de la perception du son (Slepecky, 1996) : les **cellules ciliées externes (CCE)** et les **cellules ciliées internes (CCI)**. Il contient également des **cellules de soutien** : cellules de Deiters, cellules de Hensen et cellules de Claudius, entre autres. L'organe de Corti est coiffé de la **membrane tectoriale**, une membrane acellulaire de glycoprotéines. L'apex des cellules ciliées ainsi que les prolongations des différentes cellules de soutien forment la **membrane réticulaire**, riche en actine et myosine.

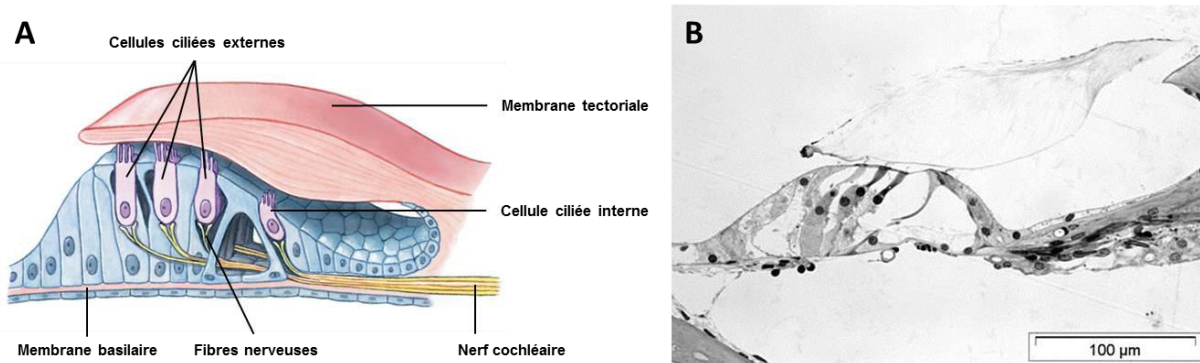


Figure 13. Anatomie de l'organe de Corti et ses différentes parties.

(A) Schéma de l'anatomie de l'organe de Corti et ses différentes parties. Source: image adaptée de <http://droualb.faculty.mjc.edu>

(B) Section histologique du canal cochléaire avec l'organe de Corti.

Les cellules ciliées font synapses avec les neurones bipolaires sans myéline. Les corps cellulaires de ces neurones forment le **ganglion spiral**. Les prolongations centrales des cellules du ganglion forment la partie cochléaire du **nerf vestibulo-cochléaire (nerf crânien VIII)** (Fig. I2-3).

2.2.3 Cellules ciliées cochléaires et innervation

Les **cellules ciliées** sont les mécanorécepteurs qui constituent en grande partie le neuroépithélium. Elles s'appellent ainsi en raison de la présence d'une centaine de **stéréocils** à leur partie apicale. Les stéréocils sont de tailles différentes, arrangés en trois rangées et en contact avec l'endolymphe. Les stéréocils sont des cils flexibles qui contiennent des filaments d'actine entourés de différents isoformes de myosine. Tous les cils sont plantés dans une région rigide d'actine dense, le **plateau cuticulaire**, qui se trouve à l'extrémité apicale de la cellule. Les **liens terminaux** (ou « **tip-links** ») sont des ponts de glycoprotéines ou d'élastine qui connectent la pointe du stéréocil le plus petit au corps du stéréocil adjacent qui est plus grand (Oghalai and Brownell, 2012). Par conséquent, tous les cils sont unis entre eux par des ponts de protéines qui interviennent directement dans le mécanisme de transduction. Les cellules ciliées reposent sur les cellules de soutien et sont en contact avec la membrane tectoriale (Fig. I3). Chez les mammifères, quand elles sont endommagées, elles ne sont pas remplacées.

Comme expliqué ci-dessus, on trouve deux types de cellules sensorielles qui diffèrent par la forme de leur corps cellulaire, l'arrangement de leurs stéréocils et leurs connexions au SNC (Fig. I4).

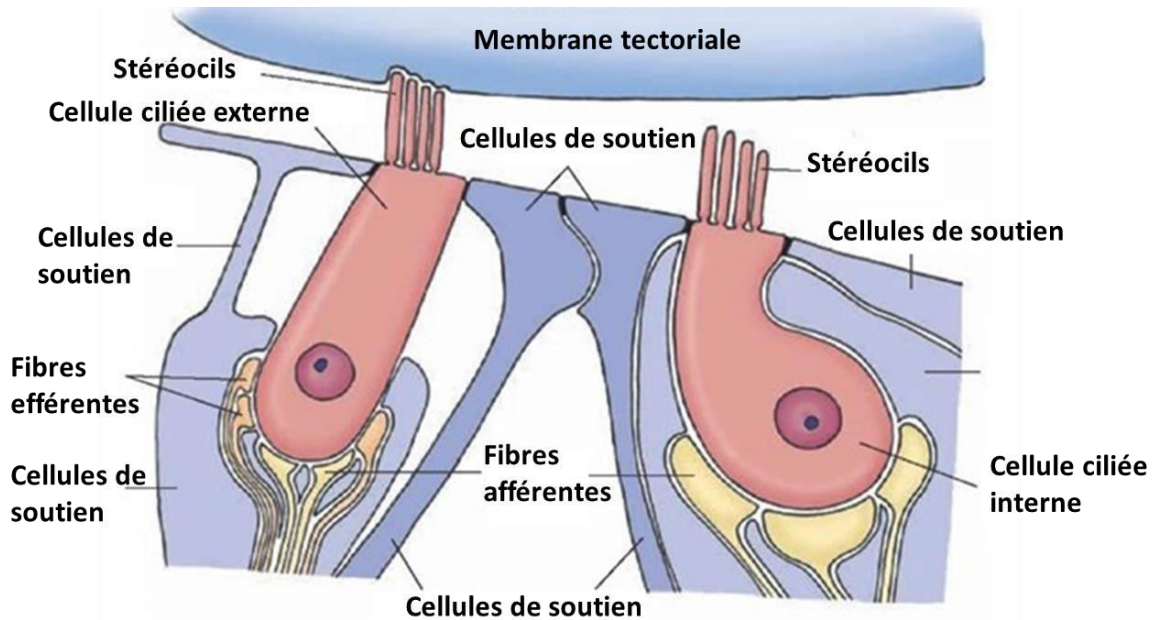


Figure I4. Schéma d'une cellule ciliée externe et d'une cellule ciliée interne dans l'organe de Corti. Source : image adaptée de <http://what-when-how.com/neuroscience/auditory-and-vestibular-systems-sensory-system-part-1>

2.2.3.1 Cellules ciliées internes

Les **cellules ciliées internes (CCI)** sont en forme de poire et s'appuient sur des cellules épithéliales (Fig. I4). Chez l'Homme, on trouve environ 3500 CCI disposées en une seule rangée avec des stéréocils arrangés en palissade (Fig. I5). Ces cellules sont les véritables neurotransducteurs sensoriels car elles transforment les signaux mécaniques en signaux nerveux qui sont transmis au cerveau par les fibres du nerf auditif et sont interprétés par les centres auditifs centraux du SNC.

Les cellules sont connectées à des fibres bipolaires de type I, lesquelles représentent les 95% des **fibres afférentes** du nerf auditif et dont le neurotransmetteur est le **glutamate**. Une CCI établit des contacts avec différents boutons terminaux, chacun d'eux provenant d'un neurone ganglionnaire différent.

2.2.3.2 Cellules ciliées externes

Les **cellules ciliées externes (CCE)** ont une forme cylindrique (Fig. I4). Chez l'Homme, on trouve environ 13000 CCE disposées en trois rangées (CCE1, CCE2, CCE3). Chaque CCE a trois rangées de stéréocils arrangés en forme de W (Fig. I5), avec les cils les plus longs plantés dans la membrane tectoriale, ce qui crée une union mécanique entre membranes basilaire et tectoriale.

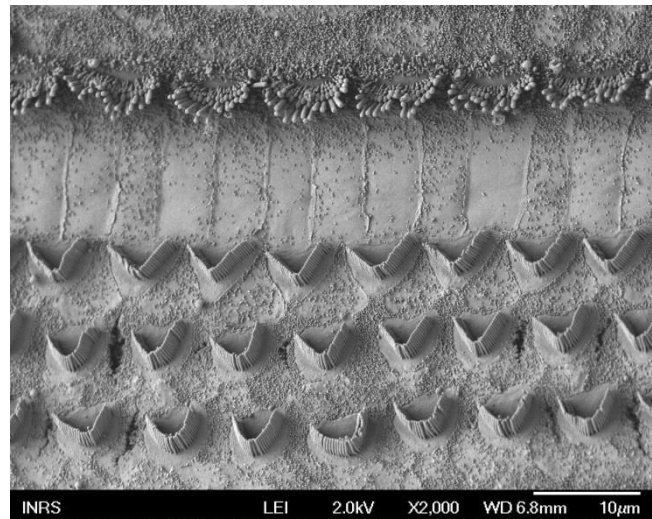


Figure 15. Image de la surface de l'organe de Corti qui présente l'organisation des stéréocils des cellules ciliées internes en palissade et externes en W.

Les stéréocils des CCE présentent un gradient de taille de la base vers l'apex de la cochlée. En partie apicale, les cils sont quatre fois plus grands qu'en partie basale. De plus, les stéréocils de la base sont plus rigides que ceux de l'apex. Ces variations morphologiques font que l'ensemble de la cochlée ne réagit pas de la même façon aux vibrations.

Les CCE peuvent varier de taille en réponse à une stimulation électrique (Brownell et al., 1985; Kachar et al., 1986), c'est ce qu'on appelle l'**électromotilité**. Pour réaliser cette contraction, elles possèdent un réticulum endoplasmique particulier qui recouvre toute la surface interne des parois latérales des cellules. De plus, ces parois sont renforcées par un manchon de protéines contractiles comme l'actine et spectrine (Tilney and Tilney, 1986) qui permet de faire varier la taille (Carlisle et al., 1988). Une protéine spécifique des CCE, la prestine, se trouve tout le long du corps cellulaire et a la capacité de changer de conformation selon le potentiel membranaire (Ashmore et al., 2010).

Les CCE sont innervées en majorité par de nombreuses terminaisons du **système efférent** (90%), lesquelles régulent leurs propriétés mécaniques et dont le neurotransmetteur est principalement l'**acétylcholine**. Du côté opposé, elles sont également connectées au SNC par des fibres afférentes de type II.

2.2.3.3 Innervation des cellules ciliées cochléaires

L'organe de Corti est innervé par trois types de **fibres nerveuses** : **fibres auditives afférentes**, **fibres auditives efférentes (faisceau olivo-cochléaire)** et **fibres nerveuses autonomes**.

Les **fibres afférentes** auditives sont des cellules bipolaires, dont les corps cellulaires forment le ganglion spiral. Chez l'Homme, le nerf auditif contient environ 30000 fibres de ce type. Les CCI apportent la majeure partie de l'information des signaux acoustiques au SNC. Les axones des fibres forment le **nerf auditif** qui pénètre le crâne par le méat auditif interne et arrive au centre auditif du SNC.

L'organe de Corti est également innervé par des **fibres efférentes**, la plupart se terminant sous les CCE. Ces efférentes cochléaires proviennent du **noyau olivaire supérieur** du tronc cérébral et s'appellent **fibres olivo-cochléaires**. Chez l'Homme, il y a environ 500 à 600 fibres de ce type.

La **cochlée du rat** est innervée par environ 19000 fibres nerveuses, dont 79% sont des fibres afférentes et 21% des fibres efférentes (Dannhof and Bruns, 1993).

2.2.4 Le son

Une **onde sonore** est la propagation progressive de la vibration des molécules d'air du milieu environnant autour de leur position de repos. Ces ondes vont dans toutes les directions depuis la source et sont caractérisées par leur **fréquence (ton : grave ou aigu)** et leur **intensité (amplitude : faible ou élevée)**. La fréquence du son est mesurée en cycles par seconde, ou **hertz (Hz)** alors que l'intensité est mesurée sur une échelle logarithmique en **décibels (dB)**. Le son est donc notre interprétation de la fréquence, de l'amplitude et de la durée des ondes sonores qui arrivent à nos oreilles. Le système auditif transforme les ondes sonores en différentes formes d'activités neuronales, où seront intégrées ensuite les informations provenant d'autres systèmes.

Le son est produit de manière naturelle. Il s'agit d'un mélange de sons purs, c'est-à-dire composés d'une seule fréquence. Le **bruit** est un son désagréable.

L'onde acoustique se propage à différentes vitesses en fonction de plusieurs caractéristiques intrinsèques au milieu qu'elle traverse. Chaque milieu est caractérisé par sa résistance au passage du son, appelée **impédance acoustique**. Une partie importante de l'onde sonore est réfléchiée quand celle-ci entre en contact avec un milieu d'une impédance différente.

Chez l'Homme, l'oreille d'un jeune en bonne santé est sensible aux stimulations sonores ayant des fréquences comprises entre 20 et 20000 Hz. Le seuil de détection d'un son pur varie à chaque fréquence. Les seuils d'audition humaine les plus bas se trouvent autour de 3 kHz (Fig. I6). L'oreille est donc plus sensible entre 1 et 3 kHz, mais la sensibilité diminue dans les hautes fréquences, car une pression acoustique supérieure est nécessaire pour arriver au seuil d'activation.

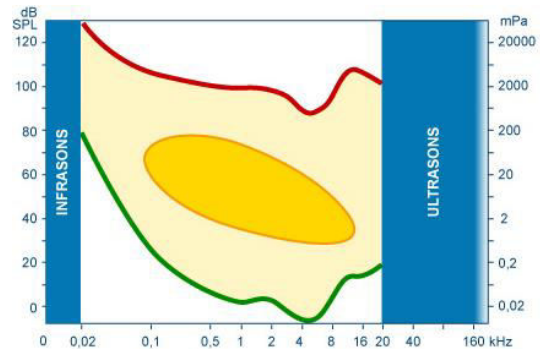


Figure 16. Champ auditif humain et seuils d'audition. Source : image de <http://www.cochlea.eu>

Les sons supérieurs à 100 dB peuvent endommager l'appareil auditif périphérique, ceux supérieurs à 120 dB causent une douleur et des lésions permanentes. En vieillissant, les seuils dans les hautes fréquences augmentent, ce qui réduit la perception acoustique (presbycusis). De plus, après une exposition à un son de longue durée, on constate l'augmentation du seuil d'audition due à la fatigue des fibres nerveuses, c'est la **fatigue auditive**.

2.2.5 Transduction du son

Le son parvient à la cochlée par deux voies différentes : par l'oreille moyenne (chaîne tympano-ossiculaire) ou par conduction osseuse à travers l'os.

L'**oreille externe** capte les vibrations de pression de l'air qui constituent le signal sonore et les conduit à travers le canal auditif externe jusqu'à la membrane tympanique qui les transforme en vibrations mécaniques (Fig. I7A). Ces variations traversent l'**oreille moyenne** par la chaîne d'osselets qui amplifie la pression des ondes sonores, de façon à ce que l'énergie sonore de l'air puisse être transmise de manière satisfaisante à la cochlée, remplie de liquide et située dans l'oreille interne (Fig. I7A). Il y a donc une adaptation d'impédance faite par l'oreille moyenne entre les milieux aérien et liquidien.

L'**oreille interne** est responsable de la transformation de ces signaux mécaniques en signaux électriques qui seront dirigés vers le SNC (Fig. 17B).

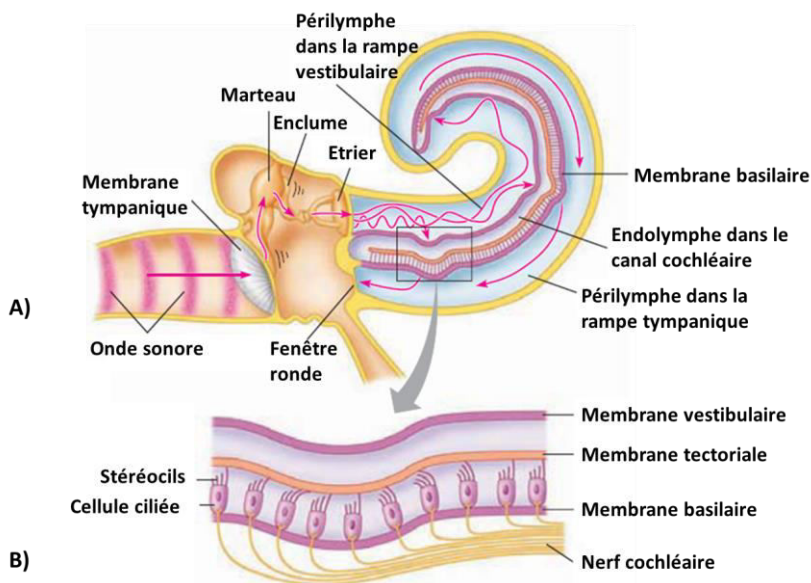


Figure 17. Conduction des ondes sonores à travers l'oreille. (A) Les ondes sonores qui entrent dans l'oreille par le pavillon auriculaire et le conduit auditif externe, frappent la membrane tympanique et la font vibrer. Les osselets vibrent en réponse à la membrane tympanique et transmettent les vibrations à la fenêtre ovale. La fenêtre ovale vibre à son tour et provoque des ondes dans la périlymphe de la cochlée. (B) Les ondes de la périlymphe provoquent le déplacement des membranes de la cochlée. Quand les membranes oscillent, les stéréocils des cellules ciliées s'inclinent, ce qui provoque la libération du neurotransmetteur au nerf cochléaire. Le nerf cochléaire envoie les signaux au SNC. Source : image adaptée de Principios de Fisiología humana. Stanfield.

Par conséquent, l'audition est un sens complexe qui implique quatre **transductions** différentes :

1. la transduction **acoustico-mécanique** : l'énergie qui arrive des ondes sonores de l'air est convertie en vibrations mécaniques au niveau de l'oreille moyenne ;
2. la transduction **hydro-mécanique** : les vibrations mécaniques sont transformées en ondes liquides dans l'oreille interne ;
3. la transduction **mécano-électrique** : le mouvement des ondes devient des signaux chimiques au niveau des cellules ciliées ;
4. la transduction **neurosensorielle** : les signaux chimiques sont traduits en potentiels d'action au niveau des neurones sensoriels.

L'**oreille moyenne** a trois fonctions importantes : elle transforme les ondes acoustiques en vibrations mécaniques, elle adapte l'impédance entre les milieux aérien et liquidien et protège l'oreille interne en modulant la quantité d'énergie qu'elle reçoit en modifiant la rigidité de la chaîne tympano-ossiculaire.

La vibration du **tympan** est transmise le long de la **chaîne d'osselets**, qui fonctionne comme un système de leviers et multiplie la force de la vibration (amplification). Quand l'étrier se met à vibrer, il déplace la membrane de la fenêtre ovale à laquelle il est attaché. Ces vibrations

créent des ondes dans les cavités pleines de liquide de la cochlée, et l'énergie de ces ondes se dissipe à travers la fenêtre ronde (Fig. I7A). Par conséquent, le tympan et la chaîne d'osselets transforment les vibrations de l'air en vibrations liquidiennes. L'oreille moyenne joue le rôle d'**adaptateur d'impédance**, en améliorant le transfert du son à l'oreille interne (Dancer, 1988). Sans cette capacité, la plupart de l'énergie acoustique serait perdue en raison de la différence d'impédance entre l'air et le liquide, beaucoup plus importante. Cet ajustement est suffisant pour augmenter l'efficacité de transmission de l'énergie d'environ 30 dB. Cet effet est plus prononcé dans les basses fréquences.

Quand des stimulations acoustiques de forte intensité arrivent dans l'oreille moyenne, les **muscles tenseurs du tympan** et de l'**étrier** se contractent par réflexe, diminuant ainsi l'énergie acoustique qui entre dans l'oreille interne. Ces réflexes seront détaillés plus tard.

L'**oreille interne** représente la dernière étape du processus mécanique du son et réalise trois fonctions importantes : elle filtre le signal sonore, réalise la transduction et la génération d'impulsions nerveuses.

Le son va engendrer des déplacements de la **membrane basilaire** et toutes les structures qu'elle supporte (Fig. I7B). A cause du déplacement de cette membrane, les cils des **cellules ciliées** s'inclinent. Ce mouvement permet la libération du glutamate dans la fente synaptique, ce qui crée des potentiels d'actions sur les terminaisons post-synaptiques qui envoient l'information du son à travers le nerf auditif jusqu'au cerveau. Par conséquent, le signal acoustique se transforme en message nerveux au niveau de l'oreille interne et plus précisément au niveau de la **cochlée**.

Les stéréocils des cellules sensorielles sont le lieu de la **transduction mécano-électrique**, c'est-à-dire de la transformation de la vibration du son en message nerveux. Le pôle apical des cellules ciliées est immergé dans l'endolymphe riche en K^+ . Le potentiel de repos de la cellule est de -60 mV, ce qui favorise son entrée (Fig. I8A). La sortie de K^+ est également réalisée de façon passive car le milieu périlymphatique, qui entoure le corps cellulaire, a une faible concentration en ions K^+ . Il en résulte une économie importante d'ATP dans les cellules ciliées. Selon la direction vers laquelle s'inclinent les stéréocils, les canaux de potassium situés à la partie supérieure des cils s'ouvrent ou se ferment. Les ponts apicaux, qui se trouvent entre les stéréocils, permettent l'ouverture des canaux et laissent entrer le K^+ dans la cellule par

gradient électrochimique, provoquant une dépolarisation (Fig. I8B). Au contraire, la fermeture des canaux évite l'entrée du K⁺, ce qui provoque une hyperpolarisation (Fig. I8C).

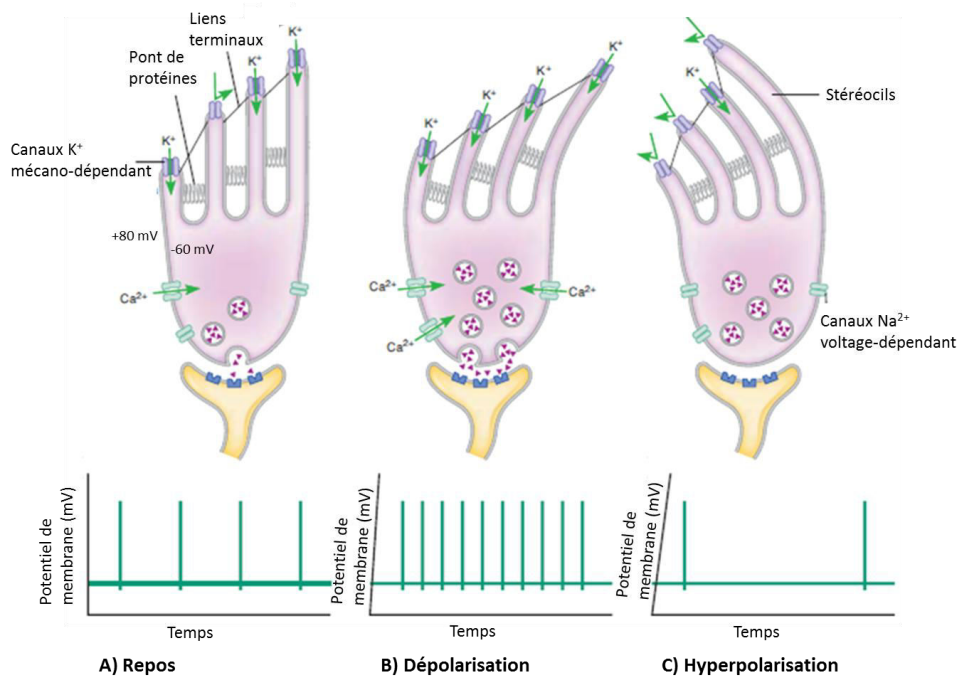


Figure I8. Fonction des stéréocils dans la transduction du son réalisée par les cellules ciliées. (A) Les canaux potassiques des stéréocils, régulés de manière mécanique, font que les ions potassium entrent dans la cellule. (B) Quand les stéréocils s'inclinent vers le cil le plus long, les canaux s'ouvrent plus et des ions potassium entrent massivement dans la cellule, ce qui produit une plus grande dépolarisation et un plus grand nombre de potentiels d'action au neurone afférent. (C) Quand les stéréocils s'inclinent à l'opposé du cil le plus long, les canaux potassiques sont fermés et peu de potassium entre dans la cellule, ce qui fait que les potentiels d'action du neurone afférent diminuent. Source : image adaptée de Principios de Fisiología humana. Stanfield.

L'onde générée à la base de la cochlée se propage de façon passive vers l'apex. La position de l'amplitude maximale de la vibration varie le long de la membrane basilaire en fonction de la **fréquence caractéristique** de la stimulation acoustique, fréquence pour laquelle la réponse d'une fibre afférente est maximale, ou, en d'autres termes, fréquence pour laquelle un potentiel est créé avec la plus faible intensité sonore. La mécanique cochléaire a été expliquée par deux grandes théories : la **théorie de la résonance (Von Helmholtz)** et la **théorie de l'onde propagée (Von Békésy)**.

Von Helmholtz proposait que la membrane basilaire soit composée d'unités indépendantes, de taille et épaisseurs spécifiques, dont chacune résonne à une fréquence donnée. C'est **Georg Von Békésy** (prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1961) qui en a apporté la preuve expérimentale. Il a démontré que chaque point le long de la membrane basilaire effectue la transduction d'une fréquence donnée, car chaque fréquence produit des vibrations maximales dans une région spécifique de la membrane, les hautes fréquences étant discriminées à la base

de la cochlée tandis que les basses fréquences le sont à l'apex (Fig. I9). Cette localisation spécifique des fréquences sur la membrane basilaire s'appelle **tonotopie fréquentielle**. L'onde créée par le son le long de la cloison cochléaire est un phénomène de résonance passive, appelé **onde de Békésy** (von Békésy, 1960).

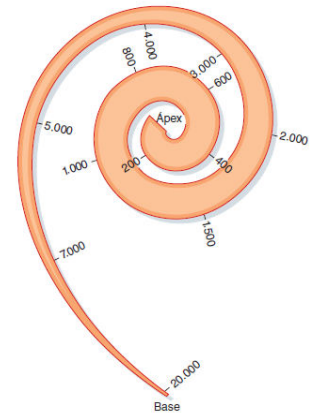


Figure I9. Schéma de la carte tonotopique de la cochlée. Source : image adaptée de Berne y Levy. Fisiología. Koepfen and Stanton.

Cependant, ce mécanisme passif n'est pas suffisant pour expliquer la finesse de l'analyse fréquentielle du signal acoustique dans les hautes fréquences. Des **phénomènes actifs**, liés à la motilité des **CCE**, améliorent considérablement les performances de la tonotopie.

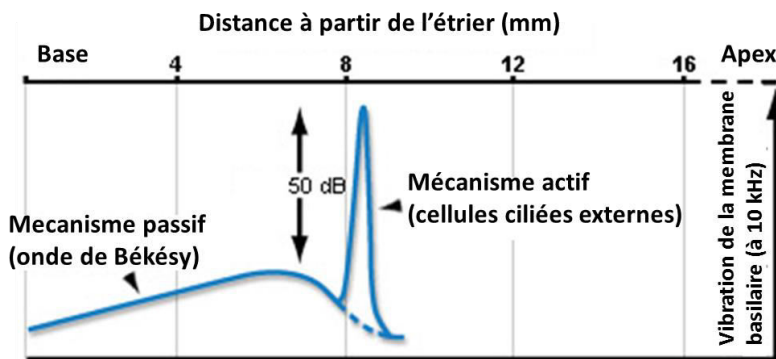


Figure I10. La vibration de la membrane basilaire est réalisée par deux mécanismes : mécanismes passif et actif. Source : image adaptée de <http://www.cochlea.eu>

Le mouvement des CCE n'est pas dû aux mouvements de la membrane basilaire. Les CCE sont fixées à la membrane tectoriale par les stéréocils les plus longs, ce qui établit une liaison mécanique entre la membrane basilaire et tectoriale. Ce sont les déplacements entre les deux membranes qui provoquent un mouvement de cisaillement des stéréocils et modifient le potentiel de membrane (Cody and Russel, 1985). Les variations électriques qui accompagnent les vibrations des CCE s'appellent **potentiels microphoniques cochléaires (PMC)**, et sont le support électrique du **phénomène actif rapide** (Hackney and Furness, 1995). Les variations de potentiel déclenchent la contraction de la prestine, une protéine située le long de la membrane plasmique, qui réalise des petites contractions rapides et successives (Guinan et al., 2012). L'**électromotilité** des CCE est un mécanisme rapide et non consommateur d'énergie. L'amplification de la vibration de la membrane a lieu dans les fréquences voisines de la fréquence caractéristique (Kachar and Brownell, 1986). Pour un son pur, le mécanisme actif amplifie la vibration d'une partie très étroite de la membrane basilaire permettant une bonne discrimination de deux fréquences voisines (Fig. I10).

Le phénomène actif rapide est complété par un **phénomène actif lent** qui implique les voies nerveuses efférentes du système cholinergique (Bonfils et al., 1986; Warr and Guinan, 1979). Ce phénomène consiste en la libération d'ACH qui impacte les propriétés mécaniques des CCE, et, par conséquent, les propriétés mécaniques de la membrane basilaire. C'est un processus lent qui requiert de l'énergie. Le SNC a la possibilité d'ajuster au niveau périphérique le fonctionnement du récepteur auditif, plus spécifiquement la sensibilité et la sélectivité en fréquence.

En résumé, les CCE réalisent une transduction inverse (électromécanique) qui permet de renvoyer l'énergie pour augmenter la sensibilité et la sélectivité fréquentielles (Frolenkov et al., 1998). Ainsi, les CCE ont un rôle d'**amplificateur cochléaire** car elles modulent le comportement mécanique des structures cochléaires (Davis, 1983). Une lésion ou une fatigue des CCE se traduit par une perte des mécanismes actifs d'amplification et une augmentation des seuils de détection du son.

Cette augmentation locale de l'amplitude des mouvements de vibration permet une inclinaison suffisante des stéréocils des **CCI** correspondantes. L'activité des neurones augmentera en fonction de l'intensité sonore. Les CCI se dépolarisent suite à l'entrée massive de K^+ , ce qui provoque une libération de Ca^{2+} intracellulaire et initie l'étape de **transduction neurosensorielle**. La libération de calcium par les CCI provoque l'exocytose des vésicules qui contiennent du glutamate. Ce neurotransmetteur excitateur rapide déclenche un train de **potentiels d'actions** qui établit le flux nerveux afférent. Le flux nerveux se transmet par le neurone auditif afférent du nerf crânien VIII jusqu'aux structures auditives centrales. Les CCI sont donc les véritables **transducteurs mécano-électriques** du message auditif (Deol and Gluecksohn-Waelsch, 1979).

L'oreille, en plus de transformer les sons en message auditif, est capable d'émettre des sons en réponse à une émission acoustique, ce sont les **oto-émissions**. Ces émissions naissent dans l'oreille interne, où les mouvements des liquides se transmettent à la platine de l'étrier, aux osselets et, pour finir au tympan qui vibre et émet un son (Kemp, 1978).

2.2.6 Voies auditives centrales

L'audition, comme toutes les fonctions sensorielles, contient une voie et des centres nerveux sur lesquels arrive l'information périphérique.

On trouve deux types de voies afférentes : les **voies primaires (voie classique)**, qui sont les voies dédiées uniquement à la fonction auditive, et les **voies non primaires (voie « non-classique »)**, sur lesquelles convergent d'autres modalités sensorielles. L'intégrité et le bon fonctionnement de ces deux voies sont nécessaires pour la perception du son. Ces voies commencent au **nerf auditif** qui a pour origine les neurones du ganglion spiral.

La **voie primaire** est une voie courte (avec trois ou quatre niveaux), rapide, car elle est composée de fibres myélinisées, et se termine dans le cortex auditif primaire. Cette voie transmet l'information codée par la cochlée. A chaque niveau, l'information est décodée et interprétée puis transmise au niveau supérieur.

La première étape de la voie auditive primaire est constituée des **noyaux cochléaires** situés dans le tronc cérébral, qui reçoivent les axones des neurones ganglionnaires de type I du ganglion spiral. Une étape importante de décodage du message auditif a lieu à ce niveau : durée, intensité et fréquence. La deuxième étape, toujours dans le tronc cérébral, est le **complexe olivaire supérieur** où la majorité des fibres auditives font synapses après avoir croisé la ligne médiane. Ensuite, le message arrive au mésencéphale en particulier au **colliculus inférieur** qui joue un rôle essentiel dans la localisation du son. La dernière étape avant d'arriver dans le cortex auditif a lieu dans le **thalamus**, le corps genouillé médian. Ici, a lieu un

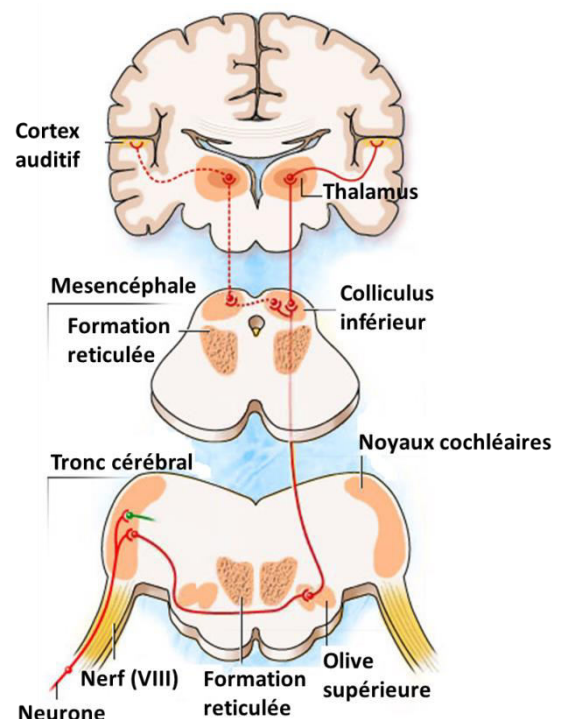


Figure I11. Voie auditive ascendante primaire. Source: <http://www.cochlea.eu>

important travail d'intégration : la préparation d'une réponse motrice. Le dernier neurone de la voie auditive unit le thalamus au **cortex auditif primaire (aires 41 et 42)**, où le message auditif, qui est déjà amplement décodé, peut être intégré (Fig. I11).

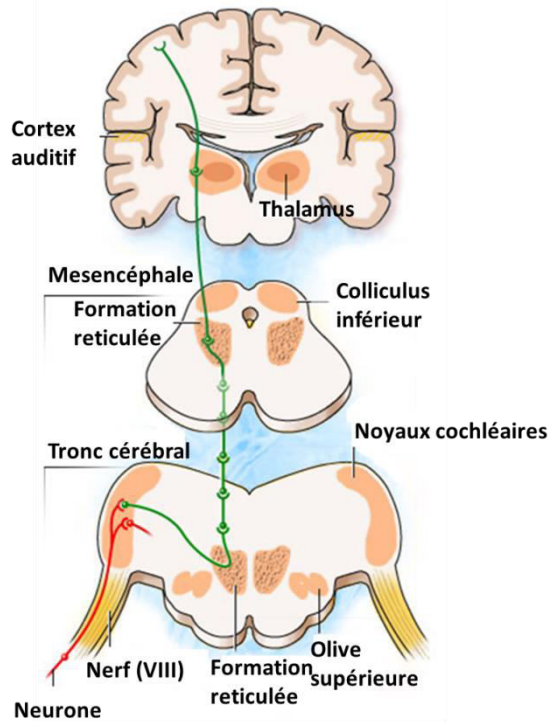


Figure 112. Voie auditive ascendante non primaire.
Source : <http://www.cochlea.eu>

Le rôle de la **voie « non-primaire »** est la sélection de l'information qui doit se traiter en priorité.

Le premier relai, commun à la voie primaire, est formé des **noyaux cochléaires**. Depuis ces noyaux, un groupe de fibres s'unit à la voie réticulaire ascendante. Après la **formation réticulée**, la voie non primaire conduit au **thalamus** et, pour finir, au **cortex multisensoriel** (Fig. I12). Des connexions s'établissent aussi avec l'**hypothalamus** et les **centres végétatifs**. Dans cette voie, l'information auditive s'intègre avec les autres modalités sensorielles.

Les **voies descendantes** envoient l'information depuis le cortex jusqu'au récepteur périphérique, en passant par différents noyaux. Le cortex envoie des fibres sur le **corps genouillé médian** et le **colliculus inférieur**. Les neurones du colliculus inférieur arrivent bilatéralement au **complexe olivaire supérieur** et aux **noyaux cochléaires**. Les faisceaux olivo-cochléaires, qui possèdent des noyaux de l'olive supérieure, arrivent aux **cellules ciliées** de l'organe de Corti et modulent le processus de transduction. Les noyaux moteurs des nerfs V et VII envoient respectivement des axones vers les **muscles tenseur tympanique et stapédien**, lesquels amortissent les mouvements des osselets à l'arrivée des sons de forte intensité.

2.2.7 Réflexes auditifs

Si l'intensité d'un son est très élevée, il peut provoquer des lésions irréversibles au niveau du récepteur auditif. Pour éviter ceci, le système auditif utilise deux arcs réflexes de protection afin de réguler cette intensité. On trouve deux types de réflexes bien identifiés : le **réflexe de l'oreille moyenne (ROM)** et le **réflexe de l'oreille interne (ROI)** ou **réflexe olivo-cochléaire**. Ces deux réflexes sont bilatéraux. Le ROM a pour fonction de protéger la cochlée du son de forte intensité, tandis que le ROI améliore le processus du signal acoustique pour lutter contre le bruit de fond dans un environnement bruyant (Liberman and Guinan, 1998).

2.2.7.1 Réflexe de l'oreille interne (ROI)

Le système olivo-cochléaire est composé de deux populations de neurones (Fig. I13) : les **neurones du système olivo-cochléaire latéral** qui proviennent de l'olive supérieure latérale et sont projetés sur les fibres de type I situées au niveau des CCI (projection ipsilatérale), et les **neurones du système olivo-cochléaire médian** qui proviennent majoritairement du noyau central du corps trapézoïdal et se connectent directement sur les CCE (projection bilatérale).

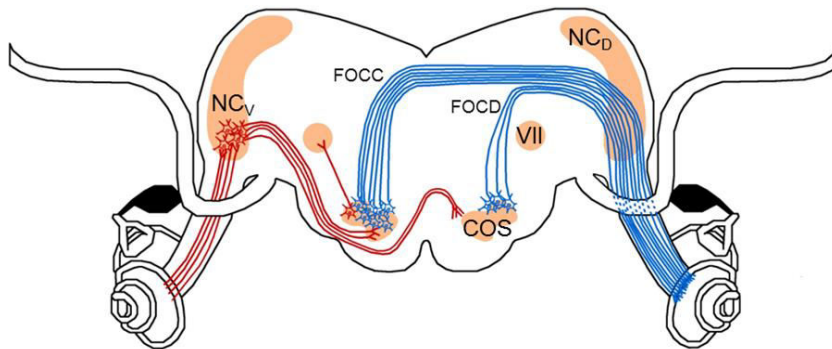


Figure I13. Voies nerveuses du réflexe olivo-cochléaire. Les voies afférentes sont représentées en rouge, les voies efférentes en bleu. NC_D : noyau cochléaire dorsal; NC_V : noyau cochléaire ventral ; COS : complexe olivaire supérieur; VII : noyau du nerf facial; FOCC : fibres olivo-cochléaires croisées; FOCD : fibres olivo-cochléaires directes. Source : INRS.

L'activation du réflexe de l'oreille interne (ROI) provoque des modifications de compliance de l'organe de Corti car il modifie la configuration des CCE et permet d'ajuster le gain de l'amplificateur cochléaire à la fréquence caractéristique. Ceci provoque l'augmentation de la résonance des CCE, et par conséquent, la diminution du seuil des stimulations des fibres afférentes de type I.

2.2.7.2 Réflexe de l'oreille moyenne

Le réflexe de l'oreille moyenne (ROM) se manifeste par la contraction de deux muscles situés dans la cavité de l'oreille moyenne : le **muscle stapédien**, qui s'insère sur l'étrier, et le **muscle tenseur tympanique** sur le marteau (Fig. I14). Chez l'Homme, le muscle stapédien est le seul impliqué dans le ROM, tandis que chez le rat, les deux muscles participent de façon équivalente (van den Berge et al., 1990). La contraction du muscle tenseur du tympan permet, comme son nom l'indique, de tendre la membrane tympanique tandis que la contraction du muscle stapédien contrarie les mouvements de l'étrier, ce qui limite la pression de la platine de l'étrier sur la fenêtre ovale. Les deux contractions diminuent ainsi l'énergie de la vibration transmise à la cochlée. L'atténuation dépend de la fréquence ; chez le rat, le ROM s'active dans les fréquences inférieures à 10 kHz avec une efficacité maximale à 1000 Hz (Lieberman and Guinan, 1998; Pilz et al., 1997).

La voie neuronale afférente de l'arc réflexe impliqué dans le ROM utilise les neurones auditifs primaires jusqu'aux noyaux cochléaires ventraux (Fig. I14). Les voies connectées au tenseur tympanique ont pour origine le noyau moteur du nerf trigéminal. Les connexions entre les voies afférentes et les voies efférentes ne sont pas bien connues mais on pense qu'il s'agit de connexions directes et croisées (Billig et al., 2007). La voie efférente du réflexe stapédien utilise les neurones provenant du noyau du nerf VII. Les connexions entre les voies afférentes et efférentes s'effectuent également de manière directe et croisée, par l'intermédiaire d'interneurones qui connectent le complexe olivaire supérieur (Borg, 1973; Venet et al., 2011). Les projections croisées des deux voies efférentes permettent une activation bilatérale du ROM en réponse à une stimulation ipsilatérale et/ou contralatérale de forte intensité (autour de 80 dB chez l'Homme).

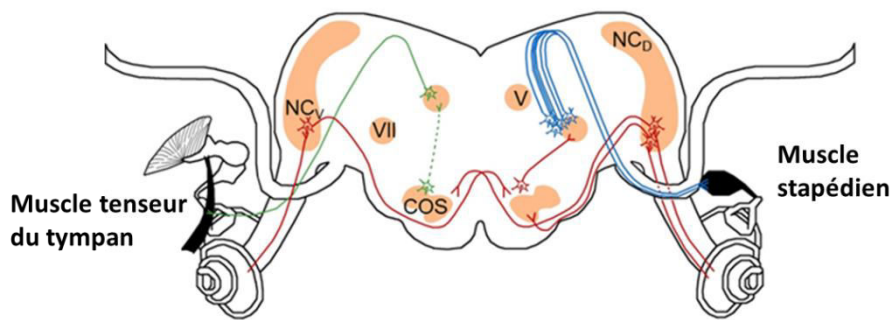


Figure I14. Schéma des voies nerveuses du réflexe de l'oreille moyenne. Les voies afférentes sont représentées en rouge, les efférentes qui innervent le muscle stapédien sont en bleu et les voies efférentes spécifiques du muscle tenseur du tympan sont les lignes continues en vert. La ligne verte en pointillés symbolise les connexions nerveuses entre les voies afférentes et efférentes du muscle tenseur du tympan mais, actuellement, elles ne sont pas encore bien identifiées. NC_D : noyau cochléaire dorsal; NC_V : noyau cochléaire ventral; COS : complexe olivaire supérieur; V : noyau moteur du nerf trigéminal ; VII : noyau du nerf facial. Source : INRS.

Indépendamment de la méthode de mesure utilisée, il est difficile de différencier les effets du muscle stapédien des effets du muscle tenseur tympanique qui participent au fonctionnement du ROM. Les latences sont rapides et proches : de 10 à 20 ms dans les intensités moyennes et de 6 à 10 ms dans les intensités de 110 à 120 dB chez le rat (Pilz et al., 1997; Van den Berge et al., 1990). De plus, ces muscles ont une forte résistance à la fatigue et sont principalement innervés par des fibres rapides (Van den Berge and Van der Wal, 1990; Van den Berge and Wirtz, 1989a, 1989b). Ces particularités donnent au ROM un rôle de protection de la cochlée particulièrement efficace contre les dommages causés par les bruits de forte intensité.

2.3 Système vestibulaire

L'**équilibre** est l'état de stabilité, c'est la fonction neurosensorielle qui régit les relations avec le monde physique et permet d'assurer et d'adapter tous les mouvements de façon à évoluer sans heurt dans l'environnement. L'équilibre est une organisation sensorielle complexe qui implique la communication entre le **système vestibulaire**, le **système visuel** et le **système proprioceptif** (Khan and Chang, 2013). L'équilibre résulte donc de l'intégration de trois sources d'information, ce qui fait qu'une discordance entre ces informations peut donner naissance à divers problèmes.

Le **système vestibulaire** est l'organe spécifique, mais non exclusif, de la fonction d'équilibre. Il est composé de trois parties : l'**appareil sensoriel périphérique**, un **intégrateur central** et un **mécanisme effecteur**. L'appareil périphérique consiste en un groupe de capteurs qui envoient au SNC des informations relatives à la vitesse angulaire et l'accélération linéaire de la tête. Le SNC traite ces signaux et les combine avec d'autres informations sensorielles pour estimer l'orientation du sujet dans l'espace. Le système vestibulaire central répond par le biais de réflexes qui mettent en jeu les muscles oculaires et la moelle épinière. Ce système est donc un composant essentiel dans la production de réponses motrices qui sont cruciales pour le fonctionnement quotidien et la survie.

2.3.1 Labyrinthe vestibulaire périphérique

Le système vestibulaire périphérique est présent chez tous les vertébrés et se trouve dans l'os temporal ; il fait partie intégrante de l'oreille interne (Fig. I1). Il comporte, comme la cochlée, un labyrinthe membraneux entouré d'un labyrinthe osseux.

De même que dans la cochlée, entre le labyrinthe membraneux et le labyrinthe osseux, on trouve un espace qui contient la **pérlimph**, dont la composition est faible en K^+ (7 mM) et élevée en Na^+ (150 mM). Le labyrinthe membraneux est rempli d'**endolymphe**, dont la composition est élevée en K^+ (150 mM) et faible en Na^+ (16 mM). Elle entoure les récepteurs sensoriels spécialisés du système vestibulaire.

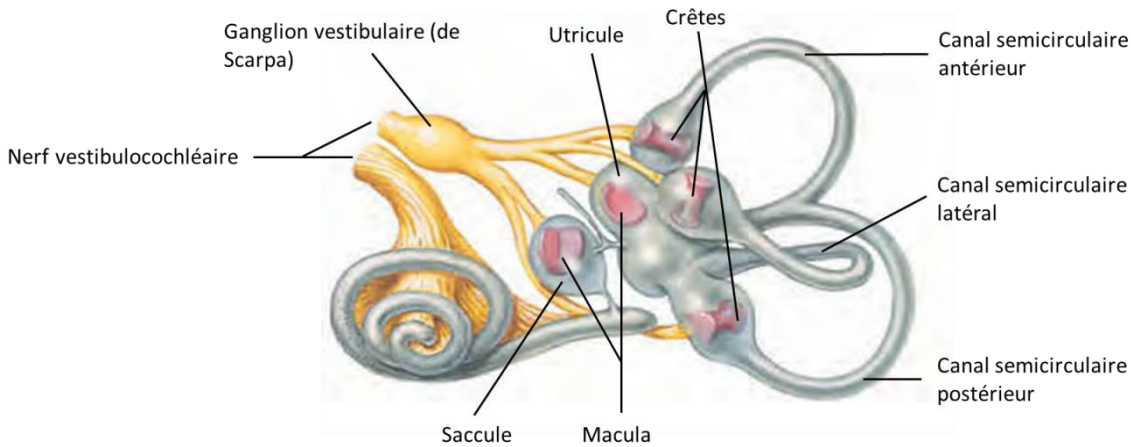


Figure I15. Labyrinthe membraneux et ses différentes parties. L'appareil vestibulaire est formé de trois canaux semi-circulaires, l'utricule et le saccule. Source : image adaptée de Atlas de neurosciences. Felter et Shetty.

Les récepteurs vestibulaires se trouvent dans des régions spécialisées du labyrinthe membraneux. Ce labyrinthe membraneux contient deux structures aux fonctions différentes (Fig. I15) : les **canaux semi-circulaires** et les **organes otolithiques** (utricule et saccule). Au total, il y a cinq **épithéliums sensoriels** vestibulaires dans chaque oreille : trois **crêtes** et deux **maculas**, la macula de l'**utricule** et la macula du **saccule**. Les deux labyrinthes vestibulaires sont des structures présentant une symétrie axiale et sont localisés dans chaque oreille. Les fonctions des cinq organes récepteurs vestibulaires de l'oreille interne sont complémentaires car chaque canal semi-circulaire et chaque organe otolithique possède une orientation spatiale différente, permettant ainsi d'avoir une sensibilité maximale aux mouvements dans tous les plans tridimensionnels de l'espace.

Sur ces épithéliums sensoriels, on trouve les **cellules ciliées vestibulaires**, les récepteurs sensoriels du système vestibulaire.

Les cellules réceptrices de chaque organe vestibulaire sont innervées par des **fibres afférentes primaires** qui s'unissent à celles de la cochlée pour former le **nerf vestibulo-cochléaire (VIII)** (Fig. I24). Les corps cellulaires des neurones afférents vestibulaires se trouvent dans le **ganglion vestibulaire (ganglion de Scarpa)** (Fig. I15). Les prolongations centrales de ces cellules bipolaires entrent dans le tronc cérébral et se terminent dans les noyaux vestibulaires et dans le cervelet. De plus, le système reçoit également des **fibres efférentes** vestibulaires du tronc cérébral.

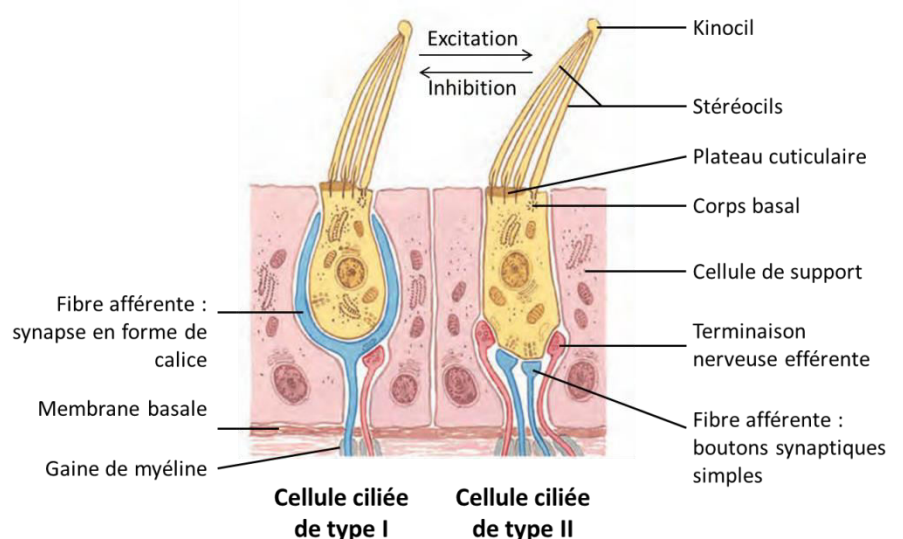
2.3.2 Cellules ciliées vestibulaires et innervation

Les récepteurs de l'équilibre sont des cellules épithéliales modifiées, appelées **cellules ciliées vestibulaires**, qui sont responsables de la transformation des accélérations de la tête en signaux électriques. De même que dans la cochlée, chaque cellule ciliée du labyrinthe vestibulaire contient sur sa surface apicale un faisceau de cils, les stéréocils (environ 50-100), qui transduisent les stimulations mécaniques en potentiels récepteurs (Fig. I16). Cependant, dans le vestibule, l'un des stéréocils est plus grand que les autres : il est appelé **kinocil**. C'est un cil non mobile constitué de 9+2 microtubules (Oghalai and Brownell, 2012). Les stéréocils sont disposés en rangées de hauteur croissante, les plus longs étant les plus proches du kinocil et les plus courts les plus éloignés. Les stéréocils de chaque cellule sensorielle sont distribués de façon hexagonale sur la surface, avec le kinocil disposé dans un coin. Tous les cils, excepté le kinocil qui est en contact direct avec le cytoplasme, proviennent d'une région rigide dense en actine, la plaque cuticulaire, qui est située à l'extrémité apicale de la cellule. Les *tip-links* connectent la pointe du stéréocil le plus court au corps du stéréocil adjacent qui est plus grand (Oghalai and Brownell, 2012) et, par conséquent, tous les cils sont unis entre eux par des ponts de protéines qui interviennent dans le mécanisme de transduction. Dans ces cellules, les cils sont en contact avec l'endolymphe alors que la base de la cellule est entourée de périlymphe. Les cellules ciliées du système vestibulaire périphérique sont **innervées par des fibres afférentes et efférentes**.

2.3.2.1 Types de cellules ciliées

L'épithélium vestibulaire contient deux types de cellules ciliées de morphologie différente (Fig. I16), les **cellules ciliées de type I** et les **cellules ciliées de type II**.

Figure I16. Structure et innervation des deux types de cellules ciliées. Source: image adaptée de Atlas de neurosciences. Felter and Shetty.



Les deux types de cellules ciliées sont **morphologiquement différents**. Les cellules ciliées de type I ont un corps cellulaire qui se rétrécit à l'apex (Ricci et al., 1997), qui prend la forme d'une bouteille et ont leur noyau en position basale. Les cellules ciliées de type II sont cylindriques avec le noyau en position médiane (Fig. I16).

Ces deux types de cellules se différencient aussi par leur **innervation**. Les axones périphériques des cellules de type I perdent leur gaine de myéline avant de pénétrer dans la base du neuroépithélium et entourent toute la zone basolatérale en créant ainsi une synapse en forme de **calice**, unique dans le système nerveux (Bonsacquet et al., 2006; Dalet et al., 2012). Les cellules de types II sont, quant à elles, innervées par des **boutons synaptiques simples** (Fig. I16).

Chaque **fibre afférente** peut innerver une ou plusieurs cellules sensorielles, aussi bien de type I que de type II. Cependant, on peut trouver des terminaisons afférentes appelées de type **calice seul** (*calyx-only afferent*), **bouton seul** (*bouton-only afferent*) ou former des terminaisons des deux types, connues sous le nom de **dimorphiques** (*dimorphic afferent*) (Fig. I17). Les deux types de cellules ont également des connexions efférentes qui arrivent du noyau vestibulaire pour moduler leur sensibilité.

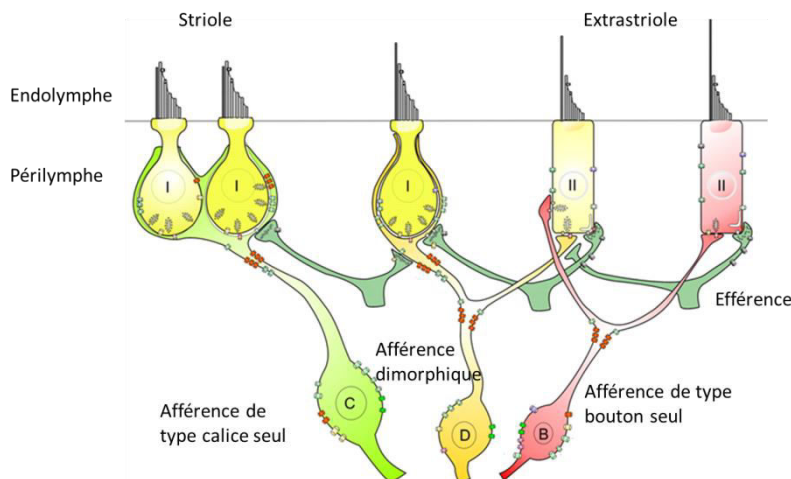


Figure I17. Schéma de l'épithélium vestibulaire montrant la classification des neurones afférents par la morphologie de la terminaison nerveuse comme les afférences de type calice seul (C), dimorphique (D) ou bouton seul (B) et localisation et distribution préférentielle des types de cellules ciliées le long de l'épithélium. Source : image adaptée de Eatock et al., 2008.

Les différents types de cellules ciliées se disposent de manière inégale le long de l'épithélium vestibulaire. Les cellules ciliées de type I avec des afférences de type calice seul se trouvent exclusivement dans la zone striolaire, qui est la plus au centre de l'épithélium, tandis que les types II sont plus abondants dans la zone extra-striolaire, zone périphérique de l'épithélium (Fig. I17). Dans la zone péristriolaire, on retrouve majoritairement les cellules ciliées de type I avec des afférences dimorphiques.

Les cellules ciliées sont encapsulées par des **cellules de soutien** qui s'étendent de la membrane basale à la surface apicale (Fig. I18). Elles contiennent une membrane réticulaire dans la zone apicale qui connecte étroitement les cellules adjacentes afin de maintenir une séparation entre les espaces endolymphatique de périlymphatique. Ces cellules présentent de nombreuses microvillosités à leur surface.

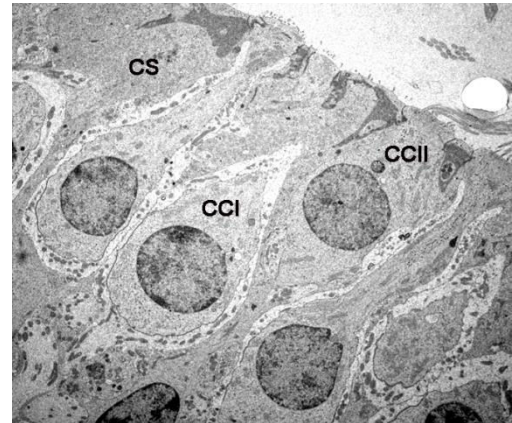


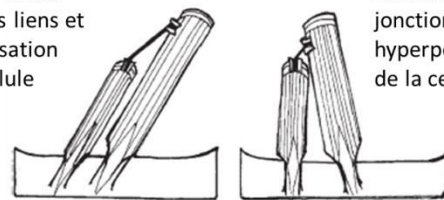
Figure I18. Image de microscopie électronique en transmission d'une crête de rat où l'on observe des cellules de soutien (CS) et les deux types de cellules ciliées : cellules ciliées de type I (CCI) et cellules ciliées de type II (CCII). Source : image adaptée de Seoane et al., 2001.

2.3.2.2 Mécanisme de transduction

Comme les cellules ciliées de la cochlée, les cellules ciliées vestibulaires sont polarisées. Cette disposition permet aux cellules de répondre de manière différente aux inclinaisons des cils en fonction des directions. Les compositions des deux liquides font que la cellule située à l'extérieur de la membrane apicale a une concentration élevée en ions K^+ et faible en ions Na^+ , et le contraire du côté de la membrane basale.

De la même manière que pour les cellules ciliées de la cochlée, quand les stéréocils se penchent vers le kinocil, le déplacement des *tip-links* provoque l'ouverture des canaux cationiques situés à la pointe des stéréocils, et dépoliarise la membrane cellulaire

Ouverture des jonctions liens et dépoliarisation de la cellule



Fermeture des jonctions liens et hyperpolarisation de la cellule

Figure I19. Fonctionnement des jonctions liens au sommet des stéréocils. Source : image adaptée de Khan and Chang, 2013.

(Fig. I19). Ceci stimule la libération de neurotransmetteurs excitateurs (**glutamate**) entre les cellules présynaptiques et les fibres afférentes des neurones ganglionnaires vestibulaires. A l'inverse, quand les cils s'inclinent dans une direction opposée au kinocil, la tension des jonctions ferme les canaux de façon mécanique, ce qui provoque l'hyperpolarisation de la cellule ciliée et réduit la libération des neurotransmetteurs. De cette manière, la fréquence des potentiels d'action dans les neurones sensoriels qui innervent les cellules ciliées donne une information sur la direction des mouvements de la tête. Les cellules ciliées présentent également un mécanisme d'adaptation qui joue sur l'ajustement des ponts protéiques de manière continue.

2.3.2.3 Innervation des cellules ciliées vestibulaires

Les organes vestibulaires sont innervés par les **fibres efférentes** qui proviennent du tronc cérébral (Gacek 1982; Schwartz and Ryan 1986). Les terminaisons efférentes forment des contacts synaptiques avec les deux types de cellules ciliées (Fig. I17) (Iurato et al., 1972; Smith and Sjostrand, 1968). Le système efférent permet le contrôle de l'information vestibulaire et, par conséquent, le maintien de l'équilibre postural. Ces fibres peuvent étendre la plage dynamique des fibres afférentes lors de fortes accélérations (Blanks and Precht, 1978). Elles peuvent également servir de signaux inhibiteurs en cas de stimulus sensoriel de forte intensité et de longue durée (Goldberg and Fernández, 1980).

En ce qui concerne le **système afférent**, les corps cellulaires des neurones vestibulaires primaires, qui établissent des contacts avec les cellules ciliées, se trouvent dans le **ganglion de Scarpa**, situé à proximité des épithéliums sensoriels. Dans la membrane de la cellule qui établit des synapses en calice, on trouve une union intercellulaire, rare chez les vertébrés, appelée « **jonction calicelle** », qui fournit un soutien structural au contact synaptique afférent du calice vers les cellules ciliées vestibulaires de type I.

2.3.3 Epithéliums vestibulaires

Comme évoqué précédemment, on trouve cinq **épithéliums sensoriels vestibulaires** dans chaque oreille : trois **crêtes**, un **utricle** et un **sacculé**, formés d'une couche de cellules ciliées et de cellules de soutien.

Les trois canaux semi-circulaires sont connectés à l'utricle qui rejoint le sacculé, lequel est connecté à la cochlée par le *ductus reuniens*, ce qui permet la circulation de l'endolymphe entre les deux organes (Fig. I15).

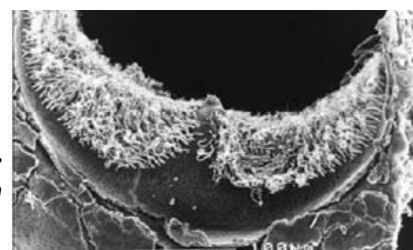


Figure I20. Image de microscopie électronique à balayage de la crête d'un rat. Image : Llorens et al., 1998.

2.3.3.1 Canaux semi-circulaires

Les **canaux semi-circulaires** sont orientés dans des plans perpendiculaires entre eux, ce qui permet de détecter les mouvements rotatoires de la tête dans les trois plans de l'espace (Fig. I15). Les **canaux semi-circulaires antérieur et postérieur** sont les deux canaux qui se trouvent en position verticale formant un angle de presque 45° avec le plan sagittal de la tête. Le troisième est le **canal semi-circulaire horizontal, ou latéral**, qui est incliné d'environ 30° par rapport au plan horizontal de la vue. Le canal antérieur détecte le mouvement d'avant en arrière, comme lorsque nous hochons la tête ou effectuons un saut périlleux avant. Le canal postérieur détecte l'inclinaison de la tête sur les côtés, comme lorsque nous penchons la tête sur l'épaule ou effectuons un saut périlleux sur le côté. Le conduit latéral détecte la rotation de la tête d'un côté à l'autre sur un axe vertical, par exemple pour dire «non» de la tête ou lorsque nous tournons sur nous-même.

La partie renflée de chaque canal s'appelle l'**ampoule**. On y trouve une protubérance appelée **crête** qui sert de neuroépithélium sensoriel car il contient les cellules ciliées, environ 7000 chez l'Homme, et les cellules de soutien (Fig. I30). Ces cellules sont couvertes par une masse gélatineuse de mucopolysaccharides et kératine, la **cupule**, qui a une densité supérieure à celle de l'endolymphe et fait le lien entre la crête et le sommet de l'ampoule (Fig. I21).

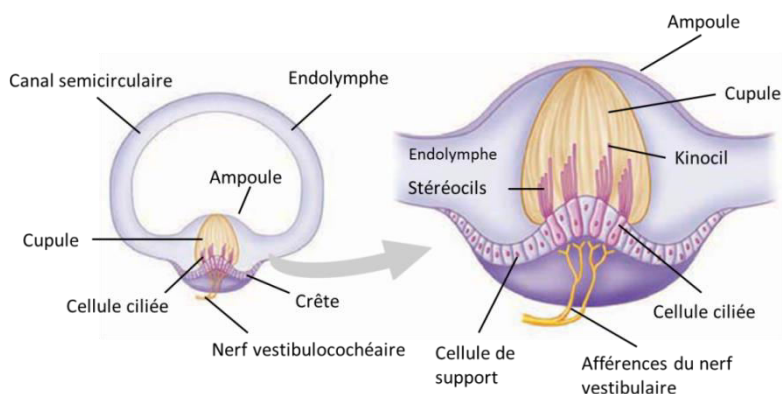


Figure I21. Anatomie fonctionnelle des canaux semi-circulaires. Source : image adaptée de Principios de Fisiología humana. Stanfield.

Les cils des cellules ciliées se dressent verticalement dans la cupule. Dans les trois crêtes, les cellules sont orientées de façon à ce que tous les cils évoluent dans la même direction. Ainsi, quand la cupule bouge, toutes les cellules ciliées de la crête s'inclinent dans la même direction. Les kinocils du canal latéral sont orientés vers l'utricule, tandis que les kinocils des autres canaux sont dirigés dans le sens opposé (Khan and Chang, 2013).

La **fonction des canaux semi-circulaires** est de détecter l'accélération ou la décélération rotatoire de la tête. Les canaux sont remplis d'endolymphe qui, lors d'une accélération

angulaire de la tête, bouge et produit des déplacements qui dévient la cupule. En conséquence, les cils s'inclinent dans la direction opposée à la rotation.

Quand la tête est au repos, aucune force ne s'applique sur la cupule, les stéréocils restent donc dressés et les cellules ciliées sont dépolarisées, ce qui produit des potentiels d'action peu fréquents dans les neurones associés (Fig. I22A). Quand la tête tourne, les parois du labyrinthe bougent, mais le liquide a tendance à rester en place à cause de l'inertie. Dans les ampoules, la résistance de l'endolymphe incline la cupule et ses cellules ciliées dans la direction opposée à celle de la rotation de la tête. Si la rotation provoque l'inclinaison des cils dans une direction opposée au kinocil, la cellule ciliée s'hyperpolarise et la fréquence des potentiels d'action diminue (Fig. I22B). Par contre, si les cils s'inclinent vers le kinocil, les cellules se dépolarisent davantage et la fréquence des potentiels d'action augmente (Fig. I22C). Si la rotation continue avec une vitesse constante, sans accélération, la cupule revient en position verticale et le potentiel de la membrane retourne à la normale, comme quand la tête est au repos (Fig. I22A). Quand la rotation s'arrête, l'inertie de l'endolymphe fait que la cupule se courbe dans la direction opposée, c'est-à-dire qu'elle se déplace dans la même direction que le mouvement de la tête, ce qui génère une sensation temporaire de tournis.

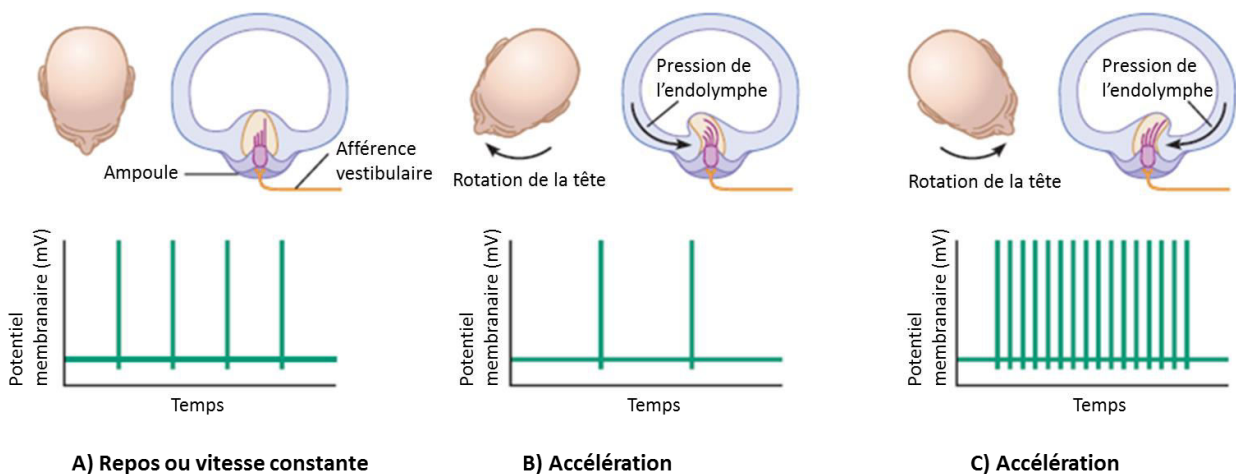


Figure I22. Réponse des canaux semi-circulaires latéraux aux mouvements de rotation de la tête dans le plan horizontal. (A) Tête au repos ou rotation à vitesse constante, aucune force ne joue sur la cupule et les cils restent dressés. (B) Accélération de la tête, l'inertie du liquide pousse la cupule dans la direction opposée de la rotation et les cils s'inclinent, ce qui provoque l'hyperpolarisation de la cellule. (C) Accélération de la tête dans la direction opposée, les cils s'inclinent, ce qui polarise la cellule. Image : adaptée de Principios de Fisiología humana. Stanfield.

Chaque canal semi-circulaire travaille en association avec celui qui se trouve du côté opposé de la tête et dont les cellules ciliées sont orientées de façon contraire. Ainsi, les canaux semi-circulaires se trouvant dans le même plan fonctionnent par paires. La rotation de la tête induit des messages opposés dans chaque canal apparié. Les cellules ciliées d'un canal s'excitent tandis que celles de l'autre canal s'inhibent.

L'information qui vient des canaux semi-circulaires est utilisée pour contrôler **les mouvements oculaires**, ce qui sera développé par la suite.

2.3.3.2 Organes otolithiques

Il existe deux **organes otolithiques**, l'**utricule** (Fig. I23A) et le **sacculé** (Fig. I34B), qui sont situés entre les canaux semi-circulaires et la cochlée.

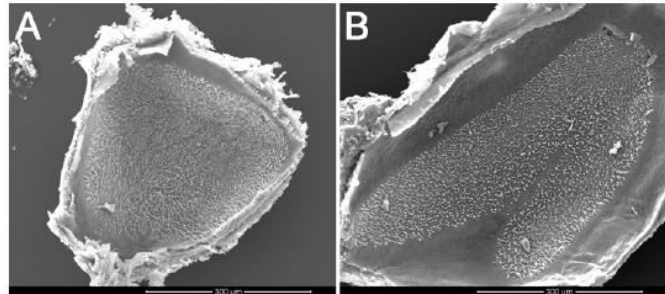


Figure I23. Microscopie électronique à balayage des organes otolithiques de rat. (A) Utricule. (B) Sacculé. Source: Thèse de Lara Sedó Cabezón, 2014.

Chaque organe otolithique contient un épithélium sensoriel, appelé **macule**, qui est orienté verticalement pour le sacculé et horizontalement pour l'utricule. La macule contient les cellules ciliées, dont les cils sont couverts d'une masse gélatineuse de mucopolysaccharides et des cellules de soutien. L'utricule humain contient environ 30 000 cellules ciliées, tandis que le sacculé en contient environ 16 000.

La masse gélatineuse de la macule contient de minuscules cristaux inorganiques de carbonate de calcium appelés **otoconies** (Fig. I24) (le terme provient du grec qui signifie « pierre de l'audition »). Dans l'ensemble, la masse gélatineuse et ses otoconies sont connues sous le nom de **membrane otolithique** (Fig. I25). Les otoconies augmentent la densité de la membrane, ce qui lui donne de l'inertie lors d'une accélération.

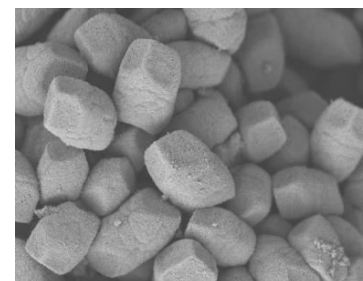


Figure I24. Image de microscopie électronique à balayage des otoconies de l'utricule de rat (1-5 μm de diamètre).

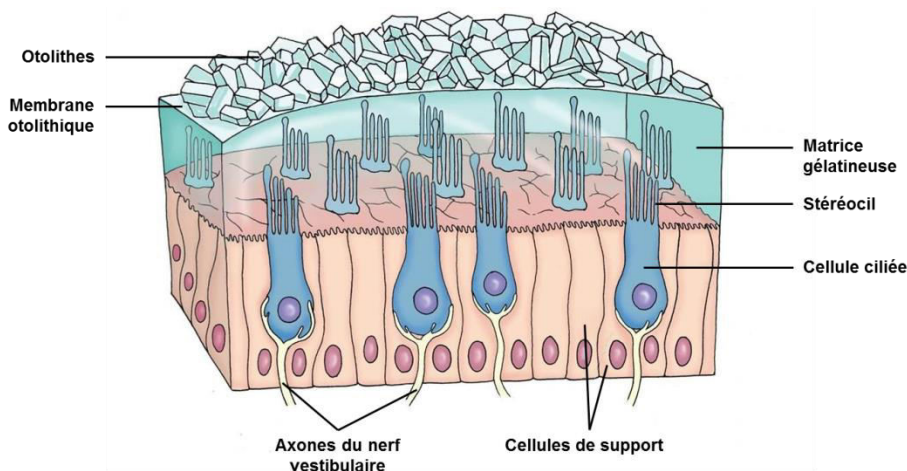


Figure I25. Macule. Epithélium sensoriel avec les cellules ciliées et les cellules de soutien couvertes par la matrice gélatineuse et sur laquelle reposent les otoconies. Source : Image adaptée de Wolters Kluwer Health. Lippincott Williams and Wilkins.

Les cellules ciliées sont disposées de manière ordonnée dans les organes otolithiques. Ceux-ci ne sont pas tous orientés dans la même direction avec un agencement des cellules différent au centre des macules, de part et d'autre d'une ligne imaginaire dite **striole** (Fig. I26). Dans l'utricule, le kinocil et les stéréocils des cellules ciliées sont orientés vers la striole, alors que dans le saccule, ils sont dans la direction opposée. C'est à cause de la forme courbe de la striole qu'on trouve des cellules orientées dans toutes les directions.

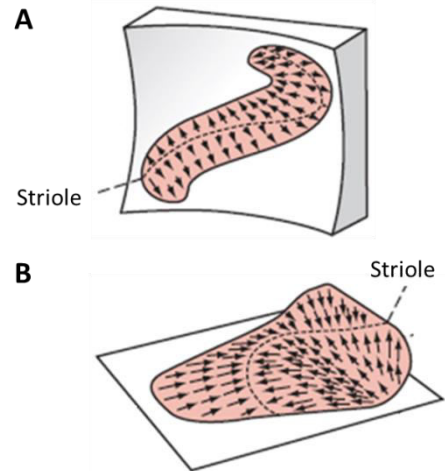


Figure I26. Polarisation fonctionnelle des cellules ciliées dans les organes otolithiques. (A) Saccule. (B) Utricule. Source : image adaptée de Berne y Levy. Fisiología. Koeppen and Stanton.

Cette distribution indique qu'il existe divers modes d'excitation des cellules qui dépendent du degré d'inclinaison de la tête (Khan and Chang, 2013). Le mouvement peut stimuler un groupe de cellules ciliées tout en inhibant un autre groupe sans avoir d'effet sur un troisième groupe (Tascioglu, 2005). Le SNC analyse les polarisations des cellules pour déterminer la position de la tête et la direction du mouvement.

La **fonction des organes otolithiques** est de capter les accélérations linéaires de la tête et de répondre aux forces gravitationnelles. La structure de ces organes permet aussi bien de percevoir les déplacements statiques causés par l'inclinaison de la tête par rapport à l'axe gravitationnel, que les déplacements transitoires causés par les mouvements de translation de la tête. A cause de l'orientation des cils dans la membrane otolithique, l'utricule détecte l'accélération vers l'avant et vers l'arrière, tandis que le saccule la détecte de haut en bas (force gravitationnelle).

Lorsque la tête se déplace par rapport à l'axe de gravité, les otoconies se déplacent en entraînant l'endolymphe environnant (Fig. I27). Ce mouvement dévie la masse gélatineuse qui couvre la macule et incline les cils des cellules ciliées. Cependant, l'adaptation est une propriété physiologique importante de la macule, ce qui signifie que si la tête reçoit un stimulus pendant quelques secondes, les cellules reviennent en position normale (Khan and Chang, 2013).

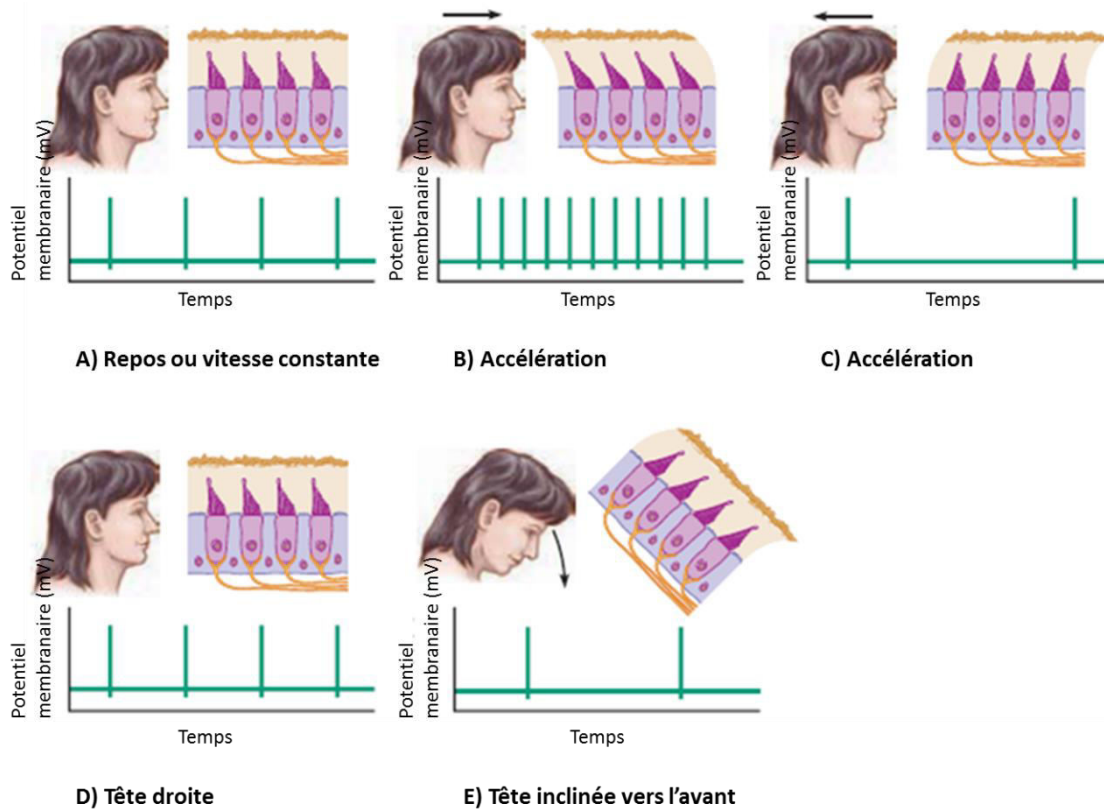


Figure 127. Réponse de l'utricule aux accélérations linéaires de la tête ou à l'inclinaison. (A) Tête au repos ou mouvement constant, aucune force appliquée sur les otoconies et les stéréocils sont droits. (B) Accélération vers l'avant, les stéréocils s'inclinent dans la direction opposée au mouvement. (C) Accélération vers l'arrière, les stéréocils s'inclinent en direction opposée au mouvement. (E, F) Effet de la gravité sur l'utricule. Source : image adaptée de Principios de Fisiología humana. Stanfield.

2.3.4 Voies vestibulaires centrales

L'information générée par les différentes structures sensorielles périphériques se transmet via les fibres afférentes qui entrent dans le tronc cérébral, par le **nerf vestibulo-cochléaire** et est dirigée vers quatre **noyaux vestibulaires** (supérieur, inférieur, médian et latéral) ou, parfois, va directement jusqu'au **cervelet** afin de fournir une information immédiate (Fig. I28). Les noyaux vestibulaires sont les intégrateurs primaires d'entrée vestibulaire et forment des connexions directes et rapides entre les neurones avec l'information afférente et les neurones moteurs efférents. Le cervelet est l'intégrateur adaptable, qui supervise le fonctionnement vestibulaire et réajuste le processus vestibulaire central si nécessaire. L'équilibre corporel est maintenu grâce à l'information provenant des récepteurs vestibulaires, des récepteurs proprioceptifs et des récepteurs visuels. Par conséquent, les noyaux vestibulaires reçoivent également des afférences d'autres systèmes.

A partir de ces noyaux, les informations sur la position et le mouvement de la tête sont distribuées aux différentes zones du **cortex cérébral** par le thalamus. Les noyaux vestibulaires sont également dirigés vers les **noyaux des muscles extra-oculaires** qui contrôlent le mouvement des yeux, vers les **motoneurones spinaux** qui contrôlent les réflexes posturaux et vers le **cervelet**.

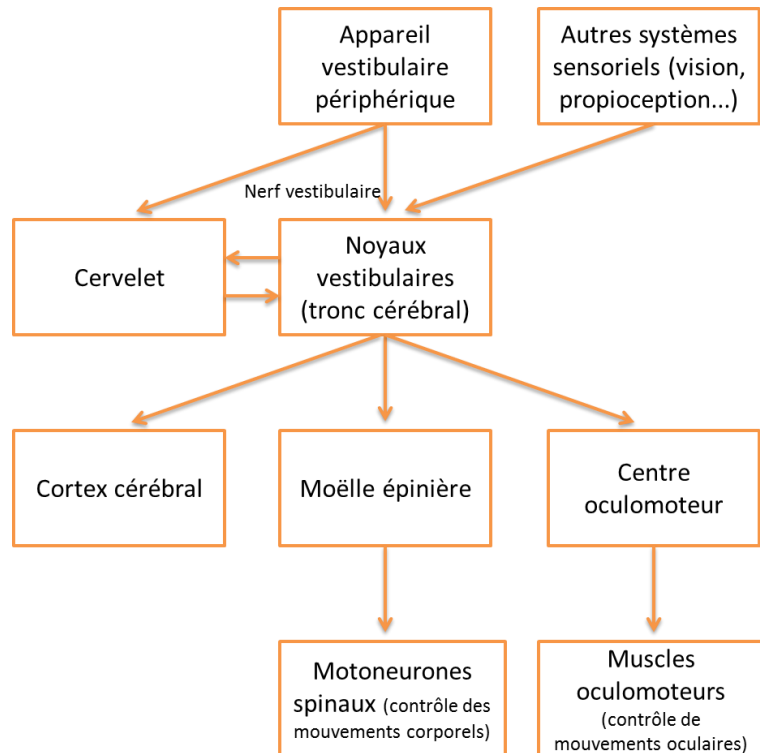


Figure 128. Voies neuronales associées au système vestibulaire et impliquées dans le maintien de l'équilibre.

2.3.5 Réflexes vestibulo-oculaire

Le réflexe vestibulo-oculaire (RVO) correspond aux mouvements oculaires compensatoires résultant d'une stimulation des organes vestibulaires, aussi bien des crêtes que des macules. La fonction du RVO est de maintenir la position des yeux dans l'espace indépendamment de la position de la tête, permettant ainsi d'avoir une vision stable pendant les mouvements. Afin d'obtenir une image stable sur la rétine, le RVO produit un mouvement des yeux qui est de même amplitude mais opposé au mouvement de la tête. C'est l'un des réflexes les plus rapides du corps humain (environ 10 ms). Ce réflexe intervient dans l'obscurité bien que son objectif principal soit d'assurer la stabilité des images sur la rétine.

Le RVO intervient dans toutes les directions et pour toutes les vitesses, aussi bien un mouvement rotatoire que linéaire ou les deux à la fois. Par conséquent, on trouve deux sortes de RVO (Crane et al., 1997; Paige 1991) :

1. le **RVO de rotation** qui compense la rotation de la tête et reçoit une afférence prédominante à partir des canaux semi-circulaires. Il existe trois types de mouvements oculaires induits par la rotation : les canaux semi-circulaires verticaux et le saccule sont responsables du contrôle des mouvements verticaux des yeux, tandis que les canaux latéraux et l'utricule sont responsables des mouvements horizontaux ; les canaux semi-circulaires verticaux et l'utricule sont également responsables des mouvements de torsion des yeux ;

2. le **RVO de translation** compense le mouvement linéaire de la tête et reçoit une afférence prédominante à partir des organes otolithiques.

Prenons comme exemple le **RVO horizontal**. Les fibres afférentes vestibulaires impliquées dans la voie du RVO forment des synapses dans les noyaux vestibulaires, principalement les médians et les supérieurs (Fig. I29), qui envoient l'information aux noyaux abducens (nerf facial VI) de manière bilatérale ; les neurones inhibiteurs (avec de la glycine ou GABA comme neurotransmetteur) sont projetés dans le même hémisphère tandis que les excitateurs (avec le glutamate comme neurotransmetteur) se projettent du côté opposé.

L'œil compte deux muscles importants impliqués dans ce réflexe, un de chaque côté du globe oculaire : le muscle droit médian qui se trouve du côté intérieur et le muscle droit latéral du côté extérieur. Ces muscles reçoivent des neurones inhibiteurs ou excitateurs (avec l'acétylcholine comme neurotransmetteur) afin de se contracter ou de se relâcher. Le noyau VI innerve et contrôle directement le muscle droit latéral et il est immédiatement projeté vers le noyau oculomoteur (III) opposé, par le biais du faisceau longitudinal médian (FLM), qui contrôle le muscle droit médian.

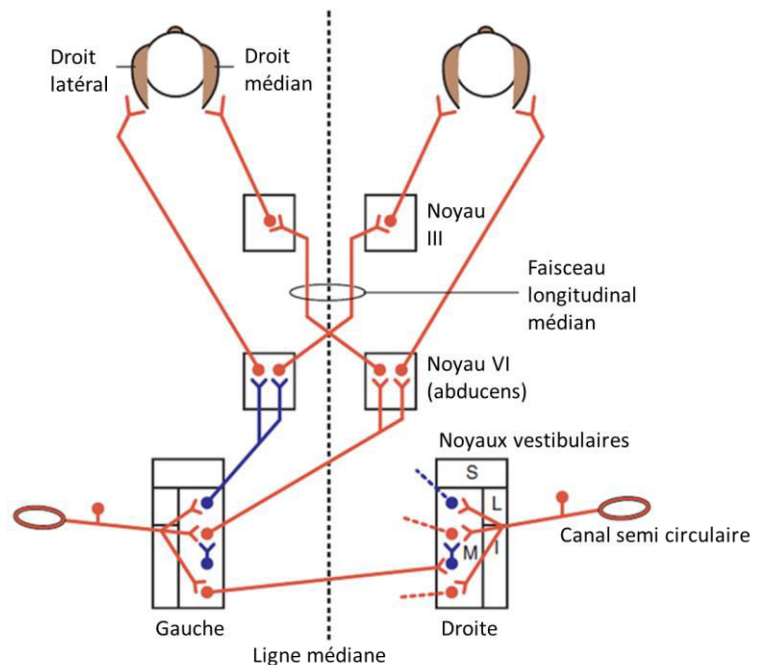


Figure I29. Circuits avec les connexions qui interviennent sur le réflexe vestibulo-oculaire. Les neurones excitateurs sont indiqués en rouge et les inhibiteurs en bleu. Source : image adaptée de Berne y Levy. Fisiología. Koeppe and Stanton.

2.3.5.1 Nystagmus

Quand le RVO est stimulé, les yeux bougent initialement dans la direction opposée au mouvement afin de maintenir une image stable sur la rétine : **phase lente**. Mais quand la stimulation est prolongée, c'est-à-dire, lors de grandes rotations de la tête si le corps tourne à 360°, les yeux arrivent à leur limite mécanique, la compensation n'est plus possible et l'image commence à se déplacer sur la rétine. Pour éviter ce phénomène, il se produit un mouvement rapide initié par le tronc cérébral, comme une saccade des yeux dans le sens opposé, afin de revenir dans la position initiale pour commencer l'observation de la scène, appelé **phase rapide** (Fig. I30). Ensuite, la phase lente, induit le RVO, recommence. C'est cette alternance de mouvements rapides et lents dans des sens opposés que l'on appelle le **nystagmus**. Nous pouvons donc définir le nystagmus comme un mouvement involontaire et rapide des globes oculaires, caractérisé par une succession rythmique et répétitive des mouvements des yeux, qui change alternativement de direction (Goddé-Jolly and Larmade, 1973).

On trouve différents types de nystagmus en fonction de leur origine. Le **nystagmus vestibulaire** est la réponse réflexe après une stimulation de l'appareil vestibulaire (Beaudoin and Weiss-Lambrou, 1984).

Quand la rotation s'arrête brutalement, l'inertie du liquide endolymphatique stimule les cellules ciliées dans le sens contraire de la rotation de la tête et produit un nystagmus en direction opposée à la rotation imposée (**nystagmus post-rotatoire**).

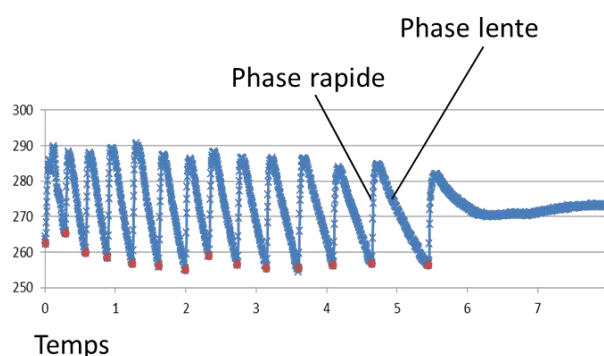


Figure I30. Mouvements oculaires pendant le nystagmus avec ses deux phases.

En plus d'apparaître de façon physiologique par la stimulation du RVO, le nystagmus peut apparaître à la suite de lésions du circuit vestibulaire, soit dans l'oreille interne (nystagmus périphérique), soit dans les centres nerveux (nystagmus central), et peut être utilisé comme outil clinique afin d'évaluer la fonction du système vestibulaire. C'est le signal le plus objectif pour identifier un trouble transitoire ou persistant de l'appareil vestibulaire, des lésions périphériques aux lésions centrales (Gabersek et al., 1963). Après une lésion vestibulaire, le RVO peut diminuer, mais à cause de la plasticité cérébrale, il peut revenir dans des conditions normales après quelques jours ou quelques semaines (Courjon et al., 1977; Paige 1983a, 1983b).

2.4 Bruit

Le **bruit** est un son généralement désagréable. Il se définit comme tout ce qui est pénible pour l'ouïe ou, plus particulièrement, comme tous les sons non désirables qui interfèrent dans la communication entre les personnes ou dans leurs activités.

L'être humain est exposé chaque jour au bruit (bruit au travail, bruit ambiant, bruit des loisirs, etc...). Ces sons sont normalement modérés et ne causent pas de dommages. Cependant, les bruits peuvent devenir préjudiciables en cas d'exposition de longue période et/ou de forte intensité. Le bruit peut avoir différents effets sur la santé : dommages physiologiques (perte auditive...), psychiques (stress, altérations du sommeil, diminution de l'attention, agressivité,...) et sociologiques (altérations de la communication, des performances,...).

2.4.1 Bruit et audition

L'exposition au bruit peut endommager l'oreille interne et produire des **pertes auditives neurosensorielles**, ce qui impacte la qualité de vie. La perte d'audition due au bruit est la seconde cause la plus commune de perte auditive, après la presbycusie.

Depuis de nombreuses années, beaucoup d'études ont porté sur l'évaluation des effets du bruit sur l'audition, aussi bien chez l'Homme (Hirsh and Ward, 1952; Mills et al., 1981, 1979) que chez l'animal de laboratoire (Campo et al., 2011; Mills, 1973a, 1973b; Subramaniam et al., 1991).

Les dommages et la perte auditive affectent les deux oreilles et peuvent être temporaires ou permanents. La nature du bruit (continu, impulsionnel ou intermittent), le temps d'exposition et son intensité déterminent l'amplitude des dégâts sur la cochlée. L'exposition au bruit impulsionnel provoque une lésion plus sévère sur la cochlée que l'exposition à un bruit continu de même énergie acoustique (Dieroff, 1976; Venet et al., 2015).

L'intensité sonore est mesurée comme un niveau de pression sonore (*sound pressure level*: SPL) sur une échelle logarithmique de décibels (dB). Pour une augmentation de 3 dB SPL, l'énergie sonore est multipliée par deux. En dessous de **80 dB SPL**, l'oreille humaine ne présente pas d'altération définitive (Puel et al., 1998). Quand l'intensité dépasse **90 dB SPL**,

des lésions irréversibles commencent à apparaître. Toutefois, la distance de la source sonore et le temps d'exposition au bruit restent des facteurs importants pour la protection de l'audition. D'après les résultats de nombreuses investigations, chez l'animal comme chez l'Homme, les recommandations d'exposition sonore ne doivent pas dépasser 85 dB SPL sur une période de 8 heures quotidiennes, sans quoi des dommages significatifs sur l'audition peuvent apparaître ("The National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Program: Noise and Hearing Loss," 1990). Les **valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP)** fixées respectivement en Europe et aux Etats Unis sont de 87 dB(A) et 90 dB(A). La **pondération A** est une pondération fréquentielle qui permet de calculer un niveau global représentatif de la sensibilité auditive humaine pour de faibles niveaux.

Les dommages sur le **récepteur auditif** sont nombreux. Un bruit continu peut provoquer une **fatigue auditive**, qui est un déficit auditif temporaire, où les éléments transducteurs ne souffrent pas de dégât définitif. C'est généralement le résultat d'une fatigue métabolique générée par des expositions sonores d'intensité modérée mais pendant une longue période. La fatigue conduit à l'apparition de différents phénomènes : vacuolisation des éléments post-synaptiques en-dessous des CCI (Liberman and Kujawa, 2017; Robertson, 1983; Ruel et al., 2007) (Fig. I31) ou dans les cellules ganglionnaires (Wang et al., 2002), raccourcissement de la racine des stéréocils qui se trouve dans la plaque cuticulaire (Nordmann et al., 2000) et génération de radicaux libres (Henderson et al., 2006). Récemment, il a été démontré que la perte synaptique entre les

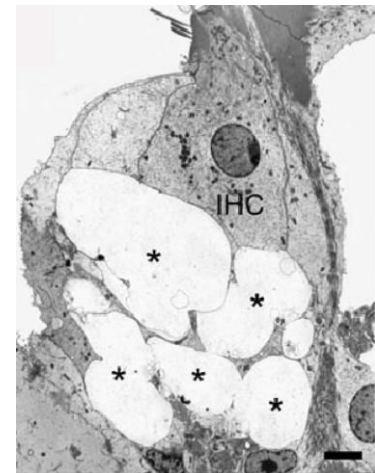


Figure I31. Phénomène d'excitotoxicité dans une cellule ciliée interne de la cochlée. Source : Liberman and Kujawa, 2017.

CCI et les neurones du ganglion spiral apparaît avant la perte cellulaire (Kobel et al., 2017; Liberman and Kujawa, 2017; Moser et al., 2013), ce qui est considéré comme un des principaux responsables des pertes auditives temporaires. Comme toute fatigue, le déficit auditif est temporaire si on accorde une période de repos métabolique.

Si l'exposition persiste, la fatigue peut se transformer en lésion irréversible de l'organe de Corti (Froymovich et al., 1995), on parlera alors de **perte auditive** (Fig. I32). Toutefois, la perte auditive peut apparaître également après une exposition brève mais de forte intensité. Les bruits impulsionnels produisent des dommages mécaniques sur les stéréocils comme des arrachements ou des fusions de stéréocils (Mulroy and Whaley, 1984), une perte des tip-links (Husbands et al., 1999; Zhao et al., 1996), ou une désorganisation des stéréocils (Liberman and

Dodds, 1987), ce qui est observé immédiatement après l'exposition et peut être irréversible en fonction de l'importance des dommages (Wang et al., 2002). Ces bruits peuvent aussi provoquer des lésions sur l'épithélium neurosensoriel de la cochlée. Les bruits continus, quant à eux, induisent des niveaux toxiques de radicaux libres et des changements physiologiques de la barrière hémato-labyrinthique (Ohlemiller et al., 1999; Suzuki et al., 2002). On peut trouver également une rupture précoce des unions cellulaires de l'épithélium sensoriel (Zheng and Hu, 2012). Certains auteurs parlent d'un collapsus des cellules de Hensen (Flock et al., 1999) ou d'une possible désorganisation de la membrane de Reissner (Mulroy et al., 1998; Wang et al., 2002). Tout ceci conduit à la **mort cellulaire des cellules ciliées** (Campo et al., 2014; Kurabi et al., 2017; Wang et al., 2002) et à la rupture mécanique des structures de la cochlée (Zenner et al., 1994). Chez les mammifères, quand une cellule ciliée disparaît, elle n'est pas régénérée.

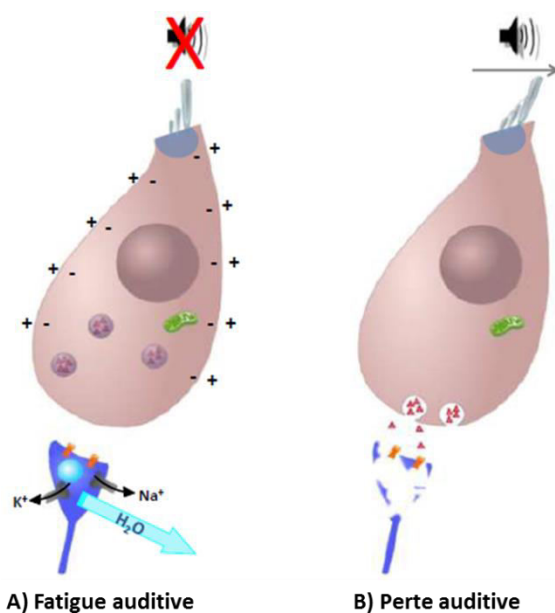


Figure 132. Réponse au son d'une cellule ciliée interne. (A) Après une exposition longue, quand le bruit s'arrête, l'eau accumulée dans les vacuoles entre la cellule ciliée et le neurone est libérée, et la cellule reste intacte = fatigue auditive. (B) Si le son continue, le contact entre la cellule ciliée et le neurone est rompu, provoquant une perte auditive, se terminant par la mort de la cellule. Source : INRS.

De même, au **niveau central**, on observe une hyperactivité du noyau dorsal cochléaire, du colliculus inférieur et du cortex auditif après une exposition sonore intense et prolongée (Kaltenbach and Afman, 2000; Komiya and Eggermont, 2000; Ma and Young, 2006).

2.4.2 Bruit et vestibule

L'effet du bruit sur le système vestibulaire a été beaucoup moins étudié et, par conséquent, on trouve moins de données bibliographiques que sur le système auditif. Toutefois, des auteurs ont établi une relation entre l'apparition de vertiges et le bruit d'une explosion (Habermann, 1890). Déjà dans les années 1900, Békésy observait des mouvements de la tête en réponse à des sons de forte intensité, mettant ainsi en évidence l'effet du bruit sur l'organe vestibulaire (Pahor, 1979; von Békésy, 1935). Plus tard, il a été découvert que le bruit affectait plus particulièrement le saccule à cause de sa position dans le labyrinthe vestibulaire. Enfin, des données histologiques ont révélé des dommages sur le neuroépithélium vestibulaire dus à certains types de bruits (Ylikoski, 1987; Ylikoski et al., 1988). Cependant, on trouve également quelques études qui ne confirment pas ces résultats (Pyykkö et al., 1989).

La proximité anatomique du labyrinthe vestibulaire et du système auditif, la ressemblance de la structure des cellules ciliées des deux systèmes et leur artère commune renforcent la possibilité qu'une exposition au bruit puisse provoquer un trouble vestibulaire en plus d'une perte auditive. Cependant, la membrane qui sépare l'utricule et les canaux semi-circulaires du reste du vestibule protège théoriquement la majorité des cellules sensorielles du système vestibulaire. Par conséquent, l'épithélium le plus exposé au bruit est le saccule (Cazals et al., 1983; Cassandro et al., 2003; McCabe and Lawrence, 1958). Les canaux semi-circulaires sont moins sensibles aux bruits impulsionnels que les organes otolithiques, en raison de la propagation symétrique de l'énergie à travers les canaux, ce qui provoque une différence de pression moins importante que dans les macules (Perez et al., 2002).

Il existerait deux mécanismes impliqués dans la destruction des organes vestibulaires liée au bruit : la destruction mécanique directe, ou la décompensation mécanique, qui provoque la dégénération des éléments sensoriels (Manabe et al., 1995; Oosterveld et al., 1982; Ylikoski, 1987). De plus, on trouve quelques neurones du noyau vestibulaire et fibres afférentes primaires sensibles au bruit de forte intensité (Murofushi et al., 1999, 1995). De même que dans la cochlée, la vulnérabilité du vestibule à l'exposition sonore dépend de différents facteurs comme le temps d'exposition, l'intensité, la durée et l'état des oreilles (Perez et al., 2002).

Des études ont montré que le système vestibulaire peut être stimulé par les sons, en particulier les sons riches en basses fréquences (Cazals et al., 1982; Halmagyi, 2005).

2.4.3 Bruits de basses fréquences

Le bruit de basses fréquences est un bruit qui se trouve dans la gamme audible des sons graves. Son onde sonore parcourt tout l'organe de Corti avant d'être discriminé à l'apex de la cochlée. Ce bruit est souvent généré par les bruits naturels et artificiels (bruit au travail, transport, moteurs, ...), ce qui fait que nous y sommes exposés quotidiennement. Chez l'Homme, les bruits de basses fréquences affectent différentes fonctions physiologiques, comme le système cardiovasculaire (Danielsson and Landstrom, 1985), nerveux (Landström, 1983), visuel, auditif et endocrinien (Waye et al., 2002).

Pour la transduction des basses fréquences, il n'existe pas, à l'apex de la cochlée, de processus d'amplification par les CCE. Toutefois, la sélectivité en fréquence reste aussi efficace qu'à la base car à l'apex la membrane basilaire peut discriminer deux longueurs d'onde différentes sans interférence, ce qui n'est pas le cas pour les fréquences élevées. On trouve également des différences anatomiques entre l'apex et la base : en se dirigeant vers l'apex, les stéréocils augmentent de taille et diminuent en rigidité (Wright, 1981a, 1981b) et l'union mécanique avec la membrane tectoriale est moins efficace (Lim and Freilich, 1981).

La **perte auditive** induite par le bruit de basses fréquences est particulière. Les déficits d'audition peuvent être localisés sur une gamme de fréquences plus étendue que celle induite par des bruits de moyennes et hautes fréquences (Burdick, 1982; Burdick et al., 1978). Par conséquent, la fonction auditive, chez l'Homme et chez l'animal, se trouve plus altérée par les bruits de basses fréquences que par les bruits de fréquence élevée (Subramaniam et al., 1991). Cependant, la nature des dommages cochléaires induits par ce type de bruit n'est pas bien décrite dans la littérature, bien que certaines études évoquent une désunion entre la membrane tectoriale et la membrane basilaire due à la perte de CCE (Zwislocki, 1984).

Chez l'Homme, l'exposition à des bruits de basses fréquences provoque des dommages de la **fonction vestibulaire** (Schust, 2004). Chez les souris exposées à de tel bruit, il a été observé une diminution du nombre de cellules ciliées vestibulaires, provoquant une détérioration de l'équilibre (Tamura et al., 2012). De plus, le saccule aurait la capacité de répondre à ces stimulations acoustiques (Jones et al., 2010).

2.5 Ototoxicité

Les ototoxiques sont des substances chimiques qui ont un effet nocif, réversible ou irréversible, dans l'oreille interne. Ils peuvent donc affecter l'audition et/ou l'équilibre. Le bruit est le principal facteur de risque pour la cochlée, mais ce n'est pas le seul. Comme évoqué précédemment, certaines **substances chimiques** peuvent aussi affecter les deux sens voire potentialiser l'effet du bruit (Campo et al., 2013; Chen et al., 2009).

2.5.1 Substances ototoxiques

Les **substances ototoxiques (cochléotoxiques et/ou vestibulotoxiques)** sont un groupe hétérogène de substances chimiques qui provoquent la détérioration de l'audition et/ou l'équilibre par différents modes d'action. Une centaine d'agents chimiques sont associés aux effets ototoxiques, incluant des grandes familles de produits chimiques comme les « solvants » ou les « pesticides ». Les premières données trouvées concernent des **médicaments** (Schacht and Hawkins, 2006). Les substances trouvées en milieu professionnel (**solvants organiques**, divers **métaux** et **asphyxiants**) présentent également des effets ototoxiques (Nies, 2012).

Comme évoqué plus haut, les substances ototoxiques peuvent causer des dommages aussi bien au **système vestibulaire** qu'au **système auditif**, mais une substance nocive pour l'un des deux systèmes ne l'est pas forcément pour l'autre (Lock and Harpur, 1992). La quantité d'informations disponibles sur la toxicité auditive est largement supérieure à celle concernant la toxicité vestibulaire, et beaucoup de travaux menés sur la cochlée restent inexplorés dans le vestibule (Sedó-Cabezón et al., 2014).

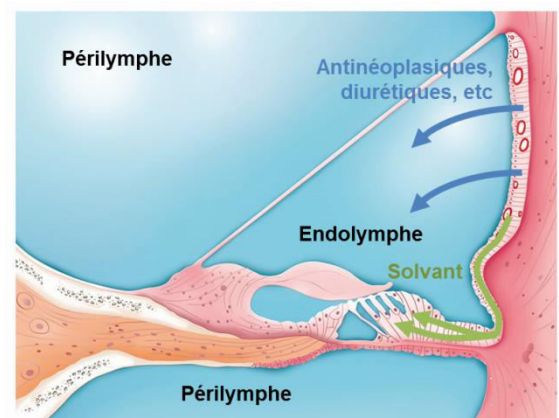


Figure I33. Voies d'intoxication de différents agents ototoxiques. Source : INRS.

La voie par laquelle les produits entrent dans la **cochlée** (Fig. I33) dépend des caractéristiques physico-chimiques de la substance. Après inhalation, une partie de ces substances passe dans le sang et traverse la barrière hémato-labyrinthique au niveau de la strie vasculaire. Les produits **hydrophiles**, comme les médicaments, passent et sont stockés dans l'endolymphe tandis que

les solvants, qui sont **lipophiles**, vont directement vers les cellules ciliées en empruntant les membranes phospholipidiques constituant le *sulcus* externe.

Les **solvants** sont connus pour leur effet neurotoxique, mais certains sont aussi ototoxiques. L'ototoxicité de ces solvants a été évoquée dans les années 60 (Lehnhardt, 1965), mais n'a pas été clairement démontrée avant la fin des années 80. Les résultats des différentes études, chez l'Homme et l'animal, indiquent que l'exposition aux **solvants industriels** peut avoir un effet néfaste sur l'audition et l'équilibre, provoquant une perte permanente de la sensibilité auditive et des troubles vestibulaires (Hodgkinson and Prasher, 2006; Hoet and Lison, 2008).

Les solvants attaquent en premier lieu les cellules de Hensen, puis les cellules de Deiters et arrivent par la base aux CCE (Campo et al., 1997; Johnson et al., 1988) (Fig. I33). Les cellules du ganglion spiral et les CCI restent normalement intactes, mais elles peuvent être affectées si la dose est élevée (Campo et al., 1999, 2001; Lataye et al., 2001; Pouyatos et al., 2004). De plus, les solvants peuvent agir spécifiquement sur différents types de canaux ioniques exprimés dans les neurones (Maguin et al., 2009; Yamakura et al., 2000) (**effet neuropharmacologique**). Par conséquent, ces solvants peuvent avoir un effet sur le ROM.

2.5.2 Mécanisme d'ototoxicité

Les agents ototoxiques peuvent affecter l'oreille interne, les cellules spécifiques de l'oreille interne, des composants spécifiques des cellules ou des voies biochimiques individuelles.

Les expositions aiguës menées sur l'**animal** (Llorens et al., 1993b; Rubel et al., 2013), aussi bien que *in vitro* sur des cultures d'organes de Corti ou des épithéliums vestibulaires (Cunningham, 2006; Forge and Li, 2000; Kotecha and Richardson, 1994; Matsui et al., 2004), ont montré clairement que les ototoxiques peuvent causer des dégâts permanents en provoquant la dégénérescence d'une partie voire de toutes les cellules ciliées.

Les observations *in vitro* de l'organe de Corti (Forge, 1985) et les organes sensoriels vestibulaires (Li et al., 1995) ont prouvé que la majorité des cellules ciliées entrent en **apoptose** après une exposition à des agents ototoxiques (Schacht et al., 2012), au bruit (Kurabi et al., 2017), ou suite au vieillissement (Usami et al., 1997). Malgré tout, le type de mort des

cellules ciliées des épithéliums sensoriels cochléaire et vestibulaire dépend de l'intensité de la stimulation et du type d'agent ototoxique. La **nécrose** prédomine après des doses aiguës, alors que l'**apoptose** est majoritaire après des expositions répétitives (Sedó-Cabezón et al., 2014). L'**extrusion** est principalement associée à la vestibulotoxicité chronique de faible intensité (Seoane et al., 2001; Seoane and Llorens, 2005). Certaines données indiquent même qu'une extrusion des cellules ciliées pourrait avoir lieu dans la cochlée des mammifères, mais ce phénomène n'est pas bien documenté (Corwin et al., 1991; Cotanche, 1987; Seoane et al., 2005; Wersäll et al., 1973; Whitworth et al., 1999).

2.5.3 Co-exposition : les agents ototoxiques accentuent le risque induit par le bruit

Une co-exposition au bruit et à un agent ototoxique peut induire une **potentialisation des effets** sur l'Homme (générant parfois, un effet pathologique supérieur à la somme des effets de chaque agent pris séparément (Campo, 2015; Humes, 1984; Morata et al., 1993; Prosen et al., 1978). Une oreille affaiblie par un agent ototoxique est plus vulnérable à une agression sonore qu'une oreille exposée uniquement au bruit. Les effets toxiques de la co-exposition au bruit et aux produits chimiques sont complexes, mais il est pertinent de les étudier afin d'évaluer les risques auxquels sont exposés les travailleurs.

Il existe une synergie entre les effets ototoxiques du bruit et les **solvants**, et inversement, tant sur l'audition (Lataye et al., 2000; Lataye and Campo, 1997), que sur l'équilibre (Morata et al., 1995). Les effets de la co-exposition au bruit et à un solvant aromatique ont été bien étudiés chez le rat (Campo et al., 2013; Chen and Henderson, 2009; Venet et al., 2015). De plus, la combinaison de deux solvants peut aussi augmenter les effets toxiques (Pryor et al., 1987).

Diverses études ont démontré que les solvants peuvent avoir un effet pharmacologique sur le noyau olivocochléaire. Ces effets expliquent, au moins en partie, les effets synergiques sur l'audition de l'exposition combinée "bruit et solvant" (Campo et al., 2007; Venet et al., 2015, 2011; Wathier et al., 2016).

La mesure du réflexe acoustique suggère que le lieu des lésions, ainsi que le mécanisme sous-jacent, sont différents s'il s'agit d'une exposition combinée ou d'une exposition « bruit seul » ou « solvant seul » (Morata et al., 1993).

2.6 Disulfure de carbone (CS₂)

Le **disulfure de carbone (CS₂)** pur est un liquide incolore avec une forte odeur sucrée, alors que dans son état impur, tel qu'il est utilisé dans la majorité des processus industriels, c'est un liquide jaunâtre avec une odeur désagréable. C'est un produit très volatil, inflammable et explosif.

2.6.1 Production et utilisation du disulfure de carbone

La production mondiale moyenne de CS₂ est approximativement d'un million de tonnes par an. Le CS₂ est également produit de manière naturelle par le sol et les microorganismes, la végétation, les volcans...

Le CS₂ est un **produit chimique industriel** important grâce à ses propriétés comme sa capacité à solubiliser les graisses, le caoutchouc et le phosphore, entre autres. Il s'utilise aussi comme intermédiaire de la synthèse de produits organiques du soufre comme les pesticides, les produits pharmaceutiques, colorants et accélérateurs de la vulcanisation. Sa principale utilisation industrielle reste la fabrication de fibres de viscose, films de cellophane et éponges.

L'exposition de l'Homme au CS₂ a lieu par l'air, la nourriture et la boisson voire même la peau. Cependant, la principale voie d'exposition reste l'air que nous respirons, par lequel le CS₂ entre rapidement dans la circulation sanguine en passant par les poumons.

2.6.2 Cinétique et métabolisme du disulfure de carbone

Les données disponibles sur l'Homme et sur l'animal indiquent que le CS₂ est rapidement **absorbé** par inhalation, par voie orale ou par l'épiderme. Le CS₂ absorbé est **distribué** rapidement dans toutes les parties du corps par le sang. A cause de sa nature lipophile, il est attiré préférentiellement par les organes qui contiennent de la graisse comme le cerveau ou le

foie, où il est **métabolisé**. La principale voie d'**excrétion** des métabolites du CS₂ est la voie urinaire. Le CS₂ non métabolisé est excrété par exhalation mais aussi par l'urine.

2.6.2.1 Absorption

Approximativement 80% du CS₂ inhalé est conservé durant les 15 premières minutes d'exposition puis diminue de 40% après 40 minutes. Le degré de rétention ne dépend pas de la concentration du toxique. De plus, il a été observé qu'une grande partie du CS₂ inhalé est absorbée et que son assimilation à travers la peau est rapide et élevée.

2.6.2.2 Distribution

Après absorption, le CS₂ est transporté par le sang via les érythrocytes (90%) et le plasma (10% lié avec des protéines), puis disparaît rapidement car il est distribué aux différents organes et tissus (Brieger, 1967; Lam and DiStefano, 1983; McKee, 1942). Dans le sang, la concentration de CS₂ augmente de manière exponentielle durant les 90 premières minutes d'exposition avant de se maintenir à une concentration constante. Une fois l'intoxication terminée, le niveau de CS₂ libre diminue rapidement : 40% disparaît pendant les 6 premières minutes, son élimination complète se fait dans les 5 à 7 heures suivantes (McKenna and DiStefano, 1977a). Dans tous les tissus, sauf les tissus gras, la concentration de CS₂ libre arrive à se stabiliser en 4 à 5 heures d'exposition. Cependant, le niveau de CS₂ lié dans les tissus continue à augmenter après la fin de l'exposition (McKenna and DiStefano, 1977a).

2.6.2.3 Métabolisme

Le CS₂ est métabolisé par deux voies différentes. La première dépend de sa capacité à réagir avec les amines libres ou aminoacides et groupes thiol (-SH) (Fig. I34). Les produits de cette réaction sont les **dithiocarbamates** (réaction avec les groupes « amine ») et les **trithiocarbamates** (réaction avec les groupes « thiol ») (Bus, 1985). Les deux métabolites sont non volatils et solubles dans l'eau (Brieger, 1967).

La seconde voie métabolique inclut le **métabolisme microsomal oxydatif** du CS_2 dans lequel des réactifs intermédiaires sont capables de s'unir de façon covalente aux macromolécules du tissu. Ce métabolisme oxydatif, qui se produit dans le foie, métabolise le CS_2 par le **cytochrome P-450** de l'oxydase à fonction mixte (MFO). Ce système catalyse la di-sulfuration oxydative du CS_2 en un oxygène intermédiaire stable, le **carbonil sulfite**, qui est l'intermédiaire de la formation ultérieure du CO_2 (Bus, 1985) (Fig. I34).

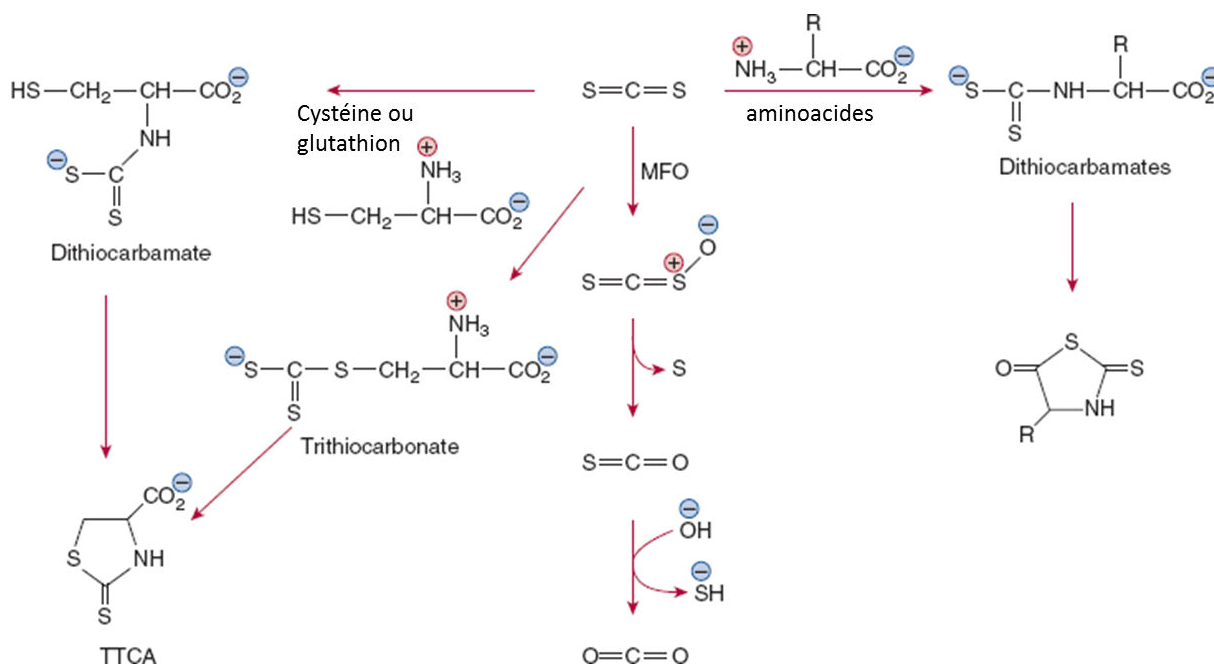


Figure I34. Métabolisme du disulfure de carbone. Le disulfure de carbone est métabolisé par l'oxydase à fonction mixte (MFO) du cytochrome P-450 en carbonil sulfite, sulfure atomique et HS-. La réaction du CS_2 avec la cystéine et le glutathion génère des triothiocarbamates, qui peuvent former un cycle pour obtenir l'acide 2-thio-1,3-thiazolidine-4-carboxylique. La réaction avec les groupes "amines" des aminoacides produit des dérivés de dithiocarbamates, qui peuvent également former des cycles et donner des 2-thio-5-thiazolidinones. Source : image adaptée de Graham et al., 1995.

2.6.2.4 Excrétion

L'élimination du CS_2 libre se fait principalement par les poumons (expiration), seule une petite partie se fait par les reins (urine). A la fin de l'exposition, la concentration de CS_2 libre diminue rapidement (McKenna and DiStefano, 1977a), ce qui fait que 8 heures après, on ne trouve plus que 25 à 30% de CS_2 dans le sang. Par contre, l'excrétion urinaire du CS_2 lié est

plus lente, avec une demi-vie de 2,2 à 42,7 heures chez le rat (Lam and DiStefano, 1982). Par conséquent, l'élimination du CS₂ lié est plus lente que celle du CS₂ libre.

2.6.3 Neurotoxicité du disulfure de carbone

Après des expositions aiguës ou subaiguës de CS₂ chez l'**animal d'expérimentation**, les effets sur le système nerveux sont les premiers à apparaître. Le CS₂ produit des **neuropathies centrale et périphérique** (Dietzmann and Laass, 1977; Richter, 1945). Un grand nombre de produits chimiques neurotoxiques induisent une accumulation et l'union anormale de **neurofilaments**, ce qui provoque un gonflement des axones (Fig. I35). Cette pathologie est associée à la dégénérescence de l'axone et une faiblesse musculaire (Monaco et al., 1990; Spencer and Schaumburg, 1977a, 1977b, 1977c). La neuropathie causée par le CS₂ progresse de la partie distale vers la partie proximale et affecte les axones longs du SNC et du système nerveux périphérique (Gottfried et al., 1985; Graham et al., 1995; Llorens, 2013; Sills et al., 2000). Dans le cas du CS₂, cette neuropathie apparaît comme une **axonopathie filamenteuse distale** (Colombi et al., 1981; Pappolla et al., 1987). Le gonflement des axones est le premier changement histologique évident puis il se produit une accumulation et une dégénérescence des organelles axoplasmiques, suivis par la fragmentation et la dégradation des fibres et, pour finir, la réduction et la destruction de la gaine de myéline (Knobloch et al., 1979; Sills et al., 1998).

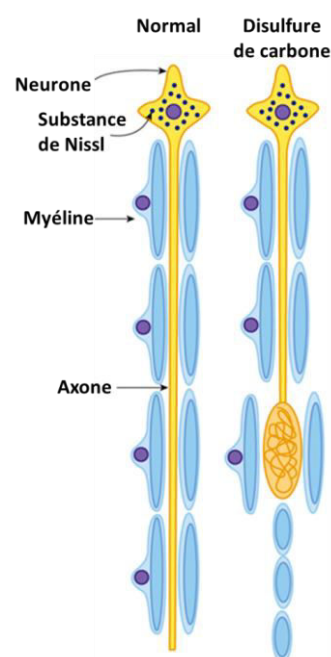


Figure I35. Axonopathie neurofilamenteuse. Gonflement de la partie distale de l'axone causée par une augmentation et un regroupement de neurofilaments, suivis par la dégénérescence de l'axone. Source : image adaptée de Curtis D. Klaassen, John B.

Ces changements provoquent la diminution de la vitesse de conduction du nerf en fonction de la concentration du CS₂ et de la durée de l'exposition (Knobloch et al., 1979; Lukas, 1970). La vitesse de conduction du nerf périphérique peut être totalement récupérée si la période d'exposition a été relativement courte. Toutefois, quand cette exposition se produit pendant une longue période de temps, la neuropathie périphérique est irréparable et la réduction de la vitesse de conduction du nerf irréversible (Knobloch et al., 1979). Alors que les nerfs périphériques ont la capacité de régénération, la dégénérescence axonale du SNC est irréversible (Spencer and Schaumburg, 1980).

Dans plusieurs études sur les expositions au CS₂ menées chez le rat, des changements de **comportement** ainsi que des modifications neuromusculaires qui affectent l'activité locomotrice des animaux ont été observés (Frantík, 1970; Moser et al., 1998; Opacka et al., 1984).

Les études menées chez l'**Homme** ont également mis en évidence un effet neurophysiologique aussi bien dans le SNC que dans le système nerveux périphérique, et en conséquence des effets sur le comportement. Il s'agit notamment de réductions de la vitesse de conduction du nerf périphérique (Hirata et al., 1996; Ruijten et al., 1993; Sandrini et al., 1983; Takebayashi et al., 1998; Vasilescu and Florescu, 1980), de perturbations physiologiques et de désordres comportementaux (De Fruyt et al., 1998; Hänninen, 1971; Hänninen et al., 1978; Tolonen and Hänninen, 1978). Des changements ultrastructurels du système nerveux périphérique similaires à ceux retrouvés chez le rat exposé au CS₂ ont été rapportés, comme des dégénération axonales avec désorganisations de neurofilaments (Chu et al., 1996).

2.6.4 Ototoxicité du disulfure de carbone

Chez les rats exposés au CS₂, il a été observé des changements de la vitesse de conduction du nerf de la voie centrale auditive avec une atteinte rétrocochléaire (Rebert et al., 1986) ainsi qu'une augmentation de la latence de certains composants du potentiel évoqué auditif (Hirata et al., 1992a; Rebert and Becker, 1986). Par contre, aucun effet significatif sur les seuils des sons purs n'a été mis en évidence, ce qui suggère que l'ototoxicité primaire du CS₂ arrive uniquement quand celui-ci est co-exposé avec le bruit (Clerci and Fechter, 1991). Les effets de l'exposition ou de la co-exposition avec du CS₂ sur le système vestibulaire n'ont pas bien été étudiés chez les animaux.

Les travailleurs co-exposés au solvant et au bruit souffrent de pertes auditives précoces, en comparaison à ceux exposés au bruit seul (Morata, 1989). Concernant le système vestibulaire, une augmentation des problèmes d'équilibre a également été rapportée (Sułkowski et al., 1992). Des pertes auditives rétrocochléaires bilatérales ont été associées à des dysfonctions centrales du système vestibulaire (Kowalska et al., 2000). Les dommages vestibulaires causés par l'intoxication au CS₂ se produisent donc au niveau central (Sułkowski et al., 1992). Chang et al., 2003 suggèrent que l'exposition au CS₂ génère un traumatisme auditif qui est relatif à la dose de CS₂ inhalée chez les personnes se trouvant dans un environnement bruyant. La gamme de fréquences endommagées est surtout centrée sur les **basses fréquences** (0,5 – 2 kHz).

3. OBJECTIFS

Compte tenu des nombreuses interrogations relatives à l'ototoxicité du CS₂, cette étude avait pour principaux objectifs d'étudier, chez le rat, la cochléotoxicité et la toxicité du système vestibulaire à la suite d'une co-exposition à un bruit riche en basses fréquences et à du CS₂.

Il s'agissait essentiellement d' :

1. évaluer l'ototoxicité du CS₂ chez le rat Long-Evans et d'étudier la toxicité au niveau du système nerveux central ;
2. évaluer et de comparer l'impact de la toxicité du CS₂ sur les systèmes auditif et vestibulaire ;
3. étudier l'impact d'une dose équivalente de CS₂ distribuée de façon continue ou intermittente sur l'audition et l'équilibre ;
4. analyser l'impact d'une combinaison bruit plus CS₂ sur les effets cochléotraumatisants et ototoxiques sur les récepteurs cochléaires et vestibulaires,
5. établir une relation entre les conséquences des effets toxiques physiologiques (comportementaux), fonctionnels (nystagmus et PDA) et pathologiques (histologiques) ;
6. évaluer et de caractériser les lésions associées à un dysfonctionnement persistant et celles qui pouvaient faire l'objet d'une récupération fonctionnelle. Le caractère subaigu de l'intoxication fait que les symptômes qui apparaissent peuvent s'inverser partiellement, voire même disparaître ;
7. évaluer la pertinence de la VLEP_{8h} et VLEP_{CT} lors d'exposition continue ou intermittente.

4 . MATERIELS ET METHODES

4.1 Animaux

L'animalerie de l'INRS est un établissement accrédité pour l'expérimentation animale (NC54-547-10) et les expérimentations ont été menées dans le respect du décret n°2013-118 relatif à la réglementation de l'utilisation des animaux à des fins scientifiques, publié au Journal Officiel le 7 février 2013. Par ailleurs, les protocoles expérimentaux impliquant des animaux ont reçu l'aval du Comité d'Ethique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale (CELMEA) et ont été validés par le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (N° APAFIS#3950-201602051 1372481).

Le modèle animal utilisé pour cette étude était des rats femelles Long-Evans. Bien que la gamme de fréquences audibles pour le rat soit située entre 250 Hz et 65 kHz, (Fay 1988; Kelly and Masterson 1977), avec une sensibilité maximale autour de 8 kHz, alors que celle de l'Homme est comprise entre 0,2 et 20 kHz, avec une sensibilité maximale à 3-4 kHz, les effets des agents ototoxiques se manifestent chez les deux espèces (Vyskocil et al., 2012). De plus, l'Homme et le rat présentent un métabolisme des solvants similaire (Pelekis and Krishnan, 1997). Les rats sont également un bon modèle pour l'étude des effets ototoxiques des solvants et/ou du bruit (Campo et al., 1997, 1999). Les rats Long-Evans ont été choisis pour la pigmentation de leur strie vasculaire, et parce qu'ils présentent de grandes amplitudes de ROM et de ROI. Nous avons utilisé des rats femelles pour leur petite taille et pour leur moindre agressivité, afin que toutes les expérimentations et les techniques se déroulent de la façon la plus confortable possible. Les femelles tolèrent bien la contention et leurs pupilles se dilatent facilement (Quinn et al., 1998).

Plusieurs groupes de rats femelles ont été utilisés, d'environ 250 g ($n = 390$), provenant des laboratoires Janvier (Le Genest St Isle, St Berthevin, 53941, France). Les animaux étaient réceptionnés à l'âge de 8 semaines et étaient stabulés à l'animalerie jusqu'au jour de l'expérimentation, à l'âge de 18 semaines. Ils étaient abrités deux par deux en cage (1032 cm² x 20 cm de hauteur) de polycarbonate garnie de cellulose BCell8 irradiée (ANIBED, Pontvallain, France). La nourriture et l'eau étaient distribuées à volonté excepté durant les périodes d'exposition. Les animaux ont été maintenus dans un cycle jour/nuit de 12 h / 12 h à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une humidité relative de $55 \pm 10\%$. Le bruit de fond dans la zone de stabulation était d'environ 42 dB.

4.2 Protocole expérimental

Deux protocoles expérimentaux ont été mis en œuvre au cours de cette étude.

Dans un premier temps, l'exposition des animaux consistait en un **bruit riche en basses fréquences et/ou à du CS₂** (Fig. M1), 6 heures par jour, 5 jours consécutifs par semaine, pendant 4 semaines. Après l'exposition, un groupe d'animaux avait une période de récupération de 4 semaines supplémentaires.

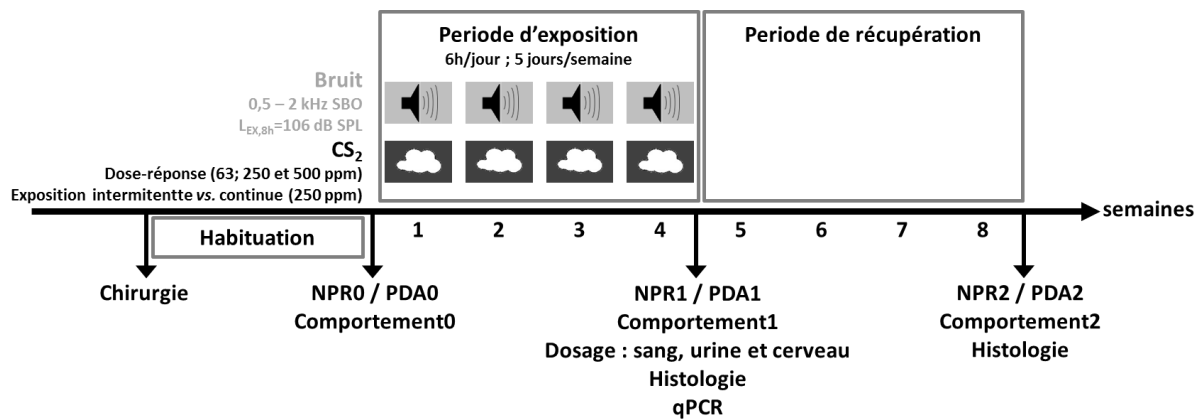


Figure M1. Protocole expérimental. Expositions au disulfure de carbone (CS₂) et/ou au bruit pendant 6h/jour, 5 jours/semaine, pendant 4 semaines. Le $L_{EX,8h}$ du bruit est de 105 dB SPL et le spectre est une bande d'octave (SBO) entre 0,5 et 2 kHz. L'exposition au CS₂ est continue et à différentes concentrations (63, 250 ou 500 ppm), ou de intermittente (1 ou 2 pics de 15min/h de 250 ppm de CS₂). Avant de réaliser les premières mesures, les animaux subissaient une chirurgie et une période d'habituation. L'audition était mesurée en utilisant les émissions de produits de distorsion acoustiques (PDA) avant (PDA0), en sortie d'exposition (PDA1), et 4 semaines après de l'exposition (PDA2). De même, l'équilibre était analysé par la mesure du nystagmus post-rotatoire (NPR), avant exposition (NPR0), en sortie d'exposition (NPR1) et 4 semaines après (NPR2) et par une batterie de tests de comportement. Des échantillons de sang, d'urine et les cerveaux étaient prélevés à la fin de l'exposition. Pour finir, une réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) était réalisée sur le cerveau en sortie d'exposition et après la période de récupération.

L'exposition au bruit était continue pendant 6 heures. Le spectre du bruit se trouvait dans une gamme de fréquences situées entre 0,5 et 2 kHz. L'exposition au bruit équivalente sur 8 h ($L_{EX,8h}$) était de 105 dB SPL. Concernant le CS₂, les animaux ont été exposés à des concentrations de 0, 63, 250 et 500 ppm de manière continue..

Parallèlement, afin d'analyser la différence entre une exposition au CS₂ continue ou intermittente, les rats ont été exposés à 250 ppm pendant 15 min chaque heure (6 pics de 15 min par jour), à 250 ppm pendant 15 min toutes les 30 minutes (12 pics de 15 min par jour), ou à 250 ppm de manière continue. Le nombre d'animaux pour chacun des groupes se trouve dans le Tableau M1, ainsi que le nombre de rats pour chaque mesure et chaque technique histologique.

Plusieurs types de mesures ont été utilisés afin d'évaluer le fonctionnement du système vestibulaire et du système auditif. Ces mesures étaient réalisées avant exposition, en sortie d'exposition, et 4 semaines après la fin de l'exposition. L'équilibre était évalué par la mesure du **nystagmus post-rotatoire (NPR)** et par différents **tests comportementaux**. Avant de réaliser les premières mesures, un casque de contention était implanté sur le crâne de l'animal, permettant d'immobiliser sa tête pendant l'enregistrement du NPR. Les animaux bénéficiaient d'une période d'habituation afin de les accoutumer à ce type de mesure. L'audition des rats était évaluée par la mesure des amplitudes des **produits de distorsion acoustique cubique (PDA)**.

Des échantillons d'urine et de sang étaient récoltés en sortie d'exposition afin d'analyser respectivement la **concentration de TTCA** et celle de **CS₂**. De même, les cerveaux de certains animaux ont été prélevés pour y doser la concentration de CS₂.

A la fin de l'exposition et après récupération, les **neuroépithélia auditifs et vestibulaires**, ainsi que leurs **ganglions** respectifs, ont été observés par microscopie optique (MO), microscopie confocale à fluorescence (IHQ) et microscopie électronique à balayage (SEM).

Pour finir, une **réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)** a été réalisée sur les cerveaux de certains animaux prélevés en sortie d'exposition, afin de mettre en évidence l'expression de gènes de neurotoxicité.

	Total	PDA			NPR			Comportement			MO	IHQ	SEM	SDH	qPCR
		T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T1 - T2	T1 - T2	T2	T2	T1
BF	40	13			13			8			9 - 6	4 - 4	5	7	/
250 ppm CS ₂	16	/			8			8			5 - 5	3 - 3	/	/	/
BF + 63 ppm CS ₂	8	8			8			/			/ - 4	/	4	4	/
BF + 250 ppm CS ₂	36	13			15			8			4 - 8	8 - 6	6	4	8
BF + 500 ppm CS ₂	8	8			8			8			/ - 4	/	4	4	/
BF + 1x15min/h 250 ppm CS ₂	32	10			13			8			9 - 10	/	5	8	/
BF + 2x15min/h 250 ppm CS ₂	22	11			10			/			/	/	/	/	/
Témoins	150	53			61			30			21 - 33	15 - 10	19	22	8

Tableau M1. Nombre d'animaux exposés et témoins pour chaque groupe expérimental. CS₂ : disulfure de carbone. BF : bruit de basse fréquence. PDA : produits de distorsion acoustique. NPR : nystagmus post-rotationnel. MO : microscopie optique. IHQ : immunohistochimie. SEM : microscopie électronique à balayage. SDH : succinate déshydrogénase. qPCR : réaction de polymérisation en chaîne quantitative. T 0 : avant exposition. T1 : en sortie d'exposition. T2 : 4 semaines après exposition.

Afin d'évaluer l'implication du solvant sur le réflexe de l'oreille moyenne, des lots d'animaux ont été exposés à **différents types de bruits (impulsionnel vs. continu) et/ou au CS₂** (Fig. M2), 6 heures par jour, pendant 5 jours consécutifs. Le nombre d'animaux pour chaque groupe est indiqué dans le Tableau M2.

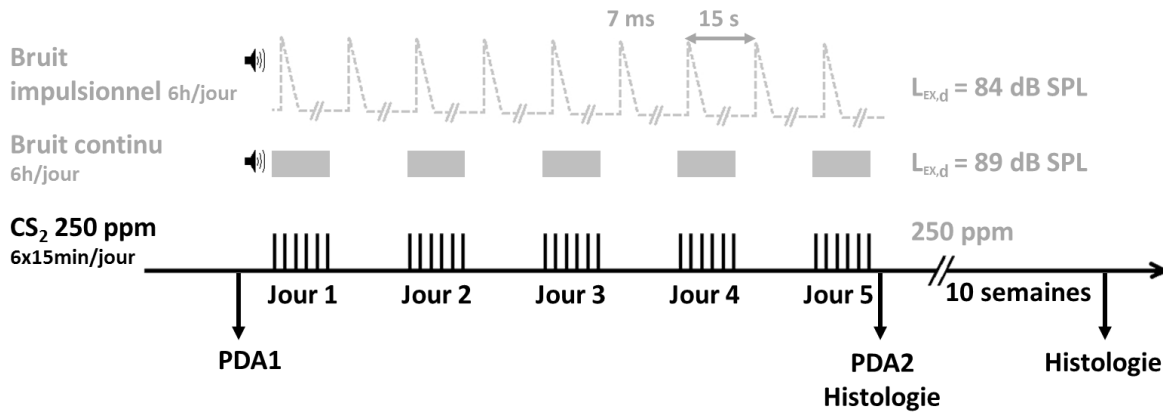


Figure M2. Protocole expérimental. Les animaux sont exposés pendant 5 jours consécutifs 6h/jour. Exposition au disulfure de carbone (CS₂) : chaque barre représente une période d'exposition de 15 min à 250 ppm. Exposition continue au bruit : chaque rectangle gris représente une période de 6 h de bruit continu avec un $L_{EX,d}$ de 89 dB SPL. Exposition impulsionnelle au bruit : la ligne discontinue représente la structure temporelle de l'émission du bruit impulsionnel. Chaque 7 ms d'émission de bruit sont séparés de 15 s, et cette séquence est répétée pendant 6 h. L'audition est évaluée en mesurant les amplitudes de produits de distorsion acoustiques (PDA) avant (PDA1) et après les 5 jours d'exposition (PDA2). Les rats sont sacrifiés à la fin de l'exposition ou 10 semaines après pour les études histologiques.

En ce qui concerne le CS₂, les rats étaient exposés à 250 ppm pendant 15 min chaque heure (6 pics de 15 min par jour), ce qui signifie qu'ils inhalaient également 45 min d'air frais par heure. Le spectre du bruit était une bande d'octave centrée sur 8 kHz. Les $L_{EX,8h}$ étaient de 89 dB pour le bruit continu et 84 dB pour le bruit impulsionnel. Pour le bruit impulsionnel, la durée de chaque pic était de 7 ms, suivies de 15 s de bruit de fond avant le prochain pic.

L'audition des rats était évaluée en mesurant les amplitudes des **PDA**. Ces mesures étaient effectuées avant (PDA1) et après 5 jours d'exposition (PDA2). En sortie d'exposition, l'état des stéréocils de la cochlée a été observé par microscopie électronique à balayage (**SEM**). Pour finir, après 10 semaines de récupération, un comptage des CC de la cochlée a été effectué en utilisant la technique de marquage de la **succinate déshydrogénase (SDH)**.

	Total	PDA	MER	SDH
		T0 T1	T1	T2
1x15min/h 250 ppm CS ₂	16	8	3	5
SC	8	8	3	5
SC + 1x15min/h 250 ppm CS ₂	8	8	3	5
SI	8	8	3	5
SI + 1x15min/h 250 ppm CS ₂	8	8	3	5
Control	30	18	9	12

Tableau M2. Nombre d'animaux exposés et témoins pour chaque groupe expérimental. CS₂ : disulfure de carbone. BC : bruit continu. BI : bruit impulsionnel. PDA : produits de distorsion acoustique SEM : microscopie électronique à balayage.

SDH : succinate déshydrogénase. T0 : avant exposition. T1 : en sortie d'exposition. T2: 10 semaines après la fin de l'exposition.

Chaque semaine, les animaux étaient pesés afin d'évaluer leur état de santé tandis que leur bien-être général était estimé en se basant sur le protocole de surveillance de Morton and Griffiths 1985 (Annexe 1).

4.3 Exposition

L'exposition des animaux a été réalisée dans des chambres d'inhalation de 200 L conçues pour supporter un flux d'air dynamique et réglable (5-6 m³/h). Chaque cellule pouvait accueillir une cage grillagée en acier inoxydable divisée en huit compartiments individuels (130 x 92 x 200 mm) (Fig. M3). Les chambres étaient maintenues à une pression négative inférieure à 3 mm H₂O afin d'éviter d'éventuelles fuites vers l'extérieur. L'air entrant était filtré et conditionné à une température de 22 ± 1 °C et un taux d'humidité relative de 55 ± 10%.

Durant l'expérimentation, les animaux exposés, ainsi que les animaux témoins, ne recevaient ni eau ni nourriture.

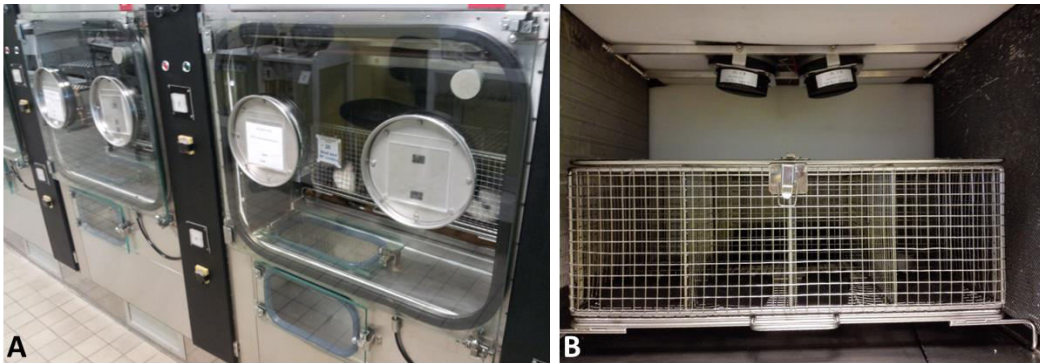


Figure M3. Exposition des animaux. (A) Chambres d'inhalation de 200L. (B) Cage divisée en 8 compartiments dans lesquels sont placés les animaux et deux haut-parleurs pour la génération du bruit.

4.3.1 Exposition au disulfure de carbone

Les vapeurs de disulfure de carbone étaient générées en utilisant une colonne de verre thermorégulée. Le solvant était délivré par une pompe et instantanément vaporisé au contact de la surface chauffée. Les vapeurs de CS₂ étaient transportées à travers la colonne grâce à un flux d'air supplémentaire dans la conduite d'arrivée d'air principale des chambres d'exposition.

Les animaux étaient exposés à différentes concentrations de CS₂ (63, 250 ou 500 ppm), de manière continue pendant 6 h ou de manière intermittente (15 min chaque heure ou 15 min toutes les 30 min). De la même façon, les rats témoins étaient ventilés avec de l'air frais.

4.3.1.1 Analyse de la concentration de CS₂

La concentration de solvant à l'intérieur des cellules d'inhalation était contrôlée en collectant des échantillons d'air à travers des tubes en verre remplis de charbon actif (Carboxen 1000, 40/60, Supelco) (3 fois/jour pour chaque chambre).

Après désorption du CS₂ par du chlorure de méthylène (DCM), les échantillons étaient analysés par chromatographie en phase gazeuse (GCMS-QP2010 Ultra; Shimadzu), en utilisant la méthyl-éthyl-cétone (MEK) comme étalon interne. Les échantillons de CS₂ étaient analysés sur une colonne RTX-1701 de 30 m et 0,25 mm (épaisseur du film 1 mm) (Restek), avec l'hélium comme gaz vecteur, à une vitesse linéaire de 45 cm/s. La température de la colonne était programmée à 40°C pendant 3 min suivies d'une augmentation jusqu'à 100°C (augmentation de 20°C/min). L'échantillon (1 µl) était injecté de manière fractionnée (1/30). Les températures du port d'injection, de la ligne de transfert et de la source d'ions étaient respectivement sélectionnées à 240°C, 250°C et 200°C. La spectrométrie de masse fonctionnait par ionisation d'électrons (70 eV) en choisissant le mode de détection d'ions : 43 pour l'étalon interne et 76 pour le CS₂. Ces analyses permettaient des calibrages quotidiens.

Tout au long de l'exposition, un spectrophotomètre de masse (Omnistar GSD 320 O2) (Pfeiffer buit) était également utilisé pour contrôler la stabilité de la génération de vapeurs.

4.3.2 Exposition au bruit

Deux haut-parleurs étaient accrochés au plafond des chambres d'exposition. Les animaux étaient placés dans des cellules séparées pour éviter les écrans acoustiques naturels. Le champ acoustique de chaque cellule était relativement homogène (± 1 dB). De plus, pour minimiser les différences entre les animaux, leur position dans les cages était modifiée chaque jour. Dans les chambres, le bruit de fond était principalement composé de basses fréquences (entre 63 Hz et 500 Hz) d'environ 50 dB. Au-delà de 500 Hz, le bruit de fond diminuait à 30 dB.

Des expositions à des bruits continus ou impulsionnels à différentes fréquences (basses fréquences ou 8 kHz) ont été réalisées.

4.3.2.1 Bruit à 8 kHz

Des lots d'animaux ont été exposés à un bruit impulsionnel, ou continu, ayant un spectre centré sur 8 kHz (Fig. M4).

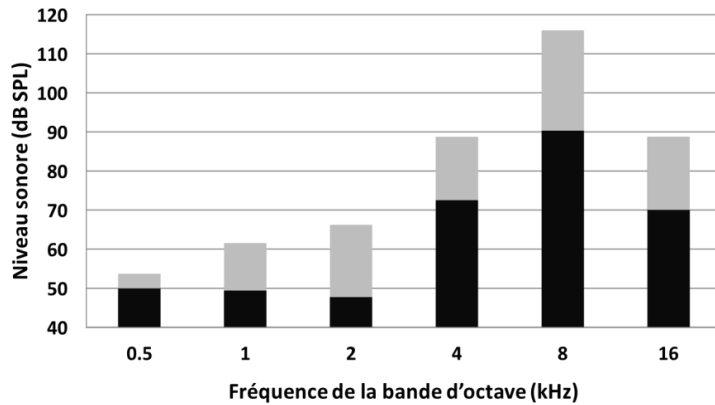


Figure M4. Spectre du bruit de bande d'octave centrée à 8 kHz. Barres noires: bruit continu. Barres grises : bruit impulsionnel.

Le $L_{EX,8h}$ de ces deux bruits a été choisi de façon à obtenir une perte auditive équivalente, d'environ 5 dB. Des expérimentations précédentes ont permis de déterminer ces conditions (Venet et al., 2015).

Le $L_{EX,8h}$ du bruit continu était de 89 dB SPL (90,2 dB SPL pendant 6h). Pour le bruit impulsionnel, chaque pic de bruit durait 7 ms, séparé entre eux par 15 s de bruit de fond. Le matériel acoustique placé dans les chambres d'exposition avait la capacité d'absorber le bruit, ce qui permettait d'obtenir un niveau de pression sonore de 116 dB SPL pendant 10 ms, suivies d'une rapide décroissance. 90 % de l'énergie acoustique était donc dissipée en 10 ms. Dans ces conditions, le $L_{EX,8h}$, calculé selon la norme ISO 9612:2009, était de 84 dB SPL.

Lors de précédentes études, la latence du ROM avait été mesurée afin de choisir les paramètres adéquats pour le bruit impulsionnel. Cette latence se mesure en utilisant les PDA, avec une haute résolution temporelle (2 ms) après la stimulation acoustique. La latence est le temps écoulé entre la stimulation sonore et l'initiation de la diminution des amplitudes des PDA. Ces mesures ont été répétées avec des primaires à différentes fréquences et différentes intensités. La latence moyenne nécessaire à l'activation du ROM s'est révélée être de 14 ms (entre 11 et 17 ms). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par van den Berge et al. 1990 et Pilz et al. 1997. En conséquence, une période de 15 s entre deux stimulations sonores est suffisante pour que, chez le rat, les muscles de l'oreille moyenne se relâchent. Chaque pic de bruit impulsionnel est donc totalement absorbé par la cochlée, sans être atténué par le ROM.

4.3.2.2 Bruit riche en basses fréquences

Les animaux ont été exposés à un bruit continu pendant 6 h à 106 dB SPL. Le spectre du bruit était filtré à travers 3 bandes d'octaves qui allaient de 0,5 à 2 kHz, ce qui correspond aux fréquences pour lesquelles la sensibilité auditive du rat est minimale (Fig. M5).

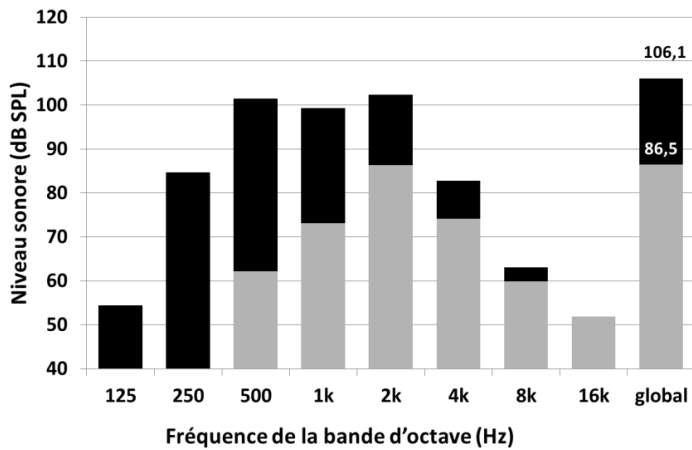


Figure M5. Spectre du bruit de basses fréquences, centré sur trois bandes d'octaves (0,5 à 2 kHz) comparant le dB SPL et le dB rat. Barres noires : dB lin. Barres grises : dB rat. L'intensité du bruit continu est de 106,1 dB SPL que correspond à 86,5 dB rat.

L'**intensité du bruit** a été choisie pour être la plus proche possible du $L_{EX,8h}$ en dB(A). Actuellement, il n'existe pas, dans la littérature, de comparaison entre les dommages/effets de stimulations acoustiques (amplitude, spectre, durée) sur différentes espèces. Pour se rapprocher des conditions humaines, notre hypothèse s'est basée sur les travaux de DeCory et al., 1992, qui a conclu que les différences de sensibilité au bruit entre les espèces, incluant l'Homme, coïncident relativement bien avec les différences de sensibilité auditive. En fait, le seuil auditif est déterminé en mesurant la quantité de potentiel acoustique qui se transmet du champ libre, c'est-à-dire de l'air, à l'oreille interne (Rosowski, 1991). La transmission de la stimulation acoustique à l'oreille interne semble être responsable de la plupart des différences de sensibilité auditive entre les espèces. Cette observation est très importante si on cherche à extrapoler à l'Homme les mesures de perte auditive due au bruit réalisées chez l'animal et pour justifier l'utilisation des modèles animaux. Pour chaque espèce, l'allure de l'audiogramme dépend donc principalement de l'amplitude de la fonction de transfert du système périphérique, en d'autres termes, des oreilles externe et moyenne. Si on compare le spectre de l'exposition au bruit avec une courbe de pondération chez le rat, il est possible d'estimer l'énergie acoustique qui pénètre la cochlée.

Nous avons choisi un bruit avec une **gamme de fréquences** comprises entre 0,5 et 2 kHz parce que, comme évoqué précédemment, le champ auditif du rat n'est pas identique à celui de l'Homme. Les rats ont la capacité d'entendre de 250 Hz à 64 kHz, tandis que la perception humaine s'étend de 20 Hz à 16 kHz, ce qui correspond à un décalage de 4 octaves (Fig. M6). Les fréquences considérées comme "basses fréquences" chez l'Homme ne sont pas les mêmes que les "basses fréquences" pour le rat. Un bruit entre 0,5 et 2 kHz pour le rat équivaut à un bruit de 63 à 250 Hz chez l'Homme. Enfin, en ce qui concerne l'**intensité**, si on regarde l'atténuation chez le rat, on remarque qu'il lui faut plus d'énergie pour percevoir des sons de basses fréquences. En utilisant la pondération A, que l'on déplace de quatre octaves, on obtient la pondération "rat" (dB rat). Ainsi, on peut considérer qu'une exposition à 105 dB de bruit de basses fréquences chez le rat équivaut à une exposition de 85 dB chez l'Homme (Fig. M6).

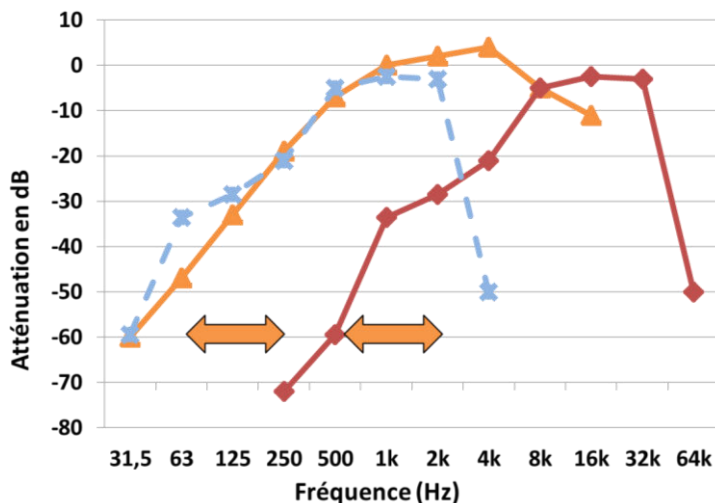


Figure M6. Comparaison du champ auditif de l'Homme et du rat. Les basses fréquences chez l'Homme (63 à 250 Hz), correspondent à 0,5 à 2 kHz chez le rat. Ligne rouge : rat moyen. Ligne orange : champ auditif à 0 dB. Ligne bleue : rat moyen décalé de 4 octaves.

4.4 Mesures fonctionnelles

Les évaluations du fonctionnement de la cochlée et du vestibule ont été réalisées respectivement à partir de la mesure des **produits de distorsion acoustique** et du **réflexe vestibulo-oculaire**.

4.4.1 Produits de distorsion acoustique

Les **produits de distorsion acoustique (PDA, DPOAE en anglais)** sont des phénomènes acoustiques qui appartiennent à la famille des oto-émissions provoquées. Ils s'obtiennent après une stimulation simultanée et continue de deux sons purs, appelés primaires, de fréquences f_1 et f_2 selon le rapport $f_2 = 1,2 f_1$. Le signal acoustique recueilli dans le conduit auditif externe est le résultat des distorsions créées par le système auditif quand ces deux fréquences primaires sont appliquées (Fig. M7). Suite à cette stimulation, différents PDA sont émis de manière simultanée, mais le plus utilisé en clinique et en recherche est le produit cubique ($2f_1-f_2$). C'est également celui que nous avons utilisé pour nos investigations, car il persiste à des intensités de primaires relativement faibles, quelles que soient ces fréquences primaires. Le PDA cubique est un indicateur spécifique du fonctionnement et du dysfonctionnement des CCE (Avan et al., 2001).

Ainsi, la mesure du PDA est une méthode objective pour évaluer le mécanisme actif des CCE. C'est une méthode sensible et rapide qui évalue une des fonctions les plus fragiles de la cochlée.

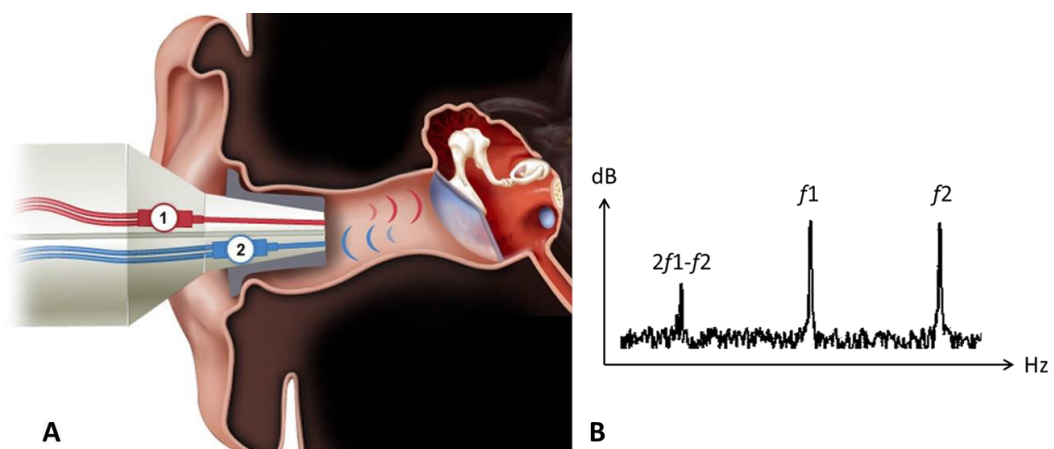


Figure M7. Produits de distorsion acoustiques. (A) La sonde est placée dans le conduit auditif externe et contient un haut-parleur (1) qui émet un son stimulant et un microphone (2) qui recueille le son émis par les cellules ciliées externes. (B) Fréquences primaires émises (f_1 et f_2), le produit cubique ($2f_1-f_2$) émis par la cochlée puis analysé. Source : image adaptée de www.cochlea.eu

4.4.1.1 Mesure des produits de distorsion acoustique

Une anesthésie générale est nécessaire pour mesurer les PDA chez le rat. L'anesthésie était induite par une injection intrapéritonéale (i.p.) d'un mélange de Kétamine (Clorkétam®, 45 mg/kg) et de Xylazine (Rompun®, 5 mg/kg). Un examen otoscopique était réalisé avant les mesures afin de s'assurer de l'absence d'infection, d'obstruction du canal auditif externe ou d'anomalie de la membrane tympanique. La température des animaux anesthésiés était maintenue autour de 38°C par une couverture chauffante.

Toutes les mesures étaient réalisées dans une cabine insonorisée. La sonde de mesure des PDA, mise au point au laboratoire, associe deux transducteurs générant les primaires f1 et f2 et un microphone qui mesure la pression acoustique dans le conduit auditif externe (Shaffer et al., 2003; Venet et al., 2011). Ces trois transducteurs sont réunis dans la sonde, dont l'extrémité était positionnée de manière étanche à l'entrée du conduit auditif externe de l'animal anesthésié (Fig. M8). Les signaux des primaires étaient générés par un synthétiseur de fréquence (Pulse, B&K 3110) et émis par deux microphones miniaturisés (B&K 4191). Les primaires f1 et f2 étaient générées simultanément dans l'oreille gauche de l'animal sous forme de signaux sinusoïdaux (sons purs) dont les fréquences étaient liées par la relation $f2 = 1,2 f1$ et dont les intensités étaient telles que $L1 - L2 = 14$ dB.

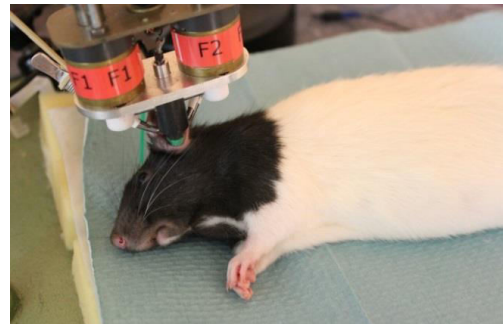


Figure M8. Positionnement de la sonde sur un animal anesthésié afin de mesurer les produits de distorsion acoustiques.

Une procédure de calibration permettait d'ajuster l'intensité des primaires. Cette calibration était réalisée avec un microphone de 1/8 pouce (B&K type 4138) placé dans une cavité spécifique, d'un volume équivalent à celui d'un conduit auditif externe du rat. La réponse acoustique était mesurée par un microphone de mesure (Knowless FG 23329-C05) relié à un analyseur FFT (Fast Fourier Transform) (B&K PULSE 3110). L'amplitude des PDA était déterminée comme la moyenne linéaire de spectres de 4 s (Fig. M9).

Six couples de primaires (f1 - f2) étaient testés successivement : (3 - 3,6), (4 - 4,8), (5 - 6), (8 - 9,6), (14,6 - 17,5), et (21,2 - 25,4) kHz, avec une intensité de 60 dB pour f1. Pour simplifier la présentation des résultats, chaque paire de primaires est désignée par f2. L'audition des animaux était testée juste avant (PDA1), en sortie d'exposition (PDA2) ainsi qu'au terme la période de récupération (PDA3).

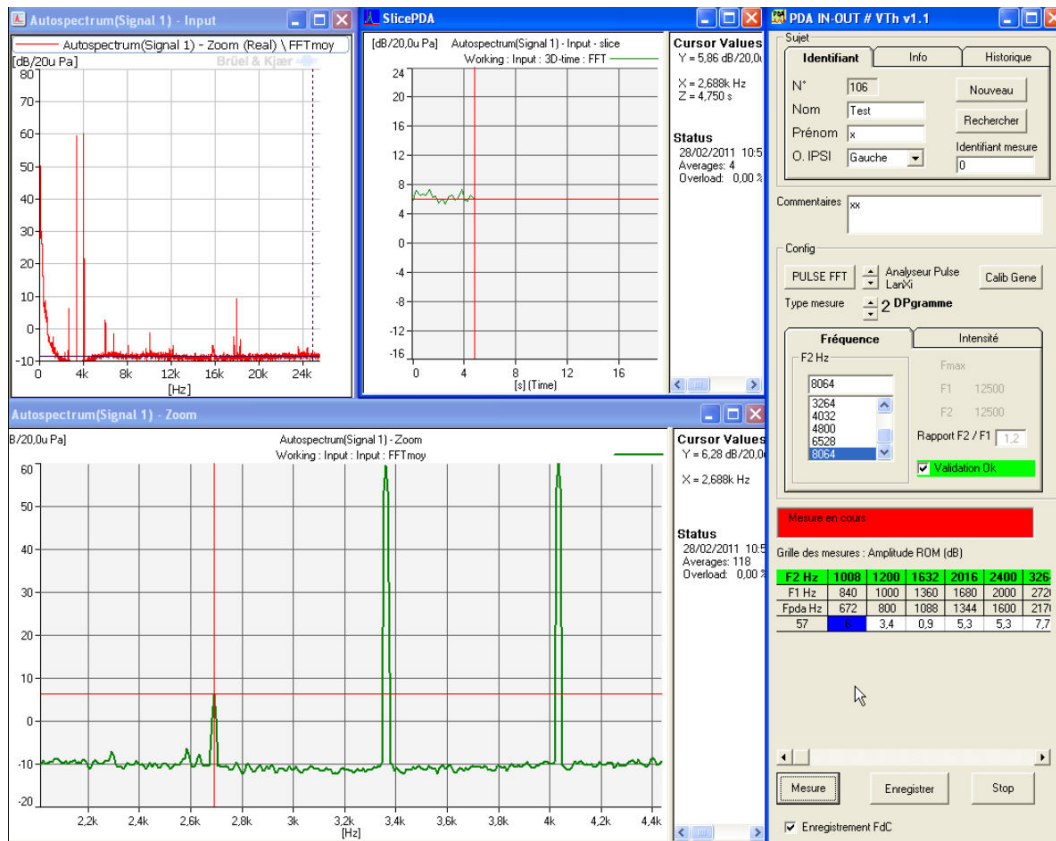


Figure M9. Analyse et enregistrement des produits de distorsion cubiques chez le rat

4.4.2 Réflexe vestibulo-oculaire

La mesure du nystagmus post-rotatoire peut être utilisée pour évaluer l'intégrité du système vestibulaire. Il s'agit d'une mesure objective sensible aux perturbations temporelles et/ou permanentes du système vestibulaire au niveau périphérique ou central (Gabersek et al., 1963).

Un système d'évaluation et d'enregistrement du NPR a été développé par notre laboratoire (INRS, France) afin d'obtenir des mesures sur rats vigiles (Fig. M10 et M11D).

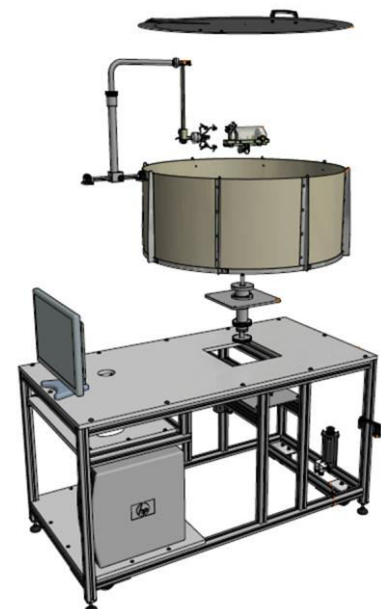


Figure M10. Plan du banc de nystagmus conçu par l'INRS. Source : INRS

4.4.2.1 Chirurgie

La chirurgie avait lieu trois semaines avant la première mesure. Une incision de la peau d'environ 1,5 cm de large était effectuée sur le scalp (de la ligne interoculaire à la ligne interauriculaire), en conditions stériles. Une fois le crâne mis à jour, le périoste était nettoyé, gratté, puis dévitalisé au nitrate d'argent. De la colle cyanoacrylate était répartie sur le crâne en une fine couche avant d'appliquer un insert (Simaf, 40C030H065) formant un angle de 30° par rapport au plan de la vue, englobé dans du ciment dentaire (Taab 2000®). Les rats étaient isolés pendant la période de récupération (1 semaine) puis surveillés attentivement les semaines suivantes.

4.4.2.2 Période d'habituation

Une semaine après la chirurgie, les animaux commençaient une période d'habituation afin de les accoutumer à rester calme pendant l'enregistrement du NPR. Il leur fallait quelques jours pour s'habituer à l'expérimentateur. Ensuite, ils étaient immobilisés dans une camisole de contention souple et résistante "Small Animal Snuggle Restraint Devices" (Harvard apparatus, 72-6267) (Fig. M11A). La dernière étape consistait à immobiliser la tête. Cette habitude, qui durait au moins une semaine et demie, était fondamentale pour obtenir des mesures correctes du NPR.

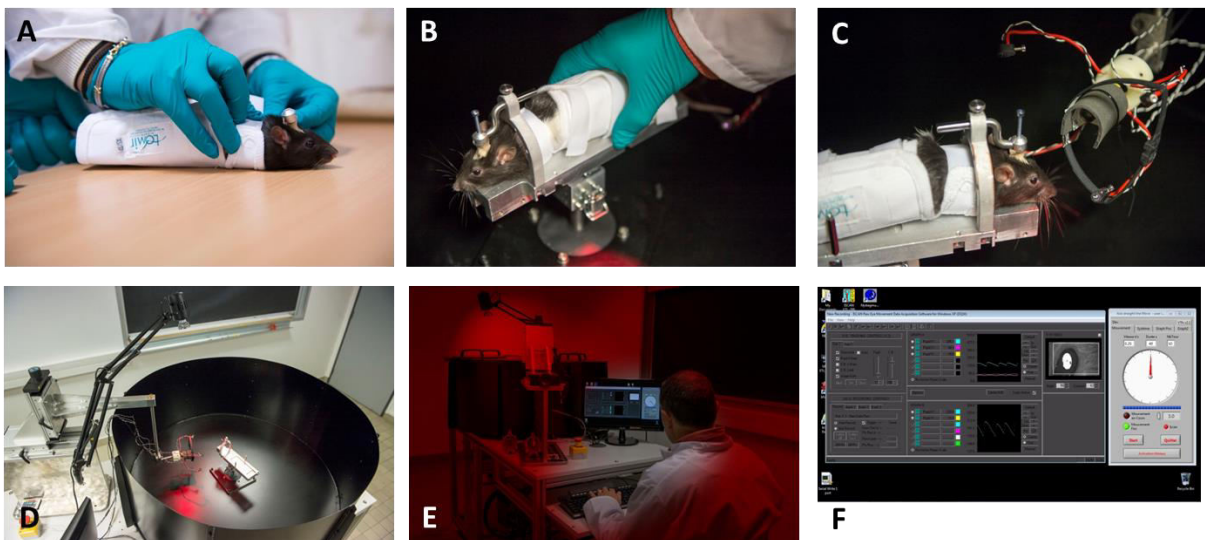


Figure M11. Mesure du nystagmus post-rotatoire chez le rat. (A) Positionnement du rat dans la camisole de contention. (B) Positionnement et fixation du rat sur le support rotatoire. (C) Positionnement de l'œil du rat au centre de la caméra. (D) Image générale du banc de nystagmus. (E) Mesure du nystagmus dans l'obscurité. (F) Image de l'écran de l'ordinateur pendant l'enregistrement des mouvements de l'œil une fois que la rotation s'arrête. Source : INRS

4.4.2.3 Mesure du nystagmus post-rotatoire

Les mesures étaient réalisées dans l'obscurité (Fig. M11E). Afin de stabiliser la tête de l'animal pendant la rotation, l'insert placé sur le crâne permettait d'y serrer une vis, elle-même fixée sur une barre de métal au centre du support de rotation (Fig. M11B). La tête était positionnée selon un angle de 30° par rapport au plan de la vue, ce qui correspond à l'angle entre le canal semi-circulaire latéral et le plan horizontal. L'animal était positionné de façon à ce que la caméra se trouve en face de son œil gauche (Fig. M11C). Le support tournait à 360° , avec une accélération et décélération maximale identiques, de $870^\circ/\text{s}^2$. La stimulation rotatoire durait 40 s et, pour chaque animal, 2 stimulations à deux vitesses différentes étaient réalisées : 0,25 et 1 Hz. Chaque stimulation était espacée de la suivante d'une minute.

Les mouvements horizontaux de l'œil étaient enregistrés en utilisant le système « RK-826PCI Eye Tracking System » (ETL-200 ISCAN, Inc. 21 Cabot Road Woburn, MA 01801 USA), combinant un système d'enregistrement avec une caméra infrarouge à haute résolution, qui capte 240 images par seconde (Fig. M11F).

Différents paramètres du NPR étaient ensuite analysés : nombre de saccades, durée totale des saccades, fréquence moyenne et pente d'amortissement des saccades (Fig. M12). Le fonctionnement du système vestibulaire des animaux était mesuré avant le début de l'exposition (NPR1), en sortie d'exposition (NPR2) et à la fin de la période de récupération (NPR3).

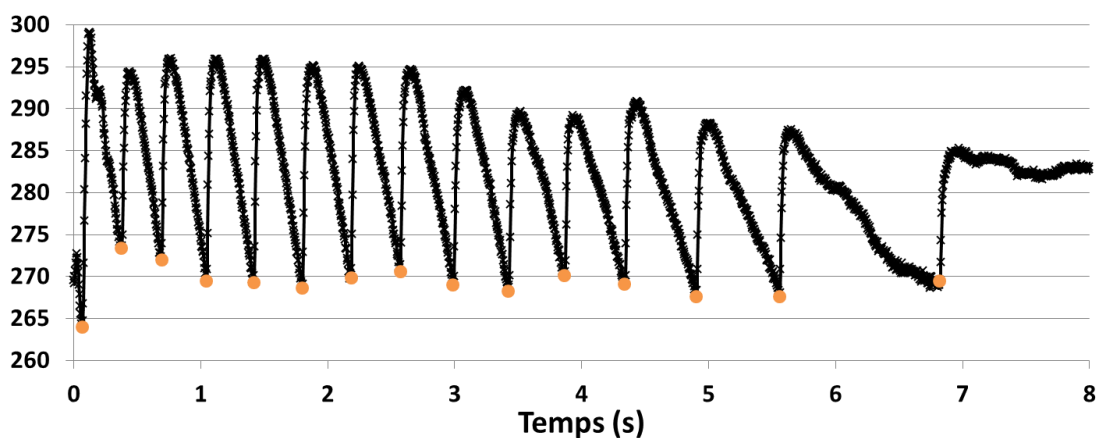


Figure M12. Exemple d'une mesure du nystagmus post-rotatoire, après une stimulation à 0,25 tour/seconde où l'on peut voir le nombre de saccades (points orange) et la durée totale du mouvement de l'œil (axe x).

4.5 Mesures du comportement

Des travaux antérieurs ont développé des **techniques comportementales** permettant d'évaluer le niveau de **dégénérescence vestibulaire du rat** (Llorens and Rodríguez-Farré, 1997). Ces techniques consistent en une batterie de tests qui évaluent le comportement spontané et les réflexes, et, une fois combinés, sont de bons indicateurs de l'état fonctionnel du vestibule du rat (Balbuena and Llorens, 2001, 2003; Boadas-Vaello et al., 2005; Desmadryl et al., 2012).

Dans nos travaux, le dysfonctionnement vestibulaire a été étudié grâce à 4 tests différents de comportement. Afin d'évaluer de manière quantitative ces tests, les mouvements de l'animal ont été enregistrés à l'aide de deux caméras GoPro (Hero4 black), situées devant, sur le côté ou derrière la surface vitrée sur laquelle avaient lieu les tests. Pour finir, les images ont été analysées avec le programme Kinovea®, un logiciel d'analyse vidéo qui permet de se concentrer sur une action spécifique et d'étudier la structure d'un mouvement photographié image par image ou au ralenti. Ces tests ont été effectués avant le début de l'exposition, en sortie des 4 semaines d'exposition ou après la période de récupération de 4 semaines, pour les différentes expositions au CS₂ et/ou au bruit.

4.5.1 Evaluation du réflexe d'atterrissage (*Tail-lift reflex*)

Quand un rat est soulevé par la queue, les pattes avant ont spontanément tendance à se préparer à un possible atterrissage (réflexe d'atterrissage). Les rats qui présentent un déficit vestibulaire, se courbent sur eux-mêmes en direction ventrale (Hunt et al., 1987; Llorens et al., 1993b).

Afin d'analyser les différences entre les animaux, l'angle entre l'axe du corps et l'axe de la tête était mesuré quand l'animal se trouvait suspendu par la queue (Fig. M13).



Figure M13. Evaluation du réflexe d'atterrissage. Rat témoin sans altération du réflexe d'atterrissage.

4.5.2 Evaluation du réflexe de retournement

Pour évaluer le réflexe de retournement, les rats étaient lâchés à une hauteur de 40 cm d'une surface molle en position de décubitus dorsal. Les rats témoins se tournaient rapidement afin d'atterrir sur leurs quatre pattes tandis que les rats vestibulo-déficients se retournaient plus lentement ou ne se retournaient pas (Ossenkopp et al., 1990).

Le temps que mettait l'animal à retourner complètement sa tête et/ou son corps était chronométré (Fig. M14).



Figure M14. Evaluation du réflexe de redressement dans l'air. Rat témoin sans altération du réflexe de redressement.

4.5.3 Evaluation de la superficie que forme les pattes

La superficie du quadrilatère formé par les quatre pattes du rat avant qu'il ne commence à marcher était mesurée (Fig. M15) (Tighilet et al., 2015). Plus grande est la superficie, plus le dommage vestibulaire est important.



Figure M15. Evaluation de la superficie formée par les pattes d'un rat témoin.

4.5.4 Locotronic®

Le locotronic® (Intellibio innovation) est un appareil qui mesure les erreurs de marche et d'équilibre des animaux (Fig. M16). Il s'utilise comme test pour les dommages sensoriels et/ou moteurs. Il consiste à faire avancer l'animal d'une extrémité à l'autre, le long d'un couloir (de 10 cm de large), sur une échelle horizontale formée de barreaux espacés de 3 cm. Des détecteurs infrarouges permettent d'enregistrer le déplacement de l'animal et de compter les erreurs lorsqu'une patte chute entre deux barreaux. Un logiciel recueille les informations des capteurs et différencie les erreurs de patte avant, de patte arrière ou de queue.



Figure M16. Appareil Locotronic®. Source: image de <http://www.intelli-bio.com>

4.6 Techniques chimioanalytiques

4.6.1 Concentration de CS₂ dans le sang

Après l'absorption du CS₂, celui-ci est transporté par le sang et distribué aux différents organes et tissus. Afin de déterminer l'impact de l'exposition sur l'animal, la concentration de CS₂ total dans le sang a été mesurée en sortie d'exposition.

4.6.1.1 Extraction de sang veineux

A la fin du dernier jour d'exposition, pendant que la concentration atmosphérique était maintenue constante dans des chambres d'inhalation, les rats étaient sortis les uns après les autres. Les rats étaient anesthésiés au gaz isoflurane (induite avec 5% d'isoflurane puis maintenue à 3% pendant le prélèvement de sang), en utilisant un vaporisateur Isotec 4 (Ohmeda) et un générateur d'O₂ Millennium 5 Concentrator (Respironics). La queue du rat était trempée dans une eau thermostatée à 40°C afin de dilater les vaisseaux sanguins. A l'aide d'un cathéter veineux de type Surflo®, environ 0,8 ml de sang veineux était prélevé dans la veine caudale latérale de l'animal. Le sang était collecté dans des tubes en verre préalablement héparinés (30 µl). Les échantillons étaient conservés à -80 °C jusqu'au moment du dosage.

4.6.1.2 Analyse de la concentration de CS₂

Afin de libérer le CS₂ lié, les échantillons de sang étaient acidifiés avec 250 µl de HCl (2%) puis agités pendant 10 min après ajout de 10 µl de la solution standard (1,5 g/L MEK en DCM) (Lam and DiStefano, 1986). Les échantillons étaient finalement extraits avec 500 µl de DCM. Après une agitation de 30 min et une centrifugation à 3220 g à -4°C pendant 20 min, la phase de DCM était analysée. La limite de détection était d'environ 0,1 µg, l'exactitude de la mesure était inférieure à -12,4 % et la précision proche de 15 %.

4.6.2 Concentration de TTCA dans l'urine

La réaction du CS₂ avec la cystéine, ou le glutathion, génère des trithiocarbamates qui peuvent former un cycle, l'acide 2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-carboxylique (TTCA). Seulement près de 5 % du CS₂ est métabolisé en TTCA, mais on retrouve des niveaux de TTCA détectables plusieurs jours après la fin de l'exposition. C'est un bon indicateur biologique de cette exposition, c'est pourquoi il est utilisé pour évaluer les expositions au CS₂ (Graham et al., 1995; Roh et al., 1999).

Le métabolisme du CS₂ s'évalue en recueillant l'urine des animaux placés dans des cages à métabolisme en sortie d'exposition.

4.6.2.1 Recueil d'urines

Après l'exposition au CS₂, les rats restaient 18 h dans des cages individuelles de métabolisme (220 x 220 x 180 mm). Les animaux avaient accès à l'eau et à la nourriture. Un système de réfrigération permettait de maintenir l'urine à 4°C. Le lendemain, pour chaque échantillon, un test rapide était effectué à l'aide d'une bandelette urinaire (Combur⁹ Test 04510038 191, Roche) afin de vérifier le pH et l'absence de sang et de nitrates. Les échantillons étaient conservés à -20°C jusqu'à analyse.

4.6.2.2 Analyse de la concentration de TTCA

La concentration de TTCA dans l'urine était déterminée en utilisant une chromatographie liquide à haute performance avec une colonne de commutation automatisée (Simon and Nicot, 1993). Brièvement, l'urine diluée était purifiée sur une colonne échangeuse d'ions et, après transfert de la fraction d'intérêt, l'analyse était effectuée en mode isocratique sur une colonne cyano-amino combinée à une détection ultraviolette à 275 nm.

Dans ces conditions, la linéarité de la mesure a été démontrée entre la limite de quantification (0,15 mg/L) et 50 mg/L de TTCA ; la limite de détection était inférieure à 0,05 mg/L ; le rendement d'extraction était supérieure à 95% et la précision inférieure à 1%.

4.6.3 Concentration de CS₂ dans le cerveau

En raison de sa nature lipophile, la distribution du CS₂ est plus importante dans les tissus riches en lipides comme le cerveau et le foie, où il est métabolisé (Hoar et al., 1985).

La concentration de CS₂ total dans le cerveau a été mesurée en sortie d'exposition.

4.6.3.1 Dissection du cerveau

Les animaux étaient profondément anesthésiés avec un mélange de Kétamine (Clorkétam®, 75mg/kg) et Xylazine (Rompun®, 5mg/kg) par i.p. puis décapités pour réaliser le prélèvement de cerveau. Les échantillons étaient plongés dans l'azote liquide pour une congélation rapide puis conservés à -80°C jusqu'à analyse.

4.6.3.2 Analyse de la concentration de CS₂

Le cerveau était décongelé et coupé en trois parties pour en utiliser seulement un tiers. Le tiers de l'organe était pesé dans un tube FastPrep Lysing Matrix de 2 ml. 500 µl de DCM était ajouté dans chaque tube ainsi que 10 µl de la solution standard MEK. Le cerveau était broyé avec le FastPrep Instrument-24 pendant 20 secondes à 4 m/s. Enfin, les échantillons étaient centrifugés 20 min à 4000 g à 4°C.

L'analyse des échantillons était effectuée par détection de masse en chromatographie en phase gazeuse : GCMS QP 2010 Ultra (Shimadzu) avec une colonne Rtx 1701 (30 m × 0,25 mm × 1 µm). Les principales caractéristiques de rendement de la méthode adaptée au cerveau sont : linéarité validée entre 0,15 µg et 15 µg de CS₂, limite de détection à 0,014 µg de CS₂, limite de quantification d'environ 0,047 µg de CS₂, rendement moyen d'extraction de 98,2% (± 8,5), biais ≤ ± 6% et répétabilité moyenne de 3,5% (± 2,0).

4.7 Techniques histologiques

Pour toutes les études histologiques, les animaux étaient profondément anesthésiés avec un mélange de Kétamine (Clorkétam®, 75mg/kg) et Xylazine (Rompun®, 5mg/kg) par voie i.p. puis décapités afin de réaliser la dissection des organes nécessaires.

4.7.1 Microscopie optique

Les CC vestibulaires et cochléaires étaient observées en sortie d'exposition. Le neurotransmetteur des fibres afférentes des deux organes étant principalement le glutamate, ceci fait de la terminaison afférente postsynaptique une cible pour les dommages excitotoxiques. En sortie d'exposition et après la période de récupération, l'état des ganglions spiraux et de ceux de Scarpa était observé, le. Les cochlées, les vestibules et les ganglions correspondants étaient fixés et inclus dans une résine EPON afin de réaliser des coupes semi-fines. Pour finir, après la période de récupération, un comptage des CC de l'organe de Corti était effectué pour réaliser un cochléogramme.

Toutes les coupes étaient observées au microscope optique Olympus BX 41. Un système d'acquisition numérique associant une caméra (Baumer TXD14c) et un ordinateur équipé du logiciel Archimed était connecté au microscope afin de réaliser des photographies des coupes.

4.7.1.1 Inclusion de la cochlée (organe de Corti et ganglion spiral)

La cochlée était prélevée rapidement pour être perfusée via les deux fenêtres par une solution de glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate de sodium 0,2 M à pH 7,2. Les cochlées restaient dans le fixateur pendant quinze jours à 4°C. Elles étaient ensuite rincées avec du tampon cacodylate 0,2M, puis post-fixées pendant une heure avec une solution de tétraoxyde d'osmium (OsO₄ 1% dans le tampon cacodylate de sodium 0,2 M) avant d'être à nouveau rincées avec du tampon cacodylate.

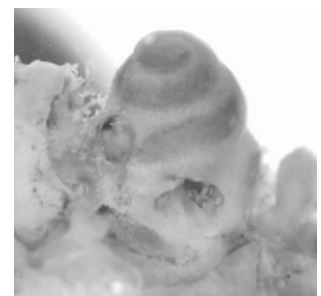


Figure M17. Image d'une cochlée fraisée.

Les cochlées étaient ensuite fraisées dans une solution d'éthanol à 70 % pour réduire la partie osseuse à une fine couche transparente (Fig. M17). Les cochlées étaient décalcifiées durant toute la nuit (ON : over night) dans une solution constituée d'EDTA (10 %) et d'éthanol à 70 %. Ensuite commençait la réalisation du protocole de déshydratation et d'inclusion. D'abord, les cochlées étaient déshydratées dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (70, 80, 90 et 100 % ON). Le lendemain, les échantillons étaient inclus dans la résine (DDSA 55,8 %, Epon 25,3 %, araldite 15,2 %, dibutyl phtalate 2 % et 2,4,6-triméthylaminométhyl phénol 1,7 %), en commençant par 50/50 d'oxyde de propylène/résine EPON pendant 1 h, puis 25/50 oxyde de propylène/résine EPON pendant 1 h pour finir par la résine EPON pure ON. Pour finir, les cochlées étaient positionnées et orientées dans des moules avec de la résine EPON puis incubées 15 h à 30°C suivies de 24 h à 60°C. Les blocs de résine polymérisée étaient alors débités à l'ultratrime (Leica) parallèlement à l'axe du modiolus de la cochlée jusqu'à voir le nerf auditif au centre de la coupe. Enfin, l'échantillon était débité au microtome (Microm HM355S, LEICA afin de réaliser des coupes de 2,5 µm d'épaisseur (Fig. M18). Les coupes étaient déposées sur lame dans une goutte de violet de crésyl (200 mg dans 40 ml d'eau distillée) puis observées au microscope optique.

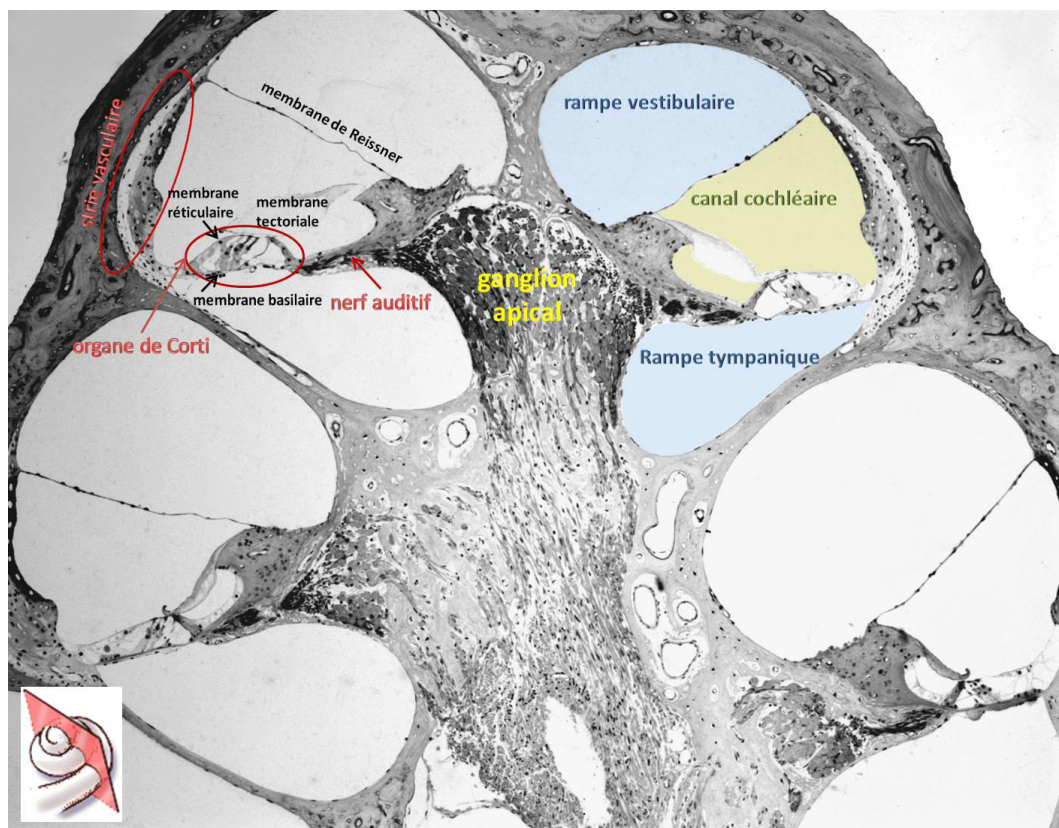


Figure M18. Coupe semi-fine transversale de 2,5 µm sur laquelle on peut observer toutes les structures anatomiques de la cochlée. Source : INRS

4.7.1.2 Inclusion de l'épithélium vestibulaire (utricle, saccule et crêtes)

L'os temporal était rapidement ouvert avec une pince afin de laisser immédiatement pénétrer dans le vestibule une solution de glutaraldéhyde 2,5 % dans du cacodylate de sodium 0,2 M. Après une semaine de fixation à 4°C, l'appareil vestibulaire était disséqué (saccule, utricule et crêtes) et les membranes qui recouvrent les épithéliums sensoriels étaient retirées.

Les tissus étaient alors rincés avec du tampon cacodylate 0,2 M à pH 7,2, post-fixés pendant une heure avec une solution de tétraoxyde d'osmium 1 % avant d'être à nouveau rincés avec du tampon cacodylate 0,2 M puis stockés dans l'éthanol 70 %.

Les échantillons étaient ensuite inclus dans la résine selon le même procédé que pour la cochlée. Pour finir, les épithéliums étaient coupés transversalement puis observés avec le même microscope (Fig. M19).

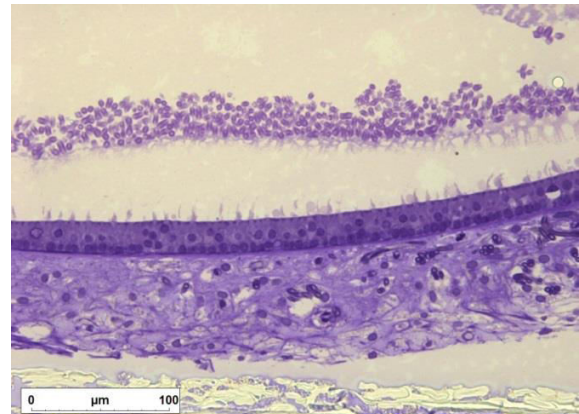


Figure M19. Image d'une coupe semi-fine transversale de 2,5 µm d'un utricule de rat témoin.

4.7.1.3 Inclusion du ganglion de Scarpa

Le crâne était ouvert au milieu, de manière longitudinale, afin de plonger l'ensemble oreille interne/os temporal/cerveau dans une solution de glutaraldéhyde 2,5 % dans du cacodylate de sodium 0,2 M. Après 15 jours de fixation à 4°C, les ganglions de Scarpa étaient disséqués sous loupe binoculaire.

Les échantillons étaient rincés dans du tampon cacodylate 0,2 M, post-fixés au tétraoxyde d'osmium 1 %, à nouveau rincés puis conservés dans l'éthanol 70 % à 4°C. Les échantillons étaient alors inclus en résine selon le même procédé que pour les inclusions de cochlée et des épithéliums vestibulaires. Ils étaient coupés au microtome à 2,5 µm, colorés au violet de crésyl avant observation en microscopie optique.

4.7.1.4 Cochléogramme

Les cochlées étaient rapidement prélevées puis perfusées via les fenêtres ronde et ovale par une solution de succinate déshydrogénase (SDH) (0,05 M de sodium succinate, 0,05 M de tampon phosphate et 0,05 % de bleu de tétrazolium). Les cochlées étaient alors immergées dans cette solution et placées 1 h au bain-marie à 37 °C avant d'être fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4 % pendant 24 h. Les cochlées étaient ensuite fraisées puis disséquées dans du tampon phosphate (PBS : phosphate buffer saline) 1 x. Avec l'aide d'une loupe binoculaire, la lame spirale osseuse, le ligament spiral ainsi que les membranes tectoriale et de Reissner étaient retirés afin de ne laisser que l'organe de Corti (Fig. M20). Celui-ci, divisé en trois fragments correspondant aux tours apical, médian et basal, était monté entre lame et lamelle dans une goutte de glycérine.

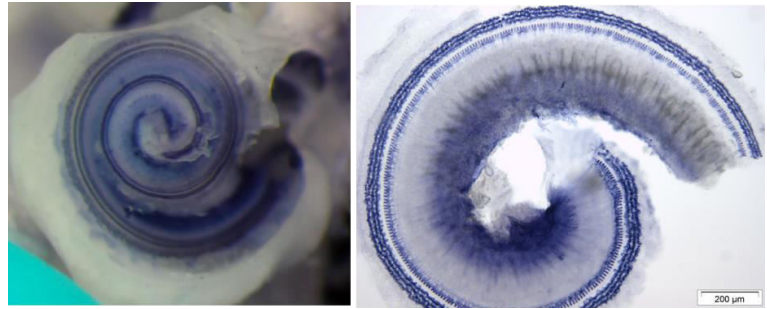


Figure M20. Image d'une cochlée disséquée (gauche) et du tour apical (droite).

Un cochléogramme est un graphique représentant le pourcentage de perte cellulaire, des trois rangées de CCE et de la rangée de CCI, tout le long de la cochlée, mettant en relation sa longueur avec la fréquence discriminée (relation distance/fréquence) (Fig. M21). Un cochléogramme de chaque animal était ainsi établi en effectuant un comptage des CC

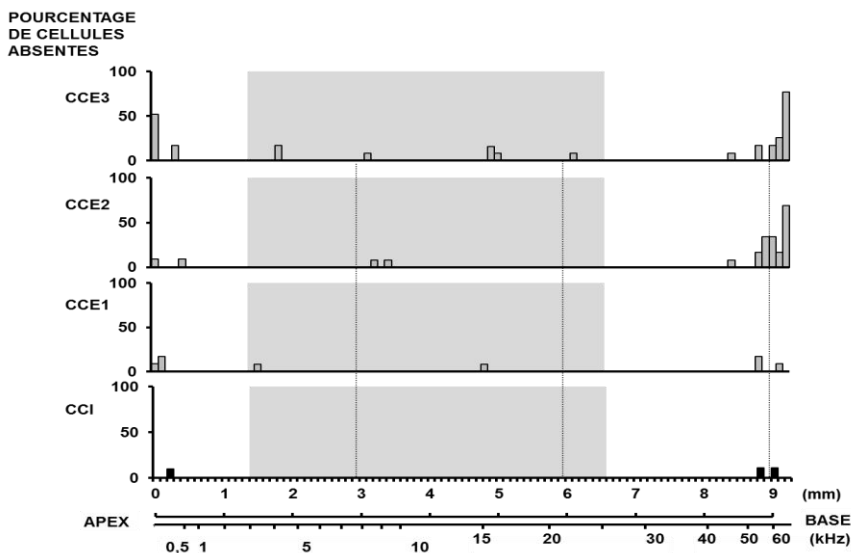


Figure M21. Cochléogramme de rat témoin où est représenté le pourcentage de perte de cellules ciliées de chaque rangée (axe Y) par rapport à la distance (mm) le long de l'organe de Corti et la carte en fréquence (axe X). L'aire grise représente la zone de fréquences analysées pendant les mesures de PDA.

présentes (spots bleus) en microscopie optique (grossissement x 400), de l'apex à la base de l'organe de Corti déroulé. La carte en fréquence de la cochlée (Müller, 1991) associée à un logiciel informatique, développé au laboratoire, était utilisée pour déterminer la position des pertes cellulaires le long de l'organe de Corti.

4.7.2 Immunohistochimie et microscopie confocale à fluorescence

En sortie d'exposition et après 4 semaines de récupération, les cochlées et les vestibules étaient isolés, fixés et marqués avec des anticorps fluorescents anti-NF200 (NF200 anticorps monoclonal clon N52, SIGMA, N0142) et MyoVIIa (Myosine VIIa polyclonal de lapin, Proteus Biosciences, 25-6790) afin d'observer l'état des fibres afférentes et les CC en microscopie confocale à fluorescence.

Les neurofilaments sont composés de 3 protéines neuronales spécifiques avec différentes masses moléculaires. L'anticorps anti-NF200 reconnaît la sous-unité lourde d'une de ces protéines (~180-220 kDa), sous forme phosphorylée ou non-phosphorylée.

Les myosines sont des protéines motrices à base d'actine qui requiert la présence d'ATP. Certaines myosines interviennent dans les mouvements intracellulaires. La myosine VIIa joue un rôle dans la motilité des cils et l'adhésion cellulaire. Dans l'oreille interne, cette protéine peut maintenir la rigidité des stéréocils pendant les mouvements dynamiques. Un déficit ou une mutation de cette protéine peut se traduire en perte auditive ou dysfonction vestibulaire.

Les échantillons étaient observés en microscopie confocale Leica TCS-SL de l'Unité de Microscopie optique avancée du CCiTUB du *Campus de Bellvitge* (Barcelone) en utilisant toujours les mêmes conditions pour les observations et les acquisitions d'images. Pour les cochlées : objectif = 40X ou 63X, zoom = 2, séries = 40 µm et sections = 1 µm. Pour les épithéliums vestibulaires : objectif = 40X ou 63X, zoom = 2, séries = 30 µm et sections = 0,5 µm. Les réglages des différents lasers d'excitation, 488 nm et 555 nm, ont été choisis avec les échantillons témoins et conservés pour les échantillons traités afin d'obtenir des valeurs de fluorescence comparables.

4.7.2.1 Immunohistochimie de la cochlée

Les rats anesthésiés étaient perfusés par voie intracardiaque avec du sérum physiologique hépariné à 1 % suivi de 300 ml de paraformaldéhyde à 4% dans du PBS 1 x. Ensuite, les cochlées étaient prélevées, post-fixées avec une perfusion intralabyrinthique avec la solution de fixateur puis plongées dans cette même solution pendant 24 h à 4°C.

Les cochlées étaient rincées deux fois dans du PBS 1 x à pH 7,2 pendant 20 min à température ambiante (TA). Ensuite, elles étaient plongées dans une solution de cryoprotecteur (34,5 % de glycérol, 30 % d'éthylène glycol, 20 % de PBS et 15,5 % d'eau distillée) pendant quelques minutes. Les cochlées pouvaient alors être placées à -20°C jusqu'à la dissection.

Sous loupe binoculaire, les cochlées étaient fraisées puis disséquées dans le PBS 1 x. La lame spirale osseuse, le ligament spiral, la strie vasculaire et les membranes étaient retirés. L'organe de Corti était divisé en trois fragments correspondant aux tours apical, médian et basal. Les échantillons étaient rincés dans du PBS 1x puis conservés à -20°C dans la solution de cryoprotection.

Pour réaliser le marquage immunohistochimique, les tissus fixés étaient pré-incubés dans une solution de blocage (0,2 % triton X-100 et 5 % donkey serum dans PBS 1 x) pendant 2 h à TA sous agitation lente. Les échantillons étaient incubés avec les anticorps primaires : MyoVIIa (1 : 200) + NF200 (1 : 400) dans PBS 1 x ON à 4°C sous agitation lente. Les échantillons étaient rincés trois fois dans le PBS 1 x contenant 0,2 % de triton X-100 sous agitation lente à TA puis étaient incubés avec les anticorps secondaires Alexa-488 anti-rabbit IgG d'âne + Alexa-555 anti-mouse IgG d'âne (1 : 500) (Fisher Bioblock Science, Invitrogen™, A21206 et A31570, respectivement) dans une solution de 0,2 % de triton X-100 dans PBS 1 x à TA deux fois pendant 90 min sous agitation lente. Les échantillons étaient ensuite rincés quatre fois 10 min dans le PBA 1 x avant montage entre lame et lamelle dans Antifade®.

4.7.2.2 Immunohistochimie de l'épithélium vestibulaire

Après sacrifice, l'os temporal des rats était ouvert à la pince afin de laisser immédiatement pénétrer dans le vestibule une solution de 4 % de paraformaldéhyde dans du PBS 1 x. Les échantillons étaient fixés ON à 4°C puis disséqués pour isoler le saccule, l'utricule et les crêtes de l'appareil vestibulaire et retirer les membranes qui recouvrent les épithéliums sensoriels de façon à obtenir une perméabilisation correcte aux anticorps primaires et secondaires.

Les échantillons étaient ensuite post-fixés avec une solution à 4 % de paraformaldéhyde pendant 1 h à TA. Les épithéliums sensoriels étaient rincés deux fois dans le PBS 1 x à pH 7,2 pendant 20 min à TA. Ensuite, ils étaient plongés dans la solution de cryoprotecteur. Ils étaient cryoconservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Avant d'utiliser les épithéliums, deux lavages de 20 min dans le PBS 1x étaient réalisés.

Afin de réaliser l'immunohistochimie des épithéliums, les échantillons fixés étaient d'abord préincubés pendant 90 min à TA sous agitation lente dans une solution 4 % triton X-100 et 20 % donkey serum dans le PBS 1 x. Les échantillons étaient incubés avec les anticorps primaires : MyoVIIa (1 : 500) + NF200 (1 : 800) dans 0,1 % triton X-100 et 1 % donkey serum dans le PBS 1 x pendant 48 h à 4°C sous agitation lente. Les échantillons étaient rincés quatre fois 10 min dans le PBS 1 x sous agitation lente à TA puis étaient incubés avec les anticorps secondaires Alexa-488 anti-rabbit IgG d'âne + Alexa-555 anti-mouse IgG d'âne (1 : 500) (Fisher Bioblock Science, Invitrogen™, A21206 et A31570, respectivement) dans une solution de 0,1 % de triton X-100 dans le PBS 1 x ON à 4°C sous agitation lente.

Quatre lavages de 10 min dans le PBS 1 x étaient réalisés sous agitation lente à TA avant d'inclure les échantillons dans la gélatine liquide (0,49 % de gélatine, 30 % d'albumine et 20 % de saccharose dans PBS 1 x). Ensuite, une couche de gélatine solidifiée grâce à 9 % de glutaraldéhyde était coulée dans un moule d'1,5 cm de diamètre puis laissée solidifiée pendant 5 min. Les épithéliums étaient alors déposés au centre de ce cercle solidifié en faisant attention à l'orientation des échantillons : les crêtes en position latérale et les utricules et saccules en position décubitus dorsal avec l'épithélium ciliaire dirigé vers le haut. L'excès de gélatine liquide était retiré précautionneusement à l'aide d'un papier absorbant. Ensuite, les épithéliums étaient recouverts d'une seconde couche de gélatine + 9 % glutaraldéhyde qui solidifiait pendant 15 min. Pour finir, les blocs étaient détaillés en forme de pyramide puis post-fixés avec du paraformaldéhyde 4 % dans le PBS 1 x à pH 7,4 ON à 4°C.

Les échantillons étaient conservés dans cette solution jusqu'à ce qu'ils soient coupés. Les blocs de gélatine contenant les échantillons étaient collés avec de la colle Loctite (Super Glue-3) sur le support du vibratome en position verticale, en positionnant la couche de gélatine solide vers l'arrière (en face de la lame de coupe), afin de réaliser des coupes transversales des épithéliums vestibulaires. Des sections de 40 µm étaient réalisées au vibratome Leica VT 1000M, les coupes étaient maintenues avec du Mowiol 4-88 et laissées à sécher ON à 4°C.

4.7.3 Microscopie électronique à balayage (SEM)

A la fin de l'exposition ou de l'expérience, les cochlées et les vestibules étaient collectés, fixés et déshydratés afin de réaliser une évaluation qualitative de l'état des stéréocils en microscopie électronique à balayage (Jeol 7400) à 2 kV de voltage.

4.7.3.1 SEM de la cochlée

Les rats profondément anesthésiés étaient perfusés par voie intracardiaque avec du sérum physiologique hépariné à 1 % suivi de 300 ml de glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon cacodylate 0,2 M. Les animaux étaient ensuite décapités et les cochlées prélevées. Une post-fixation intralabyrinthique des cochlées était réalisée avec la solution de fixateur avant d'y plonger les échantillons pendant 24 h à 4°C.

Le lendemain, après un rinçage avec du tampon cacodylate 0,2 M, les cochlées étaient post-fixées pendant 1 h avec une solution de tétraoxyde d'osmium (OsO₄ 1 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,2 M) puis rincées à nouveau au tampon. Après déshydratation dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes de 25 à 70 %, les cochlées étaient fraisées jusqu'à ne laisser qu'une fine couche osseuse. Les cochlées étaient alors disséquées pour ne laisser visible que l'organe de Corti. Les échantillons étaient ensuite déshydratés dans des concentrations de solutions d'éthanol jusqu'à 100 % puis séchés complètement dans un appareil à point critique utilisant du CO₂ liquide (Leica EM CPD300).

Pour finir, les échantillons étaient collés sur des plots en laiton, tapissés de laque d'argent conductrice et métallisés à l'or avant observation en SEM.

4.7.3.2 SEM de l'épithélium vestibulaire

L'os temporal était ouvert rapidement à la pince afin de laisser immédiatement entrer dans le vestibule une solution de glutaraldéhyde 2,5 % dans du cacodylate de sodium 0,2 M. Après 48 h de fixation à 4°C, l'appareil vestibulaire était disséqué (sacculé, utricule et crêtes) et les membranes qui recouvrent les épithéliums étaient retirées.

Les tissus étaient rincés au cacodylate 0,2 M, post-fixés avec une solution de tétraoxyde d'osmium 1 % pendant 1 h avant d'être à nouveau rincés avec du tampon cacodylate. Pour procéder à la déshydratation, les épithéliums étaient alors placés dans des capsules poreuses de 0,30 µm (Leica Microsystems SAS, 16771331242) qui permettent la diffusion de l'eau et de l'éthanol. Les échantillons étaient déshydratés avec des concentrations croissantes d'éthanol jusqu'à arriver à 100 % ON. Le jour suivant, les échantillons étaient séchés dans un appareil à point critique qui utilise du CO₂ liquide (Leica EM CPD300).

Ensuite, ils étaient montés sur un plot en laiton collés sur un adhésif double face en carbone conducteur (Electron Microscopy Sciences, 77825-09) puis métallisés à l'or. Les échantillons étaient conservés sous vide jusqu'à observation en microscopie électronique à balayage (Jeol 7400) à 2 kV.

4.8 Techniques biomoléculaires (PCR)

Afin d'analyser les lésions centrales, une qPCR du cervelet a été réalisée. Cette technique amplifie un fragment d'ADN d'intérêt.

A la fin des expositions, les animaux étaient profondément anesthésiés avec un mélange de Kétamine (Clorkétam®, 75mg/kg) et Xylazine (Rompun®, 5mg/kg) par *i.p.* puis décapités pour réaliser le prélèvement de cerveau. Les cervelets étaient plongés dans l'azote liquide pour une congélation rapide puis conservés à -80°C jusqu'à analyse.

4.8.1 Extraction des ARN totaux

Les échantillons de cervelet étaient broyés dans des tubes à billes contenant du réactif de **TRIzol** (Invitrogen™ #15596026). Selon un protocole dérivé de Chomczynski, 1993, la solution claire obtenue après centrifugation était mise en présence de chloroforme, homogénéisée puis centrifugée à nouveau. Après avoir isolé la phase aqueuse dans un tube Eppendorf «RNase free», l'ARN total était précipité par l'ajout d'isopropanol. Pour finir, l'ARN obtenu était lavé à l'éthanol 75%, séché puis dissous dans 100µL d'eau «RNase free».

Afin de quantifier l'ARN total présent, une mesure par spectrométrie avec NanoPhotometer® P-Class (IMPLEN) était réalisée. La concentration totale était mesurée et les rapports A260/A280 (indicateur de contamination par les protéines ; pureté entre 1,8 et 2,0 pour l'ADN et entre 2,0 et 2,2 pour l'ARN) et A260/A230 (2ème indicateur de pureté ; doit être compris entre 2,0 et 2,2) étaient calculés.

4.8.2 Vérification de la qualité des ARN

La qualité des ARN était vérifiée par deux techniques : gel d'agarose et par l'appareil 2100 Bioanalyser (Agilent).

4.8.3 Synthèse d'ADNc à partir de l'ARN

L'ARN total (500 ng) était réverse-transcrit avec *iScriptTM Reverse Transcription Supermix* pour RT-qPCR (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) comme suit : 5 min à 25°C, 30 min à 42°C et 5 min à 85°C.

4.8.4 Amplification PCR

Les réactions d'amplification étaient réalisées avec l'appareil CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), avec un programme qui contenait différentes étapes.

4.8.4.1 Plaque neurotoxicité

Les *PrimePCR SAB target panels* (Bio-Rad) sont une collection de gènes caractéristiques dans un processus biologique spécifique, une maladie spécifique ou une voie biologique. Dans notre cas, la plaque H96 de neurotoxicité (liste cible SAB) a été utilisée (Fig. M22).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	ABL1	BAG4	CD8B	CRADD	EREG	GSN	HTR3A	NOL3	PLP1	TNFRSF10B	TRPM4	HPRT1	A
B	ACTB	BDNF	CDKN1A	DAPK1	FAS	GSR	IL10	NOS1AP	POU1F1	TNFRSF11B	TXNIP	gDNA	B
C	ANGPTL4	BIK	CDO1	DDIT3	FASLG	GUCY1A3	KIT	NOSIP	RASD1	TNFRSF25	TYRP1	PCR	C
D	ARG1	BIRC2	CIDEA	DRD2	GAL	GUSB	LDHA	NOSTRIN	RPLP0	TP53	USP7	RQ1	D
E	ARG2	CAMK2A	CIDEB	DRP2	GALC	HEPH	LEFTY2	NOTCH4	SFXN5	TPH1	XIAP	RQ2	E
F	ARRB1	CAMK2D	CLCN5	DYNLL1	GCH1	HSP90AA1	LTA	NUP50	SLC16A3	TRAF2	YWHAE	RT	F
G	ATF4	CASP7	CLCNKA	EGLN3	GPR37	HSPA6	MMP9	PAPPA	SOD2	TRAF4	TBP		G
H	B2M	CCND1	COL12A1	EIF2AK3	GRIN1	HTR1A	NFKB1	PDIA4	TACR1	TRPM1	GAPDH		H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Figure M22. Plaque neurotoxicité. Source : Bio-Rad.

Une solution contenant 12 μL d'ADNc, 1,1 μL de 2x Supermix universel SsoAdvanced™ (Bio-Rad) et 1,088 μL d'eau sans RNase a été préparée. Un volume de 20 μL de solution a été déposé dans chaque puits. L'amplification était réalisée comme suit : 2 min à 95°C, puis 40 fois [5 s à 95°C et 60 s à 60°C, avec une *melt curve* de 65-95°C]. Les « fold changes » des gènes cibles sont exprimés en tant que animaux exposés / animaux témoins relativement à trois gènes de ménage (*Gapdh*, *Tbp* et *Hprt*).

4.8.4.2 PCR des gènes *cdkn1a*, *cideb* et *trpm1*

La PCR en temps réel était réalisée avec CFX96 Touch™ (BioRad) en présence de iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad) et des promoteurs PCRTM (*cdkn1a*, *cideb*, *trpm1*) selon le protocole du fournisseur. L'amplification était réalisée comme suit : 5 min à 95°C, puis 35 fois [15 s à 95°C et 60 s à 60°C]. Les « fold changes » des gènes cibles sont exprimés en tant que animaux exposés / animaux témoins relativement à trois gènes de ménage (*β -actin*, *Rpl13* et *Hprt*).

4.8.4.3 Analyse des résultats de la PCR

L'analyse des résultats a été réalisée avec le programme *Bio-Rad CFX Manager*. La méthode du $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ a été utilisée pour le calcul de l'expression des gènes d'intérêts :

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \text{moyenne}(\Delta\text{Ct}_{\text{exposés}}) - \text{moyenne}(\Delta\text{Ct}_{\text{témoins}}).$$

4.9 Analyse statistique

Les analyses statistiques étaient réalisées avec le programme de statistiques **Statgraphics Centurion version XVI** et le programme **Prism V7.03 (GraphPad. Software Inc., La Jolla, CA)**. Les résultats statistiques s'expriment de la manière suivante : F(dfb, dfr) F-ratio; p = valor p, où dfb est le degré de liberté inter-groupes et dfr est le degré de liberté intra-groupe. Le F-ratio est la moyenne des valeurs au carré entre groupes, divisée par la moyenne des valeurs au carré intra-groupe. Le niveau de significativité statistique (α) a été établi à 95 % ($p < 0,05$). Tous les résultats sont représentés avec la moyenne \pm SEM.

Les **concentrations sanguines et cérébrales de CS₂**, les **concentrations de TTCA dans l'urine** et le **pourcentage de perte de CC** ont été analysés avec une analyse de variance (ANOVA) à un facteur. L'analyse *post-hoc* a été réalisée en utilisant la méthode de Bonferroni pour comparer les variations entre chaque groupe.

Les données de la **RT-qPCR** ont été analysées par le test de Mann-Whitney. Les résultats sont représentés comme des médianes [Q1; Q3], avec Q1 et Q3 qui correspondent aux quartiles 25 % et 75 %, respectivement.

De même, une ANOVA à un facteur a été utilisée pour analyser les **variations de l'amplitude des PDA** entre animaux exposés et témoins pour chaque fréquence. A la fin de l'exposition, les variations correspondent à [PDA1 – PDA0] – K1. La constante K1 est la moyenne de [PDA1 – PDA0] calculée à partir du groupe témoin correspondant. Pour la fréquence à 3,6 kHz, la moyenne et la déviation standard de la variation ont été évaluées en utilisant le modèle « Tobit », qui permet de tenir compte des valeurs de PDA qui se trouvent proches voire dans le bruit de fond. Après 4 semaines de récupération, les variations correspondent à [PDA2 – PDA0] – K2. La constante K2 est la moyenne de PAS = [PDA2 – PDA0] calculée à partir du groupe témoin correspondant. Une analyse *post-hoc* a été réalisée en utilisant la méthode de Bonferroni pour comparer les variations entre chaque groupe.

Une analyse statistique des variations des différents **paramètres mesurés pour le NPS**, les **tests de comportement** et la variation de poids des animaux, a été réalisée à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs (temps et traitement) pour mesures répétées. Une analyse *post-hoc* a également été réalisée en utilisant le test de Bonferroni pour comparer les variations entre chaque groupe exposé vs. sa valeur basale (T0). Les données du NPR ont été exprimées en pourcentage par rapport aux valeurs basales.

5 . RESULTATS

5.1 CHAPITRE I :

EFFET DE LA CO-EXPOSITION AU BRUIT RICHE EN BASSES FREQUENCES ET AU CS₂

5.1.1 Santé générale des animaux

Chaque semaine, tous les animaux étaient pesés et un contrôle de leur état physiologique était réalisé. Comme d'autres solvants, le CS₂ peut générer une perte de poids importante quand les animaux sont exposés à de fortes doses et pendant une longue période (Hirata et al., 1992a; Rebert and Becker, 1986). C'est la raison pour laquelle un contrôle régulier des animaux était réalisé selon le protocole standard défini par Morton and Griffiths, 1985 (Annexe 1).

Les rats arrivaient à l'animalerie avec un poids de 150-180 g, et après une période de quarantaine d'une semaine et une période de stabulation (8 semaines au total), ils atteignaient une moyenne de poids de 220-250 g au moment où les premières mesures fonctionnelles étaient réalisées chez tous les animaux.

Les animaux témoins (n = 37) et exposés au bruit seul (n = 25) ont montré une augmentation régulière de leur poids de l'ordre de 9,3 et 5,4 g, respectivement au cours de l'**exposition** (Figure R1). Les animaux co-exposés au CS₂ 250 ppm et bruit (n = 19) et les animaux exposés au CS₂ 250 ppm (n = 8) ont eu un gain de poids beaucoup plus modéré pendant les quatre semaines d'exposition, respectivement de 0,7 et 2,6 g. L'ANOVA à deux facteurs a indiqué que l'interaction « traitement » x « temps » pendant l'exposition était significative [F(9,438) = 9,21; p < 0,0001]. Le test de Bonferroni indiquait une différence significative des poids des animaux témoins au cours de toutes les semaines d'exposition par rapport à leur poids initial, et les animaux exposés au bruit seul à partir de la deuxième semaine d'exposition. En revanche, les groupes exposés au solvant n'ont pas présenté de gain de poids significatif pendant toute l'exposition. En revanche, les animaux ne présentaient pas de signe de souffrance ou de faiblesse, leur apport alimentaire était normal et leur pelage avait un bon aspect.

Pendant la **période de récupération**, tous les groupes d'animaux ont présenté une augmentation de poids (Fig. R1). Les animaux exposés au CS₂ ou CS₂ + bruit ont vu leur poids augmenter de 27,8 et 24,8 g, respectivement, pendant la période de récupération, alors que les animaux exposés au bruit seul et les témoins n'ont gagné que 13,6 et 16,9 g, respectivement. Les groupes d'animaux ne présentaient pas de différence significative sur la moyenne de poids à la fin des 4 semaines de récupération (T2) [F(3,85) = 1,27 ; p = 0,2911].

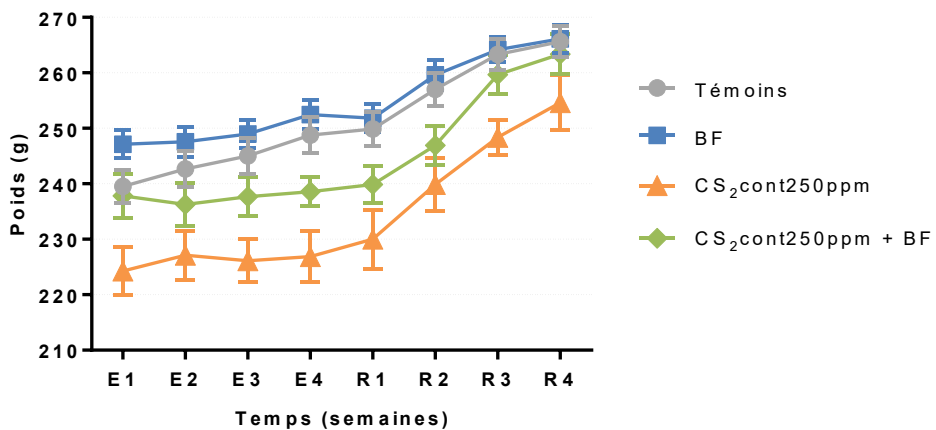


Figure R1. Evolution de la masse corporelle des rats pendant la période d'exposition (E) et la période de récupération (R) pour tous les groupes d'animaux. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM.

5.1.2 Effet sur le système auditif

5.1.2.1 Fonction auditive : produits de distorsion acoustique

L'exposition à un **bruit continu** ($L_{EX,d} = 105$ dB SPL) a provoqué une diminution significative des amplitudes de PDA entre 3,6 et 6 kHz (Fig. R2). La variation maximale en sortie d'exposition a été obtenue à 4,8 kHz ($-12,6 \pm 2$ dB), tandis que les variations maximales après 4 semaines de récupération se situaient à 3,6 kHz ($-5,1 \pm 1,3$ dB). La perte temporaire maximale (4,8 kHz) était donc localisée une octave au-dessus de la fréquence centrale du spectre du bruit de bande [0,5 kHz - 2 kHz].

Les valeurs obtenues avec le **groupe co-exposé BF-CS₂ 250 ppm** étaient significativement différentes de celles obtenues avec le groupe témoin, les pertes s'étalaient de 3,6 à 9,6 kHz (Fig. R2). Au terme des 4 semaines d'exposition, la gamme de fréquence endommagée était donc plus étendue pour le groupe co-exposé que pour le groupe exposé au bruit BF seul : à 9,6 kHz, seuls les animaux co-exposés présentaient des PDAs significativement ($p = 0,0115$) plus faibles que ceux des animaux témoins. Au terme des 4 semaines de récupération, la gamme de fréquences avec une variation d'amplitude significative était identique à celle obtenue après exposition au bruit seul : de 3,6 à 6 kHz. Ainsi, l'élargissement de la gamme des fréquences endommagées lorsque le CS₂ était combinée au bruit BF était un phénomène temporaire.

De plus, les variations de PDA observées pour le groupe CS₂-BF aux fréquences 4,8 et 6 kHz étaient légèrement inférieures à celles mesurées pour le groupe exposé au bruit seul, cependant ces différences n'étaient pas significatives ($p = 0,1226$ et $p = 0,0702$, respectivement).

Comme mentionné dans le paragraphe *matériels et méthodes*, la valeur des amplitudes des PDA en sortie d'exposition à 3,6 kHz a été calculée avec un modèle "Tobit" pour tous les groupes d'exposition. Avant l'exposition, les amplitudes des PDA à 3,6 kHz étaient les plus faibles par rapport aux autres fréquences (environ 12 dB). En sortie d'exposition, la réduction de cette amplitude résultant du traitement rendait impossible la mesure de certains animaux pour lesquelles les valeurs se trouvaient alors en-dessous du bruit de fond. Après 4 semaines sans bruit, tous les rats avaient suffisamment récupéré pour permettre la mesure des PDA à toutes les fréquences.

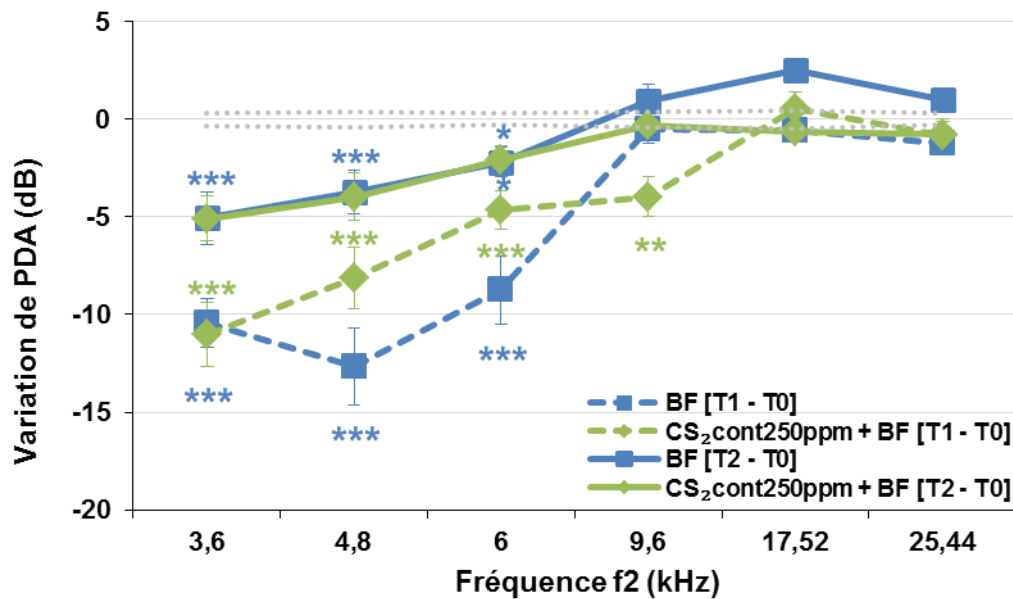


Figure R2. Variations des PDA du groupe exposé au bruit de basses fréquences seul et à 250 ppm continu de CS₂ + bruit de basses fréquences. BC : bruit riche en basses fréquences. CS₂ : disulfure de carbone. Perte auditive à la fin de la période d'exposition : $[T1 - T0] = [PDA1 - PDA0]_{\text{Exposés}} - [PDA1 - PDA0]_{\text{Témoins}}$. Perte auditive à la fin de la période de récupération : $[T2 - T0] = [PDA2 - PDA0]_{\text{Exposés}} - [PDA2 - PDA0]_{\text{Témoins}}$. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM. La ligne en pointillés gris représente la variabilité du groupe témoin (SEM) à la fin de la période d'exposition. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, significativement différent de la moyenne des témoins, test de Bonferroni.

5.1.2.2 Analyses histologiques

5.1.2.2.1 Immunohistochimie de la cochlée

Des analyses immunohistochimiques (IHC) ont été réalisées en microscopie confocale à fluorescence de manière à analyser si des pertes cellulaires et des altérations au niveau des afférences se produisaient.

L'analyse des cochlées marquées à l'aide des anticorps anti-NF-200 et anti-myosine VIIa identifiant respectivement les neurofilaments des fibres afférentes et les cellules ciliées n'ont pas montré de différence morphologique entre les animaux témoins ($n = 11$; 6 à T1 et 5 à T2), exposés au bruit seul ($n = 8$; 4 à T1 et 4 à T2) et co-exposés ($n = 7$; 4 à T1 et 3 à T2), à la fin de l'exposition et après la période de récupération, et dans tous les segments cochléaires (basal, medium et apical).

Comme montré sur la Figure R3, on peut identifier les trois rangées de CCE et une rangée de CCI grâce au marquage de l'anticorps anti-myosine VIIa. Les observations n'ont révélé aucune perte de cellules ciliées liée au traitement. L'anticorps anti-neurofilament a marqué les terminaisons afférentes qui sont en contact avec les CCI. Aucune différence n'a été observée sur les terminaisons nerveuses entre les animaux exposés et les témoins, que ce soit à la fin de l'exposition ou après la période de récupération. Ni le bruit (Fig. R3C-D), ni la co-exposition à 250 ppm de CS₂ + bruit (Fig. R3E-F) n'ont causé d'effet évident sur la distribution des fibres afférentes et des neurofilaments.

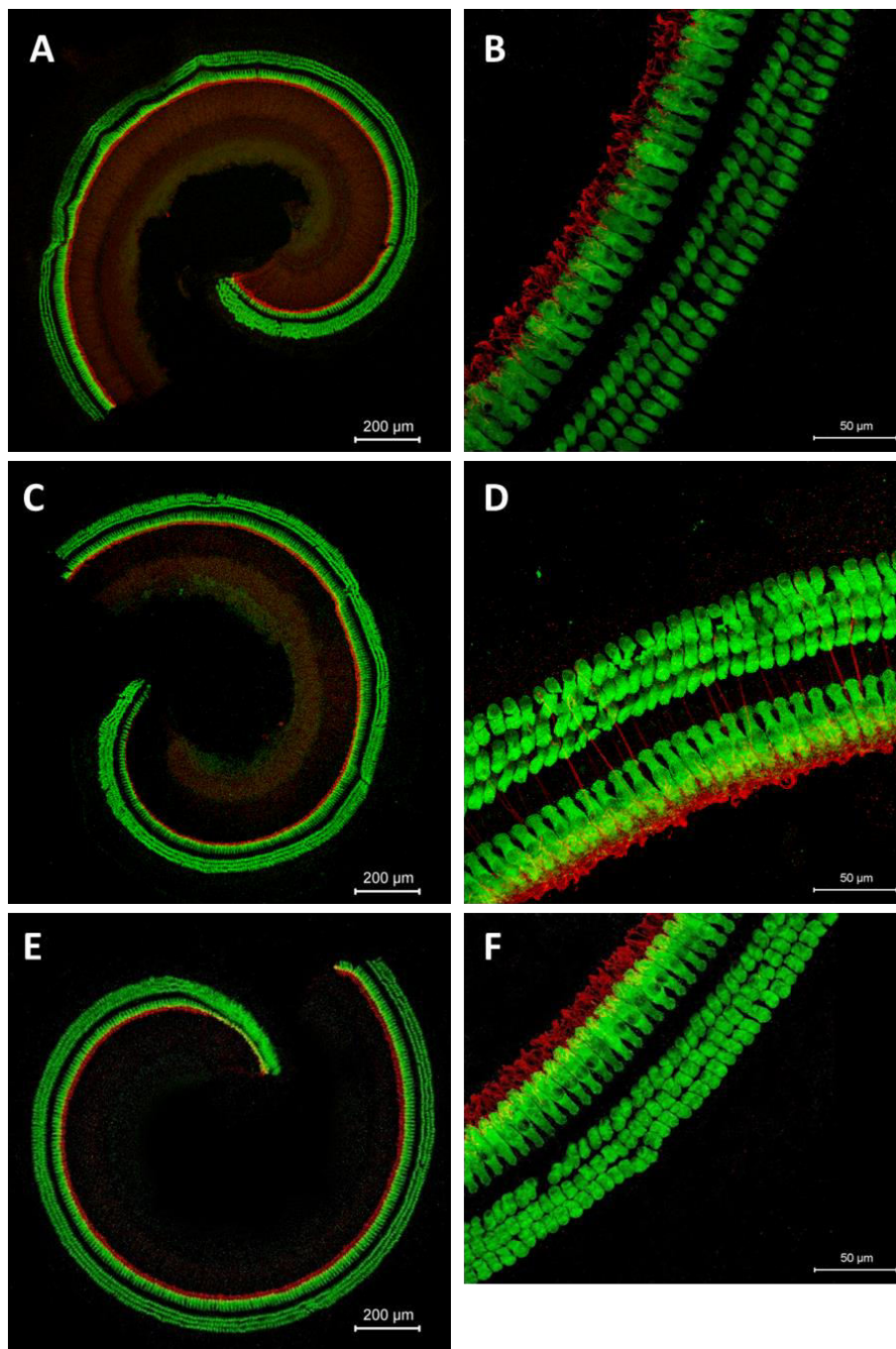


Figure R3. Images représentatives de certains animaux à la fin des 4 semaines d'exposition en microscopie confocale à fluorescence de l'épithélium sensoriel auditif où l'on voit l'organe de Corti marqué par les anticorps anti-myosine VIIa (vert) et anti-neurofilament (rouge). (A et B) Animal témoin avec le tour apical (A) et un grossissement du tour médian (B). (C et D) Animal exposé au bruit seul avec le tour apical (C) et un grossissement du tour médian (D). (E et F) Animal exposé à 250 ppm de disulfure de carbone + bruit avec le tour médian (E) et un grossissement de celui-ci (F).

5.1.2.2 Coupes semi-fines de la cochlée (organe de Corti + ganglion spiral)

Afin de révéler certaines anomalies ultrastructurelles causées par un possible dommage ototoxique et d'étudier sa récupération a posteriori, les organes de Corti et les ganglions spiraux ont été examinés en microscopie optique. Des coupes semi-fines ont été réalisées à partir d'échantillons d'animaux témoins (n = 5), d'animaux exposés au bruit seul (n = 6) et d'animaux co-exposés (n = 7).

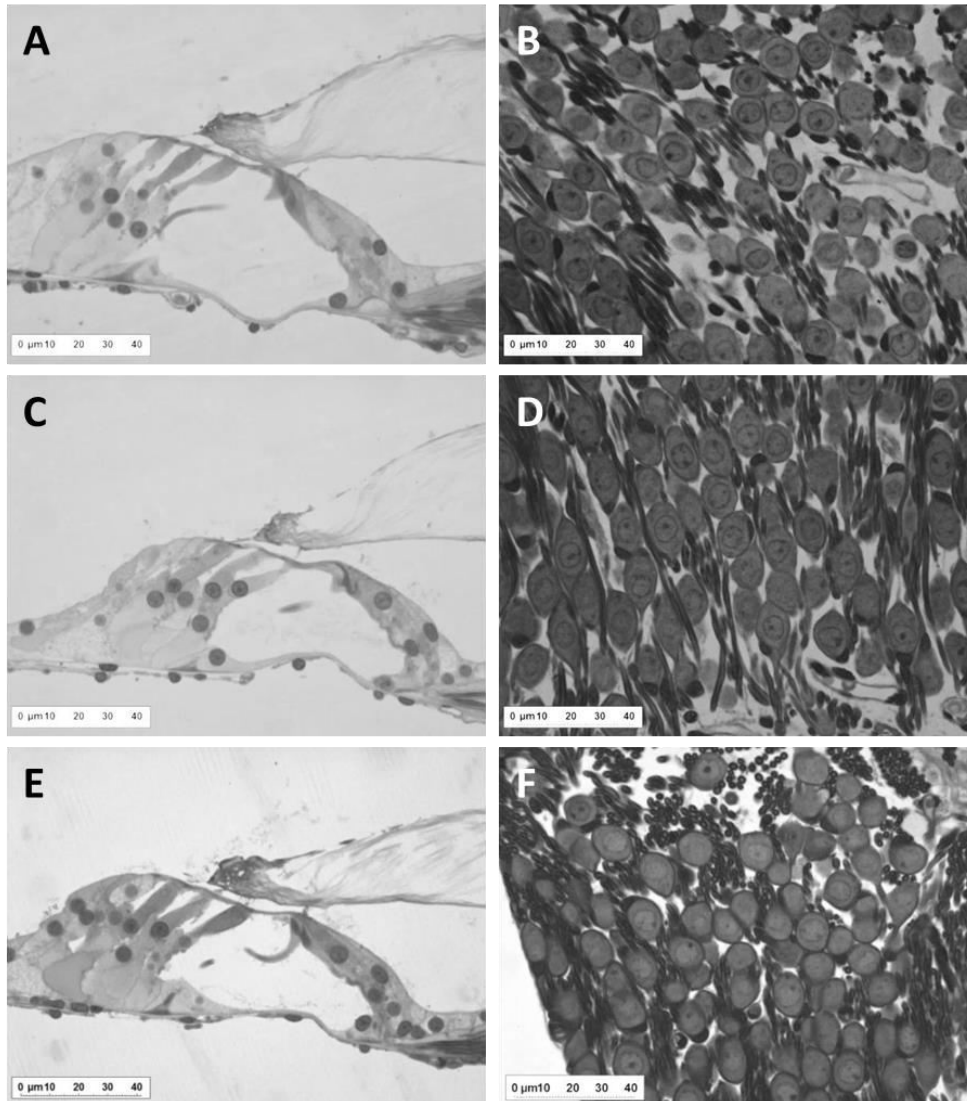


Figure R4. Microscopie optique de coupes semi-fines de la cochlée observées à la fin de l'exposition. (A et B) Animal témoin. (C et D) Animal exposé au bruit seul. (E et F) Animal exposé à 250 ppm de disulfure de carbone + bruit. (D) Animal exposé à 250 ppm continu de disulfure de carbone + bruit. Images de gauche : organe de Corti avec les trois cellules ciliées externes et une cellule ciliée interne, avec la membrane tectoriale unie aux stéréocils. Images de droite : corps cellulaires des neurones ganglionnaires du ganglion apical.

Dans toutes les coupes, la morphologie était similaire à celle de rats adultes témoins (Fig. R4A-B). Dans l'organe de Corti, les CCI, les trois rangées de CCE, les cellules de Deiters et les cellules de Hensen présentaient des caractéristiques morphologiques normales. Aussi bien à la fin des 4 semaines d'exposition (Fig. R4) qu'après la période de récupération (Fig. R5), une morphologie normale était maintenue pour tous les groupes et dans toutes les régions cochléaires. Ceci inclut le tour apical de la cochlée dédié à la discrimination des basses fréquences des rats exposés à 250 ppm de CS₂ + bruit après les 4 semaines d'exposition. De même, les cellules du ganglion spiral n'ont pas été malmenées, ni par le bruit, ni par la co-exposition CS₂ + bruit. Par conséquent, la morphologie générale des cochlées est restée intacte, indépendamment du type d'exposition et du moment de l'observation.

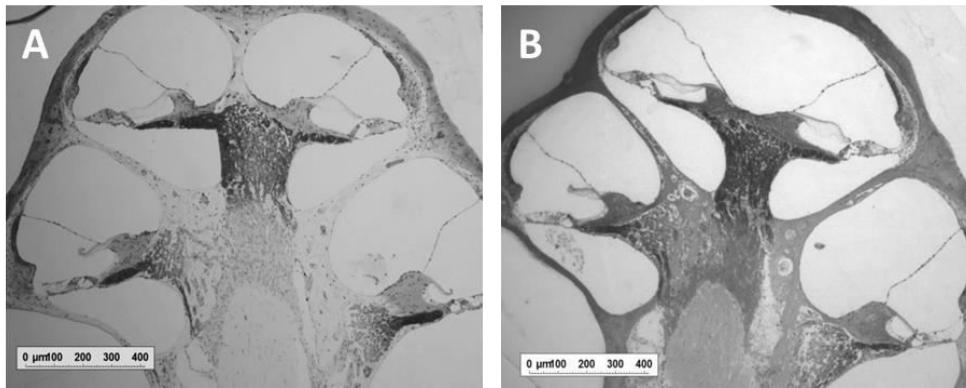


Figure R5. Microscopie optique de coupes semi-fines de la cochlée observés à la fin de la période de récupération. (A) Animal témoin (B) Animal exposé à 250 ppm de disulfure de carbone + bruit.

5.1.2.2.3 Cochléogramme

Après une période de récupération de 4 semaines, un comptage des cellules ciliées en microscopie optique a été effectué afin de quantifier le pourcentage de pertes cellulaires.

Les cochléogrammes obtenus à partir des groupes témoins (Fig. R6) et des groupes exposés (Fig. R7-8) étaient similaires. Indépendamment du groupe, on observait une très légère absence de cellules ciliées le long de l'organe de Corti. Pour tous les groupes, la perte de CCI et de CCE de la première rangée ne dépassait jamais 1%, et des pertes entre 1 et 2% ont été obtenues dans les deuxième et troisième rangées de CCE.

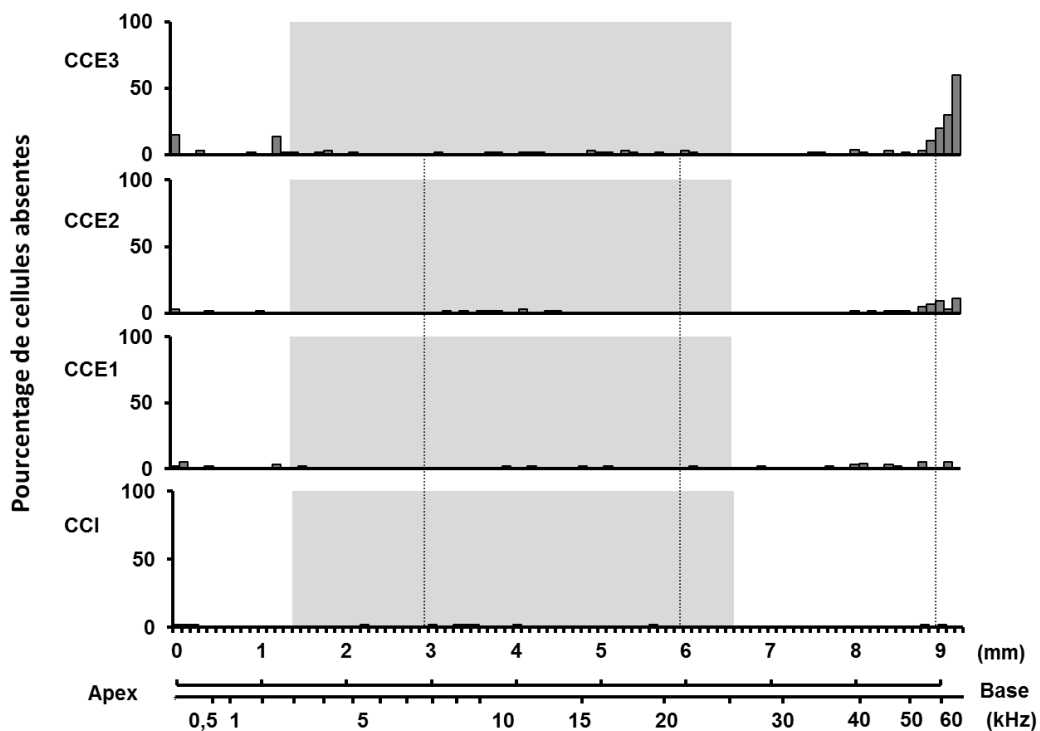


Figure R6. Moyenne des cochléogrammes ($n = 5$) de rats témoins 4 semaines après la fin de l'exposition. Axe X : la ligne supérieure représente la distance (mm) le long de la spirale de l'organe de Corti, la ligne inférieure représente la carte en fréquences. Axe Y : pourcentage de perte de cellules ciliées. CCI : cellules ciliées internes, CCE1 : première rangée de cellules ciliées externes, CCE2 : deuxième rangée de cellules ciliées externes, CCE3 : troisième rangée de cellules ciliées externes. La zone grisée indique la zone de fréquences mesurées par les produits de distorsion acoustique. Les valeurs correspondent à la moyenne.

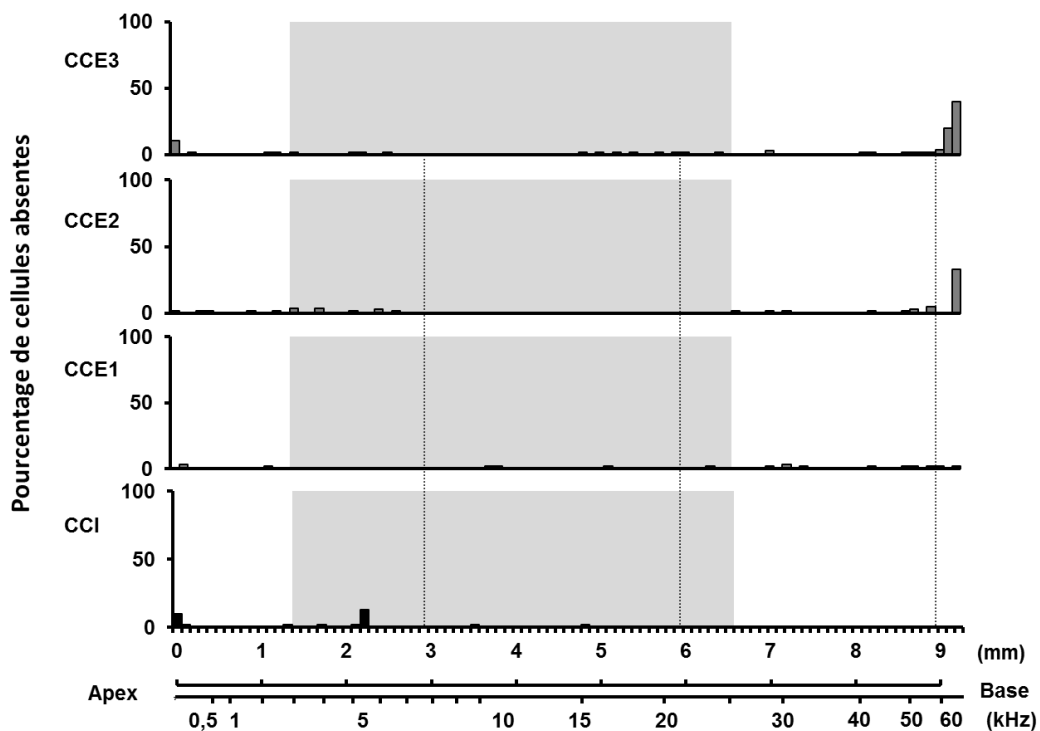


Figure R7. Moyenne des cochléogrammes ($n = 3$) de rats exposés au bruit 4 semaines après la fin de l'exposition. Axe X : la ligne supérieure représente la distance (mm) le long de la spirale de l'organe de Corti, la ligne inférieure représente la carte en fréquences. Axe Y : pourcentage de perte de cellules ciliées. CCI : cellules ciliées internes, CCE1 : première rangée de cellules ciliées externes, CCE2 : deuxième rangée de cellules ciliées externes, CCE3 : troisième rangée de cellules ciliées externes. La zone grisée indique la zone de fréquences mesurées par les produits de distorsion acoustique. Les valeurs correspondent à la moyenne.

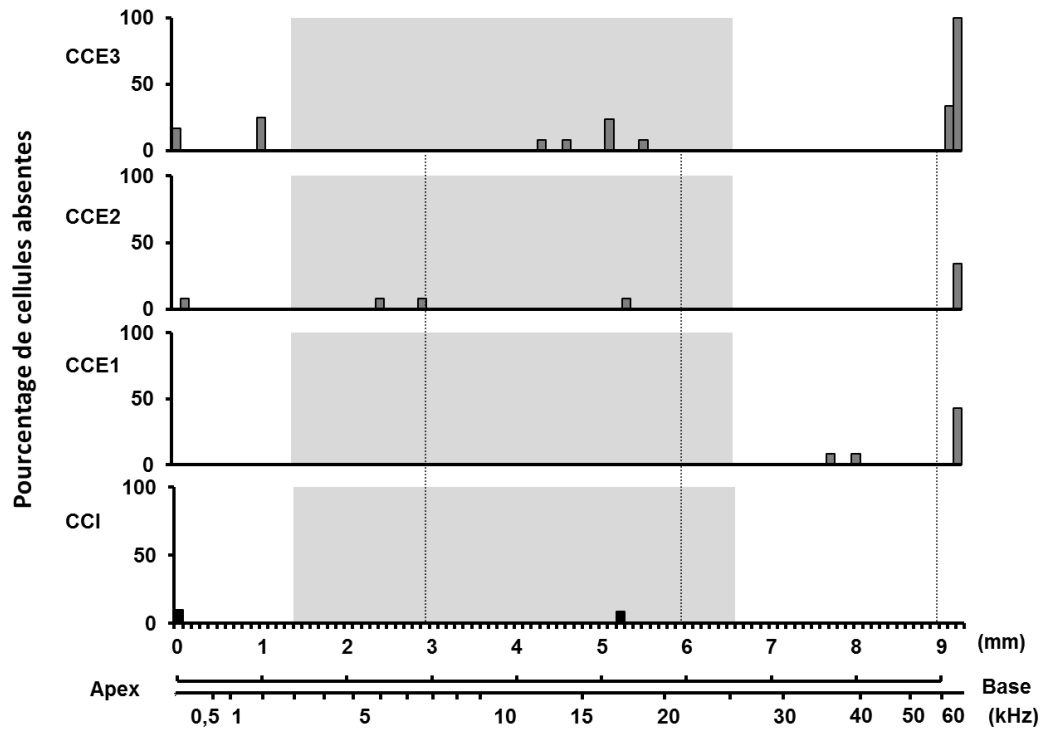


Figure R8. Moyenne des cochléogrammes ($n = 4$) de rats exposés à 250 ppm de CS₂ + bruit 4 semaines après la fin de l'exposition. Axe X : la ligne supérieure représente la distance (mm) le long de la spirale de l'organe de Corti, la ligne inférieure représente la carte en fréquences. Axe Y: pourcentage de perte de cellules ciliées. CCI : cellules ciliées internes, CCE1 : première rangée de cellules ciliées externes, CCE2 : deuxième rangée de cellules ciliées externes, CCE3 : troisième rangée de cellules ciliées externes. La zone grisée indique la zone de fréquences mesurées par les produits de distorsion acoustique. Les valeurs correspondent à la moyenne.

L'absence de certaines CCE à l'extrême base (plus de 50 kHz) révélée par le cochléogramme, n'était pas due à l'exposition au CS₂ ni au bruit, mais plutôt à la morphologie de l'organe de Corti. L'organe de Corti se rétrécit à la base de la cochlée, ce qui fait que seules les CCI restent présentes. A mesure que l'on s'éloigne de la base, apparaît la première rangée de CCE, suivie de la seconde puis de la troisième. Par conséquent, l'absence de certaines CCE à la base de la cochlée est considérée comme un état normal.

5.1.2.2.4 SEM de la cochlée

Les épithéliums sensoriels auditifs ont été observés en microscopie électronique à balayage pour les rats témoins, les rats seulement exposés au bruit de basses fréquences ($n = 5$) et pour les rats co-exposés à 250 ppm de CS₂ + bruit ($n = 6$) à la fin de la période de récupération.

Ces observations histologiques de l'épithélium sensoriel ont confirmé que les échantillons témoins de cette étude (Fig. R9) avaient les mêmes caractéristiques morphologiques que ceux décrits dans la littérature (Robles and Ruggero, 2001).

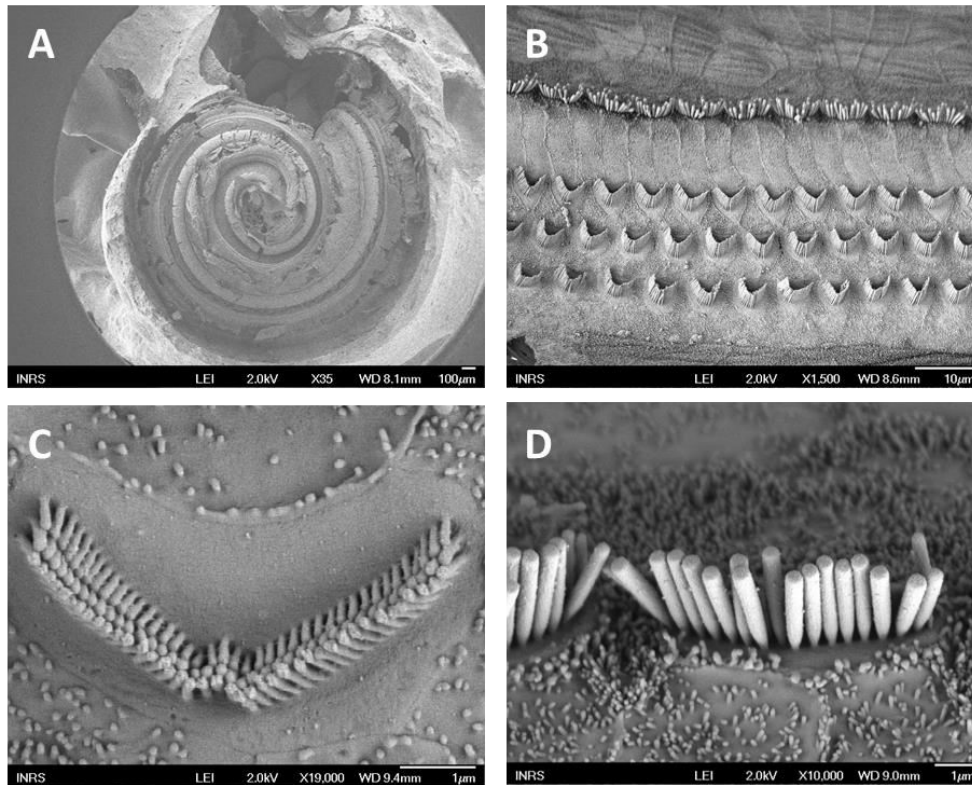


Figure R9. Microscopie électronique à balayage des organes de Corti d'animaux témoins observés à la fin de la période de récupération. (A) Vue générale de la cochlée disséquée (X35). (B) Zoom des faisceaux ciliaires intacts des trois rangées de cellules ciliées externes et la rangée de cellules ciliées internes à environ 8 kHz (X1900). (C) Cellule ciliée externe (X15000). (D) Cellule ciliée interne (X10000).

L'exposition au bruit et/ou à certains solvants, peut produire des dommages mécaniques au niveau des stéréocils, lesquels peuvent être visibles immédiatement après l'exposition et être réversibles ou non, en fonction de l'importance du dommage (Wang et al., 2002). De même, une exposition au bruit et/ou aux solvants conduit à la perte de cellules ciliées causée par la mort cellulaire.

Indépendamment du groupe, aucune lésion évidente n'a été observée au niveau des stéréocils. Les échantillons d'animaux exposés, aussi bien au bruit (Fig. R10), qu'au bruit + solvant (Fig. R11) étaient similaires aux échantillons des témoins (Fig. R9). Ces données démontrent que ni le bruit de basse fréquence ni la co-exposition de bruit avec le CS₂ n'ont endommagé les stéréocils.

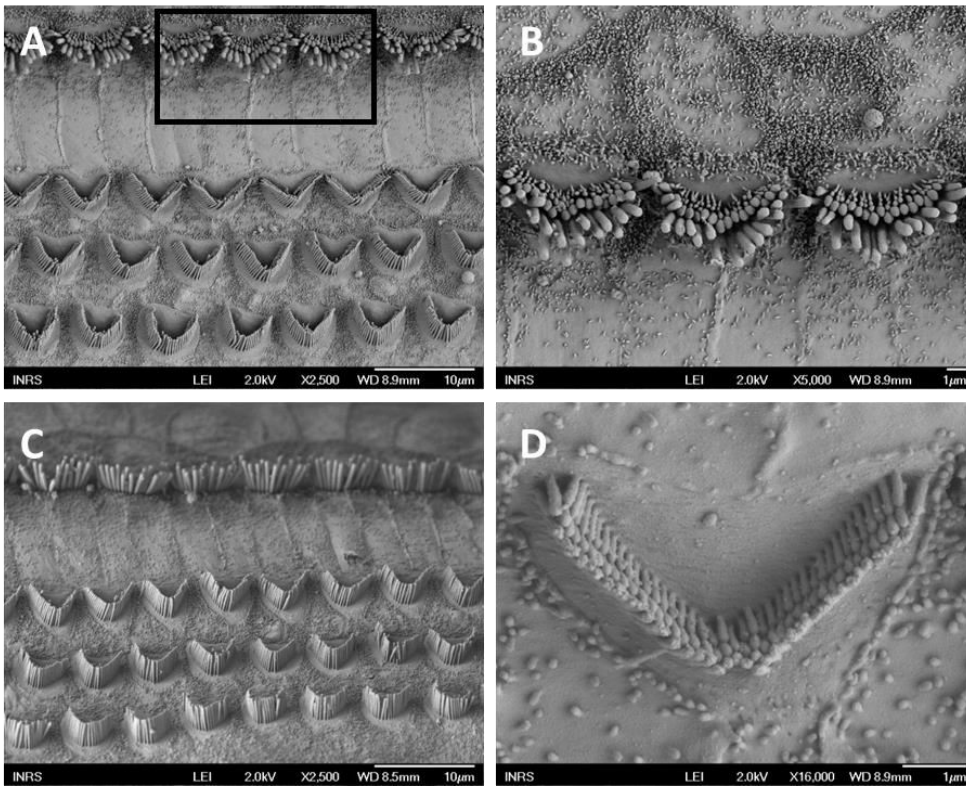


Figure R10. Microscopie électronique à balayage des organes de Corti d'animaux exposés au bruit riche en basses fréquences observés à la fin de la période de récupération. (A et C) Vue générale de l'organisation des cellules ciliées et de leurs stéréocils à respectivement environ 14 et 8 kHz (X2500). (B) Zoom des faisceaux ciliaires intacts des cellules ciliées internes à environ 14 kHz (X5000). (D) Cellule ciliée externe (X16000).

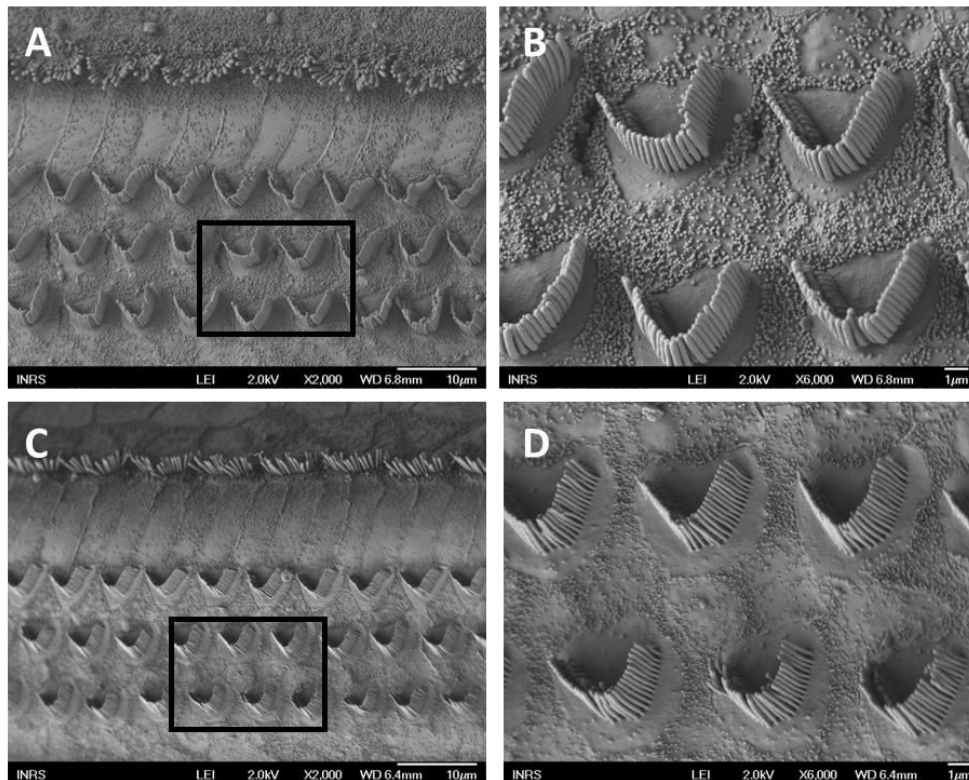


Figure R11. Microscopie électronique à balayage des organes de Corti d'animaux exposés au bruit riche en basses fréquences et 250 ppm de disulfure de carbone et observés à la fin de la période de récupération. (A et C) Vue générale de l'organisation des cellules ciliées et leurs stéréocils à respectivement environ 12 et 9 kHz, (X2000). (B et D) Zoom des faisceaux ciliaires intacts des cellules ciliées externes des deuxième et troisième rangées à environ 12 et 9 kHz (X6000).

5.1.3 Effet sur le système vestibulaire

5.1.3.1 Fonction vestibulaire : nystagmus post-rotatoire

Le traitement du signal a permis de donner, pour chaque mesure, le nombre et la durée des saccades. La Figure R12 illustre les signaux NPR obtenus chez un même rat, après une stimulation de 90°/s, avant exposition (T0), au terme de la co-exposition CS₂-BF (T1) et après 4 semaines de récupération (T2).

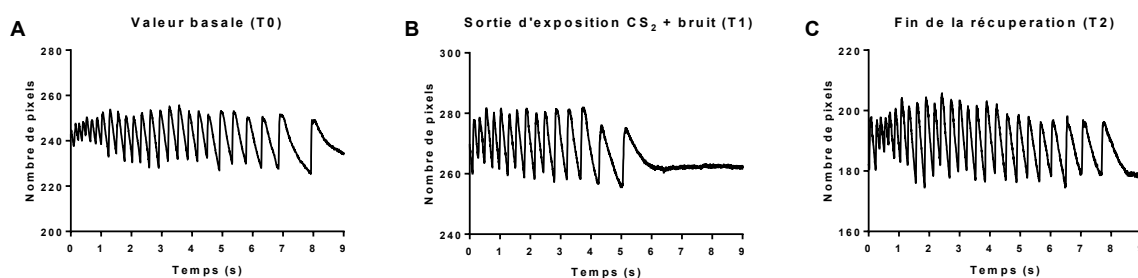


Figure R12. Tracés des NPR enregistrés chez un animal co-exposé après une stimulation à 90°/s pendant 40s dans les conditions basales (A), en sortie des 4 semaines d'exposition (B) et après la période de récupération (C).

La Figure R13 illustre le nombre moyen de saccades (A et C) et la durée moyenne (B et D) du NPR obtenus pour les différents groupes expérimentaux avant exposition (T0) au terme des 4 semaines d'exposition (T1) et de récupération (T2). Les données obtenues après traitement sont exprimées en pourcentage de la valeur T0.

Après une **stimulation à 90°/s**, l'ANOVA à 2 facteurs montre une interaction « temps » x « traitement » significative pour le nombre de saccades [$F(6,138) = 4,446$; $p = 0,0004$] et la durée des saccades [$F(6,140) = 3,326$; $p = 0,004$].

Le groupe témoin et le groupe exposé au bruit BF ne présentent pas de variations significatives ni pour le nombre de saccades ni pour la durée des saccades après la fin de l'exposition et de la récupération. Bien que l'exposition au CS₂ seul n'a pas modifié la durée des saccades (Fig. R13B), elle a modifié significativement le nombre de saccades à T1 par rapport à T0 (-18,55% ; $p = 0,024$; Fig. R13A). La co-exposition bruit BF et CS₂ a induit une diminution significative du nombre de saccades (-33%, $p < 0,0001$) et de la durée (-34%, $p < 0,0001$) à T1 par rapport à T0. Après récupération (T2), le nombre et la durée des saccades n'étaient pas significativement différents des valeurs à T0 pour tous les groupes expérimentaux, mais la récupération n'était pas totale (nombre de saccades: $p = 0,051$; durée des saccades: $p = 0,061$).

Pour la **stimulation à 360°/s**, l'ANOVA à 2 facteurs a montré aussi une interaction « temps » x « traitement » significative pour le nombre de saccades [$F(6,124) = 7,4$; $p < 0,0001$] et la durée des saccades [$F(6,134) = 6,53$; $p < 0,0001$] (Fig. R13C-D).

Le groupe témoin et le groupe exposé au bruit BF ne présentent pas de variations significatives ni pour le nombre de saccades ni pour la durée des saccades après la fin de l'exposition et de récupération. Aucune variation significative du nombre ou de la durée des saccades n'a été observée pour le groupe de rats exposés au solvant seul. Enfin, comme précédemment, après une stimulation de 360°/s, le groupe co-exposé a présenté une diminution significative du nombre (-17 % ; $p < 0,0001$) et de la durée de saccades (-18 % ; $p < 0,0001$) à T1 avec une récupération presque totale après 4 semaines (nombre de saccades : $p = 0,166$, durée des saccades ; $p = 0,204$).

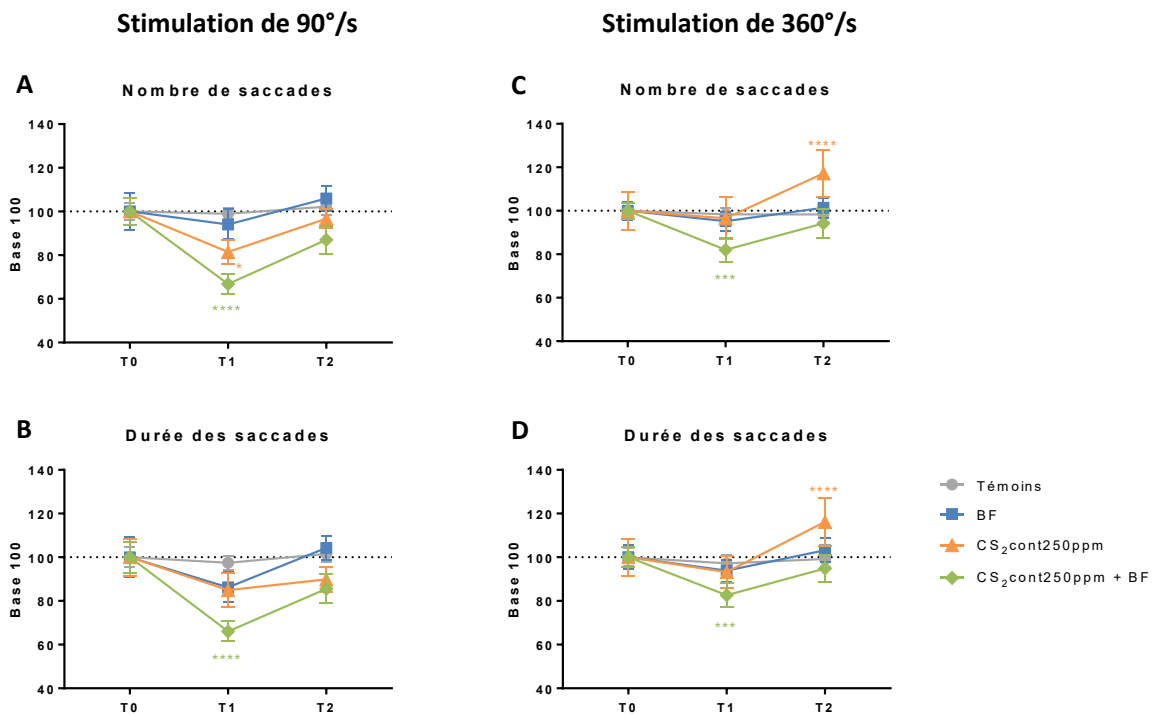


Figure R13. Nystagmus post-rotatoire. Nombre de saccades (A) et durée des saccades (B) après une stimulation de 40 s à 90°/s (gauche) ou à 360°/s (droite) mesurés pour chaque groupe expérimental (Témoins, BF, CS₂ continu 250 ppm et CS₂ continu 250 ppm +BF) à T0, T1 et T2 exprimés en pourcentage par rapport à la ligne de base. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, significativement différents de la moyenne à T0, test de Bonferroni.

5.1.3.2 Comportement

Les tests de **suspension par la queue** et de **redressement** n'ont pas révélé d'anomalie pour aucun des groupes de rats exposés, comme le montre la Figure R14, que ce soit en sortie d'exposition ou après récupération. L'ANOVA à deux facteurs ne révèle pas d'interaction « temps » x « traitement » pour le test de suspension [$F(6,44) = 0,6221$, $p = 0,71$] ni pour le test de redressement [$F(6,76) = 0,42$, $p = 0,87$].

En même temps, le test **Locotronic®** a été réalisé pour quantifier les erreurs de marche (Fig. R14C) et la durée totale du trajet (Fig. R14D). L'ANOVA à deux facteurs n'a pas révélé d'interaction « temps » x « traitement » pour les erreurs de marche [$F(6,78) = 0,93$, $p = 0,4760$] ni pour la durée du trajet [$F(6,74) = 0,84$, $p = 0,5405$]. Cependant, en ce qui concerne le groupe co-exposé, nous avons trouvé une augmentation significative des deux paramètres à T1 par rapport à la valeur de base (T0) ($p = 0,0091$ et $p = 0,0065$, respectivement). Bien que ce test ne soit pas spécifique de la fonction vestibulaire, il peut renseigner sur les fonctions de l'équilibre de l'animal ainsi que sur le système locomoteur.

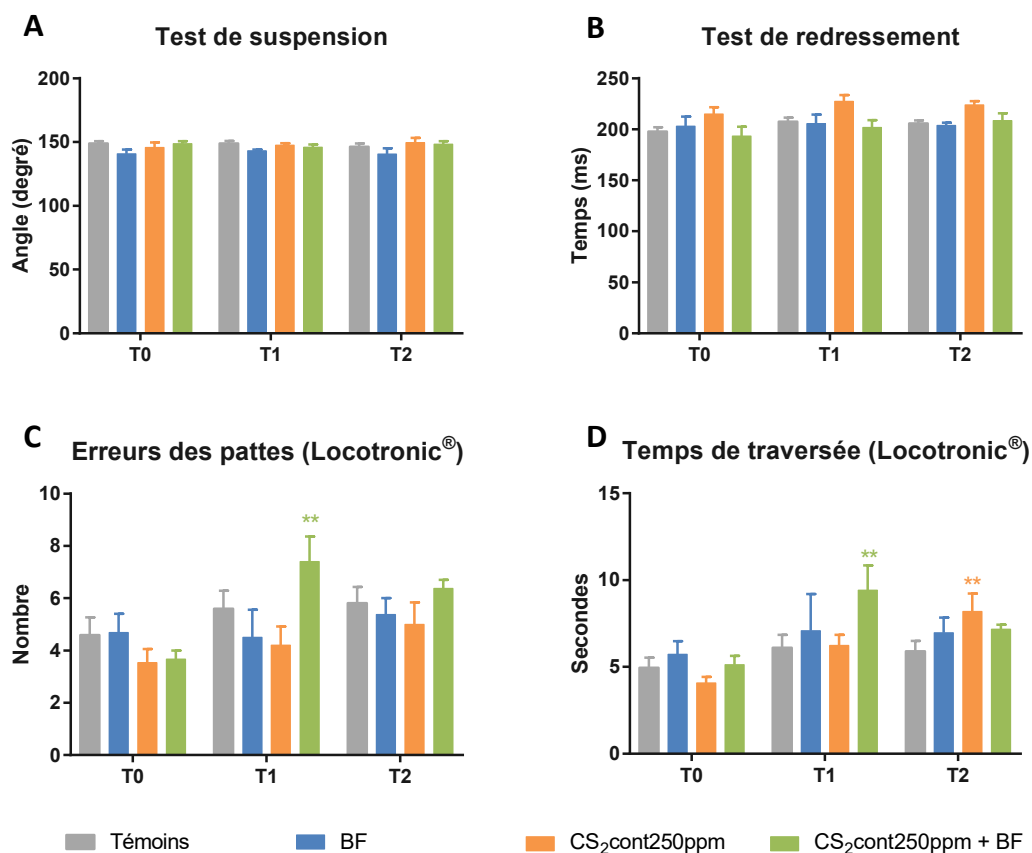


Figure R14. Tests de comportement effectués avant exposition (T0), en sortie d'exposition (T1) et après les 4 semaines de récupération (T2) permettant d'évaluer la fonction vestibulaire. Test de suspension (A), test de redressement (B), erreurs de marche (C) et temps de traversée (D). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM. ** $p < 0,01$, significativement différent de la moyenne à T0, test de Bonferroni.

5.1.3.3 Analyses histologiques

5.1.3.3.1 Immunohistochimie du vestibule

Comme cela a été fait pour l'organe de l'audition, un marquage immunohistochemique des organes vestibulaires a été réalisé. L'expression des fibres neuronales et des cellules ciliées a été observée en microscopie confocale à fluorescence afin de mettre en évidence les effets du CS₂ sur ces structures. Les anticorps utilisés étaient les mêmes que ceux utilisés pour la cochlée, qui marquent la sous-unité lourde d'une des protéines des neurofilaments et la myosine VIIa qui se trouve dans les cellules ciliées.

A la fin de l'exposition, les utricules et les crêtes des vestibules prélevés chez les animaux exposés au CS₂ seul (n = 3) ou co-exposés au CS₂ et au bruit (n = 4) ont révélé des caractéristiques morphologiques similaires à ceux des animaux témoins (n = 9). Les observations n'ont pas révélé de pertes de cellules ni de neurofilaments liées au traitement (Fig. R15). Il en est de même après 4 semaines de récupération, aucune différence entre les animaux témoins et traités n'a été observée.

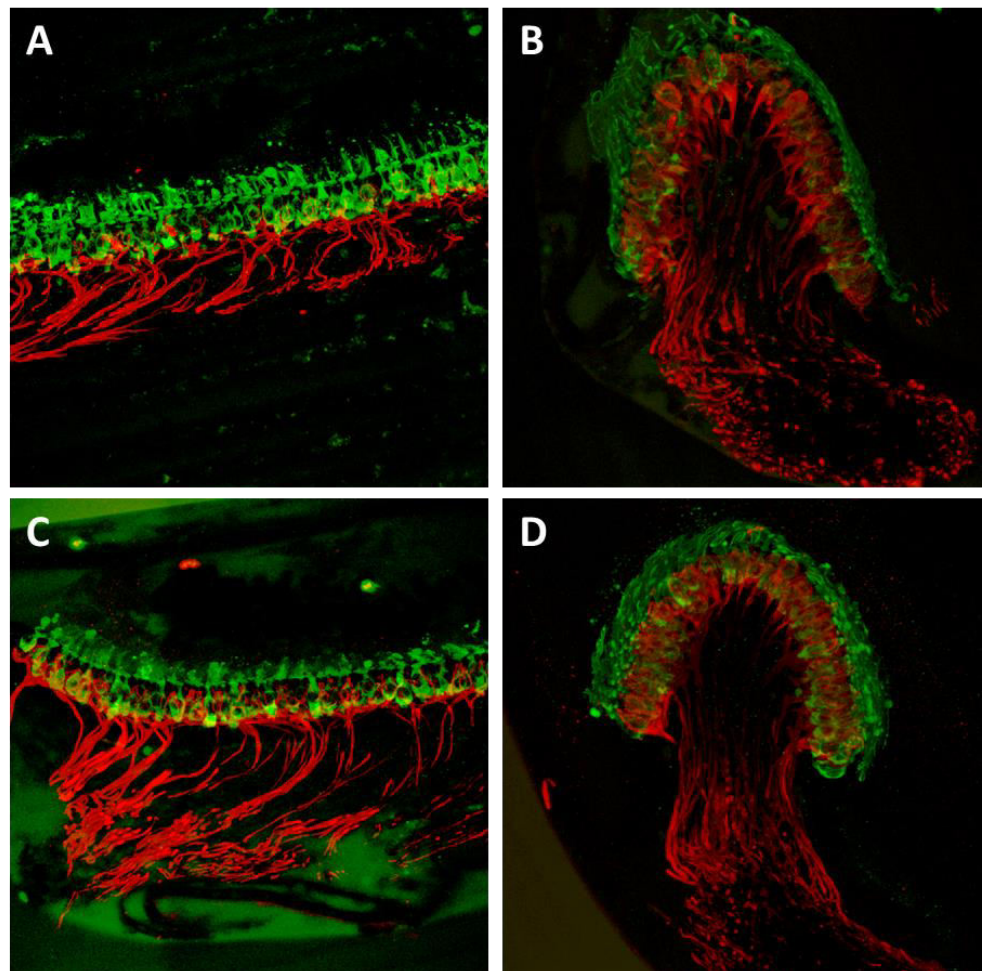


Figure R15. Images représentatives de certains animaux à la fin des 4 semaines d'exposition en microscopie confocale à fluorescence de l'épithélium sensoriel vestibulaire marqué avec les anticorps anti-myosine VIIa (vert) et anti-neurofilament (rouge). Le jaune indique une superposition des signaux rouges et verts. (A) Utricule d'un animal témoin. (B) Crête d'un animal témoin. (C) Utricule d'un animal exposé à 250 ppm de disulfure de carbone + bruit. (D) Crête d'un animal exposé à 250 ppm de disulfure de carbone + bruit.

5.1.3.3.2 Coupes semi-fines des épithéliums vestibulaires

Les observations morphologiques des épithéliums sensoriels vestibulaires des individus témoins correspondent à ceux décrits dans la littérature (Lysakowski and Goldberg, 1997; Seoane et al., 2001; Sousa et al., 2009; Wersäll and Bagger-Sjöbäck, 1974) (Fig. R16A-C).

En comparant la morphologie de l'épithélium sensoriel vestibulaire (maculas de l'utricule, du saccule et crêtes ampullaires) des animaux témoins ($n = 9$) à celles des animaux exposés au solvant, seul ($n = 5$) et co-exposés avec le bruit ($n = 4$), on a constaté que les animaux exposés à 250 ppm de CS_2 (Fig. R16D-F) et co-exposés avec le bruit (Fig. R16G-I), présentaient les mêmes caractéristiques morphologiques que les animaux témoins (Fig. R16A-C).

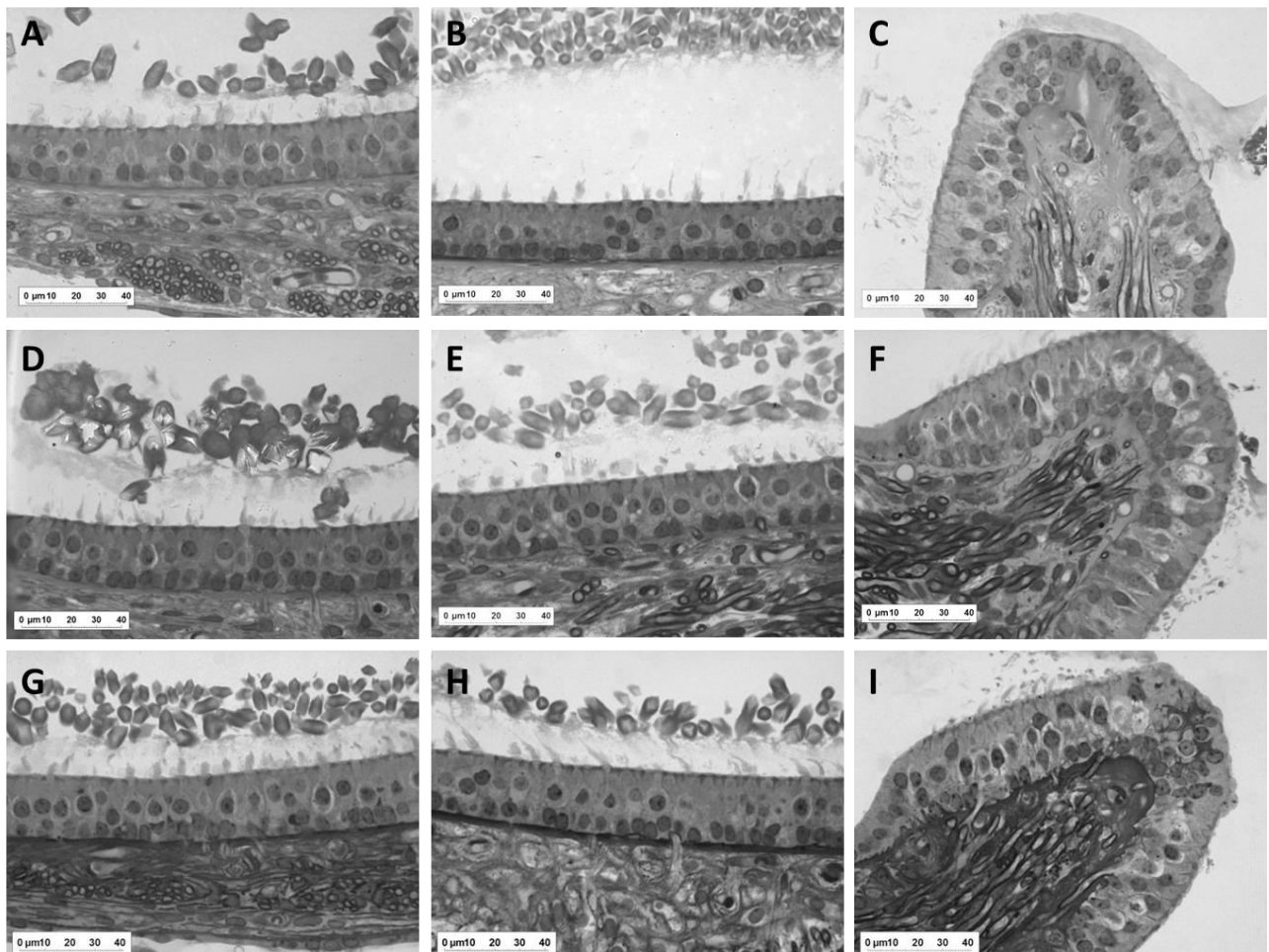


Figure R16. Microscopie optique de coupes semi-fines de l'épithélium sensoriel vestibulaire observé à la fin des 4 semaines d'exposition. (A-C) Animal témoin. (D-F) Animal exposé à 250 ppm de disulfure de carbone pendant 4 semaines. (G-I) Animal co-exposé à 250 ppm de disulfure de carbone et bruit pendant 4 semaines. Gauche : Utricule. Milieu : Saccule. Droite : Crête.

5.1.3.3 Ganglion de Scarpa

La Figure R17 illustre les résultats des coupes semi-fines des ganglions vestibulaires inclus dans la résine après une période de récupération en microscopie optique afin d'étudier la morphologie des corps cellulaires des neurones ganglionnaires.

Les résultats ont montré que les ganglions des animaux co-exposés au bruit et à 250 ppm de solvant (n = 4) (Fig. R17B) présentaient une morphologie similaire à celle des animaux témoins (n = 9) (Fig. R17A).

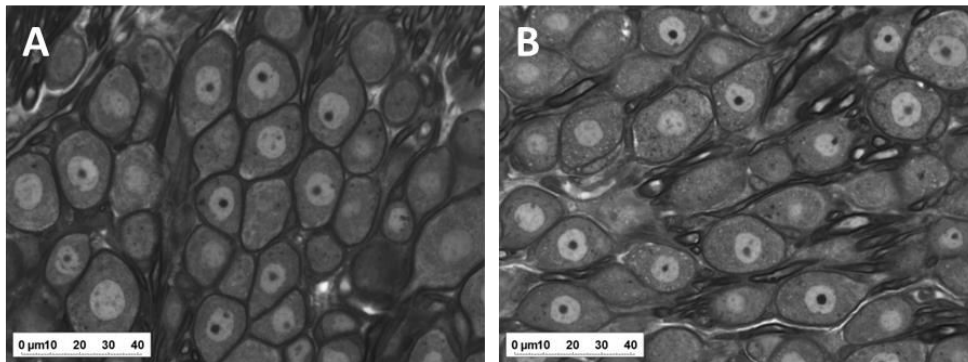


Figure R17. Microscopie optique de coupes semi-fines du ganglion de Scarpa à la fin de la période de récupération où l'on peut observer les corps cellulaires des neurones du ganglion vestibulaire. (A) Animal témoin. (B) Animal exposé à 250 ppm continu de disulfure de carbone.

5.1.4 Effet sur le système nerveux central

Afin d'examiner la toxicité centrale de la co-exposition au CS₂ et au bruit, les niveaux d'ARNm de 86 gènes impliqués dans les mécanismes de neurotoxicité ont été analysés dans le cervelet en sortie d'exposition.

Comme on peut voir sur la Figure R18, une augmentation significative des ARNm de *Cideb* principalement impliqué dans la mort cellulaire par apoptose, de *Trpm1* codant pour un canal perméable au calcium a été observée dans le cervelet des animaux exposés ($p = 0,0205$ et $p = 0,0401$, respectivement).

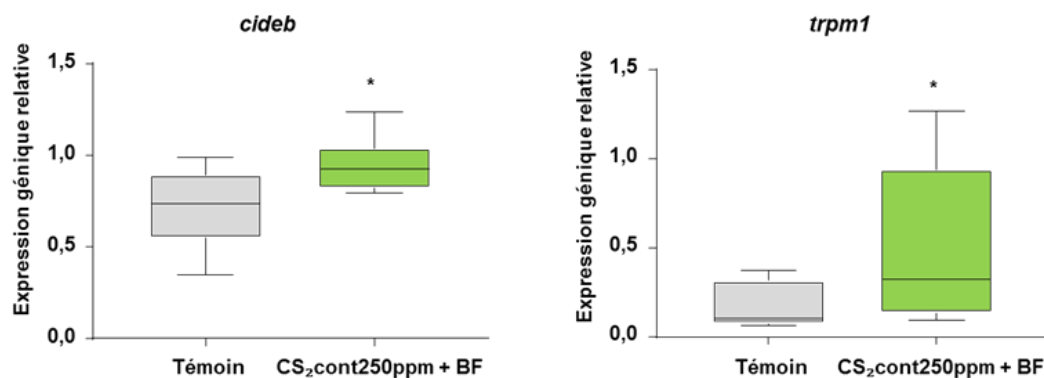


Figure R18. Expression des gènes dans le cervelet après co-exposition au bruit BF associé à du CS₂ 250 ppm. L'expression de *cideb* et *trpm1* a été analysée par RT-qPCR. *β-actine*, *Rpl13* et *Hprt* ont été utilisés comme gènes de ménage. Les résultats présentent la médiane et les quartiles de 8 animaux. * $p < 0,05$ versus animaux témoins, test de Mann-Whitney.

5.2. CHAPITRE II:

EFFET DU CS₂ EN FONCTION DE LA DOSE

5.2.1 Santé générale des animaux

Les rats arrivaient à l'animalerie avec un poids de 150-180 g, et après une période de quarantaine d'une semaine et une période de stabulation (8 semaines au total), ils atteignaient un poids compris entre 220 et 285 g au moment où les premières mesures fonctionnelles étaient réalisées chez tous les animaux.

Pendant l'exposition, les animaux témoins (n = 18) et les individus exposés au bruit seul et à 63 ppm de CS₂ plus bruit (n = 8) ont eu une augmentation de poids entre T0 et T1, respectivement de 5,2 g et 1,6 g, comme on peut le voir dans la Figure R19. En revanche, on a observé une perte de poids des animaux exposés à 250 ppm (n = 7 ; -4,4 g) et 500 ppm (n = 7 ; -5,9 g) de solvant pendant la période d'exposition. L'ANOVA à deux facteurs a confirmé des différences significatives pour l'interaction « traitement x temps » [F (9,114) = 3,27; p = 0,0014] pendant l'exposition. Un contrôle régulier de l'état de santé des animaux était réalisé selon le protocole standard défini par Morton and Griffiths, 1985 (Annexe 1). Les animaux ne présentaient pas de signes de souffrance ou de faiblesse, leur apport alimentaire était normal et leur pelage avait un bon aspect. Cependant, un animal exposé à 500 ppm de CS₂ est mort en sortie d'exposition, au cours de l'anesthésie réalisée pour la mesure du PDA (T1).

Une augmentation du poids a été constatée pendant la **période de récupération** pour tous les groupes d'animaux, témoins et exposés (Fig. R19). Les animaux qui avaient eu une plus grande perte de poids pendant la période d'exposition ou étaient restés plus ou moins constants, ont vu leur poids augmenter plus fortement pendant la récupération. Les groupes d'animaux présentaient des poids équivalents à la fin des 4 semaines de récupération [F (3,36) = 2,42 ; p = 0,08].

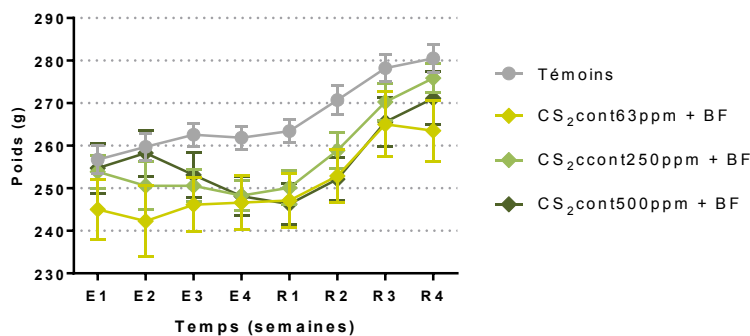


Figure R19. Evolution de la masse corporelle des rats pendant la période d'exposition (E) et la période de récupération (R) pour tous les groupes d'animaux. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM.

5.2.2 Métabolisme

5.2.2.1 Concentration de CS₂ : atmosphérique vs. sanguine

La relation entre les concentrations de CS₂ atmosphérique et sanguine mesurées à la fin de l'exposition est présentée Figure R20.

Une différence significative a été obtenue entre les groupes [F (3, 41) = 138,36 ; p < 0,001] : 63 ppm de CS₂ (1,8 ± 0,3 µg/g), 250 ppm de CS₂ (3,6 ± 0,3 µg/g) et 500 ppm de CS₂ (8,1 ± 0,6 µg/g). Comme attendu, tous les échantillons des rats témoins avaient une concentration de CS₂ sanguine en-dessous de la limite de détection. Le test de Bonferroni a révélé une différence significative entre chacun des groupes. La concentration sanguine de CS₂ augmentait donc avec les concentrations atmosphériques.

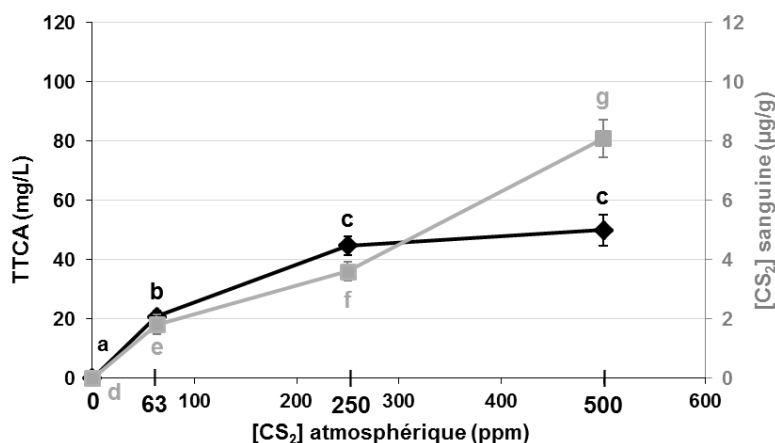


Figure R20. Relation entre la concentration atmosphérique de CS₂ (ppm) et la concentration sanguine de CS₂ ou urinaire de TTCA. Ordonnée droite : concentration de CS₂ sanguine (µg/g); ordonnée gauche : concentration urinaire de TTCA (mg/L). TTCA : acide 2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-carboxylique. Les valeurs correspondent à la moyenne ± SEM. Les différences statistiques obtenues par le test de Bonferroni sont représentées par des lettres. Les groupes avec la même lettre ne sont pas significativement différents, ils le sont s'ils ont des lettres différentes. a, b, c : TTCA. d, e, f, g : concentration sanguine de CS₂

5.2.2.2 Concentration de disulfure de carbone atmosphérique vs. concentration de TTCA urinaire

La Figure R20 montre aussi la relation entre le principal métabolite urinaire, le TTCA, recueilli à la fin de l'exposition, et les concentrations atmosphériques de CS₂. Les échantillons d'urine excrétée étaient récupérés pendant une période de 18h après la fin de l'exposition.

Une différence statistiquement significative a été observée entre les groupes [F (3, 41) = 90,63 ; p < 0,001]. Une différence significative entre les rats exposés à 63 ppm de CS₂

(20,8 ± 1,9 mg/l) et les rats exposés aux doses plus fortes a été observée. Par contre, il n'y avait pas de différence significative entre le groupe d'animaux exposé à 250 ppm (44,7 ± 3,2 mg/l) et le groupe exposé à 500 ppm (50 ± 5,2 mg/l).

Pour une concentration atmosphérique de CS₂ doublée, entre 250 et 500 ppm, la concentration de TTCA n'a augmenté que de 12%. Par contre, l'augmentation de la concentration de TTCA était de 115%, entre 63 et 250 ppm de CS₂, c'est-à-dire, pour une concentration de CS₂ atmosphérique 4 fois supérieure.

5.2.3 Effet sur le système auditif

5.2.3.1 Fonction auditive : produits de distorsion acoustique

Le bruit a provoqué des pertes auditives entre 3,6 et 6 kHz. La perte maximale en sortie d'exposition était d'environ 13 dB à 4,8 kHz (Fig. R21A). Les pertes après récupération ne sont plus que de 5,4 dB et de 4,3 dB aux fréquences 3,6 et 4,8 kHz, respectivement (Fig. R21B).

Les expériences réalisées avec les différents groupes (BF + CS₂ 0, 63, 250 et 500 ppm) montrent qu'en fin d'**exposition** la gamme de fréquences affectées s'élargit jusqu'à 9,6 kHz lorsque la concentration est supérieure ou égale à 250 ppm (Fig. R21A). Plus spécifiquement, à 63 ppm de CS₂, on note une tendance ($p = 0,1213$) à une diminution de l'amplitude du PDA à la fréquence de 9,6 kHz. La gamme de fréquences affectées s'élargit de manière significative dès que la concentration de CS₂ atteint 250 ppm. L'effet est d'autant plus marqué à la concentration de 500 ppm comme en témoigne le Tableau R1 indiquant, pour chaque groupe de rats co-exposés et pour chaque fréquence, les pertes et la significativité de l'effet (versus témoins).

Il existe une tendance à la diminution des effets du bruit BF lorsqu'il y a co-exposition avec le CS₂ à 4,8 et 6 kHz (Tableau R1).

Après la période de **récupération** de 4 semaines, la gamme de fréquences présentant une diminution d'amplitude significative était identique pour tous les groupes exposés : de 3,6 à 6 kHz. L'élargissement de la zone de fréquences endommagées par le CS₂ à T1 était donc un phénomène temporaire.

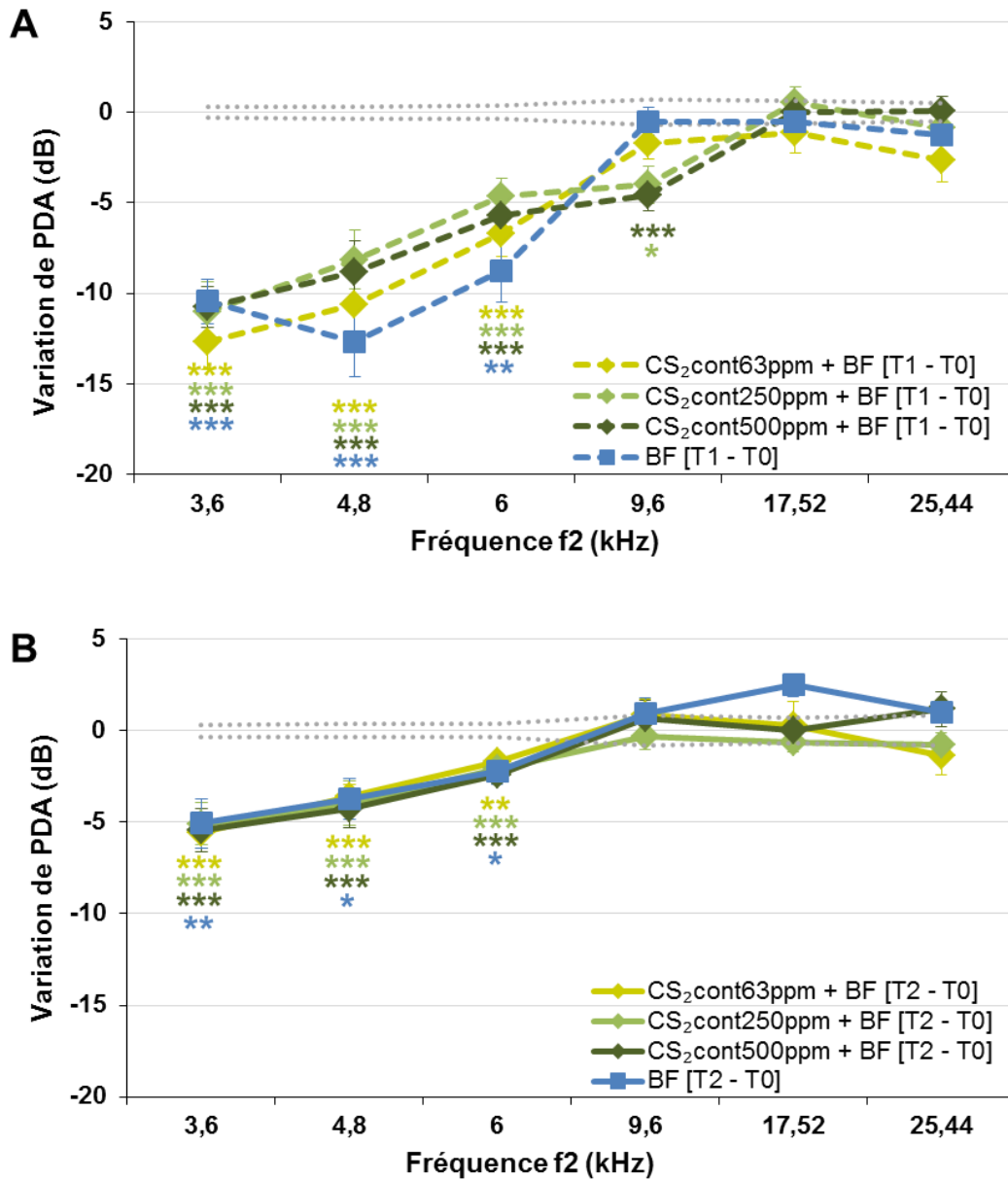


Figure R21. Variations des PDA des différents groupes exposés. (A) Variations des PDA à la fin de l'exposition : $[T1 - T0] = [PDA1 - PDA0]_{\text{Exposés}} - [PDA1 - PDA0]_{\text{Témoins}}$. (B) Variations des PDA à la fin de la récupération : $[T2 - T0] = [PDA2 - PDA0]_{\text{Exposés}} - [PDA2 - PDA0]_{\text{Témoins}}$. BF : bruit riche en basses fréquences. CS₂ : disulfure de carbone. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM. La ligne en pointillés gris représente la variabilité du groupe témoin (SEM). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, significativement différent de la moyenne du groupe témoins, test de Bonferroni.

Le Tableau R1 indique, pour chaque groupe de rats exposés et pour chaque fréquence, les pertes auditives à la sortie de l'exposition (T1) et après 4 semaines de récupération (T2).

PDA f2 (kHz)	Mesure	BF	CS ₂ cont63ppm + BF	CS ₂ cont250ppm + BF	CS ₂ cont500ppm + BF
3,6	[T1 – T0] *	-10,4	-12,7	-11	-10,8
	p	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
4,8	[T2 – T0]	-5,1	-5,6	-5,1	-5,4
	p	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
6	[T1 – T0]	-12,6	-10,6	-8,1	-8,8
	p	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
9,6	[T2 – T0]	-3,7	-3,6	-4	-4,2
	p	0,0002	0,0002	0,0001	0,0001
17,52	[T1 – T0]	-8,7	-6,7	-4,6	-5,7
	p	0,0000	0,0000	0,0033	0,0011
25,44	[T2 – T0]	-2,2	-1,7	-2,1	-2,4
	p	0,0006	0,0028	0,0008	0,0002
3,6	[T1 – T0]	-0,5	-1,7	-4	-4,6
	p	0,7518	0,1213	0,0115	0,0007
4,8	[T2 – T0]	0,9	0,9	-0,3	0,7
	p	0,9710	0,4369	0,8127	0,6091
6	[T1 – T0]	-0,5	-1,1	0,6	0
	p	0,8939	0,5188	0,6202	0,8719
9,6	[T2 – T0]	2,5	0,3	-0,7	0
	p	0,2772	0,6607	0,3160	0,8837
17,52	[T1 – T0]	-1,2	-2,6	-0,8	0,1
	p	0,2281	0,0634	0,4767	0,9973
25,44	[T2 – T0]	1	-1,4	-0,8	1,2
	p	0,2672	0,2150	0,4268	0,3319

Tableau R1. Variations des PDA (amplitude, en dB) obtenu pour tous les groupes exposés à la fin de l'exposition ($[T1 - T0] = [PDA1 - PDA0]_{\text{Exposés}} - [PDA1 - PDA0]_{\text{Témoins}}$) ou à la fin de la période de récupération ($[T2 - T0] = [PDA2 - PDA0]_{\text{Exposés}} - [PDA2 - PDA0]_{\text{Témoins}}$). P: probabilité entre groupes (exposé vs. control), en rouge quand la différence est statistiquement significative ($p < 0,05$). * Calcul avec le modèle "Tobit".

5.2.3.2 Analyses histologiques

5.2.3.2.1 Coupes semi-fines de la cochlée (organe de Corti + ganglion spiral)

Dans toutes les coupes histologiques de tous les animaux examinés (n = 4/groupe), la morphologie était similaire à celle décrite dans la littérature de rats adultes témoins (Fig. R22). Dans l'organe de Corti, les CCI, les trois rangées de CCE, les cellules de Deiters et les cellules de Hensen présentaient des caractéristiques morphologiques normales. Par conséquent, la morphologie générale des cochlées était restée intacte, indépendamment de la concentration du solvant.

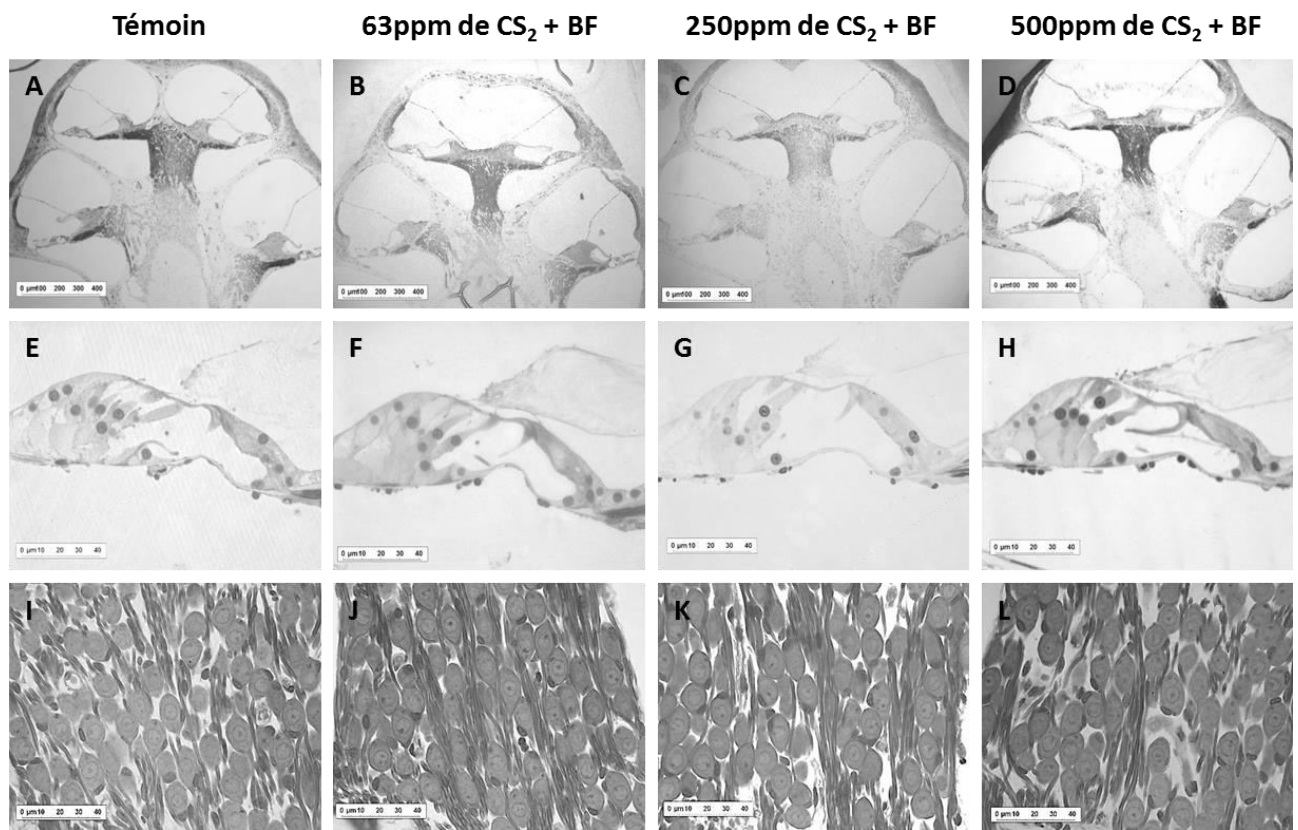


Figure R22. Microscopie optique de coupes semi-fines de la cochlée observée à la fin de la période de récupération. Exemples d'images d'animaux exposés à différentes concentrations. (A-D) Cochlée. (E-H) Organe de Corti où l'on observe trois cellules ciliées externes et une cellule ciliée interne, avec la membrane tectoriale unie aux stéréocils. (I-J) Corps cellulaires de neurones ganglionnaires du ganglion apical.

5.2.3.2.2 Cochléogramme

Après une période de récupération de 4 semaines, un comptage des CC en microscopie optique a été effectué afin de quantifier le pourcentage de cellules absentes.

Les cochléogrammes obtenus à partir des groupes témoins et exposés étaient similaires (Fig. R23). Pour tous les groupes, les pertes de CCI et de CCE ne dépassaient jamais 1-2%.

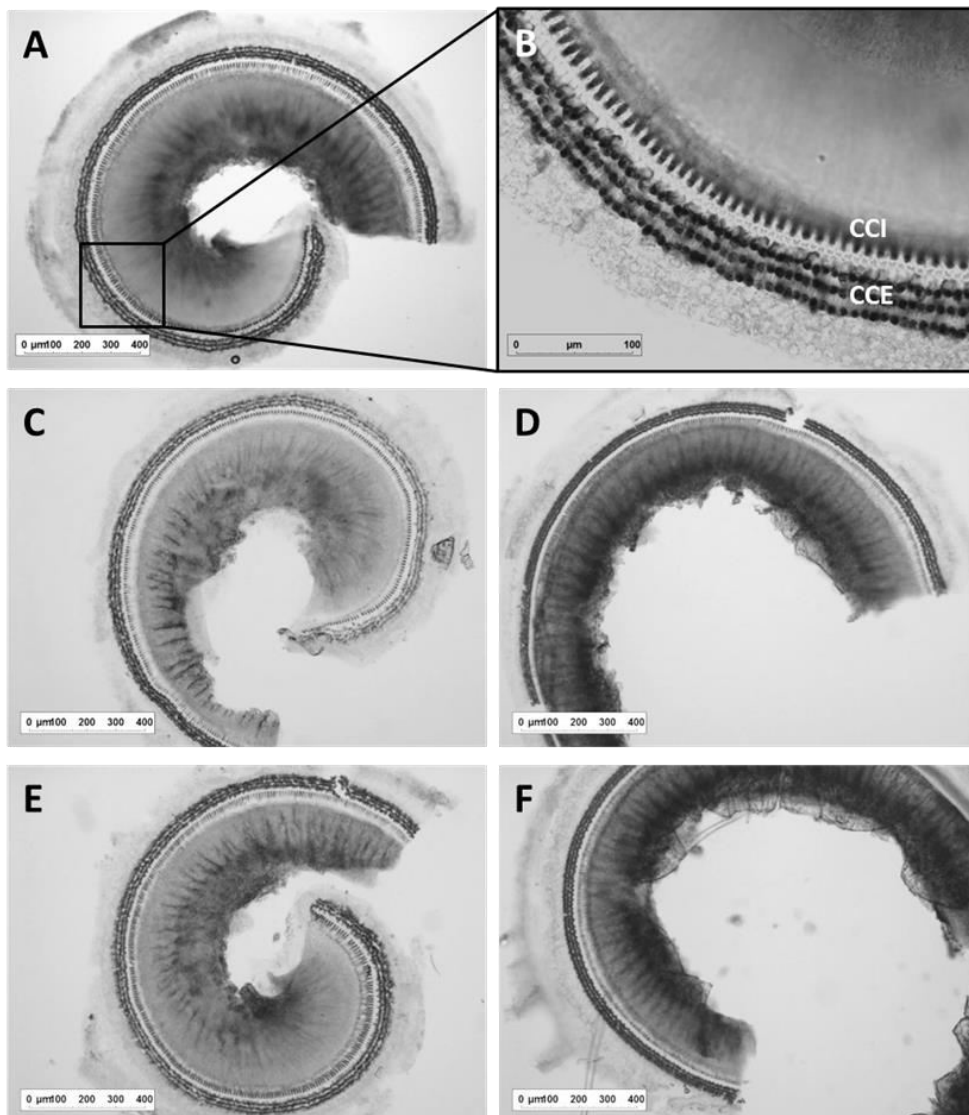


Figure R23. Image en microscopie optique de l'organe de Corti avec les cellules ciliées marquées à la succinate deshydrogénase où l'on peut apprécier les trois rangées de cellules ciliées externes et la rangée de cellules ciliées internes. (A-B) Animal témoin. (C-D) Animal exposé au bruit plus bruit 250 ppm de disulfure de carbone. (E-F) Animal exposé au bruit plus bruit 500 ppm de disulfure de carbone. Gauche : Tour apical de l'organe de Corti. Droite : Tour médian de l'organe de Corti.

Bien que la perte d'audition, mesurée à l'aide des PDA, fût significative, il n'y avait pas de perte cellulaire visible. La Figure R24 illustre le cochléogramme obtenu à partir de la moyenne de 4 rats exposés au bruit continu de basse fréquence plus 500 ppm de CS₂. Ce dernier est comparable aux cochléogrammes obtenus à partir des animaux du groupe témoin et des autres groupes co-exposés.

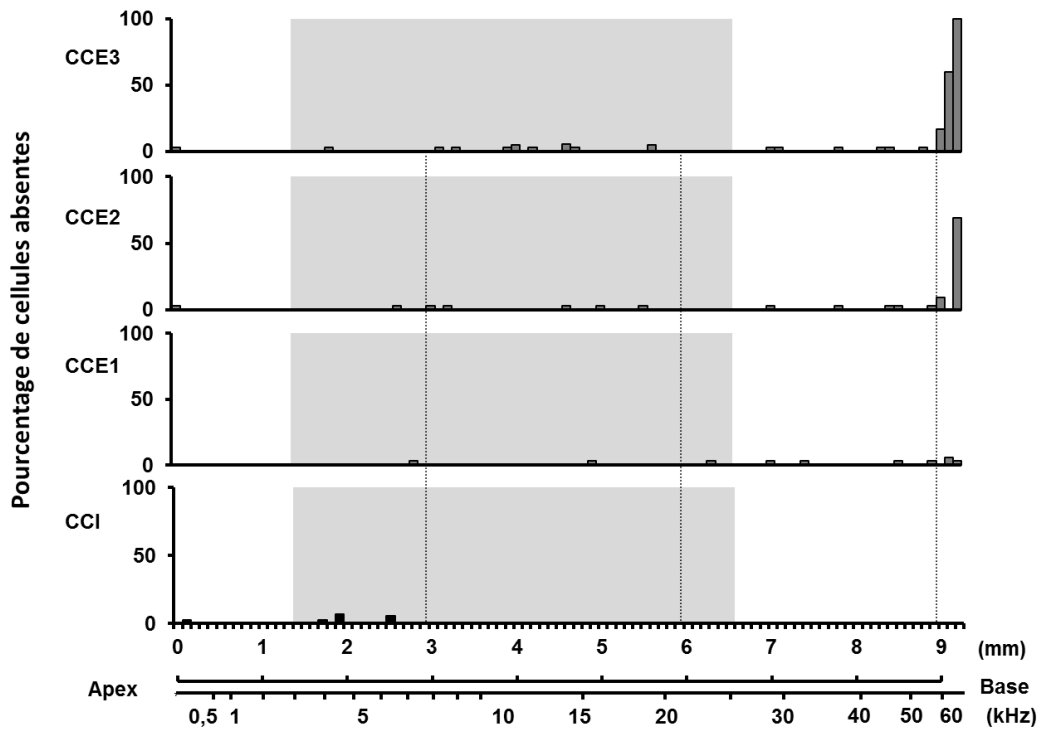


Figure R24. Moyenne des cochléogrammes ($n = 4$) de rats exposés à 500 ppm de CS₂ + bruit 4 semaines après la fin de l'exposition. Axe X : la ligne supérieure représente la distance (mm) le long de la spirale de l'organe de Corti, la ligne inférieure représente la carte en fréquences. Axe Y: pourcentage de perte de cellules ciliées. CCI : cellules ciliées internes, CCE1 : première rangée de cellules ciliées externes, CCE2 : deuxième rangée de cellules ciliées externes, CCE3 : troisième rangée de cellules ciliées externes. La zone grisée indique la zone de fréquences mesurées par les produits de distorsion acoustique. Les valeurs correspondent à la moyenne.

5.2.4 Effet sur le système vestibulaire

5.2.4.1 Fonction vestibulaire : nystagmus post-rotatoire

La Figure R25 représente le nombre (A et D), la durée des saccades (B et E) et la pente d'amortissement des saccades (C et F) du NPR pour chaque groupe expérimental avant exposition (T0), après exposition (T1) et 4 semaines après récupération (T2).

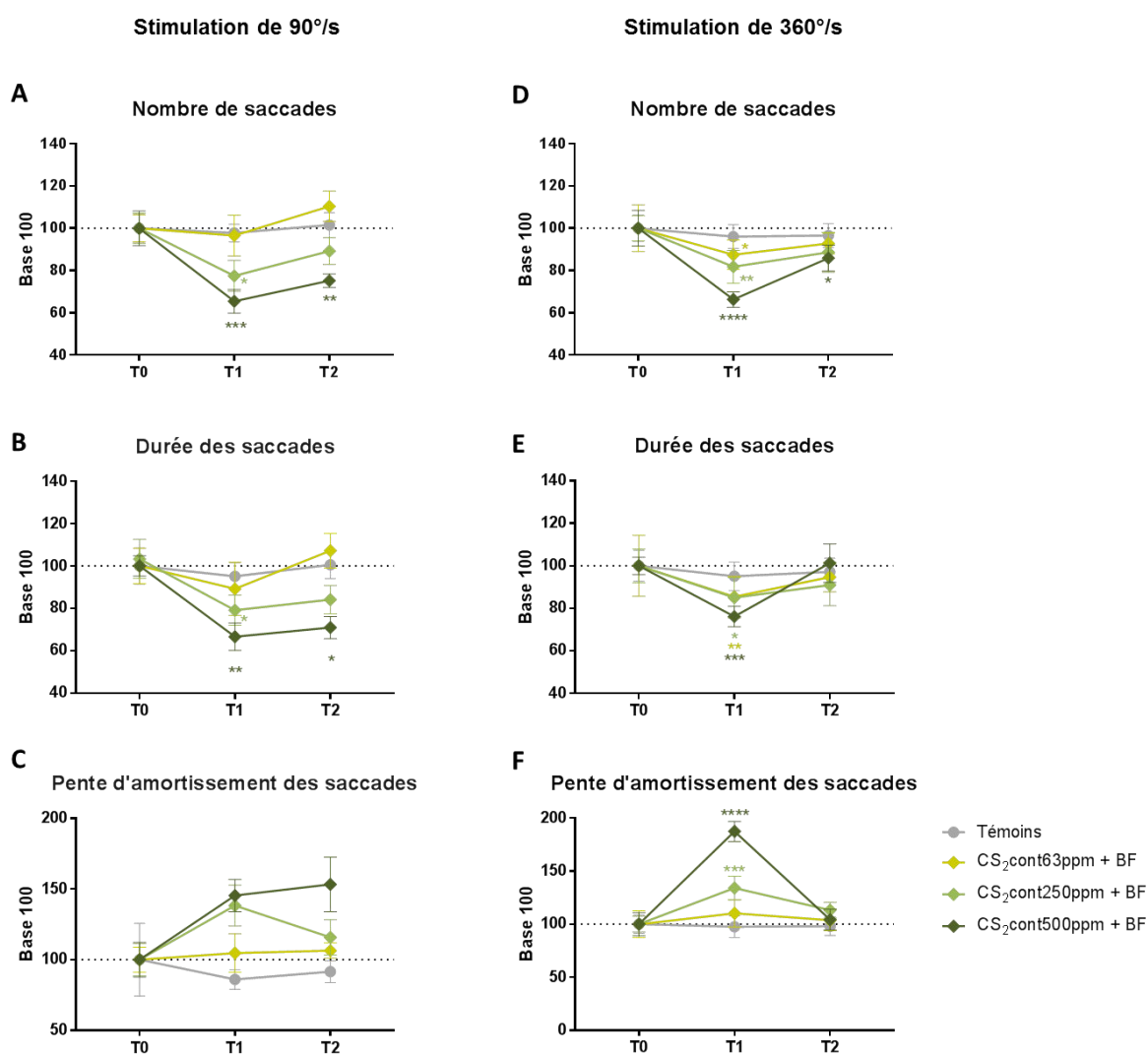


Figure R25. Nystagmus post-rotatoire. Nombre de saccades (A et D), de la durée des saccades (B et E) et de la pente d'amortissement (C et F) après une stimulation de 40 s à 90°/s (gauche) ou à 360°/s (droite) mesurés pour chaque groupe expérimental à T0, T1 et T2 exprimés en pourcentage par rapport à la ligne de base. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, significativement différents de la moyenne à T0, test de Bonferroni.

Après une **stimulation à 90°/s**, l'ANOVA à deux facteurs a relevé des différences significatives pour l'interaction « traitement x temps » pour le nombre de saccades [$F(6,58) = 2,98$; $p = 0,0133$] (Fig. R25A). L'analyse statistique n'a pas montré d'effets significatifs pour la durée des saccades [$F(6,60) = 2,02$; $p = 0,0765$], et la pente d'amortissement du signal [$F(6,58) = 1,25$; $p = 0,2929$]. (Fig. R25B-C). La co-exposition BF-CS₂ à la concentration de 63 ppm n'a pas engendré de modification significative des paramètres analysés. Ces mêmes mesures, réalisées chez les animaux témoins, se sont révélées très stables tout au long de l'expérimentation.

Comme décrit dans le chapitre précédent, la co-exposition bruit BF et CS₂ à 250 ppm a induit une diminution significative du nombre (-23% ; $p = 0,0163$), de la durée des saccades (-24% ; $p = 0,0402$) à T1, mais n'a pas provoqué de changements au niveau de la pente d'amortissement des saccades ($p = 0,2467$). A T2, le nombre et la durée des saccades ne sont pas significativement différents des niveaux de base (nombre de saccades, $p = 0,3902$ et durée des saccades, $p = 0,1249$).

La co-exposition bruit BF et CS₂ à 500 ppm a induit une diminution significative du nombre et de la durée des saccades (-34,5 % ; $p = 0,0002$, et -33,4 % ; $p = 0,0033$, respectivement) à T1. A T2, le nombre de saccades est resté significativement différent de T0 (-24,8 % , $p = 0,0077$) ainsi que la durée des saccades (- 29,1 % , $p = 0,0113$).

Pour les données obtenues après une **stimulation à 360°/s**, l'ANOVA à deux facteurs a relevé des différences significatives pour l'interaction « traitement x temps » pour les trois paramètres analysés : nombre [$F(6,62) = 3,5$; $p = 0,0048$], durée [$F(6,62) = 2,6$; $p = 0,0262$], et pente d'amortissement des saccades [$F(6,62) = 17,92$; $p < 0,0001$] (Fig. R25D-F).

Pour cette stimulation, seul le groupe témoin est resté stable pendant toute l'expérimentation. Le groupe co-exposé à 63 ppm de solvant a présenté une diminution significative du nombre de saccades (-13% ; $p = 0,0277$) et de la durée totale (-15% ; $p = 0,0076$) à T1 par rapport à T0, mais avec une récupération totale à T2.

Enfin, les groupes co-exposés à 250 ppm et à 500 ppm de CS₂ ont montré une diminution du nombre de saccades (-18 % ; $p = 0,0044$ et -34 % ; $p < 0,0001$, respectivement) et de la durée totale (-15 % ; $p < 0,0185$ et -24 % ; $p = 0,0001$, respectivement), et une augmentation de la pente d'amortissement (34 % ; $p = 0,0003$ et 87 % ; $p < 0,0001$, respectivement) à T1, avec une récupération presque totale après 4 semaines pour les deux groupes, sauf pour le nombre des saccades du groupe co-exposé à 500 ppm ($p = 0,0321$).

5.2.4.2 Comportement

Pour le test du **Locotronic®**, l'interaction « traitement x temps » n'était pas significative ni pour les erreurs de marche [$F(2,19) = 0,48$; $p = 0,6236$] ni pour le temps de la traversée [$F(2,19) = 3,47$; $p = 0,0518$] (Figure R26A-B). De plus, on ne trouve pas de différence significative entre les valeurs à la sortie de l'exposition (T1) ni 4 semaines après récupération (T2) pour aucun des groupes testés.

En revanche, l'analyse statistique du paramètre « **surface de sustentation** », c'est-à-dire la surface du quadrilatère formé par la position des pattes avant la marche montre une interaction « traitement x temps » significative [$F(2,19) = 7,54$; $p = 0,0039$]. Les animaux exposés à 500 ppm de CS₂ ont présenté une augmentation significative de la surface après récupération par rapport à sa valeur après 4 semaines d'exposition ($p = 0,026$; Fig. R26C). Enfin, l'analyse statistique n'a pas révélé d'interaction significative « traitement x temps » [$F(2,18) = 1,99$; $p = 0,1651$] pour le test de redressement (Fig. R26D).

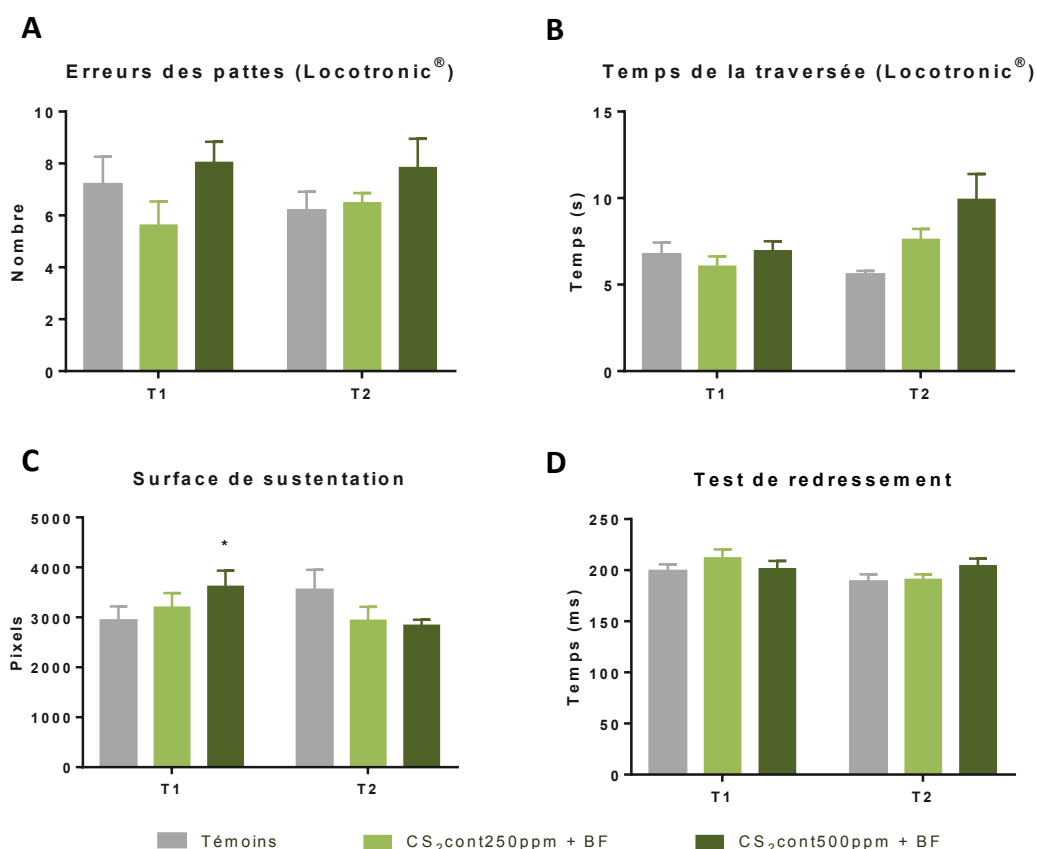


Figura R26. Tests comportementaux. La fonction vestibulaire est évaluée avec différents tests après l'exposition (T1) et après 4 semaines de récupération (T2). Erreurs des pattes (A), temps de la traversée (B), surface de sustentation (C) et test de redressement (D). Les valeurs correspondent à la moyenne ± SEM. * $p < 0,05$, significativement différents de la moyenne en T2, test de Bonferroni.

5.2.4.3 Analyses histologiques

5.2.4.3.1 MEB du vestibule

Les surfaces des échantillons d'utricules et de saccules ont été observées en microscopie électronique à balayage (SEM) après la période de récupération afin de vérifier l'état des stéréocils.

La toxicité de certains solvants ou autres produits chimiques peut se manifester par une perte de CC par extrusion, nécrose ou apoptose (Seoane et al., 2001; Seoane and Llorens, 2005). Une des caractéristiques pathologiques la plus commune est l'apparition d'ampoules à la surface des épithéliums vestibulaires comme conséquence d'un stress des cellules ciliées ou comme un artefact de préparation (Goodyear et al., 2008; Shi et al., 2005). Il est connu que la fusion des stéréocils et l'extrusion des CC est associée à un faible pronostic de récupération fonctionnelle, suggérant ainsi que ces caractéristiques peuvent être le point de non-retour chez les rats adultes (Sedo-Cabazon et al., 2015).

Les observations des échantillons des animaux témoins (Fig. R27A-B) et d'animaux exposés à 500 ppm de CS₂ plus bruit (Fig. R27C-D), ont montré une densité des faisceaux ciliaires similaire à celles décrites dans la littérature pour les rats adultes témoins (Dechesne et al., 1986; Hunter-Duvar, 1983; Llorens et al., 1993a). Ces observations ont permis de conclure que la perte de fonction observée avec les mesures de nystagmus dans le cas de la co-exposition n'était pas associée à des effets précoces de la perte cellulaire.

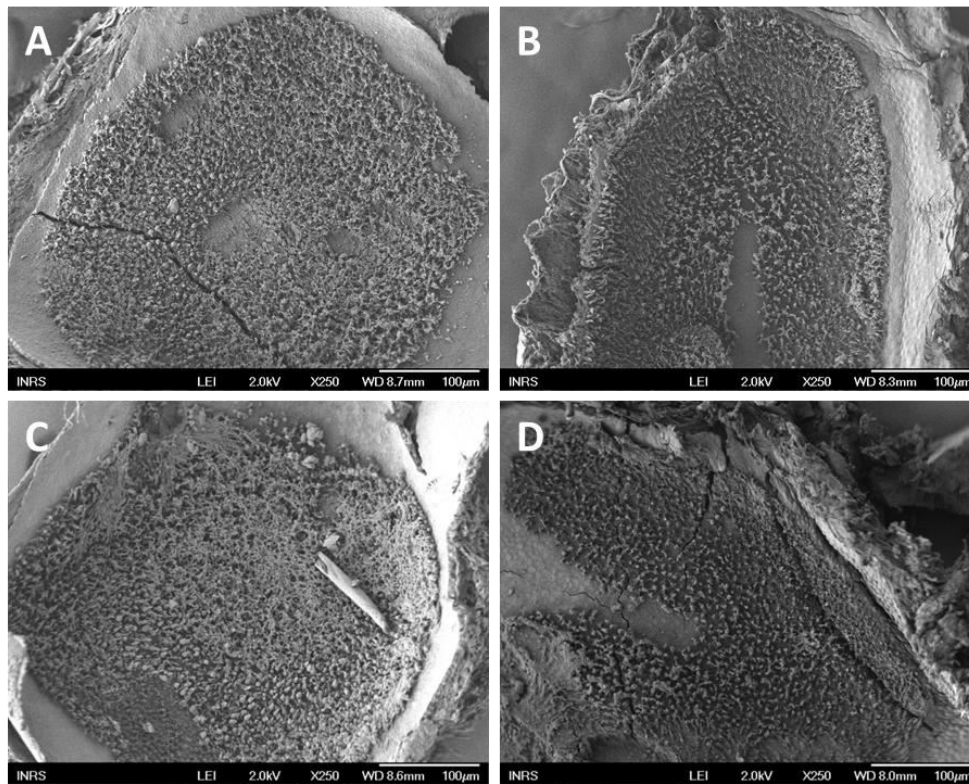


Figure R27. Microscopie électronique à balayage de vestibules observés à la fin de la période de récupération (X250). (A-B) Animal témoin. (C-D) Animal exposé à 500 ppm de disulfure de carbone + bruit. Gauche : Utricule. Droite : Saccule.

5.3. CHAPITRE III :

EXPOSITION AU CS₂: CONTINU VS. INTERMITTENT

5.3.1 Santé générale des animaux

Comme pour les expérimentations précédentes, les rats étaient pesés et examinés chaque semaine (Morton and Griffiths, 1985) (Annexe 1). Les animaux n'ont présenté aucun signe de souffrance ou de faiblesse. Leur apport alimentaire et l'aspect de leur pelage étaient normaux quelle que soit l'exposition.

Pendant **l'exposition**, les animaux témoins et les animaux exposés au CS₂ intermittent ont montré une augmentation de poids, comme on peut le voir dans la Figure R28. L'ANOVA à deux facteurs a indiqué que l'interaction « traitement » x « temps » était significative [F(27,791) = 4,59; p < 0,0001]. Entre T0 et T1 les rats témoins (n = 61), les rats exposés à 1 pic de solvant (n = 23) et les rats exposés à 2 pics (n = 14) ont présenté une augmentation de poids de 9,6 g, 7,6 g et 5,4 g, respectivement. Par contre, les individus exposés de manière continue à 250 ppm de CS₂ (n = 19) n'ont pas montré d'augmentation de poids pendant l'exposition (+0,7 g). Le test de Bonferroni indiquait une différence significative des poids des animaux témoins et exposés de manière intermittente au cours de toutes les semaines d'exposition par rapport à leur poids initial, alors que le groupe exposé de façon continue n'a pas varié son poids pendant le période d'exposition.

En ce qui concerne la **période de récupération**, tous les groupes d'animaux, témoins et exposés ont présenté un gain de poids (Fig. R28). Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes sur la moyenne de poids à la fin de la période de récupération [F(3, 113) = 1,86 ; p = 0,141].

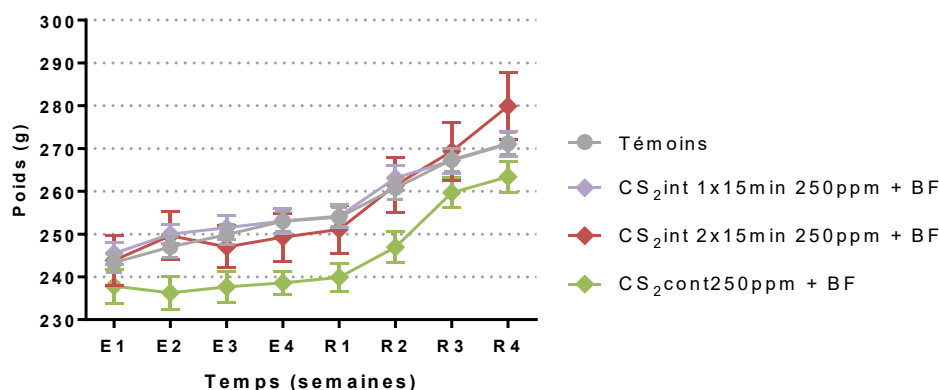


Figure R28. Evolution de la masse corporelle des rats pendant la période d'exposition (E) et la période de récupération (R) pour tous les groupes d'animaux. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM.

5.3.2 Métabolisme

5.3.2.1 Concentrations de CS₂ sanguine et cérébrale lors de différents modes d'exposition au CS₂ à 250 ppm

Les concentrations de CS₂ sanguine et cérébrale, mesurées à la fin d'exposition sont représentées sur la Figure R29.

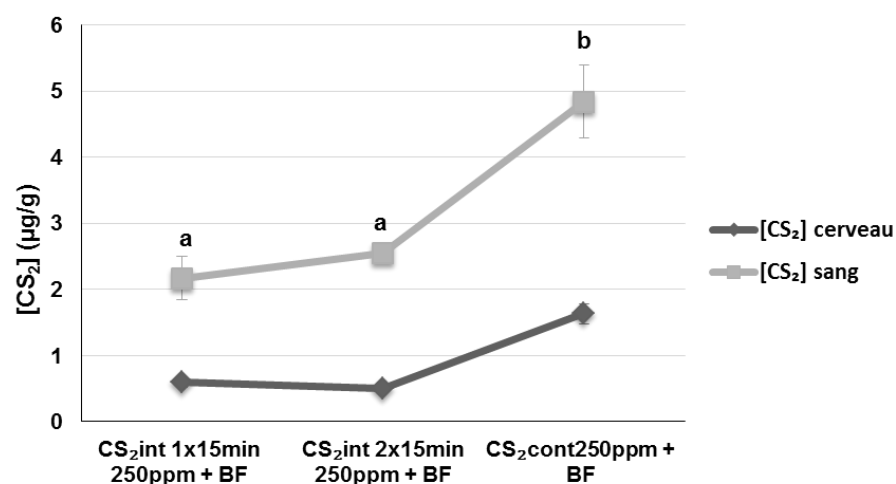


Figure R29. Relation entre la concentration atmosphérique de CS₂ (ppm) et la concentration sanguine ou cérébrale de CS₂ (µg/g). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM. Les différences statistiques obtenues avec la méthode de Bonferroni sont représentées avec des lettres. Les groupes avec la même lettre ne sont pas significativement différents, ils le sont s'ils ont des lettres différentes.

5.3.2.1.1 Concentration de CS₂ : atmosphérique vs. sanguine

Une différence significative de la concentration sanguine du CS₂ était obtenue entre les groupes [F (2,16) = 16,7; p = 0,0002] : 250 ppm continu (6 h) de CS₂ (4,9 \pm 0,4 µg/g), 15 min chaque 30 min à 250 ppm de CS₂ (2,6 \pm 0,3 µg/g) et 15 min/h à 250 ppm de CS₂ (2,2 \pm 0,4 µg/g). Comme attendu, tous les échantillons des rats témoins avaient des concentrations sanguines de CS₂ en dessous de la limite de détection. Le test de Bonferroni indiquait une différence significative entre le groupe exposé de manière continue et les deux autres groupes, mais il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes exposés de manière intermittente.

Par ailleurs, les concentrations sanguines de solvant ont été comparées avant et après une exposition à 250 ppm pendant 15 min (Fig. R30). Une différence significative a été clairement obtenue entre les extractions avant le pic d'exposition et après celui-ci [F (1,15) = 31,53 ; p = 0,0001]. Par conséquent, ceci prouvait que 45 min après l'exposition de 15 min à 250 ppm de CS₂, la concentration de solvant avait diminué de manière significative, bien qu'il existe encore une concentration importante de solvant dans le sang.

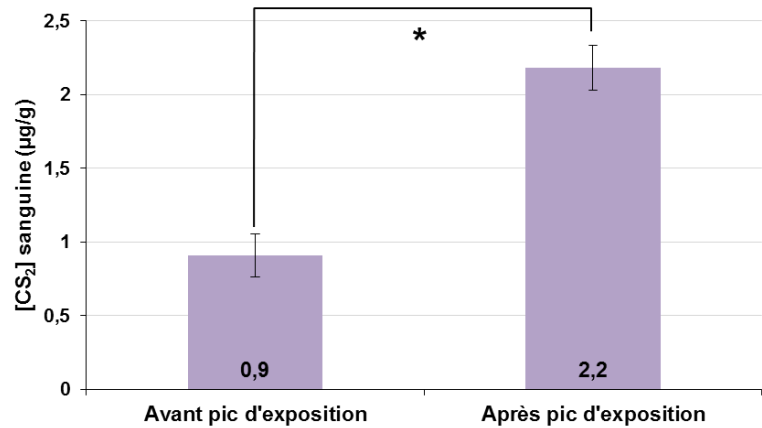


Figure R30. Comparaison de la concentration sanguine de CS₂ (µg/g) avant et après le pic d'exposition à 250 ppm pendant 15 min. Les valeurs correspondent à la moyenne ± SEM (n = 8/groupe). *p < 0,05

5.3.2.1.2 Concentrations de CS₂ : atmosphérique vs. cérébrale

La relation entre la concentration atmosphérique et la concentration cérébrale de CS₂ mesurée à la fin de l'exposition est représentée dans la Figure R29. De même que la concentration sanguine du solvant, on observait une différence statistiquement significative entre les groupes [F (2,16) = 45,39 ; p < 0,001] : 250 ppm continu de CS₂ (1,6 ± 0,1 µg/g), 15 min de CS₂ chaque 30 min (0,5 ± 0,1 µg/g) et 15 min/h de CS₂ (0,6 ± 0,1 µg/g). Les échantillons témoins avaient des concentrations en dessous de la limite de détection. De même que dans le sang, on trouvait une différence significative entre le groupe exposé de manière continue et les deux autres groupes, et il n'y avait pas de différence significative entre eux.

Si on compare la concentration de CS₂ dans le sang avec celle du cerveau, on observe une présence de solvant plus importante dans le sang. Après absorption, le CS₂ est distribué vers les différents organes (McKenna and DiStefano, 1977a).

5.3.2.2 Comparaison entre 63 ppm continu et 250 ppm intermittent (15min/h)

Quand on compare l'exposition de 15 min par heure à 250 ppm de CS₂ avec l'exposition continue à 63 ppm de CS₂, qui correspondent à une dose de solvant finale similaire sur 6 heures, on n'observe aucune différence significative entre les concentrations sanguines de CS₂ [$F(1,14) = 1,77$; $p = 0,2065$] ni entre les concentrations de TTCA urinaires [$F(1,15) = 3,84$; $p = 0,0701$]. Néanmoins, les concentrations obtenues pour l'exposition intermittente sont toujours un peu inférieures à celles de l'exposition continue, bien que cette différence ne soit pas significative (Fig. R31).

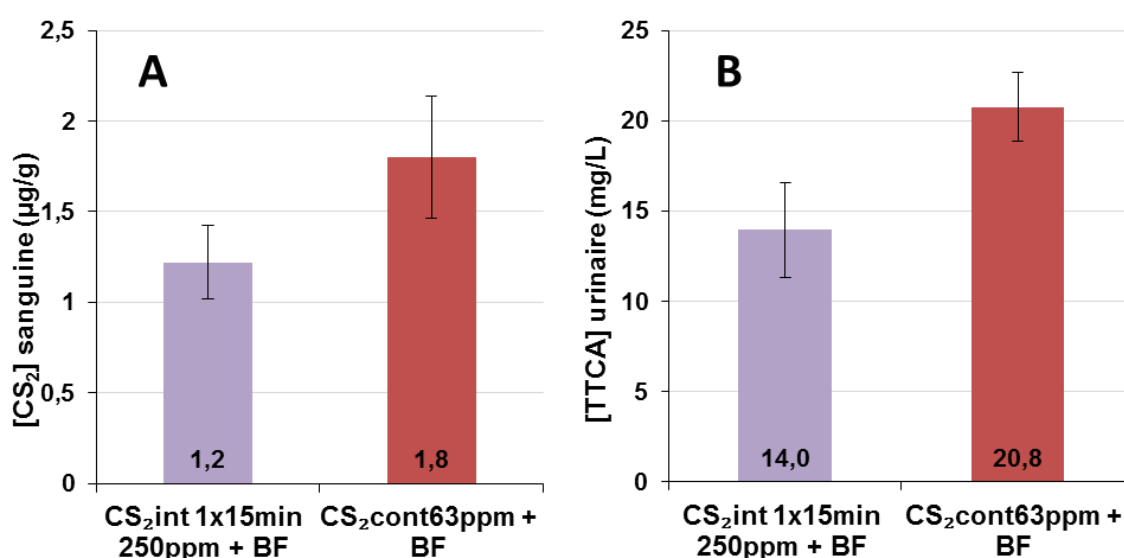


Figure R31. Comparaison du métabolisme entre deux groupes avec la même dose finale de solvant (après 6h d'exposition), mais avec différents modes d'exposition : 63 ppm de manière continue ou 250 ppm pendant 15 min chaque heure. (A) Comparaison de la concentration sanguine de CS₂ (µg/g). (B) Comparaison de la concentration de TTCA urinaire. Les valeurs correspondent à la moyenne ± SEM.

5.3.3 Effet sur l'audition

5.3.3.1 Fonction auditive : produits de distorsion acoustique

5.3.3.1.1 Fonction auditive après exposition au CS₂ à 250 ppm selon différents patterns temporels

L'exposition au bruit continu a provoqué une diminution significative des amplitudes de PDA entre 3,6 et 6 kHz. De la même façon, l'exposition au bruit plus 250 ppm de CS₂ délivré de manière intermittente (1x15 min/h ou 2x15 min/h) a provoqué une diminution significative des valeurs des PDA entre 3,6 et 6 kHz à la sortie d'exposition. Enfin, concernant le groupe exposé de manière continue à 250 ppm de CS₂ et bruit, la gamme de fréquences affectées s'élargit jusqu'à 9,6 kHz.

A la **fin d'exposition**, les déplacements d'amplitude mesurés à 4,8 et 6 kHz étaient légèrement inférieurs quand il n'y avait pas de solvant, et supérieurs à 9,6 kHz pour le groupe exposé de manière continue (Tableau R2). À la fin de la co-exposition au solvant en mode intermittent (1x15 min/h), les pertes auditives étaient significativement plus faibles que l'exposition au bruit seul à 4,8 kHz ($p = 0,0447$) et 6 kHz ($p = 0,0477$) (Fig. R32A). Enfin, en raison de l'extension des fréquences endommagées à la fin de l'exposition continue à 250 ppm CS₂, il y avait une différence significative entre ce groupe et le groupe exposé au bruit seul à 9,6 kHz ($p = 0,0310$) (Fig. R32A).

De même, bien qu'il y ait eu une **récupération**, elle n'était pas suffisante pour arriver aux valeurs du groupe témoin, et des différences significatives ont été trouvées entre le groupe exposé au bruit seul ou le groupe co-exposé au CS₂ de manière continue vs. le groupe témoin à 3,6, 4,8 et 6 kHz. En ce qui concerne les deux groupes exposés de manière intermittente au CS₂, il y avait également une récupération après 4 semaines sans exposition. On a pu observer que ces deux groupes ont récupéré, mais pas totalement, sans différence significative avec le groupe témoin à 6 kHz (1 pic de 15 min/h : $p = 0,7161$ et 2 pics de 15 min/h : $p = 0,5785$). Ainsi, bien qu'il n'y ait pas une récupération identique pour tous les groupes, on ne trouvait pas de différence significative dans les variations d'amplitude des PDA entre les groupes, quelle que soit la fréquence mesurée (Fig. R32B).

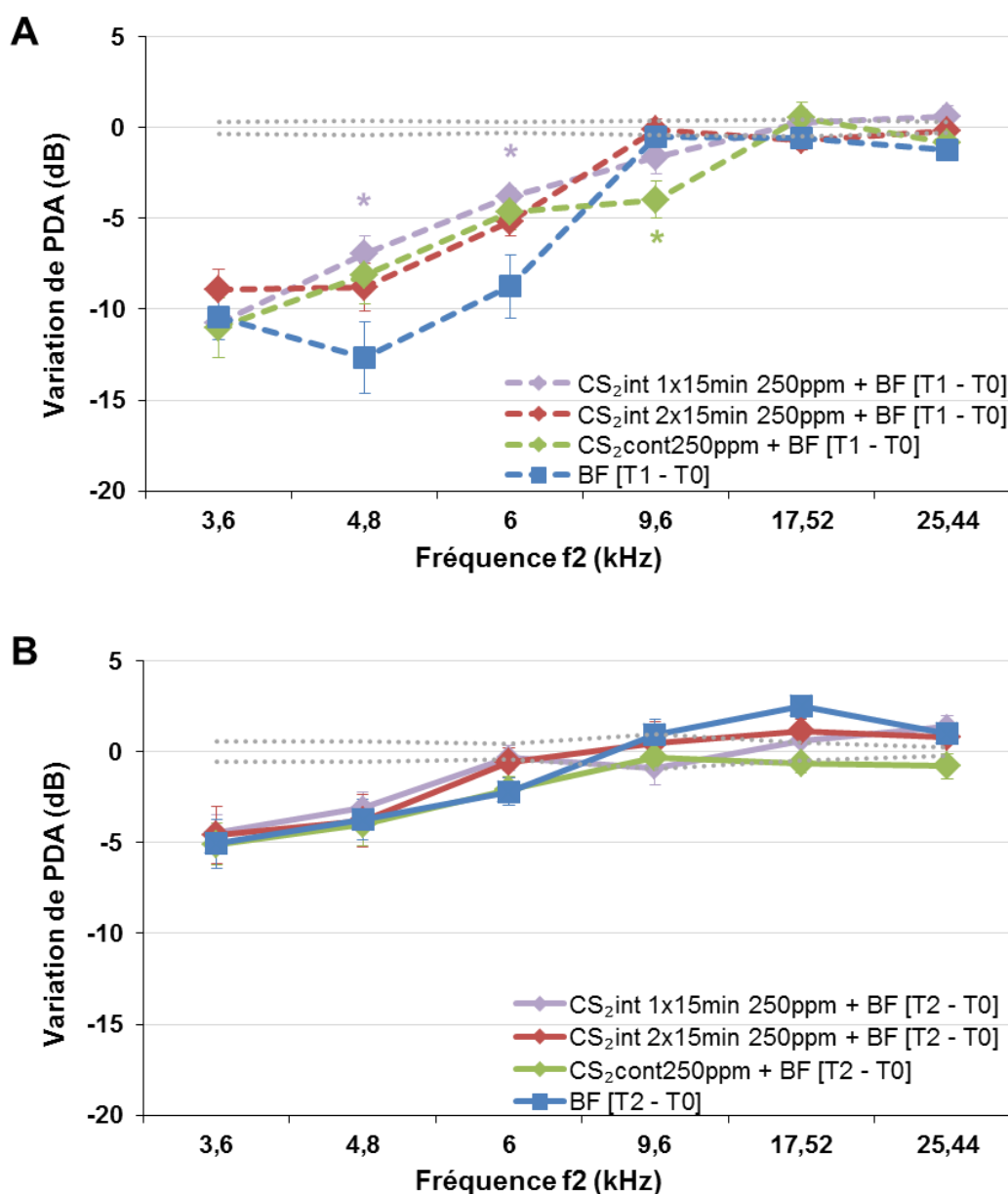


Figure R32. Variations des PDA des différents groupes exposés. (A) Variations des PDA à la fin de l'exposition : $[T1 - T0] = [PDA1 - PDA0]_{Exposés} - [PDA1 - PDA0]_{Témoins}$. (B) Variations des PDA à la fin de la récupération : $[T2 - T0] = [PDA2 - PDA0]_{Exposés} - [PDA2 - PDA0]_{Témoins}$. BF : bruit riche en basses fréquences. CS₂ : disulfure de carbone. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM. La ligne en pointillés gris représente la variabilité du groupe témoin (SEM). * $p < 0,05$, significativement différent de la moyenne du groupe exposé au bruit, test de Bonferroni.

Le Tableau R2 indique, pour chaque groupe de rats exposés et pour chaque fréquence, les pertes auditives à la sortie de l'exposition et après 4 semaines de récupération.

PDA f2 (kHz)	Mesure	BF	CS ₂ int 1x15min 250ppm + BF	CS ₂ int 2x15min 250ppm + BF	CS ₂ cont250ppm + BF
3,6	[T1 – T0] *	-10,4	-10,8	-8,9	-11
	p	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3,6	[T2 – T0]	-5,1	-4,5	-4,6	-5,1
	p	0,0000	0,0003	0,007	0,0000
4,8	[T1 – T0]	-12,6	-6,9	-8,8	-8,1
	p	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
4,8	[T2 – T0]	-3,7	-3,1	-3,8	-4
	p	0,0002	0,0279	0,0288	0,0001
6	[T1 – T0]	-8,7	-3,8	-5,2	-4,6
	p	0,0000	0,0041	0,0000	0,0033
6	[T2 – T0]	-2,2	-0,3	-0,6	-2,1
	p	0,0006	0,9999	0,9999	0,0008
9,6	[T1 – T0]	-0,5	-1,6	-0,1	-4
	p	0,7518	0,7847	0,9999	0,0115
9,6	[T2 – T0]	0,9	-0,9	0,5	-0,3
	p	0,9710	0,9999	0,9999	0,8127
17,52	[T1 – T0]	-0,5	0,2	-0,7	0,6
	p	0,8939	0,9999	0,9999	0,6202
17,52	[T2 – T0]	2,5	0,6	1,1	-0,7
	p	0,2772	0,9999	0,9999	0,3160
25,44	[T1 – T0]	-1,2	0,6	-0,2	-0,8
	p	0,2281	0,9999	0,9999	0,4767
25,44	[T2 – T0]	1	1,4	0,8	-0,8
	p	0,2672	0,9999	0,9999	0,4268

Tableau R2. Variations des PDA (amplitude, en dB) obtenu pour tous les groupes exposés à la fin de l'exposition $([T1 - T0] = [PDA1 - PDA0]_{\text{Exposés}} - [PDA1 - PDA0]_{\text{Témoins}})$ ou à la fin de la période de récupération $([T2 - T0] = [PDA2 - PDA0]_{\text{Exposés}} - [PDA2 - PDA0]_{\text{Témoins}})$. P: probabilité entre groupes (exposé vs. control), en rouge quand la différence est statistiquement significative ($p < 0,05$). * Calcul avec le modèle "Tobit".

5.3.3.1.2 Comparaison de la fonction auditive entre 63 ppm continu et 250 ppm intermittent

En comparant la fonction auditive du groupe exposé à 63 ppm continu avec le groupe exposé à 250 ppm de CS₂ pendant 15 min par heure, on remarque qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes ni à la fin de l'exposition ni après la période de récupération (Fig. R33).

De même, bien que les différences ne soient pas significatives, à la fin de l'exposition, on a trouvé une perte auditive supérieure pour le groupe exposé de manière continue entre 3,6 à 6 kHz. Au terme des 4 semaines de récupération, les groupes co-exposés se comportaient comme le groupe de rats exposés au BF seul, avec une récupération partielle (Fig. R33B).

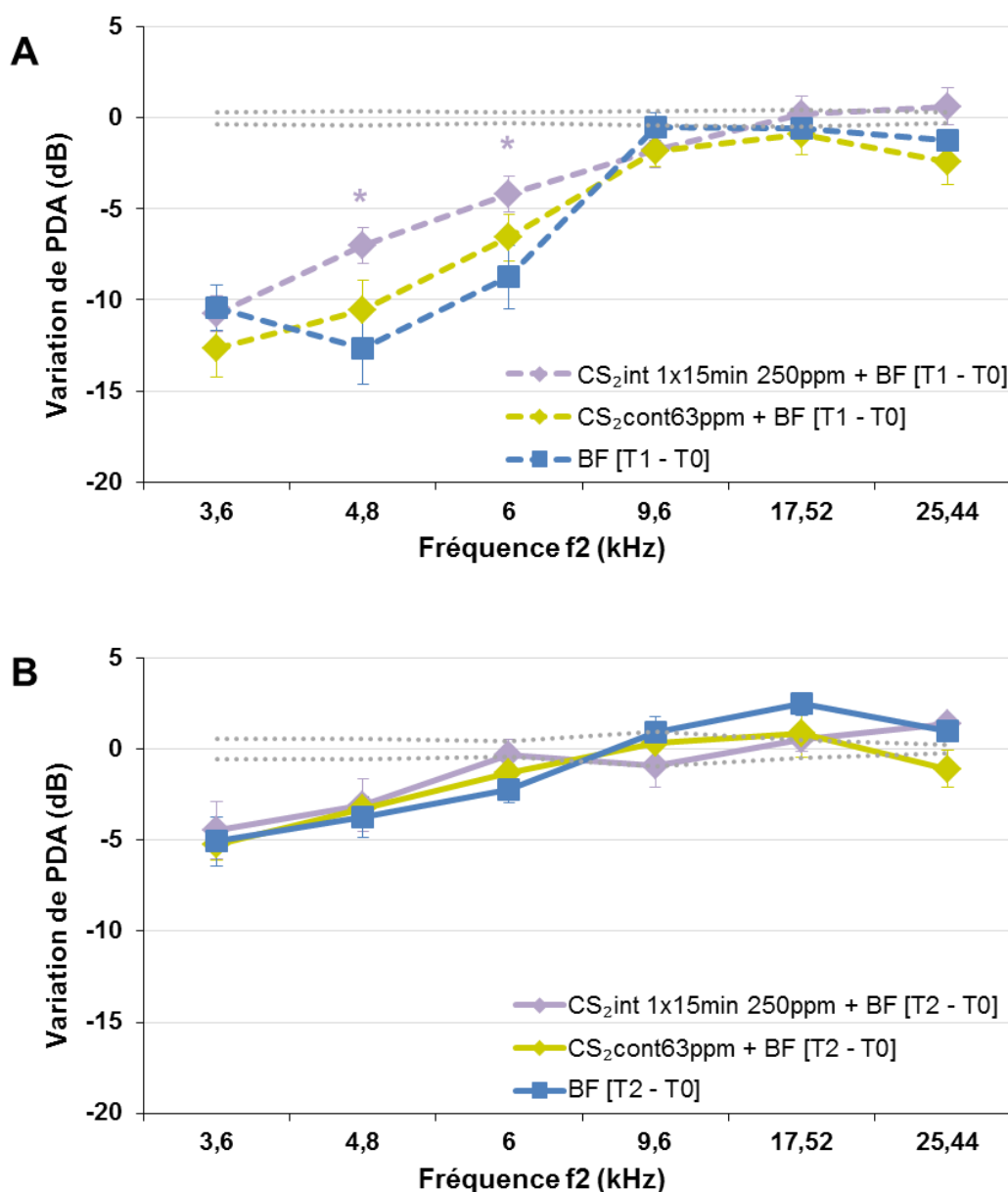


Figure R33. Variations des PDA des groupes exposés à 63 ppm continu de CS₂ et bruit et à 15min/h de 250 ppm de CS₂ et bruit. (A) Variations à la fin de l'exposition : $[PDA1 - PDA0]_{\text{Exposés}} - [PDA1 - PDA0]_{\text{Témoins}}$. (B) Variations à la fin de la période de récupération : $[PDA2 - PDA0]_{\text{Exposés}} - [PDA2 - PDA0]_{\text{Témoins}}$. BF : Bruit riche en basses fréquences. CS₂ : disulfure de carbone. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM. La ligne en pointillés gris représente la variabilité du groupe témoin (SEM). * $p < 0,05$, significativement différent de la moyenne du groupe exposé au bruit, test de Bonferroni.

5.3.3.2 Analyses histologiques

5.3.3.2.1 Coupes semi-fines de la cochlée (organe de Corti + ganglion spiral)

Toutes les cochlées, des animaux co-exposés de manière intermittente et les témoins (n = 10/groupe), présentaient une morphologie générale similaire, aussi bien à la fin de l'exposition qu'après les 4 semaines de récupération (Fig. R34).

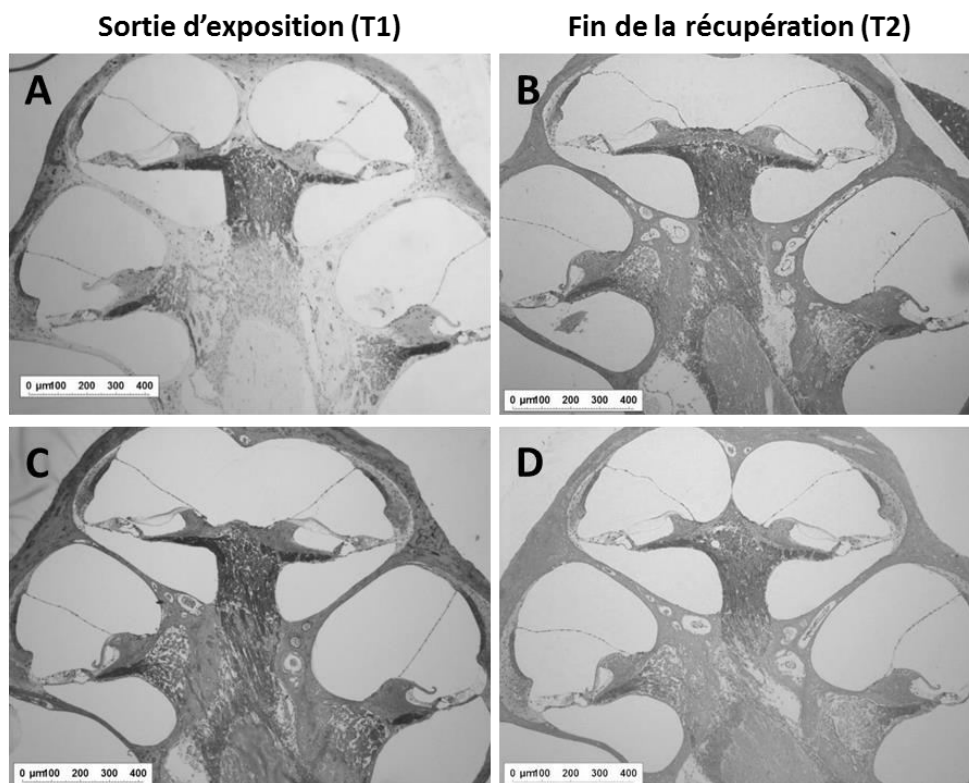


Figure R34. Microscopie optique de coupes semi-fines de la cochlée observées à la fin de l'exposition (gauche) et à la fin de la période de récupération (droite). (A-B) Animal témoin. (C-D) Animal exposé à 15 min/h de 250 ppm de disulfure de carbone + bruit.

De plus, les trois rangées de CCE et la rangée de CCI, les cellules de Deiters et de Hensen présentaient des caractéristiques normales et similaires pour tous les groupes à la fin de la période d'exposition et après la récupération de 4 semaines (Fig. R35). De même, les corps cellulaires des neurones situés dans le ganglion cochléaire avaient un aspect normal et identique à ceux des rats témoins à la fin du dernier jour d'exposition ainsi qu'à la fin de la récupération (Fig. R36).

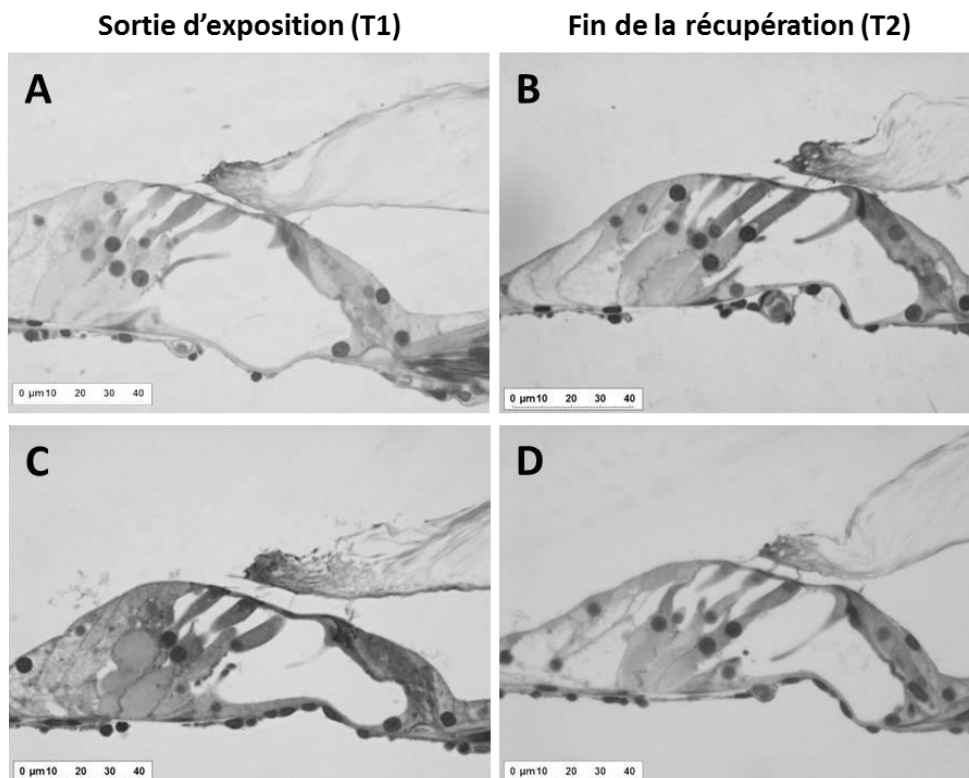


Figure R35. Microscopie optique de coupes semi-fines de la cochlée à la fin de l'exposition (gauche) et à la fin de la période de récupération (droite) où on observe les organes de Corti avec les trois cellules ciliées externes et une cellule ciliée interne, avec la membrane tectoriale unie aux stéréocils. (A-B) Animal témoin. (C-D) Animal exposé à 15 min/h de 250 ppm de disulfure de carbone + bruit.

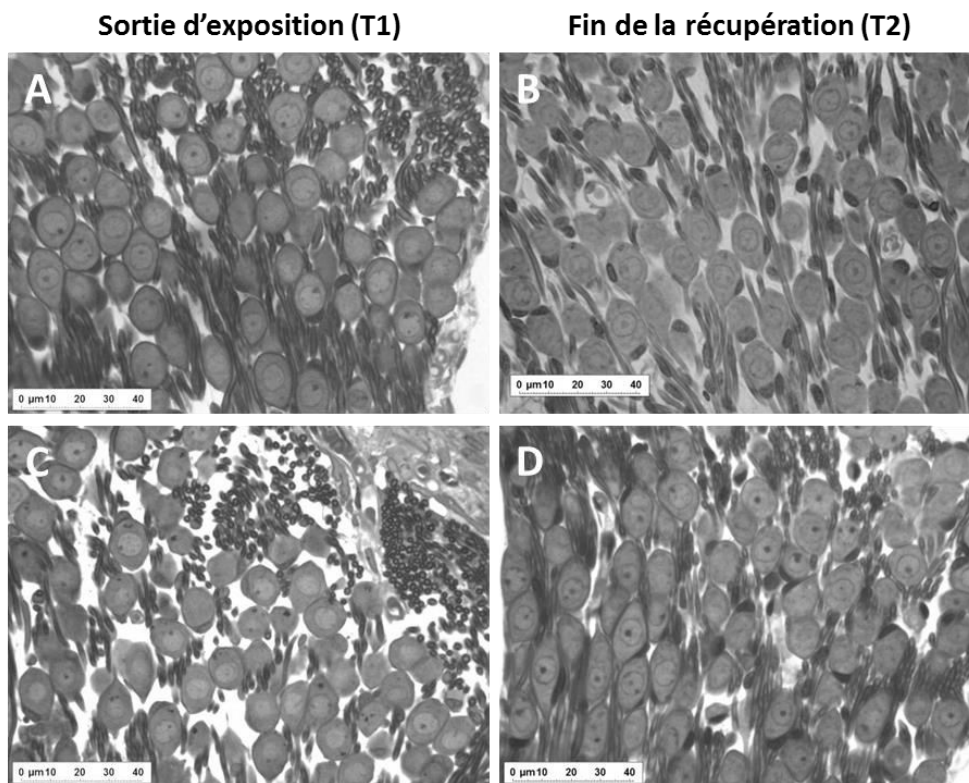


Figure R36. Microscopie optique de coupes semi-fines de la cochlée à la fin de l'exposition (gauche) et à la fin de la période de récupération (droite) où on observe les corps cellulaires des neurones du ganglion spiral apical. (A-B) Animal témoin. (C-D) Animal exposé à 15 min/h de 250 ppm de disulfure de carbone + bruit.

5.3.3.2.2 Cochléogramme

A la fin de la période de récupération de 4 semaines, les cellules ciliées ont été comptées en microscopie optique afin de déterminer le pourcentage de perte cellulaire.

De même que pour les expositions précédentes, le cochléogramme moyen des 5 rats témoins était similaire à ceux obtenus avec les animaux exposés, quel que soit le traitement (Fig. R37). Pour tous les groupes, on a observé quelques rares pertes de cellules le long de l'organe de Corti. Comme pour les animaux témoins, la perte de CCI et de CCE de la première rangée n'a jamais dépassé 1%, et des pertes entre 1 et 2% ont été mesurées dans la deuxième et la troisième rangée de CCE. Rappelons que l'absence de certaines CCE à l'extrême base est due à la morphologie cochléaire.

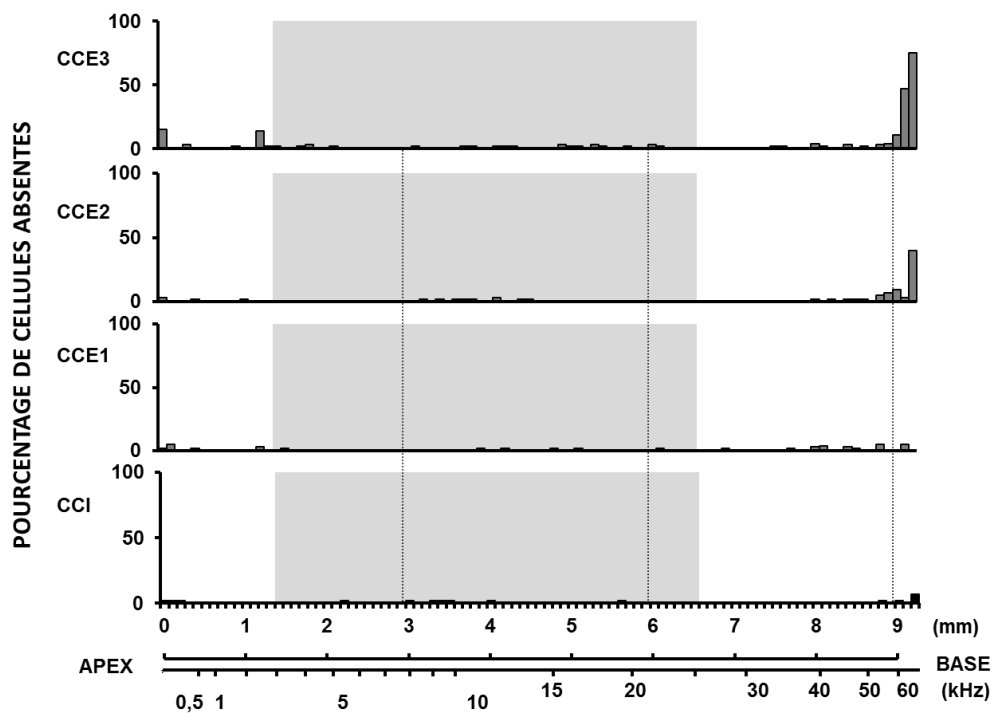


Figure R37. Moyenne des cochléogrammes ($n = 5$) de rats témoins 4 semaines après la fin de l'exposition. Axe X : la ligne supérieure représente la distance (mm) le long de la spirale de l'organe de Corti, la ligne inférieure représente la carte en fréquences. Axe Y : pourcentage de perte de cellules ciliées. CCI : cellules ciliées internes, CCE1 : première rangée de cellules ciliées externes, CCE2 : deuxième rangée de cellules ciliées externes, CCE3 : troisième rangée de cellules ciliées externes. La zone grisée indique la zone de fréquences mesurées par les produits de distorsion acoustique. Les valeurs correspondent à la moyenne.

Par conséquent, même si la perte auditive induite par l'exposition, soit par le bruit seul, soit en combinaison avec le solvant, était significative pour les fréquences les plus faibles, il n'y avait pas de perte visible de cellules (Fig. R38).

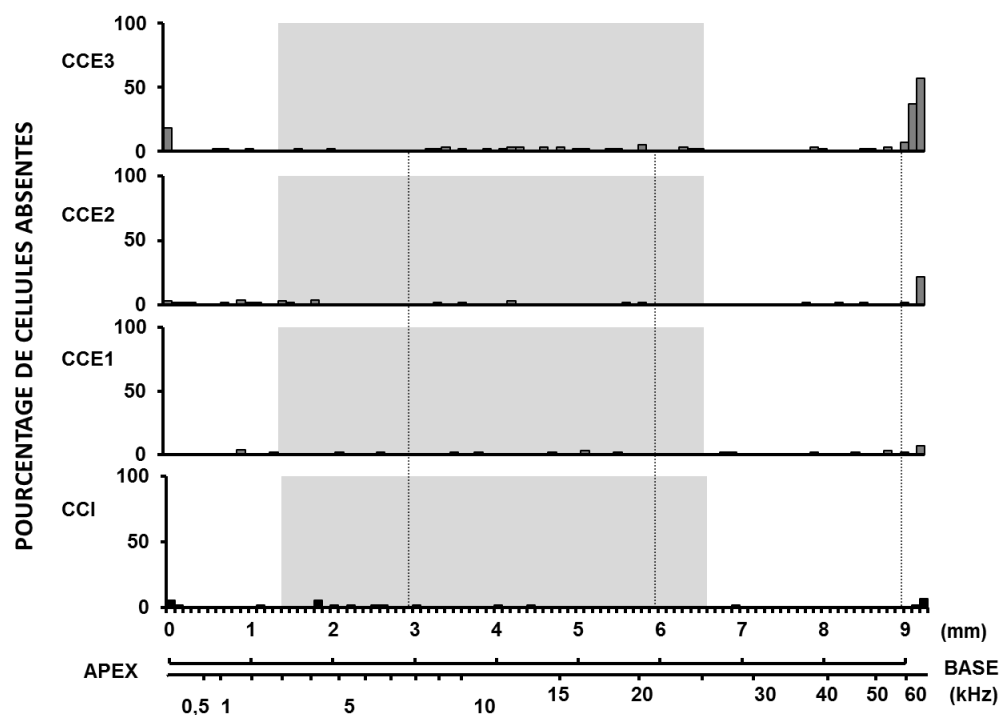


Figure R38. Moyenne des cochléogrammes ($n = 5$) de rats exposés à 250 ppm de disulfure de carbone 15 min/h + bruit 4 semaines après la fin de l'exposition. Axe X : la ligne supérieure représente la distance (mm) le long de la spirale de l'organe de Corti, la ligne inférieure représente la carte en fréquences. Axe Y : pourcentage de perte de cellules ciliées. CCI : cellules ciliées internes, CCE1 : première rangée de cellules ciliées externes, CCE2 : deuxième rangée de cellules ciliées externes, CCE3 : troisième rangée de cellules ciliées externes. La zone grisée indique la zone de fréquences mesurées par les produits de distorsion acoustique. Les valeurs correspondent à la moyenne.

5.3.3.2.3 SEM de la cochlée

Les épithéliums sensoriels auditifs ont également été observés en microscopie électronique à balayage à la fin de la période de récupération afin d'évaluer l'état des stéréocils des cellules ciliées de l'organe de Corti ($n = 3$ / groupe).

Ces observations histologiques ont confirmé que les échantillons témoins de cette étude avaient les mêmes caractéristiques morphologiques que ceux décrits dans la littérature : faisceaux ciliaires intacts émergents de la plaque cuticulaire à la surface apicale des cellules ciliées, d'abondantes microvillosités à la surface apicale des cellules de support et aucune perte significative de cellules ciliées (Fig. R39).

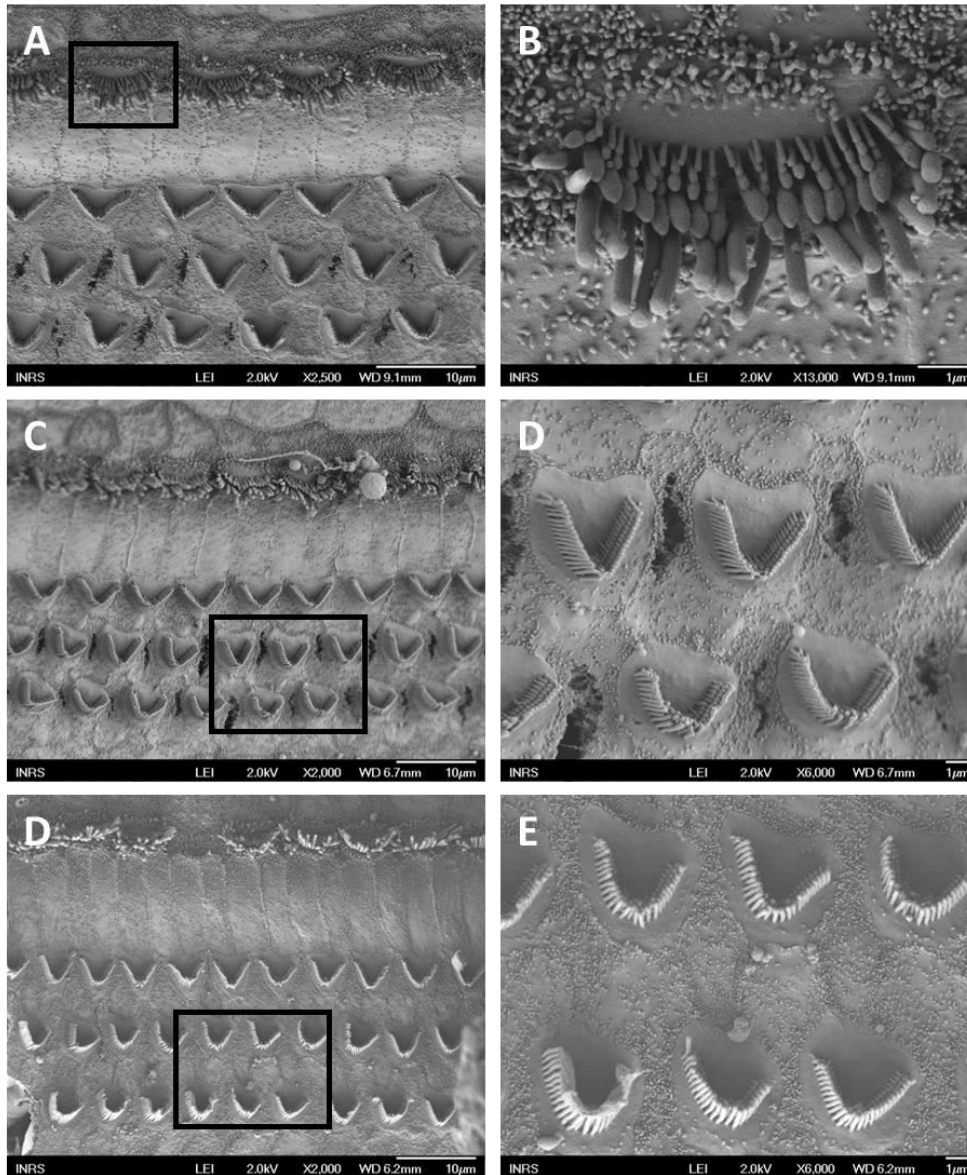


Figure R39. Microscopie électronique à balayage des organes de Corti d'animaux témoins observés à la fin de la période de récupération. (A-B) 15 kHz : vue générale de l'organisation des stéréocils (x2500) (A) et zoom des faisceaux ciliaires intacts d'une cellule ciliée interne (x13000) (B). (C-D) 12 kHz : vue générale de l'organisation des stéréocils (x2000) (C) et zoom des faisceaux ciliaires intacts des deux rangées de cellules ciliées externes (x6000) (D). (E-F) 8 kHz : vue générale de l'organisation des stéréocils (x2000) (E) et zoom des faisceaux ciliaires intacts de deux rangées de cellules ciliées externes (x6000) (F).

Quel que soit le groupe d'animaux analysé, aucune lésion évidente n'a été observée au niveau des stéréocils, comme représenté Figure R40 pour le groupe co-exposé au CS₂ de façon intermittente. Ces images illustrent que ni l'exposition au bruit riche en basses fréquences ni la co-exposition avec le CS₂ n'ont endommagé les stéréocils.

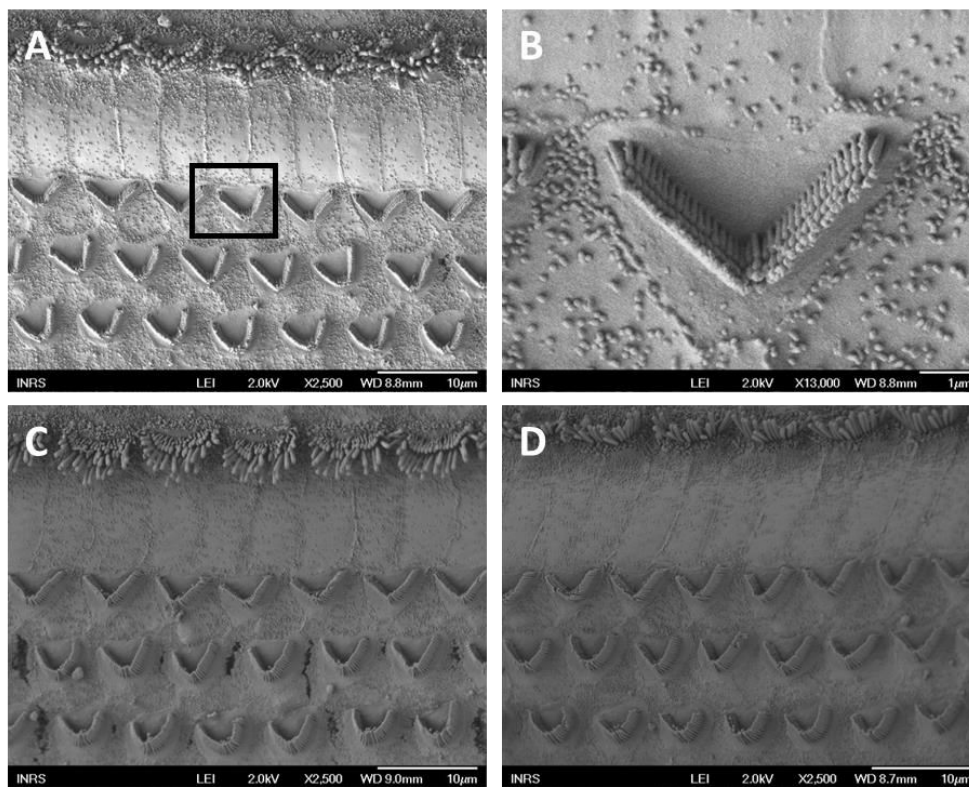


Figure R40. Microscopie électronique à balayage des organes de Corti d'animaux exposés à 250 ppm de disulfure de carbone pendant 15 min/h et au bruit continu à la fin de la période de récupération. (A et B) 14 kHz : vue générale de l'organisation des stéréocils (x2500) (A) et zoom d'une cellule ciliée externe (x6000) (B). (C) 11 kHz : vue générale de l'organisation des stéréocils (x2500). (D) 8 kHz vue générale de l'organe de Corti (x2500).

5.3.4 Effet sur le système vestibulaire

5.3.4.1 Fonction vestibulaire

5.3.4.1.1 Fonction vestibulaire après exposition au CS₂ à 250 ppm selon différents patterns temporels

La Figure R41 illustre le nombre moyen de saccades (A et D), la durée moyenne du signal (B et E) et la pente d'amortissement des saccades (C et F), obtenus dans les différents groupes expérimentaux : témoins, CS₂ 250 ppm intermittent (1 × 15 min/h) + BF, CS₂ 250 ppm intermittent (2 × 15 min/h) + BF et CS₂ 250 ppm continu + BF avant exposition (T0) au terme des 4 semaines d'exposition (T1) et de récupération (T2).

Après une **stimulation à 90°/s**, l'ANOVA à 2 facteurs montre une interaction « temps-traitement » significative pour le nombre de saccades [$F(6,124) = 3,331$; $p = 0,0045$], la durée des saccades [$F(6,126) = 2,665$; $p = 0,0181$] et la pente d'amortissement [$F(6,124) = 2,5$; $p = 0,0254$] (Fig. R41A-C).

Le groupe témoin et la co-exposition au CS₂ 250 ppm intermittent (1 × 15 min/h) + BF n'a pas induit de diminution d'aucun paramètre à T1, comme à T2, par rapport aux valeurs basales (T0). La co-exposition CS₂ 250 ppm intermittent (2 × 15 min/h) + BF a induit une diminution de 22,76 % du nombre de saccades ($p = 0,0075$) et une diminution de 22,19 % de la durée des saccades ($p = 0,0289$) à T1, mais pas de différence pour la pente d'amortissement ($p = 0,0779$). A T2, on n'observe aucune modification significative du nombre ($p = 0,7541$) et de la durée des saccades ($p > 0,9999$). Enfin, la co-exposition CS₂ 250 ppm continu + BF a induit une diminution de 33,21 % du nombre de saccades à T1 ($p < 0,0001$) par rapport à T0, une diminution de 34 % de la durée des saccades ($p < 0,0001$) et une diminution de -62 % de la pente d'amortissement ($p = 0,0002$). A T2, on observe une récupération partielle des trois paramètres (nombre de saccades : -13 % par rapport à T0 ; $p = 0,0506$, durée des saccades : -14,48 % ; $p = 0,0609$ et pente d'amortissement : -17% ; $p = 0,5242$).

La **stimulation à 360°/s** a provoqué une interaction « temps-traitement » significative pour le nombre de saccades [$F(6,116) = 5,87$; $p < 0,0001$], la durée des saccades [$F(6,124) = 5,72$; $p < 0,0001$] et la pente d'amortissement [$F(6,116) = 9,96$; $p < 0,0001$] (Fig. R41D-F).

De même que pour la vitesse lente, le groupe témoin et le groupe exposé à 1 pic de 250 ppm de CS₂ présentent des valeurs stables au cours de l'expérimentation. Cependant, le groupe co-exposé à CS₂ 250 ppm intermittent (2 × 15 min/h) + BF et le groupe co-exposé à CS₂ 250 ppm continu + BF ont présenté une diminution significative du nombre de saccades (-18% ; $p = 0,0001$, pour les deux groupes), de la durée totale (-24% et -17%, respectivement ; $p < 0,0001$) et de la pente d'amortissement (-34% ; $p < 0,0001$, pour les deux groupes) à T1 par rapport à T0. Toutes les mesures présentent une récupération totale à T2.

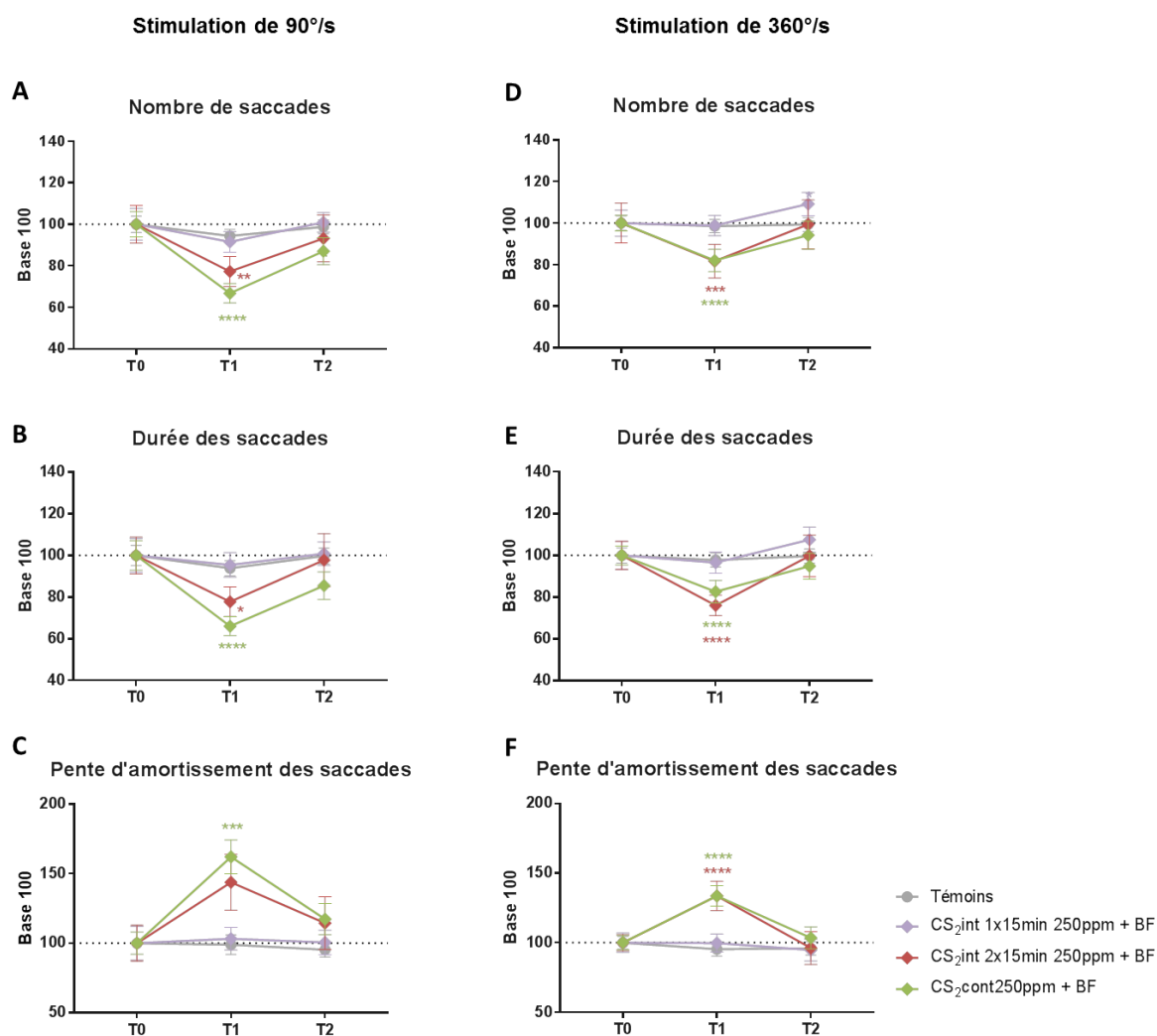


Figure R41. Nystagmus post-rotatoire. Nombre de saccades (A et D), de la durée des saccades (B et E) et de la pente d'amortissement (C et F) après une stimulation de 40 s à 90°/s (gauche) ou à 360°/s (droite) mesurés pour chaque groupe expérimental à T0, T1 et T2 exprimés en pourcentage par rapport à la ligne de base. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, significativement différents de la moyenne à T0, test de Bonferroni.

5.3.4.1.2 Comparaison de la fonction vestibulaire entre l'exposition CS₂ 63 ppm mode continu et CS₂ 250 ppm mode intermittent (1 x 15 min/h)

A **vitesse lente (90°/s)**, les deux groupes d'animaux co-exposés et le groupe témoin donnent des résultats de NPR stables au cours de toute l'expérimentation (Figure R42). Aucune différence significative par rapport aux valeurs basales n'a été observée pour aucun des groupes ni après exposition (T1) ni après récupération (T2).

Après une stimulation à 360°/s, des modifications significatives ont été observées pour le groupe d'animaux co-exposés à 63 ppm de façon continue pour le nombre de saccades (-13% ; $p = 0,0206$) et la durée totale des saccades (-15% ; $p = 0,0099$) à la fin d'exposition (Fig. R42D-F). En T2, il n'y avait aucune différence significative des paramètres mesurés par rapport à leurs valeurs initiales. Les paramètres mesurés du groupe exposé à 250 ppm de manière intermittente étaient comparables à ceux du groupe témoin. Ainsi, les animaux co-exposés ont présenté un comportement différent selon que le solvant fut administré de façon continue pendant 6 h ou selon un mode intermittent, à une concentration plus élevée, mais pour une dose finale équivalente.

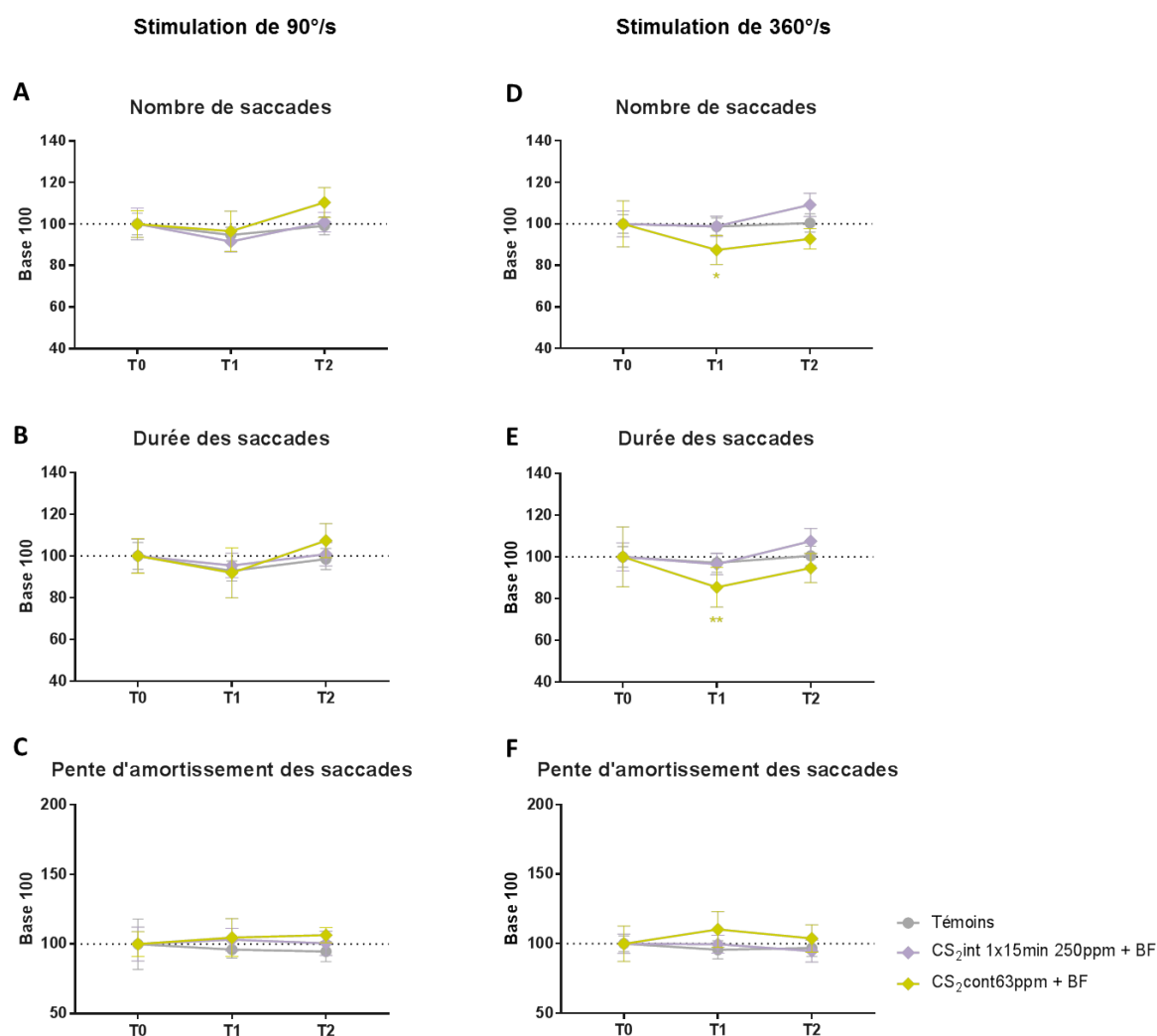


Figure R42. Nystagmus post-rotatoire. Nombre de saccades (A et D), de la durée des saccades (B et E) et de la pente d'amortissement (C et F) après une stimulation de 40 s à 90°/s (gauche) ou à 360°/s (droite) mesurés pour chaque groupe expérimental à T0, T1 et T2 exprimés en pourcentage par rapport à la ligne de base. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, significativement différents de la moyenne à T0, test de Bonferroni.

5.3.4.2 Comportement

Bien que l'analyse statistique de l'interaction «traitement» x «temps» révèle une différence significative pour les deux tests comportementaux réalisés à savoir le Locotronic® et le test de redressement : **erreurs de marche** [F (4,62) = 2,82; $p = 0,0324$] et le **air-righting reflex** [F (4,54) = 3,32 ; $p = 0,0168$], le test de Bonferroni ne montre pas de différence significative entre les trois groupes par rapport aux valeurs à T0 (Figure R43).

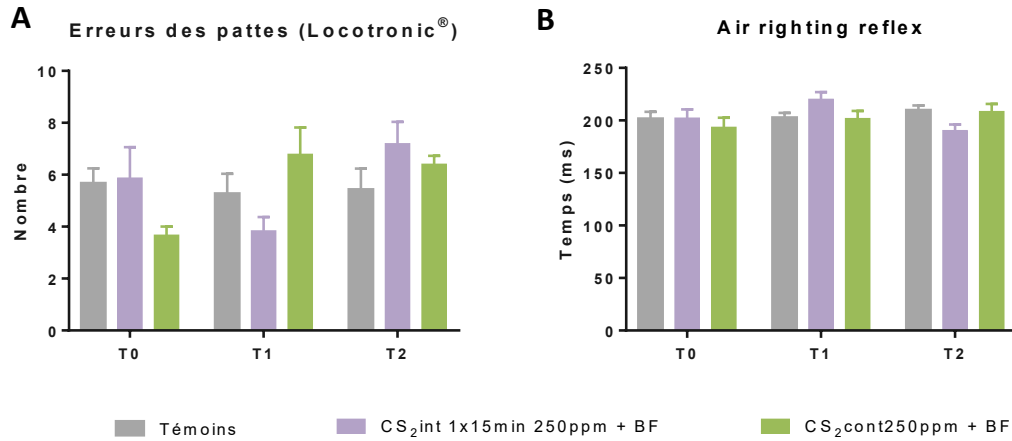


Figure R43. Tests comportementaux. La fonction vestibulaire est évaluée avec deux tests avant (T0), après l'exposition (T1) et après 4 semaines de récupération (T2). Erreurs des pattes (A) et air-righting reflex (B). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM.

5.3.4.3 Analyses histologiques

5.3.4.3.1 Ganglion de Scarpa

Les coupes semi-fines des ganglions vestibulaires inclus dans la résine ont été observées en microscopie optique afin d'étudier la morphologie des corps cellulaires des neurones ganglionnaires (n = 5/groupe).

A la fin de la période de récupération, les ganglions des animaux co-exposés au solvant de manière intermittente (Fig. R44B) présentaient une morphologie similaire à ceux des animaux témoins (Fig. R44A).

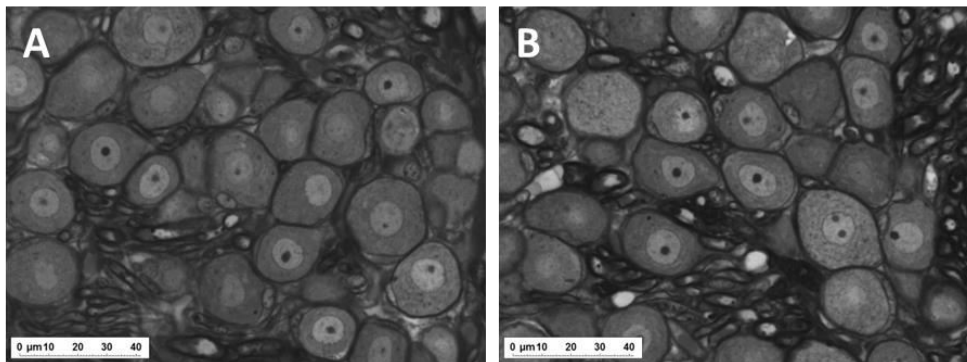


Figure R44. Microscopie optique de coupes semi-fines du ganglion de Scarpa à la fin de la période de récupération où l'on observe les corps cellulaires des neurones du ganglion vestibulaire. (A) Animal témoin. (B) Animal exposé à 15min/h de 250 ppm de disulfure de carbone + bruit.

5.3.4.3.2 SEM du vestibule

La Figure R45 illustre les résultats de la surface des échantillons d'utricules en SEM après la période de récupération. De même, on peut observer dans la Figure R46 les saccules d'un animal témoin, d'un animal exposé au bruit seul ou d'un animal co-exposé avec 250 ppm continu de solvant.

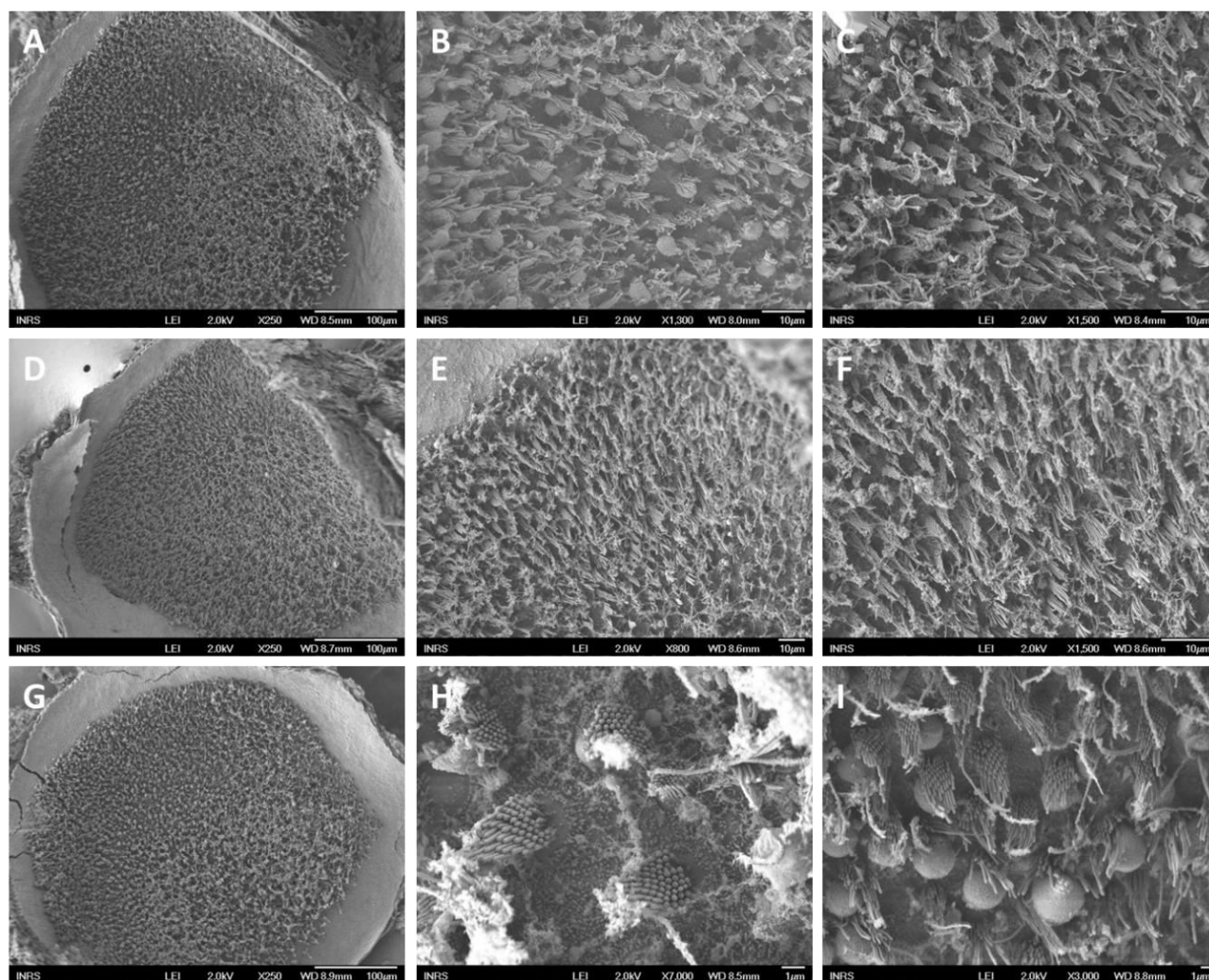


Figure R45. Microscopie électronique à balayage des épithéliums sensoriels de l'utricule à la fin de la période de récupération. (A-C) Animal témoin. (D-F) Animal exposé pendant 4 semaines au bruit de basses fréquences. (G-I) Animal exposé pendant 4 semaines au bruit de basses fréquences + 250 ppm de disulfure de carbone de manière intermittente.

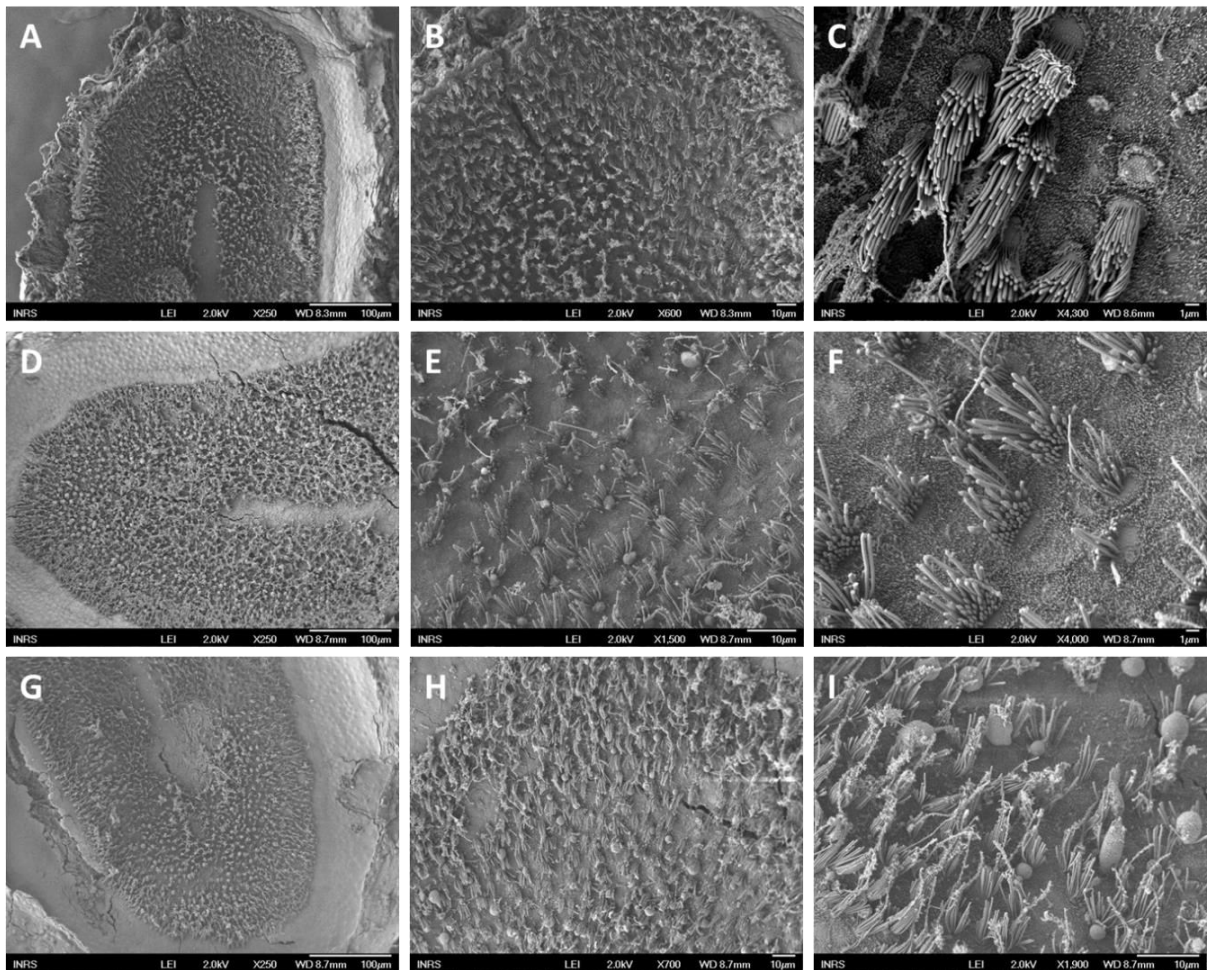


Figure R46. Microscopie électronique à balayage des épithéliums sensoriels du saccule à la fin de la période de récupération. (A-C) Animal témoin. (D-F) Animal exposé pendant 4 semaines au bruit de basses fréquences. (G-I) Animal exposé pendant 4 semaines au bruit de basses fréquences + 250 ppm de disulfure de carbone de manière intermittente.

Les observations des utricules (Fig. R45A-C) et saccules (Fig. R46A-C) témoins, présentaient des caractéristiques morphologiques similaires à ceux décrits dans la littérature pour les rats adultes témoins (Dechesne et al., 1986; Hunter-Duvar, 1983; Llorens et al., 1993). La surface des préparations a montré la partie apicale de cellules sensorielles vestibulaires avec des cils intacts, et des cellules de support non sensorielles avec d'abondantes microvillosités (Fig. R46C). Les échantillons des animaux co-exposés pendant 4 semaines à 250 ppm de CS₂ de manière intermittente et bruit ne présentaient pas d'anomalies pathologiques et étaient comparables aux animaux témoins.

5.4. CHAPITRE IV :

EFFET DU CS₂ SUR LE ROM

5.4.1 Santé générale des animaux

Les animaux étaient pesés juste avant l'exposition (d1) et le dernier jour d'exposition (d5). Tous les rats témoins (n = 30) et exposés (n = 48) étaient observés, afin d'évaluer leur état de santé et de bien-être général, selon le protocole standard défini par Morton and Griffiths (1985) (Annexe 1).

Pendant les 5 jours d'exposition la moyenne des poids des animaux est restée stable, et donc aucune différence significative n'a été trouvée sur les poids entre les différents groupes expérimentaux (Fig. R47). Ni le temps [$F(1,72) = 0,07$; $p = 0,7979$] ni le traitement [$F(5,72) = 0,8$; $p = 0,5552$] n'ont eu d'influence sur l'évolution du poids.

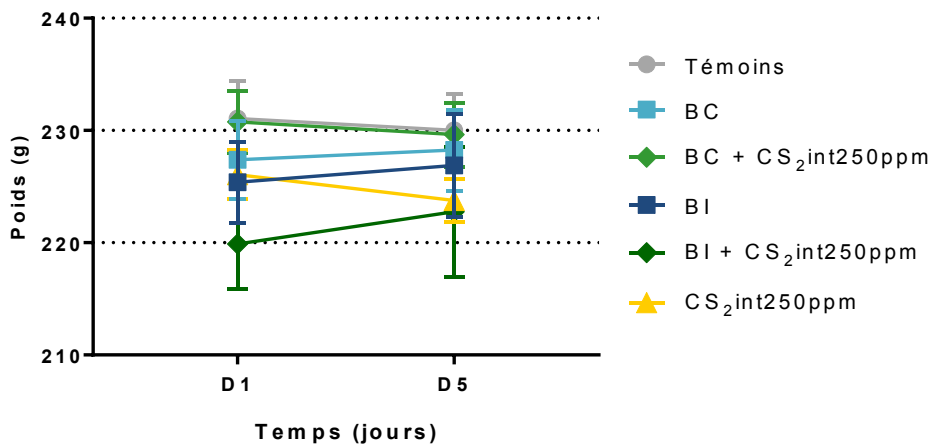


Figure R47. Evolution du poids des rats entre le début (d1) et la fin de l'exposition (d5) des différents groupes expérimentaux. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM.

5.4.2 Fonction auditive

5.4.2.1 Exposition au CS₂ et/ou bruit (continu ou impulsionnel)

Le groupe exposé de manière intermittente à **250 ppm de CS₂** ([CS₂] réelle = 228,8 ± 16,4 ppm) n'a pas montré de variations significatives dans les amplitudes de PDA en comparaison avec les animaux témoins, quelles que soient les fréquences mesurées (Fig. R48).

L'exposition au **bruit continu** avec un L_{EX,8h} de 89 dB SPL a provoqué des changements significatifs à toutes les fréquences mesurées, excepté à 25,44 kHz (Fig. R48). La variation maximale, qui est de 17,95 ± 1 dB, a été mesurée à 9,6 kHz, soit une demi-octave au-dessus de la fréquence centrale d'exposition (8 kHz).

La **co-exposition au bruit continu et à 250 ppm de CS₂** ([CS₂] réelle = 242 ± 15,9 ppm) a également donné des pertes significatives entre les animaux exposés et les témoins de 4,8 à 17,52 kHz (Fig. R48). De même que précédemment, la perte maximale se situe à 9,6 kHz (Moyenne_{témoins} = 0,2 ± 0,95 dB, Moyenne_{exposés} = -13,21 ± 1,52 dB).

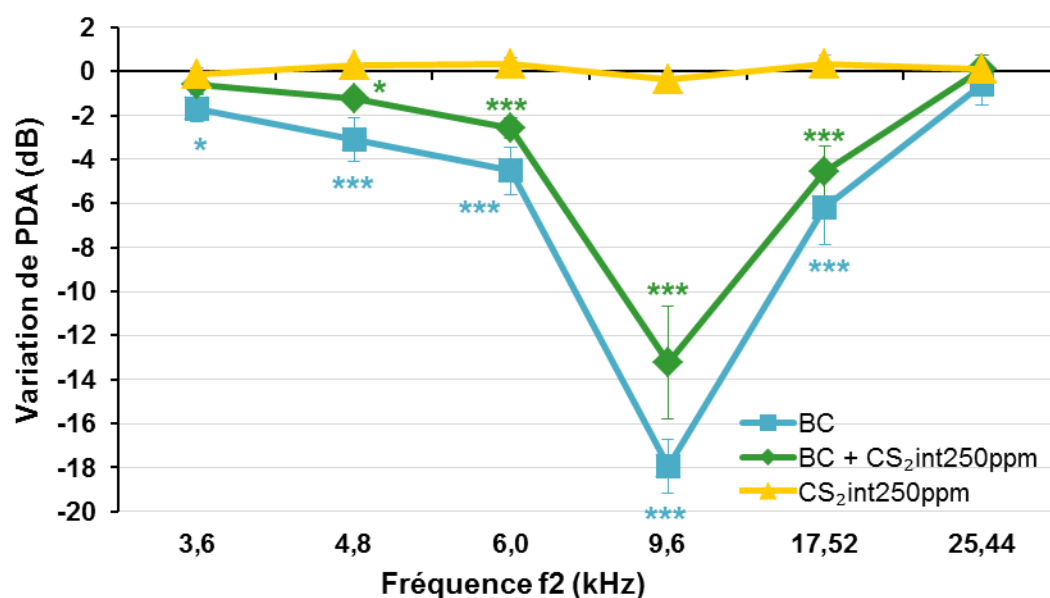


Figure R48. Variation de la perte d'audition: $[(PDA2-PDA1)_{\text{exposés}} - (PDA2-PDA1)_{\text{témoins}}]$ en fonction de f_2 pour trois conditions expérimentales. CS₂ : 250 ppm de disulfure de carbone, 15 min par heure, 6 h par jour pendant 5 jours (n = 8), BC : bruit continu avec un L_{EX,8h} de 89 dB SPL (n = 8), BC + CS₂ : bruit continu + 250 ppm de disulfure de carbone. Chaque courbe indique la différence d'amplitude de PDA obtenues pour chaque paire de fréquences mesurées. Les valeurs correspondent à la moyenne ± SEM. * p < 0,05, *** p < 0,001, significativement différent de la moyenne des témoins avec le test de Bonferroni.

Le **bruit impulsionnel** ($L_{EX,8h} = 84$ dB) a provoqué une perte d'audition significative entre les rats exposés et témoins à toutes les fréquences mesurées ($p < 0,001$) (Fig. R49). La perte auditive maximale est d'environ 9 dB à 17,5 kHz (Moyenne_{témoins} = $0,05 \pm 0,56$ dB, Moyenne_{exposés} = $-9,35 \pm 0,83$ dB) et de plus de 6 dB à 9,6 et 25,44 kHz.

La **co-exposition à 250 ppm de CS₂** ($[CS_2]$ réelle = $234,9 \pm 19,1$ ppm) associée avec le **bruit impulsionnel** a potentialisé significativement l'effet traumatisant du bruit avec des différences de pertes auditives entre les animaux exposés et témoins significatives ($p < 0,001$) à toutes les fréquences (Fig. R49). Comme pour l'exposition au bruit impulsionnel seul, l'amplitude maximale se situe à 17,5 kHz (Moyenne_{témoins} = $0,05 \pm 0,85$ dB, Moyenne_{exposés} = $-16,9 \pm 1,27$ dB).

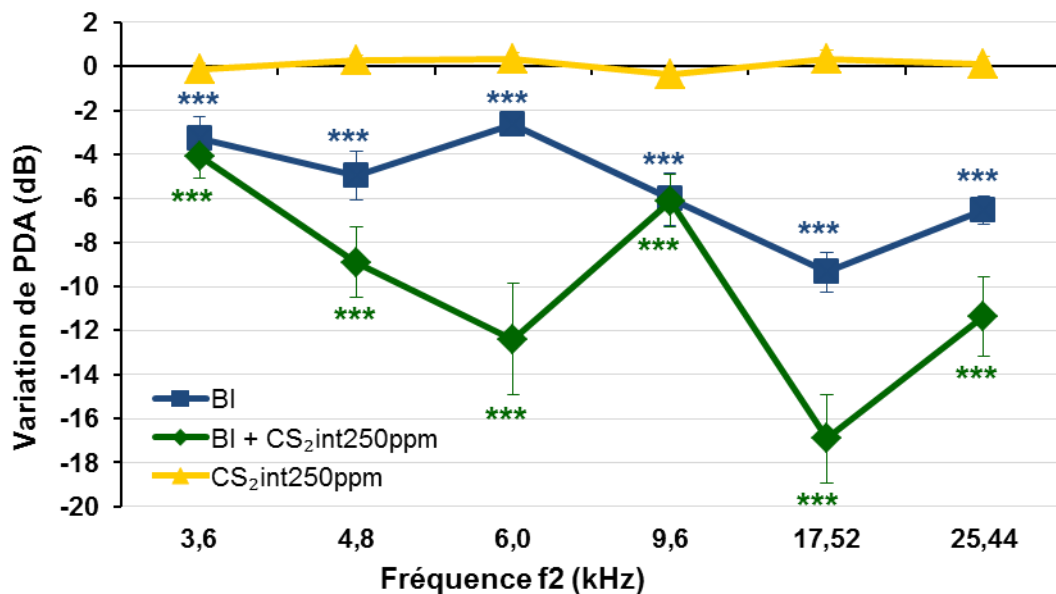


Figure R49. Variation de la perte auditive : $[(PDA2-PDA1)_{exposés} - (PDA2-PDA1)_{témoins}]$ en fonction de f_2 pour trois conditions expérimentales. CS₂ : 250 ppm de disulfure de carbone, 15 min par heure, 6 h par jour pendant 5 jours ($n = 8$), BI : bruit impulsionnel avec un $L_{EX,8h}$ de 84 dB SPL ($n = 8$), BI + CS₂ : bruit impulsionnel + 250 ppm de disulfure de carbone. Chaque courbe indique la différence d'amplitudes de PDA obtenue pour chaque paire de fréquences mesurées. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM. *** $p < 0,001$, significativement différente de la moyenne des témoins avec le test de Bonferroni.

5.4.2.2 Comparaison entre les différentes conditions expérimentales

La variation de la fonction auditive a été analysée pour tous les groupes en comparant la perte auditive générale, c'est-à-dire la somme de la perte auditive à toutes les fréquences mesurées.

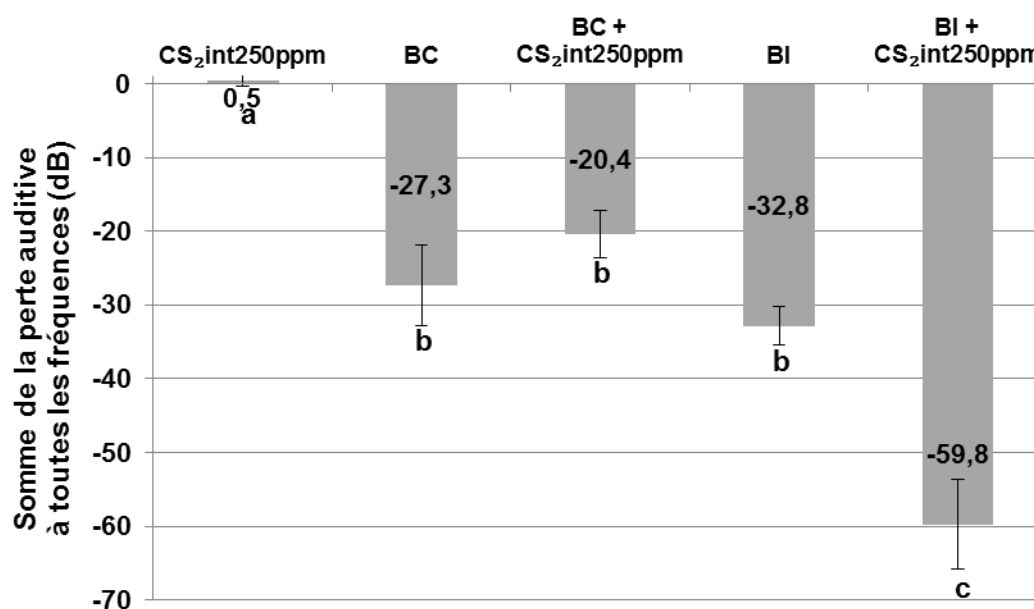


Figure R50. Histogramme avec la somme des pertes auditives à toutes les fréquences pour les différentes conditions expérimentales. Perte auditive = $[(PDA2-PDA1)_{\text{exposés}} - (PDA2-PDA1)_{\text{témoins}}]$. CS₂: 250 ppm de disulfure de carbone, 15 min par heure, 6h par jour pendant 5 jours, BC : bruit continu avec un L_{EX,8h} de 89 dB SPL, BI : bruit impulsionnel avec un L_{EX,8h} de 84 dB SPL. Axe Y: somme de la variation des amplitudes des PDA à 3,6, 4,8, 6, 9,6, 17,5 et 25,4 kHz mesurés avec une intensité de primaires de 60 dB. Les différences statistiques obtenues par le test de Bonferroni sont représentées par des lettres. Les groupes avec la même lettre ne sont pas significativement différents.

L'analyse indique qu'il n'y a pas de différence significative entre la perte auditive provoquée par le bruit continu ($-27,3 \pm 5,5$ dB) et celle produite par le bruit impulsionnel ($32,8 \pm 2,6$ dB) [$F(1,15) = 0,84$; $p = 0,3751$] (Fig. R50). Bien que le L_{EX,8h} soit plus faible pour le bruit impulsionnel que pour le bruit continu, ce résultat était attendu puisque l'intensité des deux bruits avait été préalablement choisie pour induire une perte auditive similaire dans les deux groupes exposés au bruit seul.

L'exposition au CS₂ seul n'a provoqué aucune variation significative dans les amplitudes des PDA ($0,5 \pm 0,8$ dB), ce qui suggère qu'il ne provoque pas de toxicité au niveau cochléaire (Fig. R50). Par conséquent, une différence significative a été trouvée entre le groupe exposé au CS₂ seul et les autres groupes exposés au bruit seul ou en co-exposition [$F(1,39) = 25,87$; $p < 0,0001$].

L'analyse *post-hoc* indique une différence significative entre les amplitudes de PDA obtenus avec la co-exposition au bruit impulsionnel plus 250 ppm de CS₂ et les autres groupes (Fig. R50). La combinaison de l'exposition au CS₂ et au bruit impulsionnel a augmenté significativement les différences d'amplitude de PDA ($-59,8 \pm 6,1$ dB) par rapport à l'exposition au bruit impulsionnel [$F(1,15) = 16,57$; $p = 0,0011$]. Pour finir, bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre le bruit continu et le bruit continu plus CS₂ [$F(1,15) = 1,2$; $p = 0,2928$], les données de la Figure R50 indiquent une diminution de la perte auditive quand le solvant est ajouté. D'une façon logique, en présence de bruit, c'est entre les deux groupes d'animaux co-exposés que l'on trouve la plus grande différence statistiquement significative [$F(1,15) = 32,7$; $p = 0,0001$].

5.4.3 Analyses histologiques

5.4.3.1 Microscopie électronique à balayage : état des stéréocils de la cochlée

A la fin des 5 jours d'exposition, les **caractéristiques ultra-structurales de l'organe de Corti** ont été examinées en **microscopie électronique à balayage**.

Ces observations histologiques de l'épithélium sensoriel ont confirmé que les spécimens témoins de cette étude (n = 9) avaient les mêmes caractéristiques morphologiques que les rats adultes normaux décrits dans la littérature (Robles and Ruggero, 2001). Parmi ces caractéristiques, on peut noter : des faisceaux ciliaires intacts émergeant de la plaque cuticulaire à la surface apicale des cellules ciliées, d'abondantes microvillosités à la superficie apicale des cellules de soutien et pas de perte significative de cellules ciliées (Fig. R51).

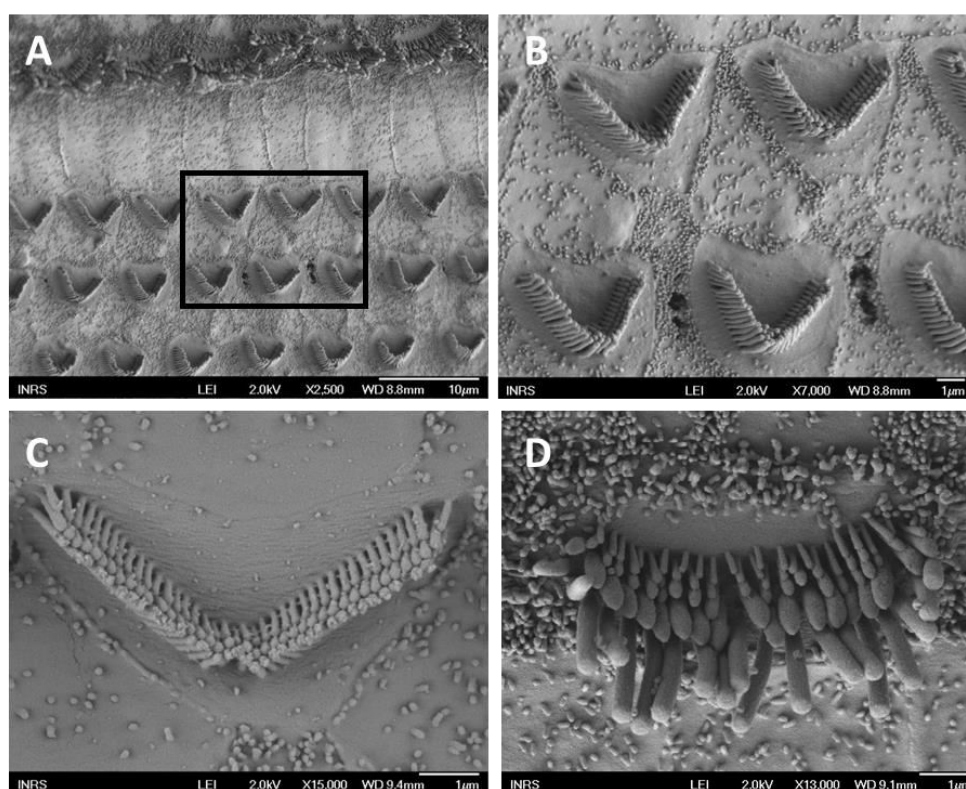


Figure R51. Microscopie électronique à balayage de l'organe de Corti d'animaux témoins observés à la fin de la période d'exposition. (A) Vue générale de l'organisation des cellules ciliées et leurs stéréocils (x2500). (B) Zoom des faisceaux ciliaires intacts et des microvillosités des cellules de soutien de la première et la deuxième rangée de cellules ciliées externes observées à environ 9 kHz (x7000). (C) Cellule ciliée externe (x15000). (D) Cellule ciliée interne (x13000).

L'exposition au bruit et/ou certains solvants (n = 3/groupe) peut provoquer des dommages mécaniques sur les **stéréocils**, et notamment les bruits impulsionnels (Zhao et al., 1996; Husbands et al., 1999), dont les dégâts sont visibles immédiatement après l'exposition et qui peuvent être réversibles, ou non, en fonction de l'importance des dommages (Wang et al., 2002). Une exposition au bruit et/ou aux solvants conduit également à la **perte de cellules ciliées** causée par la mort cellulaire.

L'exposition au **bruit continu**, que ce soit seul ou avec le solvant, n'a causé aucun dommage au niveau des stéréocils ni aucune perte évidente de cellules ciliées (Fig. R52). Ces échantillons étaient comparables aux échantillons témoins.

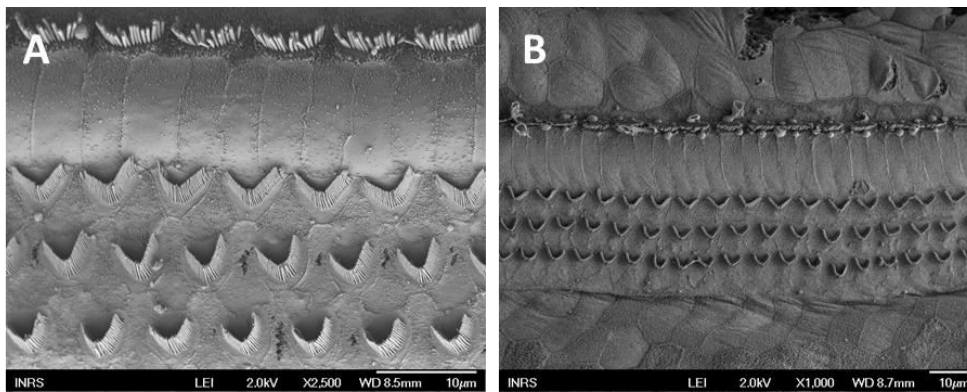


Figura R52. Microscopie électronique à balayage des organes de Corti d'animaux exposés avec ou sans disulfure de carbone observés à la fin de la période d'exposition. (A) Exposition au bruit continu seul : vue de l'organisation des cellules ciliées et de leurs stéréocils observés à environ 11 kHz (x2500). (B) Exposition au bruit continu + disulfure de carbone : vue de l'organisation des cellules ciliées et de leurs stéréocils observés à environ 10 kHz (x1000).

Par contre, chez les rats exposés au **bruit impulsionnel**, des stéréocils cassés ont été observés, voire même arrachés au niveau de la plaque cuticulaire de la troisième rangée de CCE (Fig. R53A-B). Les stéréocils malmenés se trouvent dans les régions qui correspondent aux fréquences les plus endommagées, dans la zone qui discrimine approximativement les fréquences de 4 à 20 kHz. Malgré tout, aucune perte de cellules ciliées n'a été observée. La récupération était donc trop courte pour que les cellules endommagées soient phagocytées. Des observations similaires ont eu lieu dans le groupe exposé au **bruit impulsionnel plus CS₂**, sur les stéréocils de la troisième rangée de CCE (Fig. R53C-D).

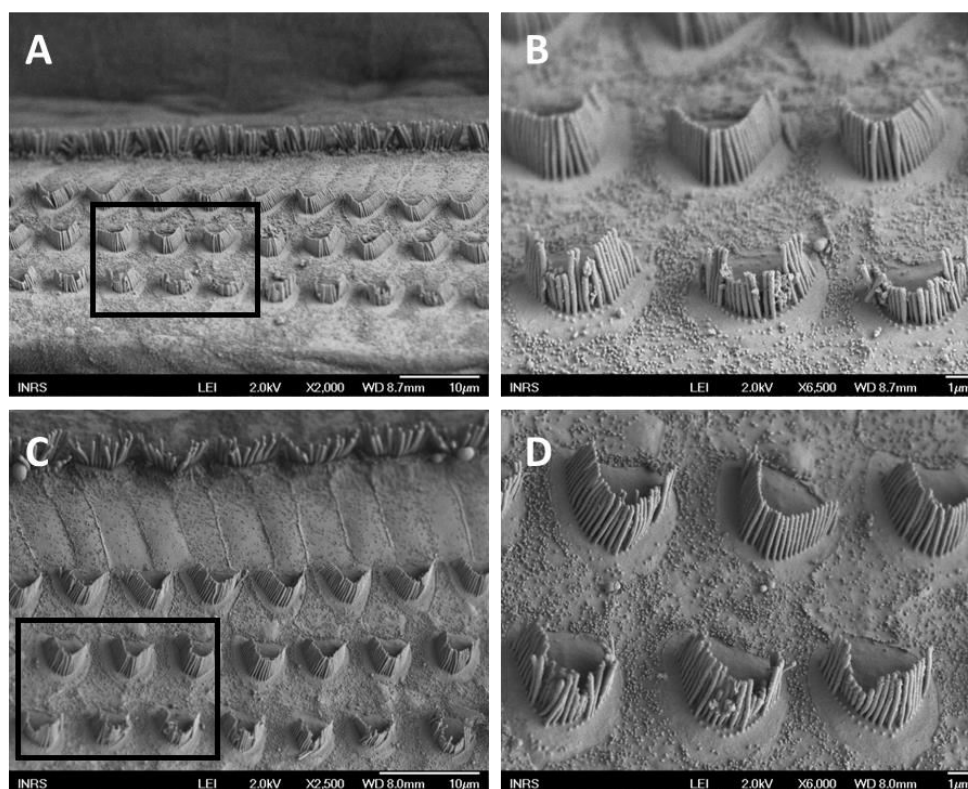


Figure R53. Microscopie électronique à balayage de l'organe de Corti d'animaux exposés au bruit impulsionnel avec ou sans disulfure de carbone à la fin de la période d'exposition. (A et B) Exposition au bruit impulsionnel seul : (A) Vue générale de l'organisation des cellules ciliées et leurs stéréocils (x2000) et (B) zoom des faisceaux de stéréocils endommagés à la troisième rangée de cellules ciliées externes observés à environ 8 kHz (x6000). (C et D) Exposition au bruit impulsionnel et au disulfure de carbone : (C) Vue générale des cellules ciliées et de leurs stéréocils (x2500) et (D) zoom des faisceaux de cils endommagés de la troisième rangée de cellules ciliées externes observés à environ 9 kHz (x6500).

5.4.3.2 Cochléogramme

Après une période de récupération de 10 semaines, un **comptage de cellules ciliées en microscopie optique** a été effectué afin d'exprimer le pourcentage de perte cellulaire.

Dans le groupe **témoin** (n = 10), la perte moyenne de CCI et CCE de la première rangée ne dépasse jamais 1%, et les pertes de cellules pour les deuxième et troisième rangées se situent entre 1 et 3% (Tableau R3).

Groupe	% CCI	% CCE1	% CCE2	% CCE3
BC	0,31	0,97	1,13	3,39
BC + CS ₂	0,80	0,73	1,22	2,58
BI	0,61	0,70	1,52	3,23
BI + CS ₂	0,47	1,71	2,76	9,16
CS ₂ 250 int	0,31	0,97	1,13	3,39
Témoins	0,32	0,89	1,05	2,75

Tableau R3. Pourcentage de perte cellulaire dans chacune des rangées de cellules de l'organe de Corti et pour chaque groupe exposé et le groupe témoin. CS₂ : 250 ppm de disulfure de carbone (15 min/h), BC : bruit continu, BI : bruit impulsionnel. CCI : cellules ciliées internes, CCE1 : première rangée de cellules ciliées externes, CCE2 : deuxième rangée de cellules ciliées externes, CCE3 : troisième rangée de cellules ciliées externes.

Le cochléogramme obtenu avec la moyenne de 5 rats témoins est représenté par la Figure R54, où l'on peut remarquer la présence de presque toutes les cellules ciliées. Comme évoqué précédemment, l'absence de certaines CCE à la base de la cochlée est normale.

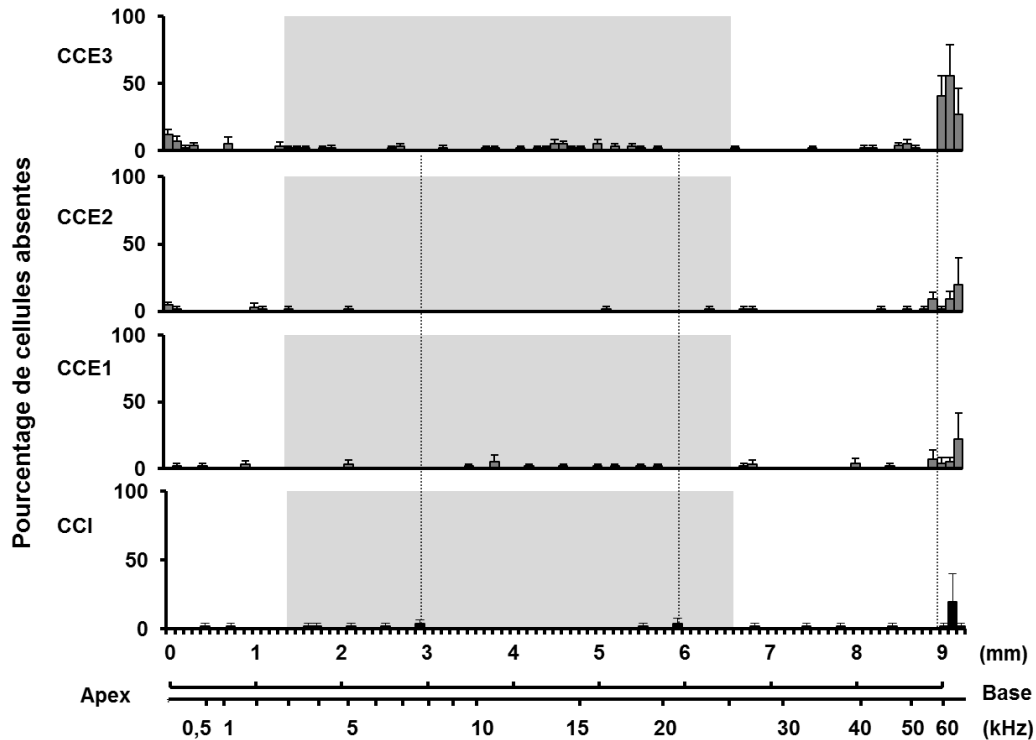


Figure R54. Moyenne des cochléogrammes ($n = 5$) de rats témoins 10 semaines après la fin de l'exposition. Axe X : la ligne supérieure représente la distance (mm) le long de la spirale de l'organe de Corti, la ligne inférieure représente la carte en fréquences. Axe Y : pourcentage de perte de cellules ciliées. CCI : cellules ciliées internes, CCE1 : première rangée de cellules ciliées externes, CCE2 : deuxième rangée de cellules ciliées externes, CCE3 : troisième rangée de cellules ciliées externes. La zone grisée indique la zone de fréquences mesurées par les produits de distorsion acoustique. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM.

Comme mentionné plus haut, l'exposition au bruit et/ou à certains solvants produit différents dommages sur les cellules ciliées qui peuvent conduire à la mort et, par conséquent, à la **perte de ces cellules**.

Le cochléogramme obtenu avec la moyenne de 5 rats exposés au CS₂ seul (Fig. R55) est similaire à celui obtenu pour les rats témoins (Fig. R54). On ne trouve pas de différence significative dans la perte de CCI ni de CCE entre les groupes témoins et le groupe exposé au solvant. Le pourcentage de perte de chacune des rangées est très similaire à celui obtenu pour les témoins (Tableau R3).

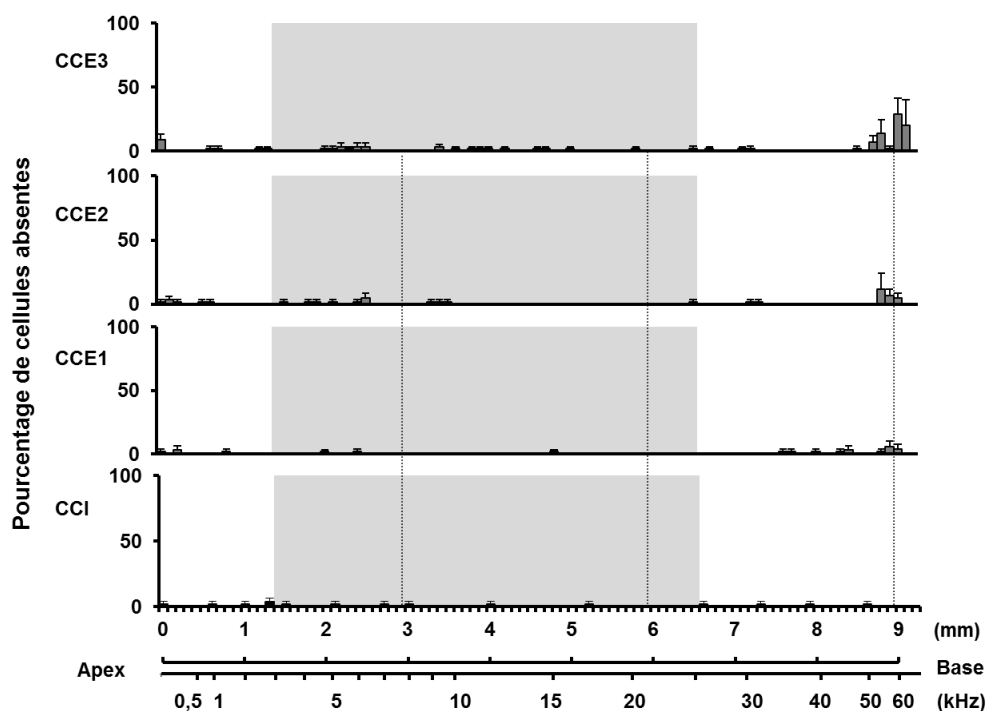


Figure R55. Moyenne des cochléogrammes ($n = 5$) de rats exposés au disulfure de carbone, 10 semaines après la période d'exposition. Axe X : la ligne supérieure représente la distance (mm) le long de la spirale de l'organe de Corti, la ligne inférieure représente la carte en fréquences. Axe Y : pourcentage de perte de cellules ciliées. CCI : cellules ciliées internes, CCE1 : première rangée de cellules ciliées externes, CCE2 : deuxième rangée de cellules ciliées externes, CCE3 : troisième rangée de cellules ciliées externes. La zone grise indique la zone de fréquences mesurées par les produits de distorsion acoustique. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM.

L'exposition au **bruit continu, seul** (Fig. R56) ou avec le **CS₂** (Fig. R57), a donné des résultats de cochléogrammes similaires à ceux du groupe témoin. Pour les deux groupes, on a également trouvé une perte moyenne inférieure à 1% pour les CCI et les CCE de la première rangée, et une perte entre 1 et 3,4% pour la deuxième et la troisième rangée de CCE (Tableau R3). Bien que la perte auditive induite par le bruit continu, avec ou sans CS₂, soit significative, on n'observe aucune perte cellulaire sur les cochléogrammes après la période de récupération. Il n'y a pas de différence significative sur aucune des 4 rangées de cellules ciliées entre les groupes témoins et les groupes exposés au bruit continu, avec ou sans solvant.

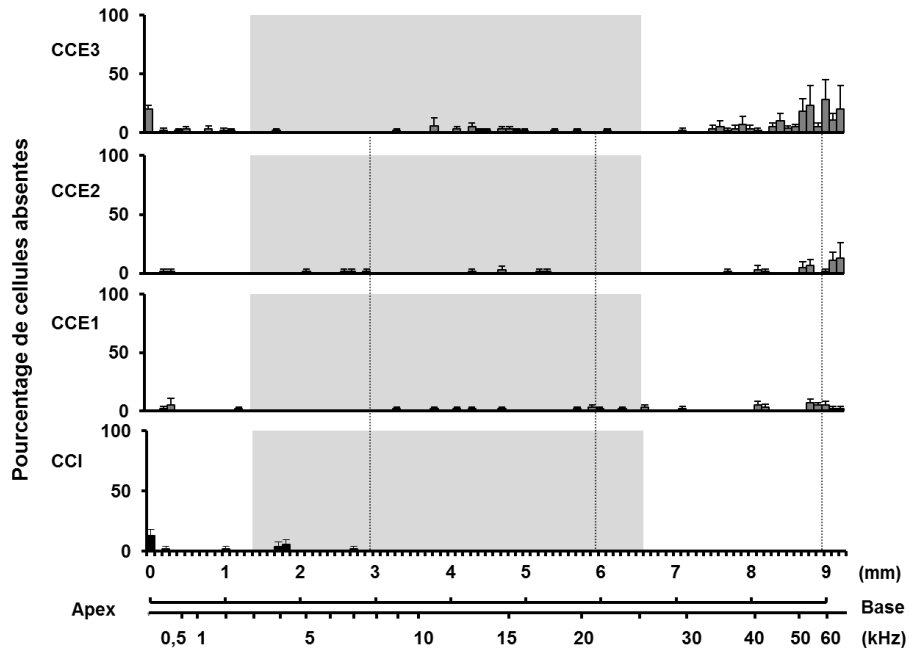


Figure R56. Moyenne des cochléogrammes ($n = 5$) de rats exposés au bruit continu 10 semaines après la période d'exposition. Axe X : la ligne supérieure représente la distance (mm) le long de la spirale de l'organe de Corti, la ligne inférieure représente la carte en fréquences. Axe Y : pourcentage de perte de cellules ciliées. CCI : cellules ciliées internes, CCE1 : première rangée de cellules ciliées externes, CCE2 : deuxième rangée de cellules ciliées externes, CCE3 : troisième rangée de cellules ciliées externes. La zone grise indique la zone de fréquences mesurées par les produits de distorsion acoustique. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM.

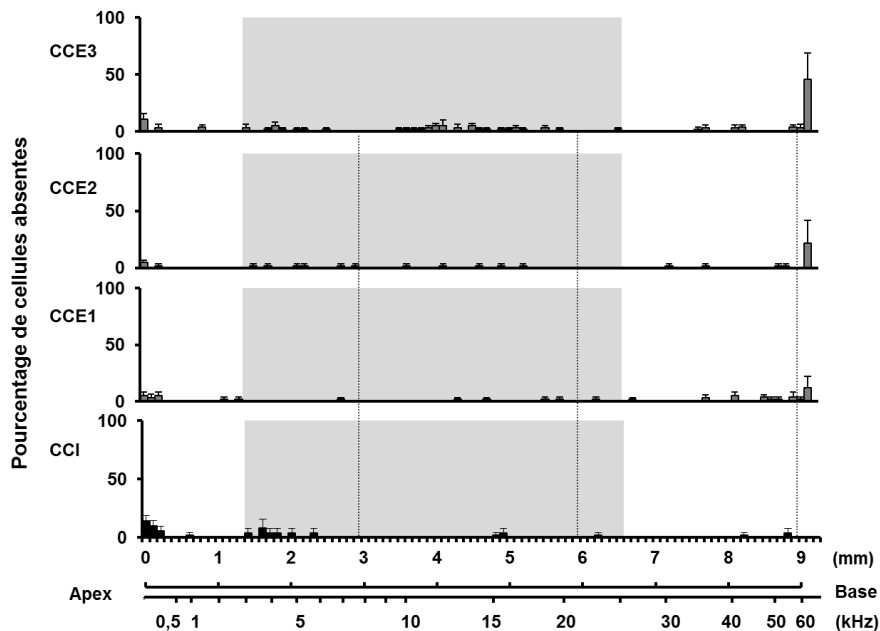


Figure R57. Moyenne des cochléogrammes ($n = 5$) de rats co-exposés au bruit continu et au disulfure de carbone, 10 semaines après la période d'exposition. Axe X : la ligne supérieure représente la distance (mm) le long de la spirale de l'organe de Corti, la ligne inférieure représente la carte en fréquences. Axe Y : pourcentage de perte de cellules ciliées. CCI : cellules ciliées internes, CCE1 : première rangée de cellules ciliées externes, CCE2 : deuxième rangée de cellules ciliées externes, CCE3 : troisième rangée de cellules ciliées externes. La zone grise indique la zone de fréquences mesurées par les produits de distorsion acoustique. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM.

De la même façon, le **bruit impulsionnel** a donné des pourcentages de perte cellulaire similaires à ceux obtenus avec l'exposition au bruit continu, et, par conséquent, similaires au groupe témoins (Tableau R3). On ne trouve donc pas de différence significative dans la perte cellulaire de l'organe de Corti entre les animaux témoins et les animaux exposés au bruit impulsionnel. De même que pour le bruit continu, le bruit impulsionnel n'altère pas de manière visible le cochléogramme, bien que les deux groupes présentent une perte auditive significative, mesurée par les PDA (Fig. R58). La période de récupération était donc trop courte pour que les cellules de Deiters aient le temps de phagocytter les CCE dont les stéréocils ont été endommagés.

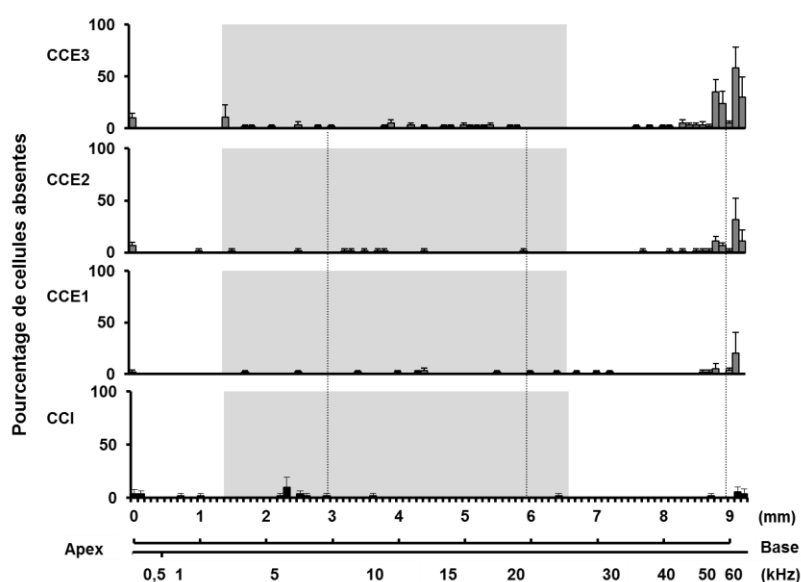


Figure R58. Moyenne des cochléogrammes ($n = 5$) de rats exposés au bruit impulsionnel avec un $L_{EX,8h}$ de 84 dB SPL 6h/jour pendant 5 jours consécutifs, 10 semaines après la période d'exposition. Axe X : la ligne supérieure représente la distance (mm) le long de la spirale de l'organe de Corti, la ligne inférieure représente la carte en fréquences. Axe Y : pourcentage de perte de cellules ciliées. CCI : cellules ciliées internes, CCE1: première rangée de cellules ciliées externes, CCE2 : deuxième rangée de cellules ciliées externes, CCE3 : troisième rangée de cellules ciliées externes. La zone grise indique la zone de fréquences mesurées par les produits de distorsion acoustique. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM.

En revanche, la combinaison de **CS₂ avec le bruit impulsionnel** a provoqué une perte de CCE statistiquement significative au niveau de la troisième rangée [$F(1,9) = 26,71$; $p < 0,001$] et de la deuxième rangée [$F(1,9) = 22,39$; $p = 0,0015$] entre le groupe exposé ($n = 5$) et son propre groupe témoin ($n = 5$) (Tableau R3). Cependant, l'augmentation de la perte cellulaire commence à se voir à la première rangée de CCE, même si ce changement n'est pas significatif. Comme illustré sur la Figure R60, une grande proportion (28 %) de la perte de CCE de la troisième rangée est située dans la région correspondante aux fréquences entre 8 et 13 kHz.

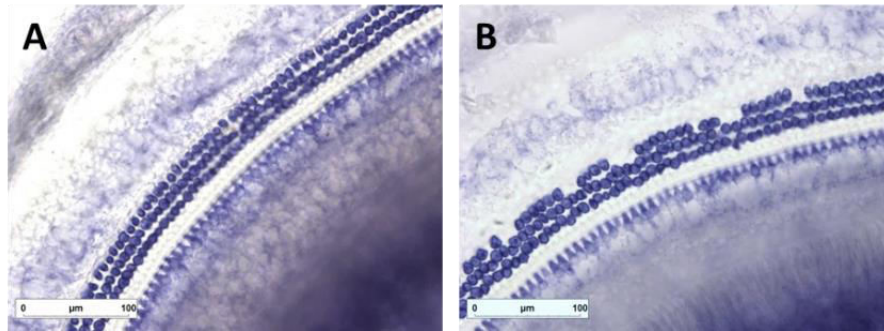


Figure R59. Image en microscopie optique de l'organe de Corti avec les cellules ciliées marquées à la succinate déshydrogénase où l'on peut apprécier les trois rangées de cellules ciliées externes et la rangée de cellules ciliées internes. (A) Rat témoin. (B) Rat exposé au bruit impulsionnel plus 250 ppm de disulfure de carbone pendant 15 min/h, 6 h/jour pendant 5 jours consécutifs.

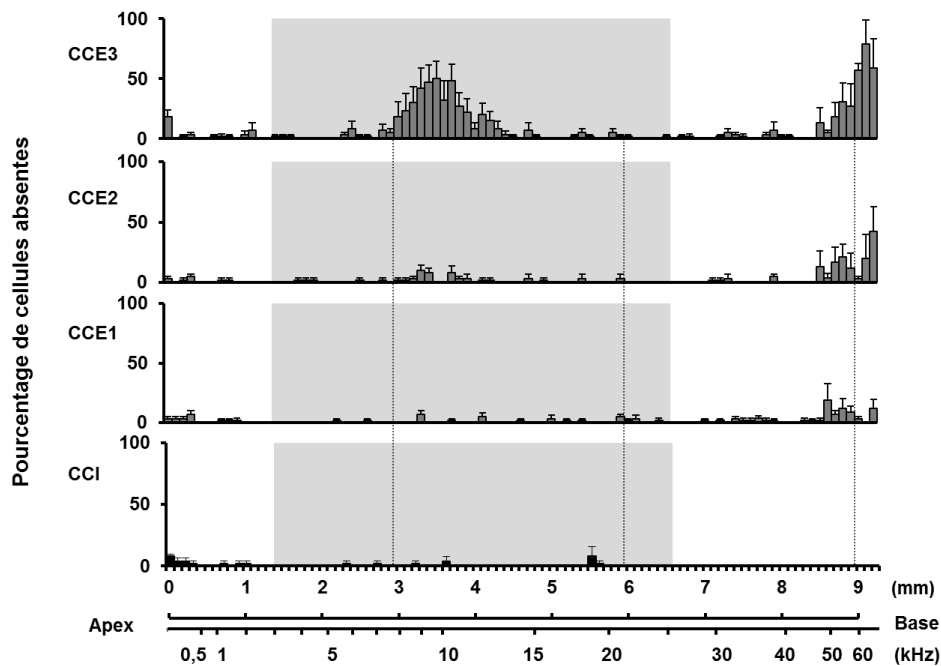


Figure R60. Moyenne des cochléogrammes ($n = 5$) de rats co-exposés au bruit impulsionnel et au disulfure de carbone 10 semaines après la période d'exposition. Axe X : la ligne supérieure représente la distance (mm) le long de la spirale de l'organe de Corti, la ligne inférieure représente la carte en fréquences. Axe Y : pourcentage de perte de cellules ciliées. CCI : cellules ciliées internes, CCE1: première rangée de cellules ciliées externes, CCE2 : deuxième rangée de cellules ciliées externes, CCE3 : troisième rangée de cellules ciliées externes. La zone grise indique la zone de fréquences mesurées par les produits de distorsion acoustique. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM.

6 . DISCUSSION

6.1 Effet de la co-exposition au bruit riche en basses fréquences et au CS₂

Les résultats de ces études ont montré que le bruit BF [0,5-2 kHz] génère des pertes dans une gamme de fréquences s'étendant de 3,6 à 6 kHz. Selon la littérature, un bruit de moyenne fréquence génère une perte auditive localisée jusqu'à une demi-octave au-dessus de la fréquence centrale du spectre du bruit d'exposition (Campo et al., 2011; McFadden, 1986). La perte obtenue avec le bruit riche en basses fréquences s'est située à plus d'une octave au-dessus du spectre généré, ce qui élargit la gamme de fréquences endommagées. Après une période de récupération, l'amplitude de la perte était approximativement de 5 dB. Ainsi, une récupération partielle des performances du récepteur périphérique s'est opérée durant la phase silencieuse qui a suivi la période d'exposition sonore. De manière surprenante, cette perte d'audition n'était pas associée à des dommages histologiques visibles. A la fin de la période d'exposition, aucun signe d'excitotoxicité ni de pertes de cellules ciliées n'ont été observés. Les stéréocils avaient un aspect normal et aucune altération des neurofilaments au niveau des terminaisons afférentes associées aux cellules ciliées internes n'a été observée. Enfin, la densité des corps cellulaires dans le ganglion spiral et leurs caractéristiques morphologiques étaient comparables à ceux des rats témoins.

Rappelons que les produits de distorsion acoustique (PDA) reflètent l'activité motrice des CCE (Avan et al., 2001). Différentes hypothèses pourraient expliquer les effets mesurés avec les PDA alors qu'aucune altération histologique n'a pu être observée. On peut supposer d'abord qu'un découplage mécanique des stéréocils avec la membrane tectoriale (Zwislocki, 1984) se serait opéré suite à l'exposition au bruit de BF ou qu'une modification de la raideur des stéréocils au niveau du plateau cuticulaire ait pu affecter le processus de transduction mécanosensorielle au niveau des CCE (Liberman and Dodds, 1987). Par ailleurs, on peut supposer qu'un traumatisme de la boucle de contrôle efférent ait pu être à l'origine d'une réorganisation synaptique sous les cellules ciliées de l'organe de Corti (Liberman and Kujawa, 2017). En s'appuyant sur ces deux hypothèses, on peut expliquer pourquoi le nombre de noyaux cellulaires et de fibres sont restés intacts alors que l'on a mesuré une perte auditive de 5 dB. On ne peut également écarter la possibilité d'une lésion anatomique subtile qui n'ait pas été détectée avec les outils utilisés dans cette étude.

Les résultats issus de la co-exposition ont montré que le solvant a élargi la gamme de fréquences impactées par le bruit jusqu'à 9,6 kHz. Ce phénomène mesuré était temporaire puisqu'au terme des 4 semaines de récupération, les pertes mesurées après la co-exposition étaient similaires à celles mesurées avec le bruit seul ; la gamme de fréquences endommagées n'allait pas au-delà de 6 kHz. Des pertes temporaires de l'audition, mesurées à l'aide de potentiels évoqués auditifs, après exposition à du CS₂ avaient été décrites dans la littérature chez l'Homme et chez le rat (Hirata et al., 1992a, 1992b). Puisque le CS₂ ne s'est pas révélé cochléotoxique (rappelons qu'aucun changement morphologique a été observée dans la cochlée), il est donc raisonnable de supposer que la perte auditive mesurée serait d'origine rétrocochléaire (Hodgkinson and Prasher, 2006; Vyskocil et al., 2012). L'élargissement de la gamme de fréquences jusqu'à 9,6 kHz pourrait être le résultat d'une action centrale du CS₂, qui agirait sur les voies efférentes contrôlant les cellules ciliées.

Par ailleurs, les résultats de cette étude ont également montré qu'une co-exposition bruit plus CS₂ engendre des pertes auditives entre 3,6 et 6 kHz, pertes dont les amplitudes étaient plus faibles que celles mesurées suite à une exposition au bruit seul. Ce phénomène était temporaire et avait déjà été décrit dans la littérature pour d'autres solvants, comme le styrène inhalé lorsque les concentrations sont modérées (Campo et al., 2014). Le CS₂ aurait probablement une action pharmacologique qui, à l'instar du styrène, diminuerait le seuil de déclenchement du ROM. Cet effet possible sera abordé un peu plus loin dans la discussion.

La toxicité du CS₂ seul, ou associé à un bruit riche en basses fréquences, sur le système vestibulaire a été évaluée en mesurant le nystagmus post-rotatoire (NPR). L'évaluation physiologique du réflexe vestibulaire tient un rôle important dans l'étude de la toxicité sensorielle. Les données physiologiques issues des études réalisées chez l'animal peuvent souvent être comparées aux données humaines obtenues avec la même méthode analytique, en établissant des liens entre les déficits des systèmes sensoriels humains et les observations histologiques et moléculaires, qui, de façon logique, peuvent se retrouver chez l'animal. Dans le cas du système vestibulaire, la comparaison entre l'animal et l'être humain est facilitée par leur conservation au cours de l'évolution (Day and Fitzpatrick, 2005). Cependant, comme l'explique Llorens et al. (2018) dans leurs travaux, l'étude du système vestibulaire en lui-même présente certaines difficultés, ce qui rend son évaluation fonctionnelle difficile.

L'analyse du RVO (Réflexe Vestibulo-Oculaire) montre qu'une concentration de 250 ppm de CS₂ peut affecter l'équilibre en diminuant la durée et le nombre de saccades. Quand la rotation de l'animal s'arrête, subsiste l'effet de la rotation de l'endolymphe sur la cupule pendant quelques instants. Si la durée du nystagmus est inférieure à celle mesurée avant exposition et si le nombre de saccades diminue après exposition, ceci signifie que le seuil de stimulation des cellules ciliées des crêtes est augmenté. Ces effets observés au niveau du NPR sont temporaires car, 4 semaines après la fin de l'exposition, les valeurs de durée et du nombre de saccades ne présentent plus de différences significatives par rapport aux valeurs initiales. On trouve des mécanismes de compensation centraux efficaces qui permettent aux neurones des noyaux vestibulaires de retrouver des valeurs basales (Darlington et al., 2002; Straka et al., 2005).

Comme reporté dans de précédentes études, le RVO se trouve affecté par différents types de solvants ou médicaments, ce qui confirme que le système vestibulaire et les autres structures impliquées dans ce réflexe sont des cibles potentielles pour ces composés (Morrow et al., 2007; Weerts et al., 2012). En général, les hydrocarbures halogénés saturés ont un effet dépresseur sur le RVO, tandis que les composés insaturés ou les composés benzéniques provoquent une excitation (Odkvist et al., 1985). Par exemple, on peut citer les études sur le styrène, le toluène, le trichloréthylène et le trichloéthane chez le rat (Larsby et al., 1986; Niklasson et al., 1993; Tham et al., 1982), et les travaux exposant des rats aux métaux comme le plomb et l'aluminium (Mameli et al., 2001, 2006), ou à différents médicaments comme la phénytoïne ou le cisplatine (Mameli et al., 1986; Takimoto et al., 2016).

De plus, l'effet temporaire mesuré par le NPR et induit par le CS₂ est exacerbé en présence de bruit BF. Des études physiologiques chez l'Homme et chez l'animal ont montré que les bruits BF ont la capacité de stimuler le système vestibulaire (Cazals et al., 1982; Halmagyi, 2005). Ainsi, l'exposition au bruit ne produit pas uniquement des pertes auditives, mais perturbe également le système vestibulaire périphérique. La proximité anatomique du labyrinthe vestibulaire avec le système auditif, l'analogie entre les cellules ciliées des deux systèmes, l'artère commune et la présence des mêmes liquides intralabyrinthiques soutiennent l'hypothèse qu'un dommage vestibulaire puisse être associé à une perte auditive après exposition au bruit.

Comme dans la cochlée, la vulnérabilité du vestibule à l'exposition sonore dépend de différents facteurs comme le temps, l'intensité, la durée, la fréquence d'exposition mais également l'état physiologique de l'oreille interne (Perez et al., 2002; Tamura et al., 2012). Il

a été montré que l'épithélium le plus exposé au bruit est le saccule (Cassandro et al., 2003; Cazals et al., 1983; McCabe and Lawrence, 1958), surtout lorsque les bruits sont riches en basses fréquences (Jones et al., 2010; Stewart et al., 2017). Néanmoins, certains travaux récents ont montré que les cinq organes vestibulaires peuvent être affectés par les bruits de basses fréquences mais à des degrés différents (Stewart et al., 2016; Zhu et al., 2014, 2011).

Il est connu que le bruit continu est capable d'induire un dommage métabolique suite à la génération d'espèces réactives à l'oxygène, en lien avec le mécanisme ischémique. Par exemple, une diminution du nombre de cellules ciliées vestibulaires a été observée chez les souris exposées à un bruit riche en basses fréquences, provoquant une altération de l'équilibre (Tamura et al., 2012).

Cependant, dans notre cas, on n'observe pas de modification morphologique au niveau périphérique. Sachant que le bruit n'impacte pas directement le SNC, les modifications du NPR obtenus chez nos rats ne peuvent s'expliquer que par une action réversible sur la cochlée et le vestibule. Par exemple, on peut penser que le bruit provoque des changements sur le volume de l'endolymphe et affecte par là-même le système vestibulaire de manière transitoire. En effet, il a été démontré que les bruits de basses fréquences causent une augmentation transitoire du volume du liquide endolymphatique (Flock and Flock, 2000; Salt 2004). Ce volume revient rapidement à sa valeur initiale grâce aux mécanismes homéostatiques (Salt 2004). Cependant, le mécanisme sous-jacent à ce changement de volume n'est pas encore bien établi (Salt and Hullar, 2010).

Les résultats issus des tests comportementaux (tests de suspension par la queue et de redressement), réalisés lors de la co-exposition CS₂ et bruit BF, ne montrent pas de changement significatif. Les animaux avec des déficits vestibulaires évidents, surtout au niveau périphérique, présentent des anomalies des réflexes vestibulaires. Aussi bien le *air-righting reflex* que le test *tail-lift reflex* (Llorens et al., 1993b, Ossenkopp et al., 1990), dépendent de la fonctionnalité du système vestibulaire. Au contraire, des changements significatifs en fin d'exposition ont été observés à l'aide du test Locotronic® évaluant les erreurs de marche avec les animaux co-exposés. Les différences mesurées entre les divers tests pourraient s'expliquer par le fait que la marche dépend aussi bien du système vestibulaire que du système locomoteur. En effet, les données de la littérature montrent que les tests évaluant la fonction motrice sont sensibles, mais pas spécifiques, aux dommages du système vestibulaire (Boadas-Vaello et al., 2005, 2017).

Les données issues de cette étude ne nous permettent pas de déterminer avec certitude les mécanismes à l'origine des perturbations du NPR. L'absence de modifications au niveau des tests de comportement (tests de suspension et de redressement) chez les animaux co-exposés comme l'absence de modification histologique au niveau des récepteurs sensoriels périphériques, suggèrent que seules des perturbations au niveau central s'opèrent. Nous avons fait le même constat au cours de cette étude pour les données relatives au système auditif. D'ailleurs, la littérature étudiant chez l'Homme l'impact de solvants sur le système vestibulaire tire les mêmes conclusions (Kowalska et al., 2000; Sulkowski, 1992).

Les analyses effectuées au niveau du cervelet des animaux co-exposés à 250 ppm de CS₂ et au bruit montrent une surexpression modérée de 2 gènes, le *Cideb* et le *Trpm1*, et une tendance à la diminution du *Cdkn1a*, sur un total de 86 gènes de neurotoxicité explorés.

Or, le *Trmp1* est un gène qui code pour un canal cationique perméable au calcium. Les canaux TRPM jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie ionique car ils contrôlent le flux du Ca²⁺, et déterminent le potentiel membranaire de la cellule. Le TRMP1 est un canal qui s'active spontanément, diminue la sortie du Ca²⁺ intracellulaire et augmente son entrée (Fleig and Penner, 2004, Kraft and Harteneck, 2005), ce qui fait que, quand ce canal est surexprimé, il y a une augmentation considérable du calcium intracellulaire et par conséquent une augmentation du seuil d'excitation. Son expression est sur-représentée dans le cerveau, aussi bien chez l'Homme que chez la souris (Fonfria et al., 2006; Jang et al., 2012).

Quant à la famille de gènes *Cideb*, elle code des protéines qui ont la capacité d'activer l'apoptose chez les mammifères. La protéine CIDEB joue un rôle important dans le métabolisme énergétique et le maintien de l'homéostasie lipidique ; le tissu présentant le niveau d'expression du gène *Cideb* le plus élevé est le foie (Xu et al., 2012; Yonezawa et al., 2010). Le gène *Cideb* est exprimé également lors du processus d'apoptose neuronale qui se produit lors d'un dommage sur un nerf (Wang et al., 2006).

La surexpression de ces deux gènes de neurotoxicité pourrait évoquer au niveau cérébelleux les prémices d'une souffrance neuronale mais cette hypothèse reste à démontrer. En effet, les effets mesurés sont mineurs et représentent un très faible pourcentage si l'on considère que 86 gènes ont été analysés.

Les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure à la présence de signes majeurs de neurotoxicité après une co-exposition à 250 ppm de CS₂ pendant 4 semaines. Les données obtenues dans cette étude ne nous ont pas permis d'identifier la cible ni le mécanisme d'action du solvant neurotoxique sur le système vestibulaire.

On sait que les solvants peuvent provoquer des dysfonctionnements au niveau du SNC, en agissant notamment sur le cervelet (Lockitch, 1993; Odkvist et al., 1985). Le système neuronal appelé système de « stockage de la vitesse » ou plus communément « *velocity storage* » intervient dans le signal de NPR, ce qui explique que le mouvement des yeux persiste après l'arrêt de la stimulation des organes périphériques. Ce *velocity storage* et d'autres éléments du RVO peuvent être modifiés et contrôlés par des stimulations inhibitrices d'origine GABAergiques provenant du cervelet, via les cellules de Purkinje (Baumann et al., 2015; Highstein et al., 2005; Precht, 1979). La perturbation de la neurotransmission peut donc provoquer des changements importants au niveau de la fonction vestibulaire.

La diminution mesurée au niveau des paramètres du NPR pourrait s'expliquer par une modification neurochimique temporaire des voies centrales contrôlant le RVO comme l'ont suggéré Mameli et al., en 2006, après traitement d'animaux au chlorure d'aluminium.

Dans nos conditions expérimentales, on peut affirmer que le CS₂ n'est pas un agent ototoxique mais, en raison de son effet sur le SNC, il a la capacité d'altérer les systèmes auditif et vestibulaire. Ces résultats vont dans le même sens que les résultats obtenus par Clerici and Fechter, 1991, qui n'ont pas constaté d'effets sur le seuil acoustique des rats exposés pendant 12 semaines à 500 ppm de CS₂ seul. L'ensemble de nos résultats et ceux de la littérature suggèrent donc que la toxicité du CS₂ au niveau auditif se produit seulement quand il est co-exposé avec le bruit. Ainsi, le solvant CS₂ peut aggraver les effets temporaires du bruit sur le système auditif et peut altérer le système vestibulaire en diminuant les paramètres du NPR. Mais l'exposition au CS₂, réalisée au cours de cette étude, était une exposition subaiguë avec une concentration modérée. On en peut pas exclure la possibilité que les effets auraient pu être permanents si les expositions avaient été chroniques.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Morata, en 1989, qui a montré une perte auditive et des problèmes d'équilibre plus marqués chez les salariés lors de co-expositions professionnelles au solvant (environ 30 ppm) et au bruit (86-89 dBA) que lors d'exposition au bruit seul. Ceci renforce la nécessité de considérer les effets d'une co-exposition bruit plus agent chimique dans les études de toxicité sur l'oreille interne.

6.2 Effet du CS₂ en fonction de la concentration testée

Dans cette étude, nous avons étudié le métabolisme des animaux exposés au CS₂ dans les différentes conditions expérimentales.

Nous avons déterminé, après 4 semaines d'exposition, la concentration sanguine du CS₂ total (fractions libre et liée aux protéines). Comme attendu, les résultats de dosage du CS₂ sanguin montrent une corrélation entre les concentrations sanguines et les concentrations atmosphériques.

L'acide 2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-carboxylique (TTCA), principal métabolite urinaire est considéré comme un bon indicateur biologique d'exposition professionnelle au CS₂ (Campbell et al., 1985; Thienpont et al., 1990; Drexler et al., 1995). Les résultats du dosage du TTCA urinaire n'ont pas montré de relation linéaire entre la concentration de CS₂ atmosphérique et la concentration de TTCA urinaire. En effet, les concentrations urinaires ont augmenté de 115 % lorsque les concentrations de CS₂ variaient de 63 ppm à 250 ppm ($\times 4$) : l'augmentation de TTCA n'a été que de 12 % quand les concentrations atmosphériques variaient de 250 ppm à 500 ppm ($\times 2$).

Ces résultats suggèrent, conformément à la littérature, qu'une saturation des voies métaboliques se produit lorsque les concentrations de CS₂ sont élevées (Kivistö et al., 1995; Moorman et al., 1998).

Lors de co-expositions bruit et CS₂, les pertes auditives étaient plus faibles que celles mesurées avec le bruit seul. Cet effet était mesuré à toutes les concentrations de solvant utilisées, de 63 ppm à 500 ppm.

Un élargissement de la gamme des fréquences affectées, a également été mesuré en fonction des doses de CS₂. La co-exposition à 63 ppm de CS₂ a généré un déficit non significatif de 2 dB à 9,6 kHz, tandis qu'un déficit de 5 dB a été mesuré à la concentration de 250 ppm.

Ainsi, nos résultats montrent un traumatisme auditif dépendant de la dose, engendré par la co-exposition CS₂ et bruit, en accord avec les résultats de Chang et al., en 2003, qui ont étudiés les effets d'expositions professionnelles chez l'homme. Ces phénomènes sont temporaires.

Etant donné que nous n'avons pas observé de changement morphologique au niveau de la cochlée, même pour la concentration de 500 ppm, il est probable que ce dommage résulte d'une action centrale du CS₂ sur les voies efférentes contrôlant les cellules ciliées et le ROM.

Lors de cette dernière expérience, il a été également confirmé que le CS₂ affecte l'équilibre en diminuant le nombre, la durée et la pente d'amortissement des saccades du NPR. Ainsi, à partir d'une exposition de 63 ppm, le solvant est capable de perturber la fonction vestibulaire, mais il n'est pas suffisant pour provoquer des changements du comportement des animaux exposés ni des altérations morphologiques des récepteurs périphériques évidentes (Frantík, 1970; Moser et al., 1998, Opacka et al., 1984). Ces effets mesurés avec le NPR sont temporaires à 63 et 250 ppm. Ce résultat corrobore ceux obtenus précédemment, et qui mettent en avant une possible modification neurochimique des voies centrales du réflexe.

En ce qui concerne l'effet permanent constaté à la concentration de 500 ppm, nous pouvons supposer, que des premiers signes de lésions neuronales apparaissent lors d'une administration subaiguë de CS₂ à la concentration de 500 ppm comme décrit dans la littérature lors d'expositions chroniques (Graham et al., 1995). Malheureusement, ces analyses pathologiques n'ont pas pu être réalisées.

La co-exposition du bruit avec différentes doses de CS₂ perturbe le système auditif comme le système vestibulaire. Pour le système auditif, ces changements commencent à être significatifs à partir de 250 ppm, tandis que pour le système vestibulaire, il y a des modifications dès 63 ppm. Cette différence de concentration pourrait s'expliquer par la sensibilité des mesures fonctionnelles utilisées pour évaluer chacun des deux systèmes.

6.3 Exposition au CS₂ : continu vs. intermittent

Le CS₂ est rapidement absorbé par inhalation puis est distribué dans toutes les parties du corps et particulièrement dans les tissus riches en lipides comme le cerveau et le foie, du fait de sa grande liposolubilité. Quatre-vingt à 90 % du CS₂ est métabolisé au niveau hépatique, les métabolites du CS₂ étant excrétés dans l'urine.

Les résultats des dosages de la concentration de CS₂ sanguine et cérébrale ont montré qu'il existe une relation avec les concentrations atmosphériques. Les concentrations n'étaient pas significativement différentes entre les deux groupes exposés de manière intermittente, mais elles l'étaient entre le groupe exposé de manière continue et les deux autres groupes. Quinze minutes d'air frais étaient suffisants pour revenir aux valeurs sanguines de base de CS₂, puisqu'il n'y a pas de différence entre les animaux qui respirent 15 min d'air entre deux pics de solvant et ceux qui respirent 45 min d'air pur. Comme relaté dans la littérature, après arrêt de l'exposition au CS₂, 40% sont éliminés pendant les 6 premières minutes et l'élimination complète est effectuée entre 5-7 h (McKenna and DiStefano, 1977a).

La cinétique d'élimination rapide du CS₂ a été confirmée lors de l'expérimentation qui consistait à prélever le sang avant et après le pic de 15 min. Quarante-cinq minutes après une exposition de 15 min à 250 ppm de CS₂ a suffi pour que la concentration de solvant diminue de manière significative.

De plus, les résultats de dosage du CS₂ dans le sang et le cerveau ont montré une concentration-sanguine de CS₂ supérieure à celle mesurée dans le cerveau. Ceci s'explique par le fait que les prélèvements étaient effectués immédiatement à la fin de l'exposition et on sait que la concentration de CS₂ qui se lie aux tissus continue d'augmenter après la fin de l'exposition (McKenna and DiStefano, 1977a).

Si on compare l'exposition de 15 min/h à 250 ppm de CS₂ avec l'exposition continue à 63 ppm de CS₂ (lesquelles correspondent à une dose finale équivalente en CS₂), on constate qu'il n'y a pas de différence dans les concentrations de CS₂ sanguines ni dans les concentrations de TTCA urinaires. Par conséquent, le profil d'exposition n'influe pas sur le métabolisme et la charge de solvant des animaux exposés; le degré de rétention ne dépend donc pas de la concentration du toxique (McKenna and DiStefano, 1977a).

En ce qui concerne les effets de la co-exposition sur le système auditif, on constate que le CS₂, administré de manière intermittente, n'élargit pas la perte auditive vers les hautes fréquences, comme lors d'une administration continue à 250 ppm. Des expositions de 15 min par heure ou de 15 min toutes les 30 min ne sont donc pas suffisantes pour que le CS₂ provoque l'élargissement de la gamme de fréquences affectées.

A l'inverse, la perte auditive des animaux co-exposés en sortie d'exposition était inférieure à celle des animaux exposés au bruit seul, comme déjà mentionné. Néanmoins, cet effet était plus marqué quand les expositions au CS₂ étaient intermittentes, provoquant une différence statistiquement significative entre les animaux exposés au bruit seul et ceux co-exposés à 15 min/h de CS₂ à 4,8 et 6 kHz. Comme cela a déjà été montré, ce phénomène est temporaire et connu pour d'autres solvants comme le styrène administré à des concentrations modérées (Campo et al., 2014). Ainsi, cette différence significative trouvée dans le groupe exposé à la dose la plus faible de solvant renforce la théorie d'un effet neuropharmacologique du CS₂.

Après les 4 semaines de récupération, on ne trouve pas de différence significative entre les 4 groupes d'animaux exposés. Cependant, pour les deux groupes co-exposés de manière intermittente, il y a une récupération totale de la perte auditive à 6 kHz mesurée en sortie d'exposition, sans différence significative par rapport au groupe témoin. En effet, les deux groupes présentaient une perte inférieure à celle du groupe exposé au bruit seul et au groupe exposé de manière continue, ce qui fait que même si les 4 groupes ont eu une récupération similaire, les animaux co-exposés de manière intermittente rejoignent les valeurs des animaux témoins.

Aucun des groupes exposés n'a présenté de changement morphologique de la cochlée et du ganglion spiral, ni en sortie d'exposition ni à la fin de la récupération. Ces constats renforcent l'hypothèse d'un effet central du solvant.

Enfin, on trouve un net effet dose sur le système vestibulaire, comme évoqué précédemment. A partir d'une dose de 15 min de CS₂ toutes les 30 min, la fonction vestibulaire se trouve perturbée de manière significative. Ces effets mesurés au niveau du NPR sont temporaires puisque 4 semaines après la fin de l'exposition, ils disparaissaient. De même, on ne trouve aucun changement dans le comportement des animaux exposés et aucune altération morphologique des récepteurs périphériques.

Par ailleurs, cette expérience a cherché à déterminer si une exposition intermittente au CS₂ provoquait des effets plus importants au niveau des deux systèmes qu'une exposition continue

avec une dose finale équivalente. La perte auditive et les modifications des paramètres du NPR des rats co-exposés au bruit riche en basses fréquences + 250 ppm de CS₂ de manière intermittente (1 x 15 min/h) ont été comparés à ceux de rats co-exposés au bruit + 63 ppm de CS₂ de manière continue.

Dans les deux groupes, on a retrouvé des pertes auditives entre 3,6 et 6 kHz. Il n'y avait donc pas de différence significative aux fréquences mesurées, ni en sortie d'exposition ni après la période de récupération. Par conséquent, le mode d'exposition n'a pas influencé l'effet du solvant sur le système auditif, ce qui fait que la dose finale administrée est le principal facteur à prendre en compte.

En ce qui concerne le système vestibulaire, on a trouvé une légère différence significative entre les deux groupes puisque les animaux exposés de manière continue présentaient certains changements à la fin des 4 semaines d'exposition, tandis que le groupe intermittent ne présentait aucune modification. Dans ce cas, le mode d'exposition au solvant a eu une influence sur le système vestibulaire.

6.4 Effet du CS₂ sur le réflexe de l'oreille moyenne

Les premiers résultats de cette étude indiquent que les bruits impulsionnels sont plus préjudiciables pour l'audition que les bruits continus. Ces données confirment les résultats obtenus au laboratoire lors de précédentes études (Campo et al., 2014; Lataye and Campo, 1996; Venet et al., 2015) et par d'autres équipes (Henderson and Hamernik, 1986). Ces données démontrent que l'hypothèse stipulant qu'une même énergie acoustique engendre les mêmes dégâts cochléaire ne s'applique pas aux bruits impulsionnels. En effet, si l'on compare les effets cochléaires d'un bruit continu ($L_{EX,8h} = 89$ dB SPL) avec ceux d'un bruit impulsionnel ($L_{EX,8h} = 84$ dB SPL) ayant le même spectre (8 kHz BBO), ces derniers provoquent des effets plus préjudiciables sur la cochlée en dépit des 5 dB de différence entre les deux $L_{EX,8h}$.

Ces effets sont confirmés par les analyses histologiques. Les stéréocils de la troisième rangée de CCE des rats exposés au bruit impulsionnel sont endommagés contrairement à ceux des rats exposés au bruit continu. Des stéréocils cassés et arrachés ont été observés dans les organes de Corti d'animaux exposés au bruit impulsionnel, bien que le $L_{EX,8h}$ était modéré et la période d'exposition relativement courte. Ceci démontre donc, qu'au-delà de l'intensité, la structure temporelle du bruit peut affecter l'efficacité des mécanismes de protection naturels comme le ROM. Alors que l'impact d'un bruit continu peut être atténué par le ROM, celui d'un bruit impulsionnel ne l'est pas (Dunn et al, 1991; Lataye and Campo, 1996). De fait, l'énergie acoustique de ce type de bruit est dispersée dans la cochlée avant même que le ROM ne soit activé (Borg et al, 1984; Stevin, 1986). Par conséquent, le ROM apparaît comme un phénomène clé pour la prévention car il réduit considérablement l'énergie acoustique absorbée par l'oreille interne (Campo et al., 2014).

De plus, l'exposition aux solvants peut modifier le fonctionnement du ROM, et donc l'impact de l'exposition combinée d'un solvant plus bruit peut être différent de celui d'une exposition au bruit seul (Wathier et al., 2016). Dans ce projet, nous avons testé les effets d'un solvant très lipophile, le CS₂, connu pour ses effets neurotoxiques. Dans les expériences réalisées, nous n'avons pas observé d'effet cochléotoxique dû au CS₂ seul, ni de pertes de cellules évidentes. Nous avons également montré que les CCE fonctionnaient correctement après cette exposition puisque les amplitudes des PDA étaient similaires à celles mesurées avant exposition. Cependant, bien que dans les conditions de cette étude le CS₂ ne se soit pas révélé cochléotoxique, il pourrait avoir la capacité de modifier le fonctionnement du ROM.

En effet, la comparaison des résultats obtenus après la co-exposition au bruit continu et au bruit impulsionnel a mis en évidence la capacité du CS₂ à modifier le fonctionnement du réflexe, de la même façon que d'autres solvants aromatiques, comme le styrène, lorsqu'ils sont associés avec le bruit (Venet et al., 2015). Dans cette étude, nous avons constaté un effet synergique des dommages sur la cochlée quand les animaux sont exposés au CS₂ et au bruit impulsionnel et, au contraire, une tendance à la diminution des lésions cochléaires avec l'addition de CS₂ au bruit continu. Comme le styrène, le CS₂ peut avoir un effet neuropharmacologique, en diminuant le seuil d'activation du ROM. Cet effet pourrait être causé par des changements dans la polarisation de la membrane plasmique (Magnusson et al., 1998). En effet, il a été démontré que le toluène modifie le fonctionnement des canaux dépendants du Ca²⁺ qui interviennent dans le ROM (Maguin et al., 2009). Ce type de modifications pourrait être la raison pour laquelle le seuil du ROM est diminué en présence de solvants aromatiques et pourraient expliquer pourquoi la co-exposition au bruit et solvants altère l'impact des bruits continus de courte durée sur l'audition. En prenant en compte la durée de l'exposition et l'intensité du bruit continu utilisées dans cette étude, le CS₂ pourrait diminuer le seuil d'activation du ROM, et par conséquent, augmenter l'amplitude de ce réflexe. Il réduit ainsi l'effet cochléo-traumatisant causé par le bruit continu de courte durée. En revanche, la co-exposition au CS₂ augmente clairement la vulnérabilité de l'organe de Corti au bruit impulsionnel. Ceci suggère une augmentation de la toxicité cochléaire du bruit en présence de CS₂ qui se manifeste uniquement avec le bruit impulsionnel, ce qui exclut l'activité protectrice du ROM. Cet effet est démontré par la perte de CCE au niveau de la troisième rangée, aux fréquences situées entre 8 et 13 kHz, ce qui correspond à une demi-octave au-dessus de la fréquence centrale du spectre du bruit généré. Comme démontré par Venet et al., en 2015, le solvant a la capacité de potentialiser les dommages sur les cellules qui sont spécifiquement stimulées par le bruit (une demi-octave au-dessus de la fréquence centrale du spectre du bruit généré). A l'inverse, un bruit impulsionnel seul casse les stéréocils sans induire une perte de cellules dans les 8 semaines. Quels que soient les mécanismes qui pourraient expliquer les effets synergiques des co-expositions, les résultats obtenus dans cette étude indiquent qu'une faible concentration de CS₂ potentialise les dommages cochléaires causés par le bruit impulsionnel, tandis qu'il semble réduire les dommages causés par le bruit continu de courte durée, même si les résultats ne montrent pas de différence statistiquement significative entre les données issues du bruit continu seul et celles issues de la co-exposition. Ainsi, le CS₂ semble avoir deux effets différents, d'une part il modifie le ROM, en diminuant son seuil d'activation par une action neuropharmacologique

sur le SNC, d'autre part il potentialise les effets délétères induits par le bruit impulsionnel sur les cellules ciliées.

6.5 Valeurs limites d'exposition professionnelle

Les valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP) sont les valeurs de référence pour le contrôle des risques inhérents à l'exposition aux agents chimiques présents sur le lieu de travail, et, par conséquent, pour protéger la santé des travailleurs (INSHT, 2017).

On trouve deux types de VLEP. D'un côté, la valeur limite d'exposition professionnelle journalière (VLEP_{8h}) qui est la valeur de référence pour l'exposition journalière, elle représente les conditions pour lesquelles, en se basant sur les connaissances actuelles, la majorité des travailleurs peuvent être exposés 8 heures par jour et 40 heures par semaine pendant toute la durée de leur vie professionnelle, sans souffrir d'effets néfastes pour la santé. L'autre valeur est la valeur limite d'exposition professionnelle à court terme (VLEP_{CT}) qui représente la concentration maximale d'un composé chimique par période de 15 min.

Les VLEP sont établies pour des agents chimiques spécifiques et pas pour les mélanges. Cependant, quand plusieurs agents qui exercent la même action sur les mêmes organes et systèmes sont présents dans l'environnement, il s'agit d'un effet combiné qui nécessite une attention particulière.

La VLEP_{8h} pour le CS₂ définie par l'*Occupational Safety and Health Administration (OSHA)* pour les Etats-Unis et celle définie par l'*European Agency for Safety and Health at Work*, sont basses : 20 et 5 ppm respectivement. Cependant, les VLEP_{CT} pour le CS₂ sont supérieures, 30 ppm pour les Etats Unis pour une exposition de 30 min, tandis que la limite maximale fixée en Europe est de 25 ppm pour 15 min.

C'est pour cette raison que, en termes de prévention, on peut dire que les effets mesurés au niveau auditif sont significatifs à partir d'une concentration équivalente à 40 fois la VLEP_{8h} (250 ppm sur 6 h = 40 x 5 ppm sur 8 h), et les effets observés sur le système vestibulaire se manifestent à partir d'une concentration équivalente à 10 fois la VLEP_{8h} (63 ppm sur 6 h = 10 x 5 ppm sur 8 h). De même, il suffit d'une exposition de 250 ppm de CS₂, pendant 15 min par heure (10 fois la VLEP_{CT}), pour obtenir des pertes auditives différentes de celles mesurées avec le bruit seul, alors que le système vestibulaire est affecté à partir d'une dose supérieure (2 x 15 min/h). Les résultats obtenus au cours de ces différentes expérimentations nous amène à remettre en question la pertinence des valeurs limites d'exposition professionnelle pour le CS₂ en cas de co-exposition avec le bruit.

7 . CONCLUSIONS

1. Le bruit riche en basses fréquences génère une perte auditive une octave au-dessus de la fréquence de stimulation acoustique. Cette perte est partiellement réversible, et elle n'est pas associée à des dommages histologiques de la cochlée.
2. Dans les conditions expérimentales utilisées dans cette étude, le CS₂ n'apparaît pas ototoxique chez le rat. L'inhalation du CS₂ seule ne génère pas de lésions visibles au niveau des systèmes périphériques auditif et vestibulaire.
3. Nous faisons l'hypothèse que CS₂ a la capacité d'altérer les fonctions des systèmes auditif et vestibulaire par une action neuropharmacologique.
4. Le CS₂ peut exacerber les effets temporaires du bruit sur le système auditif (élargissement de la gamme de fréquences altérées vers les hautes fréquences) et sur le système vestibulaire (diminution du nombre et de la durée du nystagmus post-rotatoire plus importante chez les animaux co-exposés que chez les animaux exposés à un paramètre seulement).
5. La co-exposition bruit et CS₂ peut altérer la fonctionnalité des systèmes auditif et vestibulaire sans altérer le comportement moteur des animaux ni la morphologie de l'oreille interne.
6. Les perturbations observées au niveau des systèmes auditif et vestibulaire n'apparaissent pas aux mêmes concentrations de CS₂, lorsque celles-ci sont associées à un bruit BF.
7. Le mode d'exposition au solvant (continu *vs.* intermittent) n'a pas d'influence sur l'effet qui est généré au niveau du système auditif. La dose finale administrée est le principal facteur à prendre en compte. En ce qui concerne le système vestibulaire, le mode d'exposition au CS₂ peut avoir une influence sur l'effet observé au niveau vestibulaire.
8. Une concentration de 500 ppm de CS₂ en présence de bruit BF provoque un dysfonctionnement permanent du système vestibulaire mais pas du système auditif. À

des concentrations plus faibles, les effets observés au niveau des deux systèmes sont temporaires.

9. Le modèle établi dans ce projet permettra, dans de futures études, d'obtenir beaucoup plus d'informations sur l'ototoxicité de différents composés en co-exposition avec le bruit, en étudiant la toxicité par des mesures fonctionnelles du système auditif (PDA) et du système vestibulaire (NPR), ainsi que par différents tests comportementaux et l'étude de la morphologie de l'oreille interne.

8 . BIBLIOGRAPHIE

A

- 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>
- Angelaki, D.E., Hess, B.J., Arai, Y., Suzuki, J., 1996. Adaptation of primate vestibuloocular reflex to altered peripheral vestibular inputs. I. Frequency-specific recovery of horizontal VOR after inactivation of the lateral semicircular canals. *J. Neurophysiol.* 76, 2941–2953. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.5.2941>
- Angelaki, D.E., Hess, B.J., Suzuki, J., 1995. Differential processing of semicircular canal signals in the vestibulo-ocular reflex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 7201–7216.
- Araki, S., Murata, K., Yokoyama, K., Uchida, E., 1992. Auditory event-related potential (P300) in relation to peripheral nerve conduction in workers exposed to lead, zinc, and copper: effects of lead on cognitive function and central nervous system. *Am. J. Ind. Med.* 21, 539–547.
- Aran, J.M., Erre, J.P., Guilhaume, A., Arousseau, C., 1982. The comparative ototoxicities of gentamicin, tobramycin and dibekacin in the guinea pig. A functional and morphological cochlear and vestibular study. *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* 390, 1–30.
- Ashmore, J., Avan, P., Brownell, W.E., Dallos, P., Dierkes, K., Fettiplace, R., Grosh, K., Hackney, C.M., Hudspeth, A.J., Jülicher, F., Lindner, B., Martin, P., Meaud, J., Petit, C., Santos Sacchi, J.R., Canlon, B., 2010. The remarkable cochlear amplifier. *Hear. Res., Special Issue: Annual Reviews 2010* 266, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.05.001>
- Avan, P., Bonfils, P., Mom, T., 2001. Correlations among Distortion Product Otoacoustic Emissions, Thresholds and Sensory Cell Impairments. *Noise Health* 3, 1–18.

B

- Babisch, W., 2003. Stress hormones in the research on cardiovascular effects of noise. *Noise Health* 5, 1–11.
- Balbuena, E., Llorens, J., 2001. Behavioural disturbances and sensory pathology following allylnitrile exposure in rats. *Brain Res.* 904, 298–306.
- Balbuena, E., Llorens, J., 2003. Comparison of cis- and trans-crotonitrile effects in the rat reveals specificity in the neurotoxic properties of nitrile isomers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 187, 89–100.
- Baumann, O., Borra, R.J., Bower, J.M., Cullen, K.E., Habas, C., Ivry, R.B., Leggio, M., Mattingley, J.B., Molinari, M., Moulton, E.A., Paulin, M.G., Pavlova, M.A., Schmahmann, J.D., Sokolov, A.A., 2015. Consensus paper: the role of the cerebellum in perceptual processes. *Cerebellum Lond. Engl.* 14, 197–220. <https://doi.org/10.1007/s12311-014-0627-7>
- Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A., 2007. *Neuroscience: Exploring the brain* (3a. ed). Lippicott Williams and Wilkins.
- Beauchamp, R.O., Bus, J.S., Popp, J.A., Boreiko, C.J., Goldberg, L., 1983. A critical review of the literature on carbon disulfide toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 11, 169–278. <https://doi.org/10.3109/10408448309128255>
- Beaudoin, N., Weiss-Lambrou, R., 1984. Le nystagmus: une revue des principes et des méthodes d'évaluation. *Can. J. Occup. Ther.* 51, 25–29. <https://doi.org/10.1177/000841748405100105>

- Billig, I., Yeager, M.S., Blikas, A., Raz, Y., 2007. Neurons in the cochlear nuclei controlling the tensor tympani muscle in the rat: a study using pseudorabies virus. *Brain Res.* 1154, 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.007>
- Black, F.O., Gianna-Poulin, C., Pesznecker, S.C., 2001. Recovery from vestibular ototoxicity. *Otol. Neurotol. Off. Publ. Am. Otol. Soc. Am. Neurotol. Soc. Eur. Acad. Otol. Neurotol.* 22, 662–671.
- Black, F.O., Pesznecker, S., Stallings, V., 2004. Permanent gentamicin vestibulotoxicity. *Otol. Neurotol. Off. Publ. Am. Otol. Soc. Am. Neurotol. Soc. Eur. Acad. Otol. Neurotol.* 25, 559–569.
- Blanks, R.H., Precht, W., 1978. Response properties of vestibular afferents in alert cats during optokinetic and vestibular stimulation. *Neurosci. Lett.* 10, 225–229.
- Boadas-Vaello, P., Riera, J., Llorens, J., 2005. Behavioral and Pathological Effects in the Rat Define Two Groups of Neurotoxic Nitriles. *Toxicol. Sci.* 88, 456–466. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi314>
- Boadas-Vaello, P., Sedó-Cabezón, L., Verdú, E., Llorens, J., 2017. Strain and Sex Differences in the Vestibular and Systemic Toxicity of 3,3'-Iminodipropionitrile in Mice. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 156, 109–122. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw238>
- Bohne, B.A., Harding, G.W., 2000. Degeneration in the cochlea after noise damage: primary versus secondary events. *Am. J. Otol.* 21, 505–509.
- Bonfils, P., Remond, M.C., Pujol, R., 1986. Efferent tracts and cochlear frequency selectivity. *Hear. Res.* 24, 277–283.
- Bonsacquet, J., Brugeaud, A., Compan, V., Desmadryl, G., Chabbert, C., 2006. AMPA type glutamate receptor mediates neurotransmission at turtle vestibular calyx synapse. *J. Physiol.* 576, 63–71. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.116467>
- Borg, E., 1973. On the neuronal organization of the acoustic middle ear reflex. A physiological and anatomical study. *Brain Res.* 49, 101–123.
- Borg, E., Counter, S., Röster, G., 1984. Theories of middle-ear muscle functions. Silman Shlomo Ed. *Acoust. Reflex Basic Princ. Clin. Appl.* 77–9.
- Brandenberger, G., Follenius, M., Wittersheim, G., Salame, P., 1980. Plasma catecholamines and pituitary adrenal hormones related to mental task demand under quiet and noise conditions. *Biol. Psychol.* 10, 239–252.
- Brieger, H., 1967. Carbon disulphide in the living organism. Retention, biotransformation and pathophysiological effects. H Brieger J Teisin. Eds *Toxicol. Carbon Disulfide - proceedings Excerpta Medica Found. Amst.* 27–31.
- Brownell, W.E., Bader, C.R., Bertrand, D., de Ribaupierre, Y., 1985. Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227, 194–196.
- Burdick, C., 1982. Hearing Loss from Low-frequency Noise.
- Burdick, C.K., Patterson, J.H., Mozo, B.T., Camp, R.T., 1978. Threshold shifts in chinchillas exposed to octave bands of noise centered at 63 and 1000 Hz for three days(a). *J. Acoust. Soc. Am.* 64, 458–466.
- Bus, J.S., 1985. The relationship of carbon disulfide metabolism to development of toxicity. *Neurotoxicology* 6, 73–80.

C

- Campbell, L., Jones, A.H., Wilson, H.K., 1985. Evaluation of occupational exposure to carbon disulphide by blood, exhaled air, and urine analysis. *Am. J. Ind. Med.* 8, 143–53. <https://doi.org/10.1002/ajim.4700080209>
- Campo, P., 2015. Les ototoxiques exacerbent les surdités induites par le bruit.pdf. *Env. Risque Sante* 14, 125–134.
- 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.
- 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., Maguin, K., Lataye, R., 2007. Effects of aromatic solvents on acoustic reflexes mediated by central auditory pathways. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 99, 582–590. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm180>
- Campo, P., Morata, T.C., Hong, O., 2013. Chemical exposure and hearing loss. *Dis.-Mon. DM* 59, 119–138. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2013.01.003>
- Campo, P., Venet, T., Rumeau, C., Thomas, A., Rieger, B., Cour, C., Cosnier, F., Parietti-Winkler, C., 2011. Impact of noise or styrene exposure on the kinetics of presbycusis. *Hear. Res.* 280, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.04.016>
- Campo, P., Venet, T., Thomas, A., Cour, C., Brochard, C., Cosnier, F., 2014. Neuropharmacological and cochleotoxic effects of styrene. Consequences on noise exposures. *Neurotoxicol. Teratol.* 44, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.05.009>
- Cardinali, D.P., 2007. *Neurociencia aplicada: sus fundamentos*. Ed. Médica Panamericana.
- Carlisle, L., Zajic, G., Altschuler, R.A., Schacht, J., Thorne, P.R., 1988. Species differences in the distribution of infracuticular F-actin in outer hair cells of the cochlea. *Hear. Res.* 33, 201–205.
- Cassandro, E., Chiarella, G., Catalano, M., Gallo, L.V., Marcelli, V., Nicastri, M., Petrolo, C., 2003. Changes in clinical and instrumental vestibular parameters following acute exposition to auditory stress. *Acta Otorhinolaryngol. Ital. Organo Uff. Della Soc. Ital. Otorinolaringol. E Chir. Cerv.-facc.* 23, 251–256.
- Cavalleri, A., Maugeri, U., Visconti, E., 1970. Urinary excretion of testosterone and gonadotropins stimulating interstitial cells (ICSH) in persons exposed to carbon disulfide. *Arch. Mal. Prof.* 31, 23–30.
- Cazals, Y., Aran, J.M., Erre, J.P., 1982. Frequency sensitivity and selectivity of acoustically evoked potentials after complete cochlear hair cell destruction. *Brain Res.* 231, 197–203.
- Cazals, Y., Aran, J.M., Erre, J.P., Guilhaume, A., Aurousseau, C., 1983. Vestibular acoustic reception in the guinea pig: a saccular function? *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 95, 211–217.
- Chang, S.J., Chen, C.J., Shih, T.S., Chou, T.C., Sung, F.C., 2007. Risk for hypertension in workers exposed to carbon disulfide in the viscose rayon industry. *Am. J. Ind. Med.* 50, 22–27. <https://doi.org/10.1002/ajim.20409>
- Chang, S.J., Shih, T.S., Chou, T.C., Chen, C.J., Chang, H.Y., Sung, F.C., 2003. Hearing loss in workers exposed to carbon disulfide and noise. *Environ. Health Perspect.* 111, 1620–1624.
- 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. Off. J. Soc. Toxicol.* 98, 167–177. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm078>

- Chen, G.D., Fechter, L.D., 1999. Potentiation of octave-band noise induced auditory impairment by carbon monoxide. *Hear. Res.* 132, 149–159.
- 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>
- Cheng, A.G., Cunningham, L.L., Rubel, E.W., 2005. Mechanisms of hair cell death and protection. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 13, 343–348.
- Chomczynski, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532–534, 536–537.
- Chu, C.C., Huang, C.C., Chu, N.S., Wu, T.N., 1996. Carbon disulfide induced polyneuropathy: sural nerve pathology, electrophysiology, and clinical correlation. *Acta Neurol. Scand.* 94, 258–263.
- Clerici, W.J., Fechter, L.D., 1991. Effects of chronic carbon disulfide inhalation on sensory and motor function in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 249–255. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(91\)90069-9](https://doi.org/10.1016/0892-0362(91)90069-9)
- Cody, A.R., Russell, I.J., 1985. Outer hair cells in the mammalian cochlea and noise-induced hearing loss. *Nature* 315, 662–665.
- Cohen, B., 1984. Examination of the vestibular system and of the vestibular-ocular reflex. Oosterveld WJ Ed *Otoneurology* John Wiley Sons Chichester 87–109.
- Cohen, S., Krantz, D.S., Evans, G.W., Stokols, D., 1981. Cardiovascular and behavioral effects of community noise. *Am. Sci.* 69, 528–535.
- Collins, P.W., 1988. Synergistic interactions of gentamicin and pure tones causing cochlear hair cell loss in pigmented guinea pigs. *Hear. Res.* 36, 249–259.
- Colombi, A., Maroni, M., Picchi, O., Rota, E., Castano, P., Ag, V.F., 1981. Carbon Disulfide Neuropathy in Rats. A Morphological and Ultrastructural Study of Degeneration and Regeneration. *Clin. Toxicol.* 18, 1463–1474. <https://doi.org/10.3109/15563658108990355>
- Corwin, J.T., Jones, J.E., Katayama, A., Kelley, M.W., Warchol, M.E., 1991. Hair cell regeneration: the identities of progenitor cells, potential triggers and instructive cues. *Ciba Found. Symp.* 160, 103-120; discussion 120-130.
- Cotanche, D.A., 1987. Regeneration of hair cell stereociliary bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma. *Hear. Res.* 30, 181–195.
- Courjon, J.H., Jeannerod, M., Ossuzio, I., Schmid, R., 1977. The role of vision in compensation of vestibulo ocular reflex after hemilabyrinthectomy in the cat. *Exp. Brain Res.* 28, 235–248.
- Crane, B.T., Viirre, E.S., Demer, J.L., 1997. The human horizontal vestibulo-ocular reflex during combined linear and angular acceleration. *Exp. Brain Res.* 114, 304–320.
- Cransac, H., Cottet-Emard, J.M., Hellström, S., Peyrin, L., 1998. Specific sound-induced noradrenergic and serotonergic activation in central auditory structures. *Hear. Res.* 118, 151–156.
- Crofton, K.M., Janssen, R., Prazma, J., Pulver, S., Barone, S., 1994. The ototoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile: functional and morphological evidence of cochlear damage. *Hear. Res.* 80, 129–140.
- Cunningham, L.L., 2006. The adult mouse utricle as an in vitro preparation for studies of ototoxic-drug-induced sensory hair cell death. *Brain Res.* 1091, 277–281. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.128>
- Cunningham, L.L., Cheng, A.G., Rubel, E.W., 2002. Caspase Activation in Hair Cells of the Mouse Utricle Exposed to Neomycin. *J. Neurosci.* 22, 8532–8540.

D

- Dalet, A., Bonsacquet, J., Gaboyard-Niay, S., Calin-Jageman, I., Chidavaenzi, R.L., Venteo, S., Desmadryl, G., Goldberg, J.M., Lysakowski, A., Chabbert, C., 2012. Glutamate transporters EAAT4 and EAAT5 are expressed in vestibular hair cells and calyx endings. *PloS One* 7, e46261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046261>
- Dancer, A., 1988. Biomécanique de l'audition. *Physiologie de la Cochlée*. INSERM Paris 27–73.
- Danielsson, A., Landström, U., 1985. Blood pressure changes in man during infrasonic exposure. An experimental study. *Acta Med. Scand.* 217, 531–535.
- Dannhof, B.J., Bruns, V., 1993. The innervation of the organ of Corti in the rat. *Hear. Res.* 66, 8–22. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(93\)90255-Y](https://doi.org/10.1016/0378-5955(93)90255-Y)
- Darlington, C.L., Dutia, M.B., Smith, P.F., 2002. The contribution of the intrinsic excitability of vestibular nucleus neurons to recovery from vestibular damage. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1719–1727.
- Davis, H., 1983. An active process in cochlear mechanics. *Hear. Res.* 9, 79–90.
- Day, B.L., Fitzpatrick, R.C., 2005. The vestibular system. *Curr. Biol.* CB 15, R583-586. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.053>
- De Fruyt, F., Thiery, E., De Bacquer, D., Vanhoorne, M., 1998. Neuropsychological effects of occupational exposures to carbon disulfide and hydrogen sulfide. *Int. J. Occup. Environ. Health* 4, 139–146. <https://doi.org/10.1179/oe.1998.4.3.139>
- Dechesne, C., Mbiene, J.P., Sans, A., 1986. Postnatal development of vestibular receptor surfaces in the rat. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 101, 11–18.
- DeCory, L., Dancer, A., Aran, J., 1992. Species differences and mechanisms of damage. Eds Noise-Induc. Hear. Loss St Louis MO Mosby Year 73–88.
- DeJoy, D.M., 1984. The nonauditory effects of noise: review and perspectives for research. *J. Aud. Res.* 24, 123–150.
- Deol, M.S., Gluecksohn-Waelsch, S., 1979. The role of inner hair cells in hearing. *Nature* 278, 250–252.
- Desmadryl, G., Gaboyard-Niay, S., Brugeaud, A., Travo, C., Broussy, A., Saleur, A., Dyhrfeld-Johnsen, J., Wersinger, E., Chabbert, C., 2012. Histamine H4 receptor antagonists as potent modulators of mammalian vestibular primary neuron excitability. *Br. J. Pharmacol.* 167, 905–916. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02049>
- Dieroff, H.G., 1976. Possibilities of improving the diagnosis of noise-induced hearing damage by means of directional audiometry, the dichotic speech discrimination test, and the EEG1. *Audiol. Off. Organ Int. Soc. Audiol.* 15, 152–162.
- Dietzmann, K., Laass, W., 1977. Histological and histochemical studies on the rat brain under conditions of carbon disulfide intoxication. *Exp. Pathol. (Jena)* 13, 320–327.
- Ding, D., McFadden, S.L., Woo, J.M., Salvi, R.J., 2002. Ethacrynic acid rapidly and selectively abolishes blood flow in vessels supplying the lateral wall of the cochlea. *Hear. Res.* 173, 1–9.
- DIRECTIVE 2010/63/EU, 2010. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union*.
- Discalzi, G., Fabbro, D., Meliga, F., Mocellini, A., Capellaro, F., 1993. Effects of occupational exposure to mercury and lead on brainstem auditory evoked potentials. *Int. J. Psychophysiol. Off. J. Int. Organ. Psychophysiol.* 14, 21–25.
- Drexler, H., Göen, T., Angerer, J., 1995. Carbon disulphide. II. Investigations on the uptake of CS₂ and the excretion of its metabolite 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid after occupational exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 67, 5–10.

- Dunn, D.E., Davis, R.R., Merry, C.J., Franks, J.R., 1991. Hearing loss in the chinchilla from impact and continuous noise exposure. *J. Acoust. Soc. Am.* 90, 1979–1985.
- Dupont, J., Guilhaume, A., Aran, J.M., 1993. Neuronal degeneration of primary cochlear and vestibular innervations after local injection of sisomicin in the guinea pig. *Hear. Res.* 68, 217–228.
- Dvorkin, M.A., Cardinali, D.P., 2010. Best & Taylor. *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*, 14th ed. Ed. Médica Panamericana.

E

- Eatock, R.A., Xue, J., Kalluri, R., 2008. Ion channels in mammalian vestibular afferents may set regularity of firing. *J. Exp. Biol.* 211, 1764–1774. <https://doi.org/10.1242/jeb.017350>
- Ernfors, P., Duan, M.L., ElShamy, W.M., Canlon, B., 1996. Protection of auditory neurons from aminoglycoside toxicity by neurotrophin-3. *Nat. Med.* 2, 463–467.

F

- Fay, R.R., 1988. Comparative psychoacoustics. *Hear. Res.* 34, 295–305.
- Fechter, L.D., Carlisle, L., 1990. Auditory dysfunction and cochlear vascular injury following trimethyltin exposure in the guinea pig. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 105, 133–143.
- Fechter, L.D., Cheng, G.-D., Rao, D., 2000. Characterising conditions that favour potentiation of noise induced hearing loss by chemical asphyxiants. *Noise Health* 3, 11–21.
- Fechter, L.D., Gearhart, C., Shirwany, N.A., 2004. Acrylonitrile potentiates noise-induced hearing loss in rat. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 5, 90–98. <https://doi.org/10.1007/s10162-003-4028-8>
- Fee, W.E., 1980. Aminoglycoside ototoxicity in the human. *The Laryngoscope* 90, 1–19.
- Felten, D.L., Shetty, A.N., 2010. *Netter, atlas de neurociencia* (2a ed.). Elsevier España.
- Fetoni, A.R., Ferraresi, A., Picciotti, P., Gaetani, E., Paludetti, G., Troiani, D., 2009. Noise induced hearing loss and vestibular dysfunction in the guinea pig. *Int. J. Audiol.* 48, 804–810. <https://doi.org/10.3109/14992020903023140>
- Fettiplace, R., 2017. Hair cell transduction, tuning and synaptic transmission in the mammalian cochlea. *Compr. Physiol.* 7, 1197–1227. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160049>
- Fleig, A., Penner, R., 2004. The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 633–639. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.10.004>
- Flock, A., 1977. Physiological properties of sensory hairs in the ear, in: *Psychophysics and Physiology of Hearing*. E.F. Evans and J.P. Wilson. Academic Press, London, pp. 15–25.
- Flock, A., Flock, B., 2000. Hydrops in the cochlea can be induced by sound as well as by static pressure. *Hear. Res.* 150, 175–188.
- Flock, A., Flock, B., Fridberger, A., Scarfone, E., Ulfendahl, M., 1999. Supporting cells contribute to control of hearing sensitivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 4498–4507.
- Fonfria, E., Murdock, P.R., Cusdin, F.S., Benham, C.D., Kelsell, R.E., McNulty, S., 2006. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 26, 159–178. <https://doi.org/10.1080/10799890600637506>

- Forge, A., 1982. A tubulo-cisternal endoplasmic reticulum system in the potassium transporting marginal cells of the stria vascularis and effects of the ototoxic diuretic ethacrynic acid. *Cell Tissue Res.* 226, 375–387.
- Forge, A., 1985. Outer hair cell loss and supporting cell expansion following chronic gentamicin treatment. *Hear. Res.* 19, 171–182.
- Forge, A., Brown, A.M., 1982. Ultrastructural and electrophysiological studies of acute ototoxic effects of furosemide. *Br. J. Audiol.* 16, 109–116.
- Forge, A., Li, L., 2000. Apoptotic death of hair cells in mammalian vestibular sensory epithelia. *Hear. Res.* 139, 97–115. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(99\)00177-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(99)00177-X)
- Forge, A., Schacht, J., 2000. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol. Neurootol.* 5, 3–22. <https://doi.org/10.1159/000013861>
- Frantík, E., 1970. The development of motor disturbances in experimental chronic carbon disulphide intoxication. *Med. Lav.* 61, 309–313.
- Frolenkov, G.I., Atzori, M., Kalinec, F., Mammano, F., Kachar, B., 1998. The membrane-based mechanism of cell motility in cochlear outer hair cells. *Mol. Biol. Cell* 9, 1961–1968.
- Froymovich, O., Rebala, V., Salvi, R.J., Rassael, H., 1995. Long-term effect of acoustic trauma on distortion product otoacoustic emissions in chickens. *J. Acoust. Soc. Am.* 97, 3021–3029.

G

- Gabersek, V., Aboulker, P., Pialoux, P., Laurent, J., 1963. Methods of recording nystagmus. Major significance of the potentiometric method. *Ann. Oto-Laryngol. Chir. Cervico Faciale Bull. Soc. Oto-Laryngol. Hopitaux Paris* 80, 619–661.
- Gacek, R.R., 1982. Afferent and efferent innervation of the labyrinth. *Adv. Otorhinolaryngol.* 28, 1–13.
- Goddé-Jolly, D., Larmande, A., 1973. Nystagmus. *Bull. Mem. Soc. Fr. Ophtalmol.* 86, 1–14.
- Goldberg, J.M., Fernández, C., 1980. Efferent vestibular system in the squirrel monkey: anatomical location and influence on afferent activity. *J. Neurophysiol.* 43, 986–1025. <https://doi.org/10.1152/jn.1980.43.4.986>
- Goodyear, R.J., Gale, J.E., Ranatunga, K.M., Kros, C.J., Richardson, G.P., 2008. Aminoglycoside-induced phosphatidylserine externalization in sensory hair cells is regionally restricted, rapid, and reversible. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 9939–9952. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1124-08.2008>
- Gottfried, M.R., Graham, D.G., Morgan, M., Casey, H.W., Bus, J.S., 1985. The morphology of carbon disulfide neurotoxicity. *Neurotoxicology* 6, 89–96.
- Graham, D.G., Amarnath, V., Valentine, W.M., Pyle, S.J., Anthony, D.C., 1995. Pathogenetic Studies of Hexane and Carbon Disulfide Neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 91–112. <https://doi.org/10.3109/10408449509021609>
- Guinan, J.J., Salt, A., Cheatham, M.A., 2012. Progress in cochlear physiology after Békésy. *Hear. Res.* 293, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.05.005>

H

- Habermann, J., 1890. Über die Schwerhörigkeit der Kesselschmiede. *Arch Ohrenheilk* 30, 1–25.
- Hackney, C.M., Furness, D.N., 1995. Mechanotransduction in vertebrate hair cells: structure and function of the stereociliary bundle. *Am. J. Physiol.* 268, C1-13. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.1.C1>
- Haines, D.E., 2013. *Principios de Neurociencia: Aplicaciones básicas y clínicas*. Elsevier España.
- Halmagyi, G. m., Curthoys, I.S., Colebatch, J.G., Aw, S.T., 2005. Vestibular Responses to Sound. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1039, 54–67. <https://doi.org/10.1196/annals.1325.006>
- Hamers, F.P.T., Wijnbenga, J., Wolters, F.L.C., Klis, S.F.L., Sluyter, S., Smoorenburg, G.F., 2003. Cisplatin ototoxicity involves organ of Corti, stria vascularis and spiral ganglion: modulation by alphaMSH and ORG 2766. *Audiol. Neurootol.* 8, 305–315. <https://doi.org/10.1159/000073515>
- Hänninen, H., 1971. Psychological picture of manifest and latent carbon disulphide poisoning. *Br. J. Ind. Med.* 28, 374–381.
- Hänninen, H., Nurminen, M., Tolonen, M., Martelin, T., 1978. Psychological tests as indicators of excessive exposure to carbon disulfide. *Scand. J. Psychol.* 19, 163–174.
- Henderson, D., Bielefeld, E.C., Harris, K.C., Hu, B.H., 2006. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear.* 27, 1–19. <https://doi.org/10.1097/01.aud.0000191942.36672.f3>
- Henderson, D., Hamernik, R.P., 1986. Impulse noise: critical review. *J. Acoust. Soc. Am.* 80, 569–584.
- Henkin, R.I., Knigge, K.M., 1963. Effect of sound on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Am. J. Physiol.* 204, 701–704.
- Highstein, S.M., Porrill, J., Dean, P., 2005. Report on a workshop concerning the cerebellum and motor learning, held in St Louis October 2004. *Cerebellum Lond. Engl.* 4, 140–150. <https://doi.org/10.1080/14734220510007987>
- Hilding, D., Wersall, J., 1962. Cholinesterase and its relation to the nerve endings in the inner ear. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 55, 205–217.
- Hirata, M., Ogawa, Y., Goto, S., 1996. A cross-sectional study on nerve conduction velocities among workers exposed to carbon disulphide. *Med. Lav.* 87, 29–34.
- Hirata, M., Ogawa, Y., Okayama, A., Goto, S., 1992a. Changes in auditory brainstem response in rats chronically exposed to carbon disulfide. *Arch. Toxicol.* 66, 334–338. <https://doi.org/10.1007/BF01973628>
- Hirata, M., Ogawa, Y., Okayama, A., Goto, S., 1992b. A cross-sectional study on the brainstem auditory evoked potential among workers exposed to carbon disulfide. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 64, 321–324.
- Hirose, K., Westrum, L.E., Cunningham, D.E., Rubel, E.W., 2004. Electron microscopy of degenerative changes in the chick basilar papilla after gentamicin exposure. *J. Comp. Neurol.* 470, 164–180. <https://doi.org/10.1002/cne.11046>
- Hirsh, I.J., Ward, W.D., 1952. Recovery of the Auditory Threshold after Strong Acoustic Stimulation. *J. Acoust. Soc. Am.* 24, 131–141. <https://doi.org/10.1121/1.1906867>
- Hitier, M., Besnard, S., Smith, P.F., 2014. Vestibular pathways involved in cognition. *Front. Integr. Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnint.2014.00059>
- Hoar, S.K., Santodonato, J., Cameron, T.P., Kelsey, M.I., 1985. Monographs on human exposures to chemicals in the workplace. *J. Occup. Med. Off. Publ. Ind. Med. Assoc.* 27, 585–586.
- Hodgkinson, L., Prasher, D., 2006. Effects of industrial solvents on hearing and balance: A review. *Noise Health* 8, 114. <https://doi.org/10.4103/1463-1741.33952>

- Hoeffding, V., Fechter, L.D., 1991. Trimethyltin disrupts auditory function and cochlear morphology in pigmented rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 135–145.
- 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>
- Hoffmann, P., Klapperstück, M., 1990. Effects of carbon disulfide on cardiovascular function after acute and subacute exposure of rats. *Biomed. Biochim. Acta* 49, 121–128.
- Hoffmann, P., Müller, S., 1990. Subacute carbon disulfide exposure modifies adrenergic cardiovascular actions in rats. *Biomed. Biochim. Acta* 49, 115–120.
- Hordichok, A.J., Steyger, P.S., 2007. Closure of supporting cell scar formations requires dynamic actin mechanisms. *Hear. Res.* 232, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2007.06.011>
- Huang, T., Cheng, A.G., Stupak, H., Liu, W., Kim, A., Staecker, H., Lefebvre, P.P., Malgrange, B., Kopke, R., Moonen, G., Van De Water, T.R., 2000. Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 18, 259–270.
- Hudak, W.J., Buckeley, J.P., 1961. Production of hypertensive rats by experimental stress. *J. Pharm. Sci.* 50, 263–264.
- Humes, L.E., 1984. Noise-induced hearing loss as influenced by other agents and by some physical characteristics of the individual. *J. Acoust. Soc. Am.* 76, 1318–1329.
- Hunt, M.A., Miller, S.W., Nielson, H.C., Horn, K.M., 1987. Intratympanic injection of sodium arsenite (atoxyl) solution results in postural changes consistent with changes described for labyrinthectomized rats. *Behav. Neurosci.* 101, 427–428.
- Hunter-Duvar, I.M., 1983. An electron microscopic study of the vestibular sensory epithelium. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 95, 494–507.
- Husbands, J.M., Steinberg, S.A., Kurian, R., Saunders, J.C., 1999. Tip-link integrity on chick tall hair cell stereocilia following intense sound exposure. *Hear. Res.* 135, 135–145.

I

- Iaroslavskiĭ, V.K., 1969. Toxic effect of carbon disulfide on the function of reproduction and increase in the effect produced by tryptophan. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 68, 88–91.
- Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X., Núñez, G., 1998. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J.* 17, 2526–2533. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.9.2526>
- INSHT, 2017. Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España. Inst. Nac. Empl. Segur. Soc. Gob. Esp.
- Ira, F., Stuart, 2014. *Fisiología humana* (13a. ed.). McGraw Hill Mexico.
- Ishiyama, G., 2009. Imbalance and vertigo: the aging human vestibular periphery. *Semin. Neurol.* 29, 491–499. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1241039>
- Ising, H., Babisch, W., Kruppa, B., 1999. Noise-Induced Endocrine Effects and Cardiovascular Risk. *Noise Health* 1, 37–48.
- ISO 9612:2009, 2009. URL <https://www.iso.org/standard/41718.html> (accessed 12.18.17).
- Iurato, S., Luciano, L., Pannese, E., Reale, E., 1972. Efferent vestibular fibers in mammals: morphological and histochemical aspects. *Prog. Brain Res.* 37, 429–443.

J

- Jang, Y., Lee, Y., Kim, S.M., Yang, Y.D., Jung, J., Oh, U., 2012. Quantitative analysis of TRP channel genes in mouse organs. *Arch. Pharm. Res.* 35, 1823–1830. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-1016-8>
- Jensen, D.W., 1983. Survival of function in the deafferented vestibular nerve. *Brain Res.* 273, 175–178.
- Johnson, A.C., 1993. The ototoxic effect of toluene and the influence of noise, acetyl salicylic acid, or genotype. A study in rats and mice. *Scand. Audiol. Suppl.* 39, 1–40.
- Johnson, A.C., Juntunen, L., Nylén, P., Borg, E., Höglund, G., 1988. Effect of interaction between noise and toluene on auditory function in the rat. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 105, 56–63.
- Johnson, B.L., Boyd, J., Burg, J.R., Lee, S.T., Xintaras, C., Albright, B.E., 1983. Effects on the peripheral nervous system of workers' exposure to carbon disulfide. *Neurotoxicology* 4, 53–65.
- Jones, G.P., Lukashkina, V.A., Russell, I.J., Lukashkin, A.N., 2010. The Vestibular System Mediates Sensation of Low-Frequency Sounds in Mice. *JARO J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 11, 725–732. <https://doi.org/10.1007/s10162-010-0230-7>
- Jones, S.M., Jones, T.A., Mills, K.N., Gaines, G.C., 2009. Anatomical and Physiological Considerations in Vestibular Dysfunction and Compensation. *Semin. Hear.* 30, 231–241. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1241124>

K

- Kachar, B., Brownell, W.E., Altschuler, R., Fex, J., 1986. Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature* 322, 365–368. <https://doi.org/10.1038/322365a0>
- Kaltenbach, J.A., Afman, C.E., 2000. Hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus after intense sound exposure and its resemblance to tone-evoked activity: a physiological model for tinnitus. *Hear. Res.* 140, 165–172.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., 2000. *Principios de neurociencia*. McGraw-Hill Interamericana.
- Keil, D.E., Padgett, E.L., Barnes, D.B., Pruett, S.B., 1996. Role of decomposition products in sodium methylthiocarbamate-induced immunotoxicity. *J. Toxicol. Environ. Health* 47, 479–492. <https://doi.org/10.1080/009841096161627>
- Kelly, J.B., Masterton, B., 1977. Auditory sensitivity of the albino rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 91, 930–936.
- Kemp, D.T., 1978. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J. Acoust. Soc. Am.* 64, 1386–1391.
- Khan, S., Chang, R., 2013. Anatomy of the vestibular system: A review. *NeuroRehabilitation* 32, 437–443. <https://doi.org/10.3233/NRE-130866>
- Kiang, N.Y., Rho, J.M., Northrop, C.C., Liberman, M.C., Ryugo, D.K., 1982. Hair-cell innervation by spiral ganglion cells in adult cats. *Science* 217, 175–177.
- Kivistö, H., Elovaara, E., Riihimäki, V., Aitio, A., 1995. Effect of cytochrome P450 isozyme induction and glutathione depletion on the metabolism of CS₂ to TTCA in rats. *Arch. Toxicol.* 69, 185–190. <https://doi.org/10.1007/s002040050156>
- Klaassen, C., Watkins, J.B., 2001. *Manual de Toxicología (5a. ed.)*. McGraw-Hill Interamericana.

- Klapperstück, M., Müller, S., Hoffmann, P., 1991. Carbon disulfide exposure attenuates adrenergic inotropic response in rats. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 35, 113–120.
- Knobloch, K., Stetkiewicz, J., Wrońska-Nofer, T., 1979. Conduction velocity in the peripheral nerves of rats with chronic carbon disulphide neuropathy. *Br. J. Ind. Med.* 36, 148–152.
- Kobel, M., Le Prell, C.G., Liu, J., Hawks, J.W., Bao, J., 2017. Noise-induced cochlear synaptopathy: Past findings and future studies. *Hear. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.12.008>
- Komiya, H., Eggermont, J.J., 2000. Spontaneous firing activity of cortical neurons in adult cats with reorganized tonotopic map following pure-tone trauma. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 120, 750–756.
- Kotecha, B., Richardson, G.P., 1994. Ototoxicity in vitro: effects of neomycin, gentamicin, dihydrostreptomycin, amikacin, spectinomycin, neamine, spermine and poly-L-lysine. *Hear. Res.* 73, 173–184.
- Kotseva, K., Braeckman, L., De Bacquer, D., Bulat, P., Vanhoorne, M., 2001. Cardiovascular Effects in Viscose Rayon Workers Exposed to Carbon Disulfide. *Int. J. Occup. Environ. Health* 7, 7–13. <https://doi.org/10.1179/107735201800339713>
- Kowalska, S., Sułkowski, W., Sińczuk-Walczak, H., 2000. Assessment of the hearing system in workers chronically exposed to carbon disulfide and noise. *Med. Pr.* 51, 123–138.
- Kraft, R., Harteneck, C., 2005. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch.* 451, 204–211. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1428-0>
- Kurabi, A., Keithley, E.M., Housley, G.D., Ryan, A.F., Wong, A.C.-Y., 2017. Cellular mechanisms of noise-induced hearing loss. *Hear. Res.* 349, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.11.013>

L

- Lacerda, A., Leroux, T., Morata, T., 2005. Ototoxic effects of carbon monoxide exposure: a review. *-Fono Rev. Atualizacao Cient.* 17, 403–412.
- Lam, C.W., DiStefano, V., 1982. Behavior and characterization of blood carbon disulfide in rats after inhalation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 64, 327–34. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(82\)90227-7](https://doi.org/10.1016/0041-008X(82)90227-7)
- Lam, C.-W., DiStefano, V., 1983. Blood-bound carbon disulfide: An indicator of carbon disulfide exposure, and its accumulation in repeatedly exposed rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 70, 402–410. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(83\)90158-8](https://doi.org/10.1016/0041-008X(83)90158-8)
- Lam, C.W., DiStefano, V., 1986. Characterization of carbon disulfide binding in blood and to other biological substances. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 86, 235–42. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(86\)90054-2](https://doi.org/10.1016/0041-008X(86)90054-2)
- Landström, U., 1983. Occupational aspects of infrasound and whole body vibrations. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 34, 287–293.
- 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. (Stockh.)* 101, 422–428.
- Lataye, R., Campo, P., 1996. Applicability of the L(eq) as a damage-risk criterion: an animal experiment. *J. Acoust. Soc. Am.* 99, 1621–1632.
- Lataye, R., Campo, P., 1997. Combined effects of a simultaneous exposure to noise and toluene on hearing function. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 373–382.

- Lataye, R., Campo, P., 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. *Hear. Res.* 139, 86–96.
- Lehnhardt, E., 1965. Occupational damages of the ear. *Arch. Ohren Nasen Kehlkopfheilkd.* 185, 465–468.
- Leonova, E.V., Raphael, Y., 1997. Organization of cell junctions and cytoskeleton in the reticular lamina in normal and ototoxically damaged organ of Corti. *Hear. Res.* 113, 14–28.
- Levy, M.N., Koeppen, B.M., Stanton, B.A., 2006. *Berne y Levy Fisiologia*. Elsevier España.
- Li, L., Nevill, G., Forge, A., 1995. Two modes of hair cell loss from the vestibular sensory epithelia of the guinea pig inner ear. *J. Comp. Neurol.* 355, 405–417. <https://doi.org/10.1002/cne.903550307>
- Lieberman, M.C., Dodds, L.W., 1987. Acute ultrastructural changes in acoustic trauma: Serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates. *Hear. Res.* 26, 45–64. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(87\)90035-9](https://doi.org/10.1016/0378-5955(87)90035-9)
- Lieberman, M.C., Guinan, J.J., 1998. Feedback control of the auditory periphery: anti-masking effects of middle ear muscles vs. olivocochlear efferents. *J. Commun. Disord.* 31, 471–482; quiz 483; 553.
- Lieberman, M.C., Kujawa, S.G., 2017. Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. *Hear. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.01.003>
- Lim, D.J., 1972. Fine morphology of the tectorial membrane. Its relationship to the organ of Corti. *Arch. Otolaryngol. Chic. Ill* 1960 96, 199–215.
- Lim, D.J., Freilich, I.W., 1981. Ultrastructure of the stria vascularis, vestibular dark cells and endolymphatic sac following acute diuretic ototoxicity. *Scand. Audiol. Suppl.* 14 Suppl, 139–155.
- Llorens, J., 2013. Toxic neurofilamentous axonopathies– accumulation of neurofilaments and axonal degeneration. *J. Intern. Med.* 273, 478–489. <https://doi.org/10.1111/joim.12030>
- Llorens, J., Callejoa, A., Greguskea, E., Marotoa, A., Cutillas, B., Martins-Lopes, V., 2017. Physiological assessment of vestibular function and toxicity in humans and animals. in press.
- Llorens, J., Crofton, K.M., O'Callaghan, J.P., 1993a. Administration of 3,3'-iminodipropionitrile to the rat results in region-dependent damage to the central nervous system at levels above the brain stem. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 1492–1498.
- Llorens, J., Dememes, D., Sans, A., 1993b. 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>
- Llorens, J., Rodríguez-Farré, E., 1997. Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 117–127.
- Lock, E.A., Harpur, E.S., 1992. Toxicology of sensory systems: a perspective. *Hum. Exp. Toxicol.* 11, 442–448. <https://doi.org/10.1177/096032719201100602>
- Lockitch, G., 1993. Perspectives on lead toxicity. *Clin. Biochem.* 26, 371–381.
- Lukas, E., 1970. Stimulation electromyography in experimental toxicology (carbon disulphide neuropathy in rats). *Med. Lav.* 61, 302–308.
- Lysakowski, A., Gaboyard-Niay, S., Calin-Jageman, I., Chatlani, S., Price, S.D., Eatock, R.A., 2011. Molecular microdomains in a sensory terminal, the vestibular calyx ending. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 10101–10114. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0521-11.2011>

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.

M

- Ma, W.-L.D., Young, E.D., 2006. Dorsal cochlear nucleus response properties following acoustic trauma: response maps and spontaneous activity. *Hear. Res.* 216–217, 176–188. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2006.03.011>
- Macdonald, M.R., Harrison, R.V., Wake, M., Bliss, B., Macdonald, R.E., 1994. Ototoxicity of carboplatin: comparing animal and clinical models at the Hospital for Sick Children. *J. Otolaryngol.* 23, 151–159.
- 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 Ca²⁺ Channels Involved in the Middle-Ear Reflex. *Toxicol. Sci.* 107, 473–481. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn242>
- Mameli, O., Caria, M.A., Melis, F., Solinas, A., Tavera, C., Ibba, A., Tocco, M., Flore, C., Sanna Randaccio, F., 2001. Neurotoxic effect of lead at low concentrations. *Brain Res. Bull.* 55, 269–275.
- Mameli, O., Caria, M.A., Melis, P., Zambenedetti, P., Ramila, M., Zatta, P., 2006. Effect of aluminum consumption on the vestibulo-ocular reflex. *Metab. Brain Dis.* 21, 86–104. <https://doi.org/10.1007/s11011-006-9010-9>
- Mameli, O., Tolu, E., Melis, F., Caria, M.A., Sechi, G.P., Riu, P.L.D., 1986. Postrotatory Nystagmus During Phenytoin Treatment. *Epilepsia* 27, 385–390. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1986.tb03557.x>
- Manabe, Y., Kurokawa, T., Saito, T., Saito, H., 1995. Vestibular dysfunction in noise induced hearing loss. *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* 519, 262–264.
- Mangiardi, D.A., McLaughlin-Williamson, K., May, K.E., Messana, E.P., Mountain, D.C., Cotanche, D.A., 2004. Progression of hair cell ejection and molecular markers of apoptosis in the avian cochlea following gentamicin treatment. *J. Comp. Neurol.* 475, 1–18. <https://doi.org/10.1002/cne.20129>
- Martínez-Rodríguez, R., García Lorenzo, J., Bellido Peti, J., Palou Redorta, J., Gómez Ruiz, J.J., Villavicencio Mavrich, H., 2007. Loop diuretics and ototoxicity. *Actas Urol. Esp.* 31, 1189–1192.
- Masuda, Y., Yasoshima, M., Nakayama, N., 1986. Early, selective and reversible suppression of cytochrome P-450-dependent monooxygenase of liver microsomes following the administration of low doses of carbon disulfide in mice. *Biochem. Pharmacol.* 35, 3941–3947.
- 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>
- McCabe, B.F., Lawrence, M., 1958. The effects of intense sound on the non-auditory labyrinth. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 49, 147–157.
- McFadden, D., 1986. The Curious Half-Octave Shift: Evidence for a Basalward Migration of the Traveling-Wave Envelope with Increasing Intensity, in: *Basic and Applied Aspects of Noise-Induced Hearing Loss*, NATO ASI Series. Springer, Boston, MA, pp. 295–312. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5176-4_21

- McKee, R., 1942. A quantitative microchemical colorimetric determination of CS₂ in air, water and biological materials. *J Ind Hyg Toxicol* 151–158.
- McKenna, M.J., DiStefano, V., 1977a. Carbon disulfide. I. The metabolism of inhaled carbon disulfide in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 202, 245–252.
- McKenna, M.J., DiStefano, V., 1977b. Carbon disulfide. II. A proposed mechanism for the action of carbon disulfide on dopamine beta-hydroxylase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 202, 253–266.
- Meiteles, L.Z., Raphael, Y., 1994. Scar formation in the vestibular sensory epithelium after aminoglycoside toxicity. *Hear. Res.* 79, 26–38.
- Meyer, R.E., Aldrich, T.E., Easterly, C.E., 1989. Effects of noise and electromagnetic fields on reproductive outcomes. *Environ. Health Perspect.* 81, 193–200.
- Mills, J.H., 1973a. Threshold shifts produced by exposure to noise in chinchillas with noise-induced hearing losses. *J. Speech Hear. Res.* 16, 700–708.
- Mills, J.H., 1973b. Temporary and permanent threshold shifts produced by nine-day exposures to noise. *J. Speech Hear. Res.* 16, 426–438.
- Mills, J.H., Adkins, W.Y., Gilbert, R.M., 1981. Temporary threshold shifts produced by wideband noise. *J. Acoust. Soc. Am.* 70, 390–396.
- Mills, J.H., Gilbert, R.M., Adkins, W.Y., 1979. Temporary threshold shifts in humans exposed to octave bands of noise for 16 to 24 hours. *J. Acoust. Soc. Am.* 65, 1238–1248.
- Møller, A.R., 2006. *Hearing: Anatomy, Physiology, and Disorders of the Auditory System.* Academic Press.
- Monaco, S., Wongmongkolrit, T., Shearson, C.M., Patton, A., Schaetzle, B., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P., Sayre, L.M., 1990. Giant axonopathy characterized by intermediate location of axonal enlargements and acceleration of neurofilament transport. *Brain Res.* 519, 73–81.
- Montaguti, M., Brandolini, C., Ferri, G.G., Hatzopoulos, S., Prete, A., Pession, A., 2002. Cisplatin and carboplatin-induced ototoxicity in children: clinical aspects and perspectives for prevention. *Acta Otorhinolaryngol. Ital. Organo Uff. Della Soc. Ital. Otorinolaringol. E Chir. Cerv.-facc.* 22, 14–18.
- Moorman, M.P., Sills, R.C., Collins, B.J., Morgan, D.L., 1998. Carbon disulfide neurotoxicity in rats: II. Toxicokinetics. *Neurotoxicology* 19, 89–97.
- Morata, T., 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.
- Morata, T.C., 1989. Study of the effects of simultaneous exposure to noise and carbon disulfide on workers' hearing. *Scand. Audiol.* 18, 53–58.
- 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.
- Morton, D.B., Griffiths, P.H., 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet. Rec.* 116, 431–436.
- Moschovakis, A.K., 1997. The neural integrators of the mammalian saccadic system. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 2, d552-577.
- Moser, T., Predoehl, F., Starr, A., 2013. Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. *Otol. Neurotol.* 34. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e3182814d4a>
- Moser, V.C., Phillips, P.M., Morgan, D.L., Sills, R.C., 1998. Carbon disulfide neurotoxicity in rats: VII. Behavioral evaluations using a functional observational battery. *Neurotoxicology* 19, 147–157.
- Müller, M., 1991. Frequency representation in the rat cochlea. *Hear. Res.* 51, 247–254.

- Mulroy, M.J., Henry, W.R., McNeil, P.L., 1998. Noise-induced transient microlesions in the cell membranes of auditory hair cells. *Hear. Res.* 115, 93–100.
- Mulroy, M.J., Whaley, E.A., 1984. Structural changes in auditory hairs during temporary deafness. *Scan. Electron Microsc.* 831–840.
- Münzel, T., Gori, T., Babisch, W., Basner, M., 2014. Cardiovascular effects of environmental noise exposure. *Eur. Heart J.* 35, 829–836. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu030>
- 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.
- Murofushi, T., Matsuzaki, M., Wu, C.H., 1999. Short tone burst-evoked myogenic potentials on the sternocleidomastoid muscle: are these potentials also of vestibular origin? *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 125, 660–664.

N

- Nicotera, T.M., Hu, B.H., Henderson, D., 2003. The Caspase Pathway in Noise-Induced Apoptosis of the Chinchilla Cochlea. *JARO J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 4, 466–477. <https://doi.org/10.1007/s10162-002-3038-2>
- Nies, E., 2012. Ototoxic Substances at the Workplace: a Brief Update. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 63, 147–152. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2199>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(93\)90034-L](https://doi.org/10.1016/0892-0362(93)90034-L)
- Nikolov, Z., 1974. Hearing reduction caused by manganese and noise. *JFORL J. Francais Oto-Rhino-Laryngol. Audiophonol. Chir. Maxillo-Faciale* 23, 231–234.
- Nordmann, A., Bohne, B., Harding, G., 2000. Histopathological differences between temporary and permanent threshold shift. *Hear Res.* 2000 Jan;139(1-2):13-30.
- 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. (Stockh.)* 111, 36–43.

O

- Odkvist, L., Bergholtz, L., Larsby, B., Tham, R., Eriksson, B., Edling, C., 1985. Solvent-induced central nervous system disturbances appearing in hearing and vestibulo-oculomotor test. *Clin. Ecol.* 3(3), 149–153.
- 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.
- Oghalai, J.S., Brownell, W.E., 2012. Chapter 44. Anatomy & Physiology of the Ear, in: Lalwani, A.K. (Ed.), *CURRENT Diagnosis & Treatment in Otolaryngology—Head & Neck Surgery*. The McGraw-Hill Companies, New York, NY.
- Ohlemiller, K.K., Wright, J.S., Dugan, L.L., 1999. Early elevation of cochlear reactive oxygen species following noise exposure. *Audiol. Neurootol.* 4, 229–236. <https://doi.org/10.1159/000013846>
- Oosterveld, W.J., Polman, A.R., Schoonheydt, J., 1982. Vestibular implications of noise-induced hearing loss. *Br. J. Audiol.* 16, 227–232.

- Opacka, J., Baranski, B., Wrońska-Nofer, T., 1984. Effect of alcohol intake on some disturbances induced by chronic exposure to carbon disulphide in rats. I. Behavioural alterations. *Toxicol. Lett.* 23, 91–97.
- Ossenkopp, K.P., Prkacin, A., Hargreaves, E.L., 1990. Sodium arsenilate-induced vestibular dysfunction in rats: effects on open-field behavior and spontaneous activity in the automated digiscan monitoring system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36, 875–881.

P

- Pahor, A.L., 1979. Blast injuries to the ear: an historical and literary review. *J. Laryngol. Otol.* 93, 225–251.
- Paige, G.D., 1983a. Vestibuloocular reflex and its interactions with visual following mechanisms in the squirrel monkey. I. Response characteristics in normal animals. *J. Neurophysiol.* 49, 134–151. <https://doi.org/10.1152/jn.1983.49.1.134>
- Paige, G.D., 1983b. Vestibuloocular reflex and its interactions with visual following mechanisms in the squirrel monkey. II. Response characteristics and plasticity following unilateral inactivation of horizontal canal. *J. Neurophysiol.* 49, 152–168. <https://doi.org/10.1152/jn.1983.49.1.152>
- Paige, G.D., 1991. Linear vestibulo-ocular reflex (LVOR) and modulation by vergence. *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* 481, 282–286.
- Pappolla, M., Penton, R., Weiss, H.S., Miller, C.H., Sahenk, Z., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P., 1987. Carbon disulfide axonopathy. Another experimental model characterized by acceleration of neurofilament transport and distinct changes of axonal size. *Brain Res.* 424, 272–280.
- Pelekis, M., Krishnan, K., 1997. Assessing the relevance of rodent data on chemical interactions for health risk assessment purposes: a case study with dichloromethane-toluene mixture. *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP* 25, 79–86. <https://doi.org/10.1006/rtph.1996.1075>
- Perez, R., Freeman, S., Cohen, D., Sohmer, H., 2002. Functional Impairment of the Vestibular End Organ Resulting From Impulse Noise Exposure. *The Laryngoscope* 112, 1110–1114. <https://doi.org/10.1097/00005537-200206000-00032>
- Pickles, J.O., Comis, S.D., Osborne, M.P., 1984. Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hear. Res.* 15, 103–112. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(84\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0378-5955(84)90041-8)
- Pilz, P.K., Ostwald, J., Kreiter, A., Schnitzler, H.U., 1997. Effect of the middle ear reflex on sound transmission to the inner ear of rat. *Hear. Res.* 105, 171–182.
- Ping Yang, W., Henderson, D., Hua Hu, B., Nicotera, T.M., 2004. Quantitative analysis of apoptotic and necrotic outer hair cells after exposure to different levels of continuous noise. *Hear. Res.*, 40th Inner Ear Biology (IEB) Workshop 196, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.04.015>
- Pla, C.M., 2011. *Fisiología Médica: Del razonamiento fisiológico al razonamiento clínico.* Editorial Médica Panamericana S.A.
- Pocock, G., Richards, C.D., 2005. *Fisiología humana: la base de la medicina.* Elsevier España.
- Pompeiano, O., 2006. The vestibulo-ocular and the vestibulospinal reflexes: noradrenergic influences on the plastic changes which affect the cerebellar cortex during vestibular adaptation. *Arch. Ital. Biol.* 144, 197–253.

- Pouyatos, B., Gearhart, C.A., Fechter, L.D., 2005. Acrylonitrile potentiates hearing loss and cochlear damage induced by moderate noise exposure in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.015>
- 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. *Hear. Res.* 189, 83–91. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(03\)00394-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(03)00394-0)
- Precht, W., 1979. Vestibular mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* 2, 265–289. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.02.030179.001405>
- Prosen, C.A., Petersen, M.R., Moody, D.B., Stebbins, W.C., 1978. Auditory thresholds and kanamycin-induced hearing loss in the guinea pig assessed by a positive reinforcement procedure. *J. Acoust. Soc. Am.* 63, 559–566.
- 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.* JAT 7, 55–61.
- Puel, J., Ruel, J., Gervais d'Aldin, G., Pujol R., 1998. Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss. *Neuroreport.* 9(9):2109-14.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., 2007. *Neurociencia*. Editorial Médica Panamericana S.A.
- Pyykkö, I., Aalto, H., Ylikoski, J., 1989. Does impulse noise induce vestibular disturbances? *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* 468, 211–216.

Q

- Quinn, K.J., Rude, S.A., Brettler, S.C., Baker, J.F., 1998. Alterations in rat horizontal vestibulo-ocular reflex phase as a function of orientation in gravity. *J. Gravitational Physiol. J. Int. Soc. Gravitational Physiol.* 5, 41–49.

R

- Rancz, E.A., Moya, J., Drawitsch, F., Brichta, A.M., Canals, S., Margrie, T.W., 2015. Widespread Vestibular Activation of the Rodent Cortex. *J. Neurosci.* 35, 5926–5934. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1869-14.2015>
- Raphael, Y., Altschuler, R.A., 1991. Reorganization of cytoskeletal and junctional proteins during cochlear hair cell degeneration. *Cell Motil. Cytoskeleton* 18, 215–227. <https://doi.org/10.1002/cm.970180307>
- Rebert, C.S., Becker, E., 1986. Effects of inhaled carbon disulfide on sensory-evoked potentials of Long-Evans rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8, 533–41.
- Rebert, C.S., Sorenson, S.S., Pryor, G.T., 1986. Effects of intraperitoneal carbon disulfide on sensory-evoked potentials of Fischer-344 rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8, 543–549.
- Ricci, A.J., Cochran, S.L., Rennie, K.J., Correia, M.J., 1997. Vestibular type I and type II hair cells. 2: Morphometric comparisons of dissociated pigeon hair cells. *J. Vestib. Res. Equilib. Orientat.* 7, 407–420.
- Richter, R., 1945. Degeneration of the basal ganglia in monkeys from chronic carbon disulfide poisoning. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 4, 324–353.
- Robertson, D., 1983. Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 9, 263–278.

- Robles, L., Ruggero, M.A., 2001. Mechanics of the Mammalian Cochlea. *Physiol. Rev.* 81, 1305–1352.
- Roh, J., Kim, C.N., Lim, N.G., Chang, J.H., Cho, Y.B., 1999. Simultaneous analysis of urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid and thiocarbamide as a biological exposure index for carbon disulfide exposure. *Yonsei Med. J.* 40, 265–272. <https://doi.org/10.3349/ymj.1999.40.3.265>
- Rosowski, J.J., 1991. The effects of external- and middle-ear filtering on auditory threshold and noise-induced hearing loss. *J. Acoust. Soc. Am.* 90, 124–135.
- Rúa, F., Buffard, M., Sedó-Cabezón, L., Hernández-Mir, G., Torre, A. de la, Saldaña-Ruíz, S., Chabbert, C., Bayona, J.M., Messeguer, A., Llorens, J., 2013. Vestibulotoxic Properties of Potential Metabolites of Allylnitrile. *Toxicol. Sci.* 135, 182–192. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft127>
- Ruan, Q., Ao, H., He, J., Chen, Z., Yu, Z., Zhang, R., Wang, J., Yin, S., 2014. Topographic and quantitative evaluation of gentamicin-induced damage to peripheral innervation of mouse cochleae. *Neurotoxicology* 40, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.11.002>
- Rubel, E.W., Furrer, S.A., Stone, J.S., 2013. A brief history of hair cell regeneration research and speculations on the future. *Hear. Res.* 297, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.12.014>
- Ruel, J., Wang, J., Rebillard, G., Eybalin, M., Lloyd, R., Pujol, R., Puel, J.-L., 2007. Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear. Res.* 227, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2006.08.017>
- Ruijten, M.W., Sallé, H.J., Verberk, M.M., 1993. Verification of effects on the nervous system of low level occupational exposure to CS₂. *Br. J. Ind. Med.* 50, 301–307.
- Rybak, L.P., Ramkumar, V., 2007. Ototoxicity. *Kidney Int.* 72, 931–935. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002434>

S

- Saldaña-Ruíz, S., Hernández-Mir, G., Sedó-Cabezón, L., Cutillas, B., Llorens, J., 2012. Vestibular toxicity of cis-2-pentenenitrile in the rat. *Toxicol. Lett.* 211, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.04.010>
- Salt, A.N., 2004. Acute endolymphatic hydrops generated by exposure of the ear to nontraumatic low-frequency tones. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 5, 203–214. <https://doi.org/10.1007/s10162-003-4032-z>
- Salt, A.N., Hullar, T.E., 2010. Responses of the ear to low frequency sounds, infrasound and wind turbines. *Hear. Res.* 268, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.06.007>
- Sandrini, G., Bosso, A., Biscaldi, G., Malamani, T., Franco, G., Grampella, D., Alfonsi, E., Moglia, A., Arrigo, A., 1983. Electromyographic investigation in early diagnosis of carbon disulphide neuropathy: a study on 216 workers with different degrees of exposure. *G. Ital. Med. Lav.* 5, 199–202.
- Schacht, J., Hawkins, J.E., 2006. Sketches of othistory. Part 11: Ototoxicity: drug-induced hearing loss. *Audiol. Neurootol.* 11, 1–6. <https://doi.org/10.1159/000088850>
- Schacht, J., Talaska, A.E., Rybak, L.P., 2012. Cisplatin and Aminoglycoside Antibiotics: Hearing Loss and Its Prevention. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* 295, 1837–1850. <https://doi.org/10.1002/ar.22578>
- Schust, M., 2004. Effects of low frequency noise up to 100 Hz. *Noise Health* 6, 73–85.

- Schwartz, I.R., Ryan, A.F., 1986. Amino acid labeling patterns in the efferent innervation of the cochlea: an electron microscopic autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.* 246, 500–512. <https://doi.org/10.1002/cne.902460407>
- Sedó-Cabezón, L. *Estudi d'un Model d'Exposició Subcrònica a IDPN en la Rata: Patologia Vestibular i Reparació*, 2015. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
- Sedó-Cabezón, L., Boadas-Vaello, P., Soler-Martín, C., Llorens, J., 2014. Vestibular damage in chronic ototoxicity: A mini-review. *NeuroToxicology, neurodevelopmental basis of Health and disease. The 14th Meeting of the International Neurotoxicology Association* 43, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.11.009>
- Sedó-Cabezón, L., Jedynak, P., Boadas-Vaello, P., Llorens, J., 2015. Transient alteration of the vestibular calyceal junction and synapse in response to chronic ototoxic insult in rats. *Dis. Model. Mech.* 8, 1323–1337. <https://doi.org/10.1242/dmm.021436>
- Sekiya, T., Kojima, K., Matsumoto, M., Holley, M.C., Ito, J., 2007. Rebuilding lost hearing using cell transplantation. *Neurosurgery* 60, 417–433; discussion 433. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000249189.46033.42>
- Seoane, A., Apps, R., Balbuena, E., Herrero, L., Llorens, J., 2005. Differential effects of trans-crotonitrile and 3-acetylpyridine on inferior olive integrity and behavioural performance in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 22, 880–894. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04230>.
- Seoane, A., Demêmes, D., Llorens, J., 2001. Relationship between insult intensity and mode of hair cell loss in the vestibular system of rats exposed to 3,3'-iminodipropionitrile. *J. Comp. Neurol.* 439, 385–399.
- Seoane, A., Llorens, J., 2005. Extruding auditory hair cells in rats exposed to subchronic 3,3'-iminodipropionitrile. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 571–574. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.12.021>
- Shaffer, L.A., Withnell, R.H., Dhar, S., Lilly, D.J., Goodman, S.S., Harmon, K.M., 2003. Sources and mechanisms of DPOAE generation: implications for the prediction of auditory sensitivity. *Ear Hear.* 24, 367–379. <https://doi.org/10.1097/01.AUD.0000090439.16438.9F>
- Shi, X., Gillespie, P.G., Nuttall, A.L., 2005. Na⁺ influx triggers bleb formation on inner hair cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C1332–1341. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00522.2004>
- Sills, R.C., Harry, G.J., Morgan, D.L., Valentine, W.M., Graham, D.G., 1998. Carbon disulfide neurotoxicity in rats: V. Morphology of axonal swelling in the muscular branch of the posterior tibial nerve and spinal cord. *Neurotoxicology* 19, 117–127.
- Sills, R.C., Valentine, W.M., Moser, V., Graham, D.G., Morgan, D.L., 2000. Characterization of carbon disulfide neurotoxicity in C57BL6 mice: behavioral, morphologic, and molecular effects. *Toxicol. Pathol.* 28, 142–148. <https://doi.org/10.1177/019262330002800118>
- Silverthorn, D.U., 2008. *Fisiología Humana. Un enfoque integrado 4a edición*. Ed. Médica Panamericana.
- Simmons, D.D., Liberman, M.C., 1988a. Afferent innervation of outer hair cells in adult cats: I. Light microscopic analysis of fibers labeled with horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 270, 132–144. <https://doi.org/10.1002/cne.902700111>
- Simmons, D.D., Liberman, M.C., 1988b. Afferent innervation of outer hair cells in adult cats: II. Electron microscopic analysis of fibers labeled with horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 270, 145–154. <https://doi.org/10.1002/cne.902700112>
- Simmons, D.D., Manson-Gieseke, L., Hendrix, T.W., McCarter, S., 1990. Reconstructions of efferent fibers in the postnatal hamster cochlea. *Hear. Res.* 49, 127–139.

- Simon, P., Nicot, T., 1993. Automated column-switching high-performance liquid chromatography for the determination of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid in urine. *J. Chromatogr.* 620, 47–53.
- Slepecky, N.B., 1996. Structure of the Mammalian Cochlea, in: *The Cochlea*, Springer Handbook of Auditory Research. Springer, New York, NY, pp. 44–129. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0757-3_2
- Smith, C.A., Sjostrand, F.S., 1961. Structure of the nerve endings on the external hair cells of the guinea pig cochlea as studied by serial sections. *J. Ultrastruct. Res.* 5, 523–556.
- Smookler, H.H., Buckley, J.P., 1969. Relationships between brain catecholamine synthesis, pituitary adrenal function and the production of hypertension during prolonged exposure to environmental stress. *Int. J. Neuropharmacol.* 8, 33–41.
- Snyder-Halpern, R., 1985. The effect of critical care unit noise on patient sleep cycles. *CCQ.* 7, 41–51.
- Sobkowicz, H.M., August, B.K., Slapnick, S.M., 1997. Cellular interactions as a response to injury in the organ of Corti in culture. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 15, 463–485.
- Soler-Martín, C., Díez-Padrisa, N., Boadas-Vaello, P., Llorens, J., 2007. Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs, and frogs. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 96, 123–132. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl186>
- Sousa, A.D., Andrade, L.R., Salles, F.T., Pillai, A.M., Buttermore, E., Bhat, M.A., Kachar, B., 2009. The Septate Junction Protein Caspr is Required for Structural Support and Retention of KCNQ4 at Calyceal Synapses of Vestibular Hair Cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3103–3108. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4868-08.2009>
- Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., 1977a. Neurotoxic properties of certain aliphatic hexacarbons. *Proc. R. Soc. Med.* 70, 37–39.
- Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., 1977b. Ultrastructural studies of the dying-back process. III. The evolution of experimental peripheral giant axonal degeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 36, 276–299.
- Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., 1977c. Ultrastructural studies of the dying-back process. IV. Differential vulnerability of PNS and CNS fibers in experimental central-peripheral distal axonopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 36, 300–320.
- Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., 1980. Recent morphological studies of toxic neuropathy. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* 8, 3–11.
- Staecker, H., Van De Water, T.R., 1998. Factors controlling hair-cell regeneration/repair in the inner ear. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 480–487.
- Stanfield, C., 2011. *Principios de fisiología humana*, 4th ed. Pearson.
- Stevin, G.O., 1986. Simulation of the Middle Ear Acoustic Reflex Applied to Damage-Risk for Hearing Produced by Burst Fire, in: *Basic and Applied Aspects of Noise-Induced Hearing Loss*, NATO ASI Series. Springer, Boston, MA, pp. 271–280. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5176-4_19
- Stewart, C., Yu, Y., Huang, J., Maklad, A., Tang, X., Allison, J., Mustain, W., Zhou, W., Zhu, H., 2016. Effects of high intensity noise on the vestibular system in rats. *Hear. Res.* 335, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.03.002>
- Stewart, C.E., Kanicki, A.C., Altschuler, R.A., King, W.M., 2017. Vestibular short latency evoked potential (VsEP) is abolished by low frequency noise exposure in rats. *J. Neurophysiol.* jn.00668.2017. <https://doi.org/10.1152/jn.00668.2017>
- Steyger, P.S., Burton, M., Hawkins, J.R., Schuff, N.R., Baird, R.A., 1997. Calbindin and parvalbumin are early markers of non-mitotically regenerating hair cells in the bullfrog vestibular otolith organs. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 15, 417–432.

- Straka, H., Vibert, N., Vidal, P.P., Moore, L.E., Dutia, M.B., 2005. Intrinsic membrane properties of vertebrate vestibular neurons: function, development and plasticity. *Prog. Neurobiol.* 76, 349–392. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.10.002>
- Stypulkowski, P.H., 1990. Mechanisms of salicylate ototoxicity. *Hear. Res.* 46, 113–145.
- Subramaniam, M., Campo, P., Henderson, D., 1991. Development of resistance to hearing loss from high frequency noise. *Hear. Res.* 56, 65–68.
- Sułkowski, W.J., Kowalska, S., Sobczak, Z., Józwiak, Z., 1992. The statokinesiometry in evaluation of the balance system in persons with chronic carbon disulphide intoxication. *Pol. J. Occup. Med. Environ. Health* 5, 265–276.
- Sulsky, S., Hooven, F., Burch, M., Mundt, K., 2002. Critical review of the epidemiological literature on the potential cardiovascular effects of occupational carbon disulfide exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 75, 365–380. <https://doi.org/10.1007/s00420-001-0309-x>
- Suzuki, M., Yamasoba, T., Ishibashi, T., Miller, J.M., Kaga, K., 2002. Effect of noise exposure on blood-labyrinth barrier in guinea pigs. *Hear. Res.* 164, 12–18.

T

- Tabuchi, K., Pak, K., Chavez, E., Ryan, A.F., 2007. Role of inhibitor of apoptosis protein in gentamicin-induced cochlear hair cell damage. *Neuroscience* 149, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.06.061>
- Takebayashi, T., Omae, K., Ishizuka, C., Nomiyama, T., Sakurai, H., 1998. Cross sectional observation of the effects of carbon disulphide on the nervous system, endocrine system, and subjective symptoms in rayon manufacturing workers. *Occup. Environ. Med.* 55, 473–479.
- Takimoto, Y., Imai, T., Kondo, M., Hanada, Y., Uno, A., Ishida, Y., Kamakura, T., Kitahara, T., Inohara, H., Shimada, S., 2016. Cisplatin-induced toxicity decreases the mouse vestibulo-ocular reflex. *Toxicol. Lett.* 262, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.09.009>
- Tamura, H., Ohgami, N., Yajima, I., Iida, M., Ohgami, K., Fujii, N., Itabe, H., Kusudo, T., Yamashita, H., Kato, M., 2012. Chronic Exposure to Low Frequency Noise at Moderate Levels Causes Impaired Balance in Mice. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039807>
- Tascioglu, A.B., 2005. Brief review of vestibular system anatomy and its higher order projections. *J Neuroanat* 4, 24–27.
- Tham, R., Larsby, B., Eriksson, B., Bunnfors, I., Odkvist, L., Liedgren, C., 1982. Electronystagmographic findings in rats exposed to styrene or toluene. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 93, 107–112.
- The National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Program: Noise and Hearing Loss, 1990. URL <https://consensus.nih.gov/1990/1990NoiseHearingLoss076html.htm> (accessed 12.19.17).
- Thienpont, L.M., Depourcq, G.C., Nelis, H.J., De Leenheer, A.P., 1990. Liquid chromatographic determination of 2-thioxothiazolidine-4-carboxylic acid isolated from urine by affinity chromatography on organomercurial agarose gel. *Anal. Chem.* 62, 2673–2675. <https://doi.org/10.1021/ac00223a005>
- Tighilet, B., Leonard, J., Bernard-Demanze, L., Lacour, M., 2015. Comparative analysis of pharmacological treatments with N-acetyl-DL-leucine (Tanganil) and its two isomers (N-acetyl-L-leucine and N-acetyl-D-leucine) on vestibular compensation: Behavioral

- investigation in the cat. *Eur. J. Pharmacol.* 769, 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.041>
- Tilney, L.G., Tilney, M.S., 1986. Functional organization of the cytoskeleton. *Hear. Res.* 22, 55–77.
- Tilson, H.A., Mitchell, C.L., 1984. Neurobehavioral techniques to assess the effects of chemicals on the nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24, 425–450. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.24.040184.002233>
- Tolonen, M., Hänninen, H., 1978. Psychological tests specific to individual carbon disulfide exposure. *Scand. J. Psychol.* 19, 241–245.
- Tresguerres, J.A.F., Hernández, J.Á.F.-T., 2006. *Fisiología humana*. McGraw-Hill Interamericana.

U

- Usami, S., Takumi, Y., Fujita, S., Shinkawa, H., Hosokawa, M., 1997. Cell death in the inner ear associated with aging is apoptosis? *Brain Res.* 747, 147–150.

V

- van den Berge, H., Kingma, H., Kluge, C., Marres, E.H., 1990. Electrophysiological aspects of the middle ear muscle reflex in the rat: latency, rise time and effect on sound transmission. *Hear. Res.* 48, 209–219.
- van den Berge, H., van der Wal, J.C., 1990. The innervation of the middle ear muscles of the rat. *J. Anat.* 170, 99–109.
- van den Berge, H., Wirtz, P., 1989a. Detailed morphology of the stapedius muscle of the rat. An integrated light microscopical, morphometrical, histochemical, immunohistochemical and electron microscopical study in relation to function. *J. Anat.* 166, 157–169.
- van den Berge, H., Wirtz, P., 1989b. Detailed morphology of the tensor tympani muscle of the rat. An integrated light microscopical, morphometrical, histochemical, immunohistochemical and electron microscopical study in relation to function. *J. Anat.* 164, 215–228.
- Vasilescu, C., Florescu, A., 1980. Clinical and electrophysiological studies of carbon disulphide polyneuropathy. *J. Neurol.* 224, 59–70.
- Vasiljeva, I., 1973. Effect of low concentrations of carbon disulfide and hydrogen sulfide on the menstrual function in women and on the estrous cycle under experimental conditions. *Gig Sanit* 38(7), 24–27.
- Venet, T., Campo, P., Thomas, A., Cour, C., Rieger, B., Cosnier, F., 2015. The tonotopicity of styrene-induced hearing loss depends on the associated noise spectrum. *Neurotoxicol. Teratol.* 48, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.02.003>
- 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>
- Vernon, J., Brummett, R., Brown, R., 1977. Noise trauma induced in the presence of loop-inhibiting diuretics. *Trans. Sect. Otolaryngol. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* 84, 407–413.

- von Békésy, G., 1935. Über akustische Reizung des Vestibularapparates. *Pflüger's Arch Ges Physiol* 236, 59–76.
- von Békésy, G., 1960. *Experiments in Hearing.*, in: McGraw-Hill. New-York.

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>

W

- Wang, J., Ladrech, S., Pujol, R., Brabet, P., Van De Water, T.R., Puel, J.-L., 2004. Caspase inhibitors, but not c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor treatment, prevent cisplatin-induced hearing loss. *Cancer Res.* 64, 9217–9224. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1581>
- Wang, J.-M., Li, B.-C., Chen, L., Wang, G.-B., Sun, H., Chen, Z., Zhang, L.-C., 2006. Cell death-inducing DFF45-like effector may take part in neuronal apoptosis of the lumbar spinal cord after sciatic nerve injury caused by a firearm. *Mil. Med.* 171, 793–799.
- Wang, Y., Hirose, K., Liberman, M.C., 2002. Dynamics of Noise-Induced Cellular Injury and Repair in the Mouse Cochlea. *JARO J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 3, 248–268. <https://doi.org/10.1007/s101620020028>
- Warr, W.B., Guinan, J.J., 1979. Efferent innervation of the organ of corti: two separate systems. *Brain Res.* 173, 152–155. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)91104-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)91104-1)
- Wathier, L., Venet, T., Thomas, A., Nunge, H., Bonfanti, E., Cosnier, F., Parietti-Winkler, C., Campo, P., Tsan, P., Bouguet-Bonnet, S., Gansmüller, A., 2016. Membrane fluidity does not explain how solvents act on the middle-ear reflex. *Neurotoxicology* 57, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.08.001>
- Waye, K.P., Bengtsson, J., Rylander, R., Hucklebridge, F., Evans, P., Clow, A., 2002. Low frequency noise enhances cortisol among noise sensitive subjects during work performance. *Life Sci.* 70, 745–758.
- Wennmo, C., Henriksson, N.G., Pyykkö, I., Schalén, L., 1981. Eye-velocity programming in brain-stem disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 374, 774–783.
- Wersäll, J., Bagger-Sjöbäck, D., 1974. Morphology of the Vestibular Sense Organ, in: *Vestibular System Part 1: Basic Mechanisms, Handbook of Sensory Physiology.* Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 123–170. https://doi.org/10.1007/978-3-642-65942-3_4
- Wersäll, J., Björkroth, B., Flock, A., Lundquist, P.G., 1973. Experiments on ototoxic effects of antibiotics. *Adv. Otorhinolaryngol.* 20, 14–41.
- Whitworth, C.A., Hudson, T.E., Rybak, L.P., 1999. The effect of combined administration of cadmium and furosemide on auditory function in the rat. *Hear. Res.* 129, 61–70.
- Wright, A., 1981a. Scanning electron microscopy of the normal human cochlea. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 6, 237–244.
- Wright, A., 1981b. Scanning electron microscopy of the human cochlea--the organ of Corti. *Arch. Otorhinolaryngol.* 230, 11–19.

X

Xu, L., Zhou, L., Li, P., 2012. CIDE proteins and lipid metabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1094–1098. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.241489>

Y

Yamakura, T., Sakimura, K., Shimoji, K., 2000. The stereoselective effects of ketamine isomers on heteromeric N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Anesth. Analg.* 91, 225–229.

Yamamura, K., Terayama, K., Yamamoto, N., Kohyama, A., Kishi, R., 1989. Effects of acute lead acetate exposure on adult guinea pigs: electrophysiological study of the inner ear. *Fundam. Appl. Toxicol. Off. J. Soc. Toxicol.* 13, 509–515.

Yamasoba, T., Goto, Y.-I., Komaki, H., Mimaki, M., Sudo, A., Suzuki, M., 2006. Cochlear damage due to germanium-induced mitochondrial dysfunction in guinea pigs. *Neurosci. Lett.* 395, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.10.045>

Ylikoski, J., 1987. Impulse noise induced damage in the vestibular end organs of the guinea pig. A light microscopic study. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 103, 415–421.

Ylikoski, J., Juntunen, J., Matikainen, E., Ylikoski, M., Ojala, M., 1988. Subclinical vestibular pathology in patients with noise-induced hearing loss from intense impulse noise. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 105, 558–563.

Yonezawa, T., Kurata, R., Kimura, M., Inoko, H., 2011. Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism. *Mol. Biosyst.* 7, 91–100. <https://doi.org/10.1039/c0mb00099j>

Young, J.S., Fechter, L.D., 1986. Trimethyltin exposure produces an unusual form of toxic auditory damage in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82, 87–93.

Z

Zenner, H.P., Reuter, G., Zimmermann, U., Gitter, A.H., Fermin, C., LePage, E.L., 1994. Transitory endolymph leakage induced hearing loss and tinnitus: depolarization, biphasic shortening and loss of electromotility of outer hair cells. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 251, 143–153.

Zhao, Y., Yamoah, E.N., Gillespie, P.G., 1996. Regeneration of broken tip links and restoration of mechanical transduction in hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15469–15474.

Zheng, G., Hu, B.H., 2012. Cell-cell junctions: a target of acoustic overstimulation in the sensory epithelium of the cochlea. *BMC Neurosci.* 13, 71. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-71>

Zhu, H., Tang, X., Wei, W., Maklad, A., Mustain, W., Rabbitt, R., Highstein, S., Allison, J., Zhou, W., 2014. Input-output functions of vestibular afferent responses to air-conducted clicks in rats. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 15, 73–86. <https://doi.org/10.1007/s10162-013-0428-6>

Zhu, H., Tang, X., Wei, W., Mustain, W., Xu, Y., Zhou, W., 2011. Click-evoked responses in vestibular afferents in rats. *J. Neurophysiol.* 106, 754–763. <https://doi.org/10.1152/jn.00003.2011>

Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R., 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 92, 57–70.

Zimmermann, K.C., Green, D.R., 2001. How cells die: apoptosis pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, S99-103.

Zwislocki, J.J., 1984. How OHC lesions can lead to neural cochlear hypersensitivity. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 97, 529–534.

URLgrafia

Dreamstime. URL: <https://www.dreamstime.com/>

Spring. URL: <http://droualb.faculty.mjc.edu/>

http://droualb.faculty.mjc.edu/Lecture%20Notes/Unit%205/special_senses%20Spring%202007%20with%20figures.htm

Voyage au centre de l'audition. URL: <http://www.cochlea.eu/>

What – When – How. URL: <http://what-when-how.com/neuroscience/auditory-and-vestibular-systems-sensory-system-part-1>

9. ANNEXES

9.1 Annexe 1: Protocole de surveillance des animaux

Dans toutes les procédures expérimentales, et en particulier celles avec une sévérité moyenne ou élevée, un protocole de surveillance de la santé générale des animaux doit être inclus.

L'un des protocoles les plus utiles est celui proposé par Morton et Griffiths, 1985. Ce protocole de surveillance permet de décrire la douleur causée par une procédure.

Le protocole de surveillance des animaux était le suivant:

Feuille d'observation des animaux après administration d'un toxique

Toxique étudié : Disulfure de carbone (CS₂) **Voie d'administration :** Voie inhalatoire

Protocole d'exposition : **Dose :**

Date d'exposition :

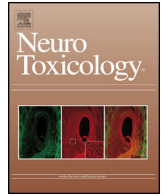
Evaluation des effets : Effet prononcé: +; Absence d'effet: -; effet modéré: +/- ; (seuls 4 rats/8 pourront être observés dans une cage d'exposition)

Nom de l'observateur et date observation :

	Dose														
	Au cours de l'exposition								1h après la fin d'exposition						
Rat															
Poils hérissés															
Yeux mi-clos															
Troubles respiratoires et durée cas échéant															
Signes d'agitation															
Tremblements															
Troubles de l'équilibre															
Mouvements de tête															
Commentaires															

Points limites procédure exposition du projet MCN-08 :

Points limites en cours d'exposition	Points limites après sortie des cages (1 h après environ)
<ul style="list-style-type: none"> - Dyspnée pendant au moins plusieurs minutes - Convulsions 	<ul style="list-style-type: none"> - Perte de poids de 20 % après 4 semaines d'exposition/groupe témoins



Full Length Article

Carbon disulfide potentiates the effects of impulse noise on the organ of Corti



Maria Carreres Pons^{a,c}, Monique Chalansonnet^a, Thomas Venet^a, Aurélie Thomas^a, Hervé Nunge^a, Lise Merlen^a, Frédéric Cosnier^a, Jordi Llorens^{c,d}, Pierre Campo^{a,b,*}

^a Institut National de Recherche et de Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, F-54519 Vandœuvre Cedex, France

^b DevAH EA 3450-Développement, Adaptation et Handicap, Régulations cardio-respiratoires et de la motricité-Université de Lorraine, F-54500 Vandœuvre, France

^c Departament de Ciències Fisiològiques and Institute of Neurosciences, Universitat de Barcelona, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

^d Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 December 2016

Received in revised form 7 February 2017

Accepted 7 February 2017

Available online 8 February 2017

Keywords:

Impulse noise

Carbon disulfide

Middle-ear reflex

Combined exposure

Rats

Risk assessment

ABSTRACT

Occupational noise can damage workers' hearing, and the phenomenon is even more dangerous when noise is associated with an ototoxic solvent. Aromatic solvents are known to provoke chemical-induced hearing loss, but little is known about the effects on hearing of carbon disulfide (CS₂) when combined with noise. Co-exposure to CS₂ and noise may have a harmful effect on hearing, but the mechanisms involved are not well understood. For instance, CS₂ is not thought to have a cochleotoxic effect, but rather it is thought to cause retrocochlear hearing impairment. In other words, CS₂ could have a distal neuropathic effect on the auditory pathway. However, a possible pharmacological effect of CS₂ on the central nervous system (CNS) has never been mentioned in the literature. The aim of this study was to assess, in rats, the effects of a noise (continuous vs. impulse), associated with a low concentration of CS₂ [(short-term threshold limit value) x 10 as a safety factor] on the peripheral auditory receptor. The noise, whatever its nature, was an octave band noise centered at 8 kHz, and the 250-ppm CS₂ exposure lasted 15 min per hour, 6 h per day, for 5 consecutive days. The impact of the different experimental conditions on hearing loss was assessed using distortion product oto-acoustic emissions and histological analyses. Although the LEX_{8h} (8-h time-weighted average exposure) for the impulse noise was lower (84 dB SPL) than that for the continuous noise (89 dB SPL), it appeared more damaging to the organ of Corti, in particular to the outer hair cells. CS₂ exposure alone did not have any effect on the organ of Corti, but co-exposure to continuous noise with CS₂ was less damaging than exposure to continuous noise alone. In contrast, the cochleo-traumatic effects of impulse noise were significantly enhanced by co-exposure to CS₂.

Therefore, CS₂ can clearly modulate the middle-ear reflex function. In fact, CS₂ may have two distinct effects: firstly, it has a pharmacological effect on the CNS, modifying the trigger of the acoustic reflex; and secondly, it can make the organ of Corti more susceptible to impulse noise. The pharmacological effects on the CNS and the effects of CS₂ on the organ of Corti are discussed to try to explain the overall effect of the solvent on hearing. Once again, the results reported in this article show that the temporal structure (continuous vs. impulse) of noise should be taken into consideration as a key parameter when establishing hearing conservation regulations.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: CNS, central nervous system; dB (A), decibel weighted A; dB SPL, decibel sound pressure level; DPOAEs, distortion product oto-acoustic emissions; FFT, fast fourier transform; LEX_{8h}, equivalent continuous noise level calculated over 8 h; MER, middle-ear reflex; NIHL, noise-induced hearing loss; IHC, inner hair cells; IS, internal standard; OHC, outer hair cells; SD, standard deviation; SDH, succinate dehydrogenase; SEM, scanning electron microscopy; STEL, short term exposure limit; TWA, time-weighted averages.

* Corresponding author at: Institut National de Recherche et de Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, F-54519 Vandœuvre Cedex, France.

E-mail address: pierre.campo@inrs.fr (P. Campo).

1. Introduction

Despite preventive regulations, noise-induced hearing loss (NIHL) remains a major occupational health hazard. Noise exposure in workplaces can be either due to continuous noise or to impulse noises. Impulse noises are characterized by high intensities over a short duration, and the stereociliae at the top of the hair cells are known to be particularly vulnerable to acoustic

injury from this type of noise (Hamernik et al., 1989). Impulse noise can provoke functional disruption of intercellular junctions in the sensory epithelium (Zheng and Hu, 2012). As far as the continuous noises are concerned, recent research has showed a possible disruption of the synaptic communication (Lieberman and Kujawa, 2017; Kobel et al., 2017; Moser et al., 2013). However, the authorities do not distinguish between noise types when formulating recommendations to protect workers against NIHL. Both European and American frameworks and guidance documents for hearing conservation in workers require noise exposure to remain within certain limits: $L_{EX,8h}$ and peak values (Directive 2003/10/EC; <http://www.worksafefbc.com>). The strategy used to assess noise-related danger relies on the equal energy principle over an 8-h workday ($L_{EX,8h}$), which presumes that hearing damage is mainly a function of the total acoustic energy received, not the pattern in which it arrives. Based on this assumption, the theory of conservation of acoustic energy (the 3-dB exchange rate in the European Union and the 5-dB exchange rate in the USA) should result in a constant hearing hazard whatever the type of noise. The maximum permissible noise exposure levels over an 8-h work shift are $L_{EX,8h} = 87$ dB(A) in the European Union, and 90 dB(A) in the USA, and occupational exposure to noise must therefore be maintained below these limits. For impulse noise, peak value limits is 140 dB(C) in the European Union.

While noise remains the predominant occupational hazard to hearing, there is growing evidence that a number of chemicals used in industry, such as organic solvents, may also affect hearing, or exacerbate the effects of occupational noise (Chen and Henderson, 2009; Campo et al., 2013). The toxicological effects of co-exposure to noise and chemicals are complex, but highly relevant when it comes to assessing worker risk. Co-exposures to noise and carbon disulfide (CS_2) are present in various industry sectors, but the most important use remains in the manufacturing of rayon and cellophane (Hodgkinson and Prasher, 2006). It can be used also as a solvent in chemical industry. Surprisingly, relatively little has been published on research into how CS_2 affects hearing in workers (Morata, 1989; Chang et al., 2003) or in animals (Clerici and Fechter, 1991). As CS_2 has neurotoxic effects, the threshold limit values – time-weighted averages (TWA) defined by Occupational Safety and Health Administration (OSHA) and the European agency for safety and health at work – are low: 20 and 5 ppm, respectively. However, the short-term exposure limits (STEL) are higher, 30 ppm is the ceiling value for 30 min exposure in the USA, whereas exposure is limited to a maximum of 25 ppm for 15 min in Europe. Based on these limits, the carbon disulfide concentration tested in the study presented in this paper (250 ppm) was chosen as it is 10 times (safety factor) higher than the European STEL value.

One concern of this investigation was to evaluate the relevance of the STEL values recommended in Europe and in the USA, taking a moderate safety factor into account. We also addressed the relevance of the TWA value in case of combined exposure to noise in factories. We continue to believe that it is important to take the type of noise into consideration when assessing risks to human hearing and that co-exposure to solvents should also be considered in this occupational context.

Several studies in rats have shown that solvents can have a pharmacological effect on olivocochlear nuclei. These effects explain, at least partially, the synergistic effects on hearing of combined exposure to noise and solvent (Campo et al., 2007; Wathier et al., 2016; Venet et al., 2011, 2015). For the study described in this paper, carried out in rats, two types of noise with similar spectra but different temporal structures (continuous vs. impulse) were tested to compare their impact on hearing when associated with CS_2 . Impulse noise does not always trigger the middle-ear reflex (MER), and even when it does, the delay before its activation allows acoustic energy to penetrate into the cochlea. In contrast, the acoustic energy of continuous noise is significantly decreased by the protective effect of the MER (Venet et al., 2015). Therefore, the main goal of the current study was to test whether exposure to either type of noise in combination with CS_2 had different effects due to perturbation of the MER in a rat's model.

In summary, the goals of this study were first, to assess the relevance of the TWA values for CS_2 recommended in Europe and the USA, and second, to test whether CS_2 can modify the neuropharmacology of the MER and further weaken the resistance of the organ of Corti to noises.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult female Long Evans ($n = 78$) rats weighing approximately 250 g were used in experiments. Animals were purchased from Janvier breeders (Le Genest St Isle, St Berthevin, 53941, France). Two rats were housed in each cage ($1032 \text{ cm}^2 \times 20 \text{ cm}$ high) with irradiated cellulose BCell8 bedding (ANIBED, Pontvallain, France). All animals were 16-weeks-old before starting experiments. Food and tap water were available *ad libitum*, except during exposure periods. Animals were maintained on a 12 h/12 h day/night cycle during experiments. Room temperature and relative humidity in the animal facility were 22 ± 2 °C and $55 \pm 10\%$, respectively. The background noise level in the animal facilities was around 42 dB.

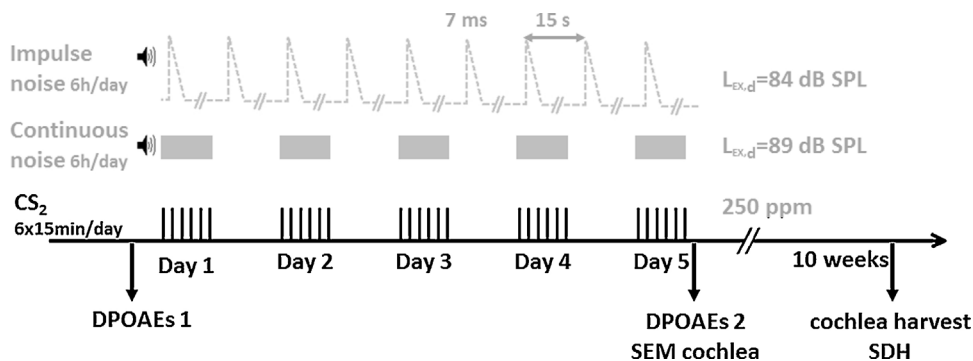


Fig. 1. Experimental protocol. The animals were exposed during 5 consecutive days for 6h/day. Carbon disulfide (CS_2) exposure: each bar represents a period of 15 min exposure at 250 ppm. Continuous noise exposure: each gray rectangle represents a period of 6 h continuous noise with a $L_{EX,d}$ of 89 dB SPL. Impulse noise exposure: dotted line represents the temporal structure of the impulse noise emission. Each 7 ms pulse was separated by 15 s and this sequence was repeated during 6 h. Hearing loss was measured using the cubic distortion product oto-acoustic emissions (DPOAEs) before (DPOAEs1) and after the 5 days of exposure (DPOAEs2). Scanning electron micrographs (SEM): rats were sacrificed at the end of the exposures. Succinate dehydrogenase (SDH): animals were sacrificed 10 weeks after the end of the exposures.

The animal facilities are fully accredited (C54-547-10), and while conducting the research described in this article, investigators adhered to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals promulgated by the European parliament and council (Directive, 2010/63/EU, 22 September 2010; Directive, 2010/63/EU, 22 September 2010). The study protocol used here was approved by the Lorraine-region ethics committee for animal experimentation (CELMEA).

2.2. Protocol

A schematic representation of the experimental design is shown in Fig. 1.

Animals were exposed either to noise (impulse vs. continuous) and/or to CS₂. As a result, there were different groups: impulse noise, continuous noise, solvent alone, solvent + impulse noise, and, finally, solvent + continuous noise. The number of controls and exposed animals for each experiment are described in Table 1. The rats were exposed during 6 h per day, for 5 consecutive days.

The noise spectrum was an octave band noise (OBN) centered at 8 kHz. The L_{EX,8h} for the continuous and impulse noises were 89 and 84 dB SPL, respectively. For the impulse noise, the duration of each peak lasted 7 ms and was followed by a 15-s background noise before the next peak. The solvent exposure conditions were defined as follows: 250 ppm for 15 min per hour, 6 h per day, 5 consecutive days. The same conditions were applied for combined exposures. Rats' hearing was tested with cubic distortion product oto-acoustic emissions (DPOAEs). Hearing was tested before and after the 5 days of exposure. Twenty five animals were sacrificed at the end of the exposure for scanning electronic microscopy (SEM) analyses; the other animals were allowed to recover for 10 weeks in the animal facility before performing succinate dehydrogenase (SDH) analyses.

2.3. Anesthesia

DPOAEs were measured in animals under light anesthesia induced by a single injection of a mixture of ketamine/xylazine (45/5 mg/kg). Body temperature was continuously monitored throughout the procedure using a rectal probe connected to a system maintaining a body temperature between 34 and 36 °C.

2.4. Hearing tests

DPOAEs are low-level sounds generated by the cochlea and emitted by the tympanic membrane. The DPOAE procedure was performed inside a sound-attenuated booth. The custom-designed DPOAE probe consisted of two transducers generating f1 & f2 frequencies and a microphone measuring the acoustic pressure within the outer ear canal (Shaffer et al., 2003; Venet et al., 2011). The primary tones were produced by frequency synthesizers (Pulse, B&K 3110) and emitted by two miniature speakers

(Microphone, B&K type 4191). The difference between the two tones (L1–L2) was equal to 14 dB. Calibration was performed with a 1/8-inch microphone (B&K type 4138) placed in a specifically designed cavity with a volume equivalent to the rat's outer ear canal. This calibration ensured that f1 and f2 were always emitted at the target intensities. The response was measured using an FFT (Fast Fourier Transform) analyzer (B&K PULSE 3110). DPOAE amplitude was determined by averaging a linear spectrum over 4 s (N = 382); each FFT epoch lasted 31.25 ms, with a 66.7% overlap. The f1 to f2 ratio was maintained at 1.2, a ratio that has been reported to be suitable for studies with rats (Henley et al., 1990). Six couples of primary tones (f1–f2) were delivered to the left ear: (3–3.6), (4–4.8), (5–6), (8–9.6), (14.6–17.5), and (21.2–25.4) kHz. To simplify the presentation of results, hereafter each pair of primaries will be indicated only by the f2. These six couples of frequencies were chosen to surround the extent of the hearing loss induced by an octave band noise centered at 8 kHz. At this intensity, the hearing loss was expected to be half an octave above the central frequency of the noise.

Hearing was tested just prior to the 5-day exposure (DPOAEs 1) and at the end of exposure (DPOAEs 2). The hearing loss was determined by calculating the difference between the two measurements (DPOAEs 2–DPOAEs 1) for the control and exposed rats.

2.5. Carbon disulfide exposure

During the exposure period, all rats (controls, noise-, CS₂- or noise + CS₂-exposed) were housed in individual cells within an inhalation chamber designed to sustain dynamic and adjustable airflow (5–6 m³.h⁻¹). The chambers were maintained at a negative pressure of no more than 3 mm H₂O. Input air was filtered and conditioned to a temperature of 22 ± 1 °C and relative humidity of 55 ± 10%.

CS₂ vapor was generated using a thermoregulated glass streamer. The solvent was delivered by a pump and instantaneously vaporized upon contact with the heated surface. The vapor was transported through the streamer along with an additional airflow, into the main air inlet pipe of the exposure chambers. Rats were exposed to 250-ppm CS₂, 15 min per hour for 6 h per day, over 5 consecutive days. Controls (n = 30) were always ventilated with fresh air.

Effective exposure levels were determined for half of the 15-min exposures by collecting samples of the chamber's atmosphere using glass tubes packed with Carboxen 1000 40/60 mesh (Supelco). CS₂ was desorbed from the adsorbent using methylene chloride. 2-butanone was added as an internal standard (IS) and samples were analyzed on a gas chromatograph/mass spectrometer (GCMS-QP2010 Ultra; Shimadzu). CS₂ samples were assayed on a 30 m × 0.25 mm (1 μm film thickness) Rtx-1701 column (with integra-guard) (Restek), using helium as the carrier gas at a linear velocity of 45 cm/s. The column temperature program was: 40 °C

Table 1

Number of control and exposed animals for each experiment. CS₂: carbon disulfide. CN: continuous noise. IN: impulse noise. DPOAE: cubic distortion product oto-acoustic emissions. SEM: scanning electron micrographs. SDH: succinate dehydrogenase. Exp: exposed rats. Ctrl: control rats.

Exposure group	Exposed rats	Control rats	Hearing measurement		Histology			
			DPOAE		SEM		SDH	
			Exp	Ctrl	Exp	Ctrl	Exp	Ctrl
CS ₂	16	16	8	8	4	3	5	5
CN	8	7	8	10	3	3	5	5
CN + CS ₂	8		8		3		5	
IN	8	7	8		3	3	5	
IN + CS ₂	8		8		3		5	

for 3 min followed by an increase to 100 °C at a rate of 20 °C/min. The sample (1 µl) was injected in split mode with a split ratio of 1/30. The temperatures for the injection port, transfer line and ion source were set to 240 °C, 250 °C and 200 °C, respectively. The MS was operated by electron ionization (70 eV) in selected ion monitoring mode and ions 43 (for IS) and 76 (for CS₂) were monitored. These analyses allowed daily calibrations to be performed.

During exposure, a benchtop mass spectrometer (OmniStar GSD 320 O2) with yttrium-iridium filament (Pfeiffer vacuum) was also used to continuously monitor the stability of vapor generation throughout exposure.

2.6. Noise exposures

Two loudspeakers were positioned in the ceiling of the exposure chambers. Whatever the nature of the noise tested (continuous or impulse), the spectrum was always an octave band noise centered at 8 kHz (8kHzOBN) (Fig. 2). The L_{EX,8h} of the noises was chosen to obtain an equivalent level of hearing loss of approximately 5 dB with both types of noise. Preliminary experiments were used to determine the conditions producing a 5-dB difference. Based on the results of these experiments, the L_{EX,8h} of the impulse noise was chosen as 84 dB SPL, whereas the L_{EX,8h} of the continuous noise was determined to be 89 dB SPL.

Animals were placed in separate cells during noise exposure to avoid the creation of natural acoustic screens. The acoustic field was quite homogenous (±1 dB between the different cells). In addition, to minimize between-subject differences, the animals were positioned according to a rotating scheme. Within the chambers, the background noise was a low-frequency noise ranging from 63 Hz to 500 Hz. The noise level was approximately 50 dB. Over 500 Hz the background noise was only 30 dB.

2.6.1. Continuous noise

The noise intensity applied for continuous exposure was 90.2 dB SPL for 6 h, which corresponds to a L_{EX,8h} of 89 dB SPL.

2.6.2. Impulse noise

Each sound burst lasted 7 ms and was separated from the following one by 15 s background noise. The sound-absorbing acoustic material placed within the exposure chambers allowed a steady sound pressure level of 116 dB SPL to be maintained for 10 ms, followed by a steep decline. Thus, 90% of the acoustic energy was dissipated within 10 ms. In these conditions, the L_{EX,8h}, as calculated according to ISO 9612:2009, was equal to 84 dB SPL.

The MER latency was measured with high time resolution (2 ms) by recording the DPOAE after acoustic stimulation. The latency was calculated between the time of the noise impulsion

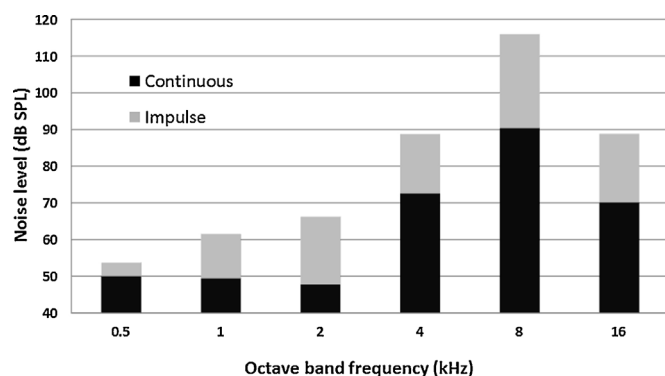


Fig. 2. Spectrum of octave band noises centered at 8 kHz. Black area: continuous noise; Gray area: impulse noise.

and the start of decrease in DPOAE amplitudes. The measurements were repeated with different primaries. The contralateral stimulation intensities ranged from 110 dB to 125 dB. The mean latency required to trigger the MER was found to be 14 ms [range: 11 to 17 ms]. These results are in accordance with those reported by Berge et al. (1990) and Pilz et al. (1997). Both of them recorded the MER latency from cochlear microphonic potentials. As a result, a 15-s period between noise pulses was enough for the middle-ear muscles to relax. Each noise burst was therefore fully absorbed by the cochlea, with no attenuation due to the MER.

2.7. Histological analyses

At the end of the noise/CS₂ exposures, the cochleae of 25 rats were harvested for scanning electron microscopy (SEM) analyses of the organ of Corti. The other animals (n = 40) were returned to the animal facility for 10 weeks' recovery before the cochleogram analyses.

2.7.1. Scanning electron microscopy

Deep anesthesia was induced in rats with a mixture of ketamine/xylazine. Tissues were then fixed by intracardiac perfusion with 100 ml heparinized saline followed by 300 ml of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4). The temporal bones were then removed, the tympanic bullae opened and the cochleae fixed once again by perilymphatic perfusion with 2.5% glutaraldehyde solution. Following primary fixation for 24 h, the cochleae were post-fixed with OsO₄ 1% in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 1 h. After dehydration in graded ethanol concentrations from 25 to 70%, the cochleae were drilled to leave only a thin layer of cochlear bone.

The cochleae were then dissected to remove the bony capsule, the spiral ligament, the stria vascularis, the Reissner's, and tectorial membranes. The organ of Corti was dehydrated in ascending ethanol concentrations up to 100%. Samples were dried in a critical-point dryer using liquid CO₂ (Leica EM CPD300) and mounted on brass stubs using conductive silver paint prior to observation by SEM (Jeol 7400).

2.7.2. Cochleogram

Both the round and oval windows were opened to perfuse the cochleae with a succinate dehydrogenase (SDH) solution (0.05 M sodium succinate, 0.05 M phosphate buffer, and 0.05% tetranitro blue tetrazolium). Cochlea were then immersed in the solution for 1 h at 37 °C before fixing with 4% paraformaldehyde for 24 h. Cochleae were dissected under a binocular loupe to remove remaining bone and the lateral cochlear wall. The three turns of the organ of Corti were mounted in glycerin as a surface preparation to allow hair cells to be counted (cochleogram). The frequency-place map established by Müller (1991) was used to determine the positions of the frequency coordinates along the length of the organ of Corti. SDH staining density was plotted as a function of location along the basilar membrane. Hair cell loss was quantified by counting the number of cells present (blue spots) on the organ of Corti. A cochleogram showing the percentage hair cell loss as a function of distance/frequency was plotted for each animal. The results were averaged across each group of animals for comparison between groups.

2.8. Statistical analysis

A one way ANOVA was used to analyze the variations of in DPOAE amplitudes between exposed and control rats. The variations corresponded to $\Delta = [DPOAEs\ 2 - DPOAEs\ 1] - K$. The constant K was taken as the average of [DPOAEs 2 - DPOAEs 1] calculated for the relevant control group. Δ variations

corresponded either the sum of the DPOAE variations at all frequencies or the DPOAE variation for one frequency. Statistical results are expressed as follows: $F(\text{dfb}, \text{dfr}) = F\text{-ratio}$; $p = p\text{ value}$, in which dfb is the number of degrees of freedom between groups, and dfr is the number of residual degrees of freedom.

A multiple-range test was run to compare the Δ variation between groups. This test was performed using the Bonferroni method expressed as follows: (contrast difference, with \pm limit).

Similarly, a one way ANOVA was used to analyze the percent hair cell loss between exposed and control rats.

The standard deviation (SD) is presented throughout the manuscript as an indicator of the variability of data distribution, and thus of the significance of the values. The statistical significance level was set to 5%.

3. Results

3.1. General health

All rats ($n = 78$) were in good health prior to inducing anesthesia to perform hearing tests. No significant differences in body weight were observed between exposed ($n = 48$) and control groups ($n = 30$) following exposure to noise and/or CS_2 . Before starting exposure, the average body weight was almost identical for the control ($225.7 \pm 18.1\text{ g}$), and exposed groups ($226.6 \pm 9.2\text{ g}$). At the end of the exposure period, there were no significant differences in body weight between exposed animals ($229.4 \pm 10.6\text{ g}$) and control animals ($226.7 \pm 17.9\text{ g}$).

3.2. Hearing tests

3.2.1. Carbon disulfide exposure

None of the animals exposed to the nominal CS_2 concentration of 250 ppm (actual $[\text{CS}_2] = 228.8 \pm 16.4\text{ ppm}$) showed any significant variations in DPOAE amplitudes compared to the amplitudes measured in control animals for any of the couples of primaries tested.

3.2.2. Exposure to continuous noise

Exposure to continuous noise with a $L_{\text{EX},8\text{h}}$ of 89 dB SPL caused significant changes to the sum of DPOAE amplitudes [$F_{\text{group}}^{[1,25]} = 50.2$; $p < 0.001$]. One way ANOVAs indicated that the hearing loss differences between exposed ($n = 8$) and control animals ($n = 18$) were significant at all frequencies except at 25440 Hz. The maximum amplitude of approximately 18 dB was measured at 9600 Hz ($p < 0.001$) (Mean_{control} = $0.2 \pm 0.53\text{ dB}$, Mean_{exposed} = $-17.95 \pm 1\text{ dB}$) (Fig. 3) which corresponds to a half-octave band above the exposure frequency (8kHzOBN).

3.2.3. Exposure to continuous noise plus carbon disulfide

Combined exposure to continuous noise ($L_{\text{EX},8\text{h}} = 89\text{ dB SPL}$) and to the nominal CS_2 concentration of 250 ppm (actual $[\text{CS}_2] = 242 \pm 15.9\text{ ppm}$) also affected the sum of DPOAE amplitudes [$F_{\text{group}}^{[1,25]} = 53.28$; $p < 0.001$]. Surprisingly, the hearing loss was lower than that measured for animals exposed to continuous noise alone. The differences between exposed ($n = 8$) and control animals ($n = 18$) were significant from 4800 Hz until 17520 Hz. As previously, the maximum amplitude was localized at 9600 Hz (Mean_{control} = $0.2 \pm 0.95\text{ dB}$, Mean_{exposed} = $-13.21 \pm 1.52\text{ dB}$) (data not shown). The overall effects of this combined exposure are reported and illustrated in Fig. 4.

3.2.4. Exposure to impulse noise

The impulse noise with a $L_{\text{EX},8\text{h}}$ of 84 dB caused a significant hearing loss difference between exposed ($n = 8$) and control rats ($n = 18$) [$F_{\text{group}}^{[1,25]} = 159.5$; $p < 0.001$]. The amplitude of the

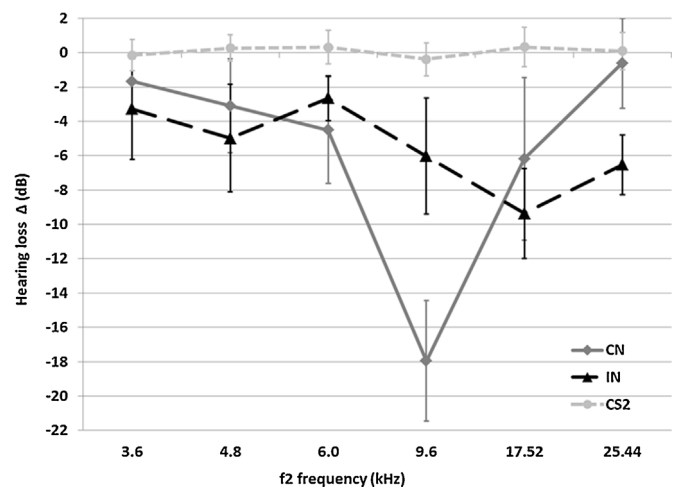


Fig. 3. Hearing loss Δ : $[(\text{DPOAE2} - \text{DPOAE1})_{\text{exp}} - (\text{DPOAE2} - \text{DPOAE1})_{\text{ctrl}}]$ as a function of the f_2 primary for three experimental conditions. [1] CN: 6-h continuous noise with a $L_{\text{EX},8\text{h}}$ of 89 dB SPL ($n = 8$), [2] IN: impulse noise with a $L_{\text{EX},8\text{h}} = 84\text{ dB SPL}$ ($n = 8$), [3] CS_2 : 250-ppm of CS_2 , 15 min per hour for 6 h per day ($n = 8$). Each curve indicates the difference in DPOAE amplitude obtained for each couple of frequencies tested. Values shown correspond to mean \pm SD.

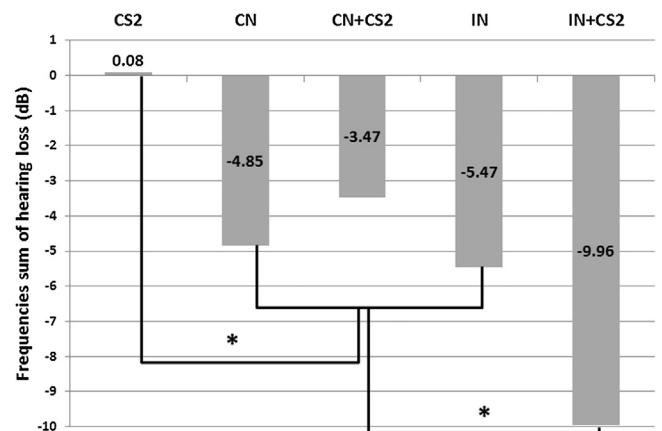


Fig. 4. Comparison of the sum of the variations in DPOAE amplitude measured at the frequencies tested in the different experimental conditions. $[(\text{DPOAE2} - \text{DPOAE1})_{\text{exp}} - (\text{DPOAE2} - \text{DPOAE1})_{\text{ctrl}}]$ for the five experimental conditions. CN: continuous noise, IN: impulse noise, CS_2 : carbon disulfide. Y-axis: sum at 3.6, 4.8, 6, 9.6, 17.5 and 25.4 kHz measured with a 60-dB primary intensity. * = $p < 0.05$.

hearing loss was 9 dB at 17500 Hz, and more than 6 dB at 9600 and 25440 Hz (Fig. 3). The sum of amplitudes measured at the frequencies tested was quite similar to that obtained with the 6-h continuous noise alone (Fig. 4), even though the $L_{\text{EX},8\text{h}}$ was lower for the impulse noise than for the continuous noise. In this experiment, the variations measured at all the frequencies tested were clearly significantly different ($p < 0.001$) between exposed and control animals; the most severe damage was measured at 17500 Hz ($p < 0.001$) (Mean_{control} = $0.05 \pm 0.56\text{ dB}$, Mean_{exposed} = $-9.35 \pm 0.83\text{ dB}$).

3.2.5. Exposure to impulse noise plus 250-ppm carbon disulfide

Co-exposure to the nominal CS_2 concentration of 250 ppm (actual $[\text{CS}_2] = 234.9 \pm 19.1\text{ ppm}$) associated with the impulse noise potentiated the traumatic impact of the noise [$F_{\text{group}}^{[1,25]} = 183.7$; $p < 0.001$]. One way ANOVAs tests indicated that the hearing loss differences between exposed ($n = 8$) and control animals ($n = 18$) were statistically significant ($p < 0.001$) at all frequencies (data not shown). As impulse noise alone, the maximum amplitude was

localized at 17500 Hz ($\text{Mean}_{\text{control}} = 0.05 \pm 0.85 \text{ dB}$, $\text{Mean}_{\text{exposed}} = -16.9 \pm 1.27 \text{ dB}$). The overall effects of this combined exposure are reported and illustrated in Fig. 4.

3.2.5.1. Comparison between the different experimental conditions. Multiple-range test indicated that there were no significant differences between the extent of hearing loss obtained between continuous noise ($-4.85 \pm 2.6 \text{ dB}$) vs. impulse noise ($-5.47 \pm 1.2 \text{ dB}$) (Fig. 4). This result was to be expected as the $L_{\text{EX,8h}}$ of the noises were initially chosen to induce similar levels of hearing loss between the two groups of animals following exposure to noise alone.

Also as expected, exposure to CS_2 did not provoke any significant variation in DPOAE amplitudes ($0.08 \pm 0.4 \text{ dB}$). Therefore, a large difference was measured between the carbon disulfide group and the other groups of exposed animals (Fig. 4).

In addition, there was a large difference between the DPOAE amplitudes obtained with the impulse noise plus 250-ppm CS_2 and the other groups. The combination of exposure to CS_2 and the impulse noise significantly increased the differences in DPOAE amplitude ($-9.96 \pm 2.2 \text{ dB}$) relative to those measured with the impulse noise alone (contrast difference = 4.49, with limit ± 2.59). Finally, although there was no significant difference between continuous noise and continuous noise plus CS_2 , the data shown in Fig. 4 indicate a decrease in the amplitude. Thus, the continuous noise plus CS_2 group ($-4.85 \pm 1.5 \text{ dB}$) showed a less extensive variation in amplitude than the group exposed to continuous noise alone.

3.3. Histological analyses

3.3.1. Cochleogram (10 weeks after exposure)

3.3.1.1. Continuous noise alone or in combination with CS_2 . The average cochleogram obtained from 5 rats exposed to continuous noise plus CS_2 is shown in Fig. 5. Similar cochleograms were obtained for the group of animals exposed to continuous noise alone and the control group (data not shown). For these three groups, loss of inner hair cells and hair cells on the first outer row

never exceeded 1%. However, losses of 1 and 3% were measured in the second and third rows of outer hair cells in the animals exposed to continuous noise or to continuous noise and solvent. Although the hearing loss induced by the 6-h continuous noise was significant, there was not visible cell loss on the cochleograms. The absences of outer hair cells (OHC) at high frequencies (over 50 kHz) reported in the cochleogram were due to the morphology of the organ of Corti in the region dedicated to the highest frequency discrimination. The organ of Corti is so straight at the extremity that only the inner hair cells are present, then appears the first, the second and finally the third row of outer hair cells.

3.3.1.2. Impulse noise plus CS_2 and impulse noise alone. The average cochleogram obtained for 5 rats exposed to impulse noise alone was similar to that obtained with controls ($n=5$). Like the continuous noise, the impulse noise did not visibly alter the cochleogram. However, the combination of CS_2 with the impulse noise provoked significant loss of outer cells at the level of OHC3 [$F_{\text{group}}^{[1,9]} = 26.71$; $p < 0.001$] and OHC2 [$F_{\text{group}}^{[1,9]} = 22.39$; $p = 0.0015$], as illustrated in Fig. 6.

In these experimental conditions, a large proportion (28%) of outer hair cell loss at OHC3 was located in the region corresponding to frequencies ranging from 8 to 13 kHz.

3.3.1.3. 250-ppm carbon disulfide. The average cochleogram obtained for 5 rats exposed to CS_2 alone was similar to that obtained with control animals ($n=5$). For these reasons, the cochleogram obtained with CS_2 -exposed rats is not shown here. The cochleogram was very similar to that obtained for animals exposed to continuous noise plus CS_2 (Fig. 5).

3.3.2. Scanning electron microscopy (at the end of exposure)

Exposure to continuous noise alone ($L_{\text{EX,8h}}$ of 89 dB, 6 h/d, 5 d) or to continuous noise plus solvent (250 ppm, 6 h) did not cause any obvious injury to stereociliae. Most of the time, samples from these animals resembled samples from controls (Fig. 7A and B). When present, injuries were subtle and difficult to evaluate with regard to controls. In contrast, in rats exposed to impulse noise ($L_{\text{EX,8h}}$ of 89 dB, 6 h/d, 5 d) broken stereociliae were observed, some

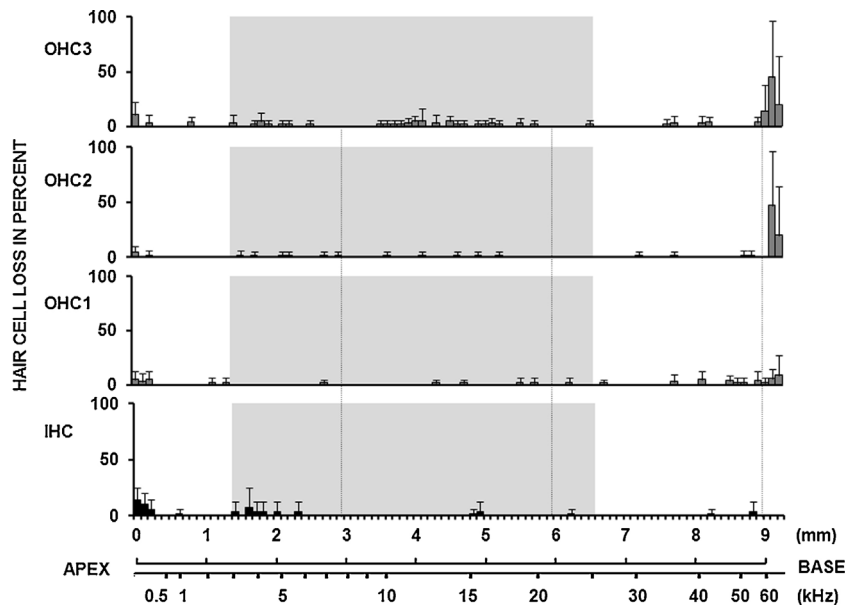


Fig. 5. Average cochleogram ($n=5/\text{group}$) at the end of exposure from sedentary Long Evans rats exposed to 6-h continuous noise [$L_{\text{EX,8h}} = 89 \text{ dB SPL}$] plus 250-ppm CS_2 . Exposure schedule: 6 h/d, 5 d/w, 1 w. X-axis – upper trace: distance (mm) along the spiral course of the organ of Corti – lower trace: frequency-map. Y-axis: percent hair cell loss. IHC: Inner hair cells; OHC1 first row of outer hair cells, OHC2's row of outer hair cells, OHC3 third row of outer hair cells. The gray area indicates the frequency range explored using DPOAE-based hearing tests.

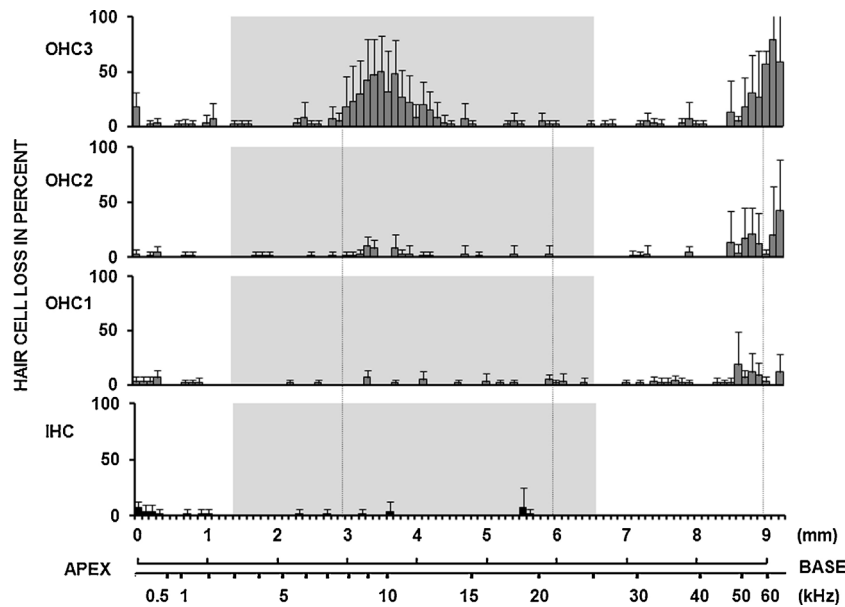


Fig. 6. Average cochleogram ($n = 5/\text{group}$) at the end of exposure from sedentary Long Evans rats exposed to impulse noise [$L_{EX,8h} = 84 \text{ dB SPL}$] plus 250-ppm CS_2 . Exposure schedule: 6 h/d, 5 d/w, 1 w. X-axis – upper trace: distance (mm) along the spiral course of the organ of Corti – lower trace: frequency-map. Y-axis: percent hair cell loss. IHC: Inner hair cells; OHC1 first row of outer hair cells, OHC2 s row of outer hair cells, OHC3 third row of outer hair cells. The gray area indicates the frequency range explored using DPOAE-based hearing tests.

of them were even uprooted from the cuticular plates at the level of the third row of OHC (Fig. 7E and F). Injured stereociliae were observed in the regions corresponding to the most damaged frequencies, in a tonotopic area ranging from approximately 4 to 20 kHz. Similar observations were made in the group exposed to impulse noise plus CS_2 ; in samples from these animals, damaged stereociliae were observed at the level of the third row of outer hair cells (Fig. 7C and D).

4. Discussion

The primary findings of this study are that impulse noises are more damaging to hearing than continuous noises. The data presented here confirm results obtained in previous studies by our research group (Lataye and Campo, 1996; Campo et al., 2014; Venet et al., 2015) and by other teams (Henderson and Hamernik, 1986), demonstrating that the effects of impulse noise do not fit the equal energy hypothesis. Indeed, when we compared the cochlear effects of a continuous noise ($L_{EX,8h} = 89 \text{ dB SPL}$) with those obtained with an impulse noise ($L_{EX,8h} = 84 \text{ dB SPL}$) with the same spectrum (8kHzOBN), the latter induced more harmful effects in the cochlea than the continuous noise although the 5 dB difference between both $L_{EX,8h}$. These effects are best illustrated by the histological data. Thus, stereociliae in the third row of outer hair cells are clearly damaged after exposure to impulse noise, compared to those exposed to a continuous noise. Broken and ripped stereociliae were observed only on organs of Corti exposed to impulse noises (Fig. 7C, D), even though the $L_{EX,8h}$ was moderate and the exposure period (one week) was relatively short. Based on these results, the equal energy principle is obviously inappropriate for use in designing preventive measures as it fails to effectively prevent damage/risk to workers' hearing due to impulse noises. Because of these results, we strongly believe that the temporal structure (continuous vs. impulse) of noises should be taken into consideration when developing hearing conservation programs in the USA and Europe. In the experiments described in this paper, the maximum intensity (peak level) reached with the impulse noise exposure was 128 dB SPL. This level is considerably lower than the noise exposure limits defined either in the USA or Europe. Given

the traumatic effects observed with this level of impulse noise, it seems clear that the current recommended noise limits are still too high. Beyond the intensity, the temporal structure of the noise can affect the efficiency of natural protective mechanisms such as the MER. Although the impact of a 6-h continuous noise can be quite well attenuated by the MER, the impact of impulse noise cannot (Dunn et al., 1991; Lataye and Campo, 1996). Indeed, the acoustic energy of this type of noise is dissipated into the cochlea before the MER can be triggered (Borg et al., 1984; Stevin, 1986). Thus, the MER appears to be a key phenomenon in terms of prevention as it considerably reduces the acoustic energy absorbed by the inner ear.

However, exposure to solvents can modify the function of the MER, and therefore the impact of combined exposure to solvent plus noise may differ from exposure to noise alone (Wathier et al., 2016). In the series of experiments presented here, we tested the effects of a highly lipophilic solvent, CS_2 , which is known to be neurotoxic (Clerici and Fechter, 1991). The primary neural lesion produced by CS_2 exposure is central-peripheral distal axonopathy (Pappolla et al., 1987). In the experiments performed here, no cochleotoxic effect was observed after CS_2 exposure and the cochleogram for the CS_2 group was similar to that for the control group. We also observed that the outer hair cells functioned correctly following exposure to CS_2 since the DPOAE amplitudes were the same as prior to exposure (Fig. 4). Although CS_2 did not show a cochleotoxic effect in the conditions applied in this study, it could modify the MER function. Indeed comparison of the results obtained after exposure to the continuous and impulse noises reflected the same phenomenon as previously reported with aromatic solvents, such as styrene, when associated with noise (Venet et al., 2015). In the current study, the results show that the protective effect brought by the CS_2 is more weak than that measured in the styrene study, but the experimental conditions were also different. The CS_2 and styrene exposures lasted 1 week and 4 weeks respectively, moreover the noise intensity was 5 dB higher in the current experiment. Such differences can easily explain the difference of significance between the two experiments. Nevertheless the trend is obvious. Depending on the nature of the noise, the MER can make a drastic difference in terms of the

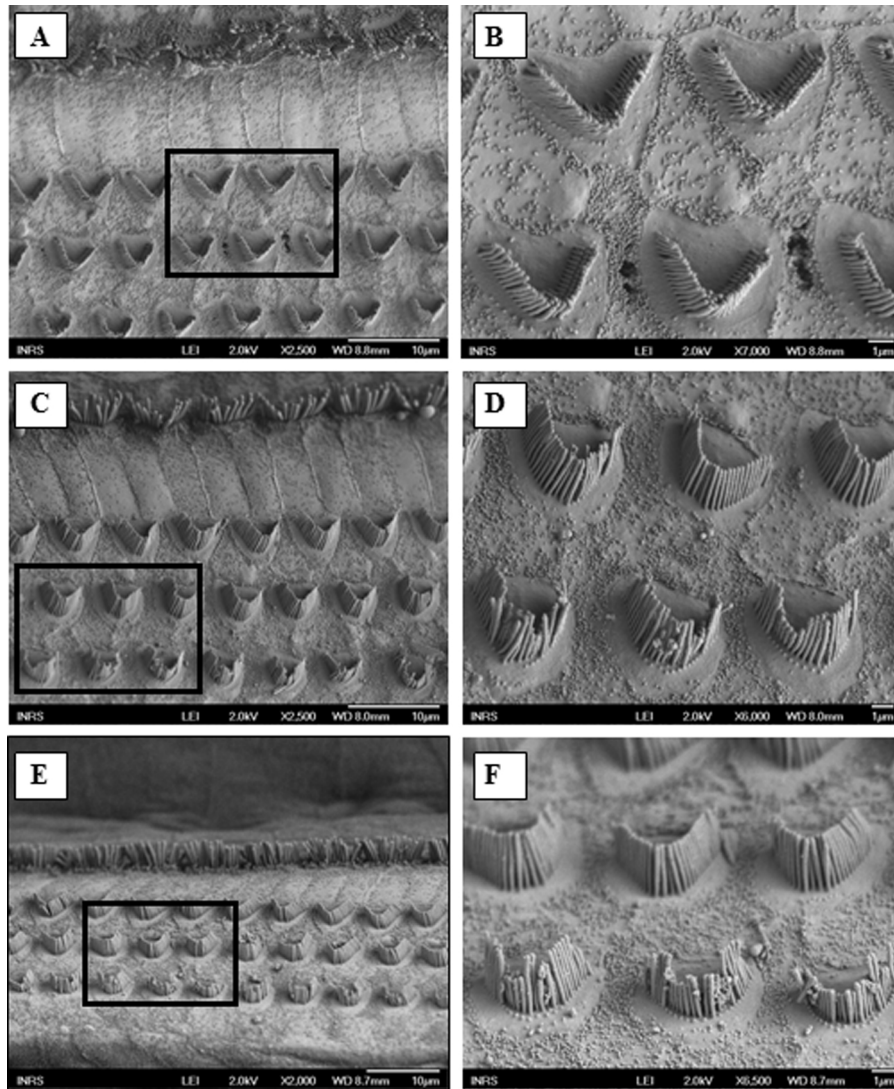


Fig. 7. Scanning electron micrographs of organs of Corti 10 weeks after exposure from Long Evans rats.

Upper panel. Control rats: (A) Low power view (X 2500) showing the organization of stereociliae making up the outer hair cells (OHC) and inner hair cells (IHC); (B) (X 7000) The W shape of the stereociliae can be observed at approximately 9 kHz.

Central panel. Rats exposed to an impulse noise ($L_{EX,8h}$ of 84 dB) for 1 week. (C) (X 2500) and (D) (X 6000) show typical injury to stereociliae at the level of OHC3. Tonotopic area: approximately 8 kHz.

Lower panel. Rat exposed to impulse noise plus CS_2 for 1 week. (E) (X 2000) and (F) (X 6500) show injuries to stereociliae at the level of OHC3. Tonotopic area: approximately 9 kHz.

traumatic effects on the cochlea (Campo et al., 2014). We obtained a synergistic cochlear effect with the following combination: CS_2 plus impulse noise, and, as expected and described in Campo et al. (2014), a tendency to reduction in cochlear injury with the combination CS_2 plus continuous noise. As for styrene (an aromatic solvent), CS_2 can have a rapid pharmacological impact on the central nervous system (CNS), decreasing the threshold beyond which the MER is triggered. This effect could be due to a change in polarization at the level of the plasma membrane (Magnusson et al., 1998), which could modify the threshold of the MER trigger. Indeed, toluene (another aromatic solvent) has been shown to modify the voltage-dependant functioning of Ca^{2+} channels involved in the MER (Maguin et al., 2009). These types of modifications could be the reason behind why the MER threshold was decreased in the presence of aromatic solvents, or CS_2 , and may explain why co-exposure to noise and solvents alters the impact of continuous noises on subjects' hearing. Given the duration of exposure and the moderate intensity of the continuous noise used in the current investigation, CS_2 appears to decrease the

MER trigger threshold (consequently it would increase the MER amplitude) by neuropharmacological effects. This would in turn reduce the cochleotraumatic effect of the continuous noise. In stark contrast, co-exposure to impulse noise and CS_2 increased the vulnerability of the organ of Corti, probably due to inefficient triggering of the MER. This clearly illustrates the risk of potentiating NIHL when exposures to impulse noise and CS_2 are combined. This effect is shown by the loss of outer hair cells at the level of the third row, corresponding to frequencies ranging from 8 to 13 kHz which corresponds to half an octave above the central frequency of the noise exposure spectrum. The solvent-induced hearing loss is not located at specific frequencies. As shown in Venet et al. (2015), the damage due to solvents is rather restrained to noise-stimulated cells (half an octave above the central frequency of the noise spectrum). Damage to the stereociliae was observed at the end of the exposure period. Ten weeks post-exposure, co-exposure to impulse noise plus CS_2 triggered or speeded up the cell elimination process (Fig. 6). In contrast, the impulse noise alone broke the stereociliae, without inducing a cell

loss after a 10-week recovery period. Whatever the nature of the synergistic phenomenon, the results obtained in this study indicated that a moderate concentration of CS₂ potentiates the cochlear damage caused by impulse noise, whereas it reduces the cochlear damage caused by continuous noise. The explanation for this paradox is probably that CS₂, like styrene, has a rapid pharmacological impact on the CNS which modifies the efficiency of the MER. Whatever the physiological explanation, it should be remembered that impulse noises are more damaging to hearing than continuous noises, and that their traumatic effects can be potentiated by CS₂.

5. Conclusions

Depending on the nature of noises (impulse vs. continuous), various levels of traumatic effects can be induced in cochlea. Impulse noises are clearly more damaging than continuous noises, when all other acoustic parameters are equivalent (spectrum and energy). This difference in effects is even more obvious when noise and solvent exposure are combined. Carbon disulfide has two different impacts: it can modify the MER and it can potentiate the severity of impulse noise effects. The stereociliae of the outer hair cells in the third row are the most vulnerable cellular structures within the organ of Corti, they are particularly sensitive to co-exposure to impulse noise plus solvent. Based on results obtained both with CS₂ (non-aromatic solvent) and styrene (aromatic solvent), it is clear that the nature of the noise and any co-exposure to solvents should be integrated into hearing conservation programs devised to help protect workers' audition. A 5-dB decrease in action values [80 dB (A) vs. 85 dB (A)] and in peak values [a recommendation at 125 vs. 130 dB (C) and a required protection from 130 dB (C) instead of 135 dB (C)] in case of co-exposure would be a quick and (hopefully) efficient solution.

Funding

This work was entirely supported by the French Research and Safety Institute for the Prevention of Occupational Accidents and Diseases (INRS, France).

Conflict of interest statement

The authors indicate that they have no actual or potential conflict of interest to declare, including any financial, personal or other relationships with other people or organizations that could inappropriately influence, or be perceived to influence, the results as presented in this work.

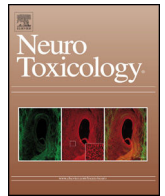
Acknowledgments

The authors would like to thank Marie-Joseph Décret, Lionel Dussoul and Laurine Douteau for their help with rat handling and husbandry.

References

Berge, H., Kingma, H., Kluge, C., Marres, E.H., 1990. Electrophysiological aspects of the middle ear muscle reflex in the rat: latency, rise time and effect on sound transmission. *Hear. Res.* 48 (3), 209–219.

- Borg, E., Counter, S., Röster, G., 1984. Theories of middle-ear muscle functions Silman Shlomo, *The Acoustic Reflex: Basic Principles and Clinical and Applications.*, pp. 77–79.
- Campo, P., Maguin, K., Lataye, R., 2007. Effects of aromatic solvents on acoustic reflexes mediated by central auditory pathways. *Toxicol. Sci.* 99, 582–590.
- Campo, P., Morata, T., Hong, O., 2013. Chemical exposure and hearing loss. *Dis. Mon.* 59 (4), 119–138.
- Campo, P., Venet, T., Thomas, A., Chantal, C., Brochard, C., Cosnier, F., 2014. Neuropharmacological and cochleotoxic effects of styrene: consequences on noise exposures. *Neurotoxicol. Teratol.* 44, 113–120.
- Chang, S.J., Shih, T.S., Chou, T.C., Chen, C.J., Chang, H.Y., Sung, F.C., 2003. Hearing loss in workers exposed to carbon disulfide and noise. *Environ. Med.* 111, 1620–1624.
- Chen, G.D., Henderson, D., 2009. Cochlear injuries induced by the combined exposure to noise and styrene. *Hear. Res.* 254, 25–33.
- Clerici, W., Fechter, L., 1991. Effects of chronic carbon disulfide inhalation on sensory and motor function in rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 249–255.
- Directive 2003/10/EC, 2003. On the minimum health and safety requirements regarding the exposure of workers to the risks arising from physical agents (noise). *Off. J. Eur. Communities L042*, 38–44.
- Directive 2010/63/EC, 2010. Protection of animals used for scientific purposes. *Official journal of the European Communities L 276/33*.
- Dunn, D., Davis, R., Merry, C., Franks, R., 1991. Hearing loss in chinchilla from impact and continuous noise exposure. *J. Acoust. Soc. Am.* 90, 1979–1985.
- Hamernik, R., Patterson, J., Turrentine, G., Ahroon, W.A., 1989. The quantitative relation between sensory cell loss and hearing thresholds. *Hear. Res.* 38, 199–212.
- Henderson, D., Hamernik, R., 1986. Impulse noise: critical review. *J. Acoust. Soc. Am.* 80 (2), 569–584.
- Henley, C.M., Owings, M.H., Stagner, B.B., Martin, G.K., Lonsbury-Martin, B.L., 1990. Postnatal development of 2f1-f2 otoacoustic emissions in pigmented rat. *Hear. Res.* 43, 141–148.
- Hodgkinson, L., Prasher, D., 2006. Effects of industrial solvents on hearing and balance: a review. *Noise Health* 8 (32), 114–133.
- ISO 9612:2009 Acoustics – Determination of occupational noise exposure – Engineering method (ISO 9612:2009)
- Kobel, M., Le Prell, C.G., Liu, J., Hawks, J.W., 2017. Noise-induced cochlear synaptopathy: past findings and future studies. *Hear. Res.*
- Lataye, R., Campo, P., 1996. Applicability of the Leq as a damage-risk criterion: an animal experiment. *J. Acoust. Soc. Am.* 99, 1621–1631.
- Liberman, M.C., Kujawa, S.G., 2017. Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: manifestations and mechanisms. *Hear. Res.*
- Müller, M., 1991. Frequency representation in the rat cochlea. *Hear. Res.* 51, 247–254.
- Magnusson, A., Sulaiman, M., Dutia, M., 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.
- Maguin, K., Campo, P., Parietti-Winkler, C., 2009. Toluene can perturb the neuronal voltage-dependent Ca²⁺ channels involved in the middle-ear reflex. *Toxicol. Sci.* 107, 473–481.
- Morata, T., 1989. Study of the effects of simultaneous exposure to noise and carbon disulfide on workers' hearing. *Scand. Audiol.* 18, 53–58.
- Moser, T., Predoehl, F., Starr, A., 2013. Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. *Otol. Neurotol.* 34 (6), 995–1004.
- Pappolla, M., Penton, R., Weiss, H., Miller, C., Sahenk, H., Autilio-Gambetti, Z., Gambetti, P., 1987. Carbon disulfide axonopathy: another experimental model characterized by acceleration of neurofilament transport and distinct changes of axonal size. *Brain Res.* 424, 272–280.
- Pilz, P.K., Ostwald, J., Kreiter, A., Schnitzler, H.U., 1997. Effect of the middle ear reflex on sound transmission to the inner ear of rat. *Hear. Res.* 105 (1–2), 171–182.
- Shaffer, L.A., Withnell, R.H., Dhar, S., Lilly, D.J., Goodman, S.S., Harmon, K.M., 2003. Sources and mechanisms of DPOAE generation: implications for the prediction of auditory sensitivity. *Ear Hear.* 24 (5), 367–379.
- Stevin, G., 1986. Simulation of the middle ear acoustic reflex applied to damage-risk for hearing produced by burst fire. *Basic and Applied Aspects of Noise-Induced Hearing Loss*, vol. 111, pp. 271–280 NATO ASI Series.
- Venet, T., Rumeau, C., Campo, P., Thomas, A., Chantal, C., 2011. Neuronal circuits involved in the middle-ear acoustic reflex. *Tox. Sci.* 119, 146–155.
- Venet, T., Campo, P., Thomas, A., Chantal, C., Rieger, B., Cosnier, F., 2015. The tonotopicity of styrene-induced hearing loss depends on the associated noise spectrum. *Neurotoxicol. Teratol.* 48, 56–63.
- Wathier, L., Venet, T., Thomas, A., Cour, C., Nunge, H., Bonfanti, E., Cosnier, F., Parietti-Winkler, C., Campo, P., Gansmüller, A., 2016. Membrane fluidity does not explain how solvents act on the middle-ear reflex. *Neurotoxicology* 57, 13–21.
- Zheng, G., Hu, B.H., 2012. Cell-cell junctions: a target of acoustic overstimulation in the sensory epithelium of the cochlea. *BMC Neurosci.* 13, 71.



Full Length Article

Continuous exposure to low-frequency noise and carbon disulfide: Combined effects on hearing



Thomas Venet^{a,*}, Maria Carreres-Pons^{a,c}, Monique Chalansonnet^a, Aurélie Thomas^a, Lise Merlen^a, Hervé Nunge^a, Elodie Bonfanti^a, Frédéric Cosnier^a, Jordi Llorens^{c,d}, Pierre Campo^{a,b}

^a Institut National de Recherche et de Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, F-54519, Vandœuvre Cedex, France

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

^c Departament de Ciències Fisiològiques and Institute of Neurosciences, Universitat de Barcelona, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

^d Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2017

Received in revised form 22 June 2017

Accepted 22 June 2017

Available online 24 June 2017

Key-words:

Carbon disulfide

Low-frequency noise

Combined exposure

Rat

Hearing

Dose effect

ABSTRACT

Carbon disulfide (CS₂) is used in industry; it has been shown to have neurotoxic effects, causing central and distal axonopathies. However, it is not considered cochleotoxic as it does not affect hair cells in the organ of Corti, and the only auditory effects reported in the literature were confined to the low-frequency region. No reports on the effects of combined exposure to low-frequency noise and CS₂ have been published to date. This article focuses on the effects on rat hearing of combined exposure to noise with increasing concentrations of CS₂ (0, 63, 250, and 500 ppm, 6 h per day, 5 days per week, for 4 weeks). The noise used was a low-frequency noise ranging from 0.5 to 2 kHz at an intensity of 106 dB SPL. Auditory function was tested using distortion product oto-acoustic emissions, which mainly reflects the cochlear performances. Exposure to noise alone caused an auditory deficit in a frequency area ranging from 3.6 to 6 kHz. The damaged area was approximately one octave (6 kHz) above the highest frequency of the exposure noise (2.8 kHz); it was a little wider than expected based on the noise spectrum. Consequently, since maximum hearing sensitivity is located around 8 kHz in rats, low-frequency noise exposure can affect the cochlear regions detecting mid-range frequencies. Co-exposure to CS₂ (250-ppm and over) and noise increased the extent of the damaged frequency window since a significant auditory deficit was measured at 9.6 kHz in these conditions. Moreover, the significance at 9.6 kHz increased with the solvent concentrations. Histological data showed that neither hair cells nor ganglion cells were damaged by CS₂. This discrepancy between functional and histological data is discussed. Like most aromatic solvents, carbon disulfide should be considered as a key parameter in hearing conservation regulations.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Noise exposure is known to cause hearing loss, and the main contributor to occupational hearing loss is exposure to high-intensity noise in the working environment. The permissible threshold limit values for occupational noise in Europe and the United States are 87 dB(A) and 90 dB(A), respectively. The types of injury incurred by the auditory receptor are numerous. For instance, high-intensity noise or impulse noises can damage the stereocilia of hair cells (Carreres Pons et al., 2017; Liberman and

Dodds, 1987; Wang et al., 2002); noise can provoke hair cell loss and even collapse of Hensen cells (Campo et al., 2014; Kurabi et al., 2016; Wang et al., 2002); some authors have reported possible Reissner membrane disruptions (Wang et al., 2002); and recently, synaptopathies and swelling underneath the hair cells were linked to temporary and permanent hearing loss (Kobel et al., 2016; Liberman and Kujawa, 2017; Moser et al., 2013; Wang et al., 2002).

Hearing loss induced by low-frequency noises differs from that caused by mid- or high-frequency noises. For instance, hearing deficits caused by low-frequency noise cover a wider frequency window than those induced by mid- and high-frequency noises (Burdick, 1982). Thus, low-frequency noises first cause damage in the cochlear region where low-frequencies are discriminated (apex), then sweep down toward the mid- and high-frequency

* Corresponding author.

E-mail address: thomas.venet@inrs.fr (T. Venet).

Acronyms	
AS	Amplitude Shift of DPOAE levels at the end of exposure
CNS	Central Nervous System
CS ₂	Carbon Disulfide
dB SPL	Decibel Sound Pressure Level
dB(A)	Decibel weighted A
DPOAEs	Distortion Product Oto-Acoustic Emissions
IHC	Immunohistochemistry
LEX,8h	Equivalent continuous noise level calculated over 8 h
LM	Light microscopy
OHC	Outer Hair Cells
PAS	Permanent Amplitude Shift of DPOAE levels 4 weeks after exposure
PBS	Phosphate Buffer Saline
SDH	Succinate DeHydrogenase
SEM	Scanning electronic microscopy
TTCA	2-Thio-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid
TWA	Time Weighted Average. Average exposure within the workplace using the baseline of an 8-hour day or 40-hour week work schedule

regions (base) (Bohne and Harding, 2000). However, the nature of the damage caused by this type of noise is not well described in the literature.

Carbon disulfide (CS₂) is a volatile, inflammable solvent which is widely used in the production of viscose rayon fibers and cellophane films (Rolecki and Tarkowski, 2000). In industrial viscose production, daily exposures of around 40 ppm have been reported in the literature (Göen et al., 2014; Vanhoorne et al., 1995). These exposure levels are well above the threshold limit values (TWA) authorized in Europe (5 ppm) and the United States, where the OSHA recommends 20 ppm. Currently, based on numerous epidemiological studies, experts recommend even lower limit values, ranging between 1 and 10 ppm (Beauchamp et al., 1983; Newhook and Meek, 2002).

The most common toxic effects of CS₂ reported in the literature are neurofilamentous axonopathies (Llorens, 2013), which can affect both sensory and motor neurons (Hirata et al., 1996; Johnson et al., 1983; Takebayashi et al., 1998). Vascular complications have also been reported (Kotseva et al., 2001; Partanen et al., 1970; Sulsky et al., 2002). In rats, an abnormal accumulation of neurofilaments in the long axons of the peripheral and central

nervous systems has been observed (Clerici and Fechter, 1991; Gottfried et al., 1985; Knobloch et al., 1979; Pappolla et al., 1987). Rebert and Becker, 1986, and Hirata et al., 1992, demonstrated CS₂-induced axonopathies in peripheral and central auditory fibers in rats. In occupational environments, CS₂ exposure is most frequently associated with co-exposure to noise, and significant hearing loss is often found in co-exposed workers. According to Chang et al., 2003, Morata, 1989, hearing loss is more frequent and severe in cases of co-exposure than with exposure to noise alone. Similar effects have been observed with other aromatic solvents, and experimental studies in rats clearly demonstrated synergistic effects on hearing of co-exposure to noise (Campo et al., 2013; Chen and Henderson, 2009; Pouyatos et al., 2005; Venet et al., 2015). Very few studies have been performed to date in humans (Chang et al., 2003; Morata, 1989) combining exposure to noise and CS₂, and no histological analyses have been performed in rats.

For these reasons, the main purpose of the current investigation was to analyze how co-exposure to a low-frequency noise and a range of CS₂ concentrations affected hearing in rats. The impact of the exposure scenario on hearing was assessed using distortion product oto-acoustic emissions (DPOAEs) which reflect outer hair cell (OHC) motility (Avan et al., 2001). OHC are innervated by afferent nerve fibers (10%) and efferent nerve fibers (90%) which control their mechanical activity and determine frequency discrimination (Dannhof and Bruns, 1993). Functional investigations were complemented by a morphological analysis of the cochlea. In addition, 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA) was assayed in rat urine as it is known to be the best urinary metabolic indicator of CS₂ exposure in both humans (Riihimäki et al., 1992) and rats (Cox et al., 1996). Circulating CS₂ levels were also determined in blood.

The results obtained are discussed with regard to current occupational threshold limits which are supposed to regulate the risks encountered by all workers, including co-exposed workers.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The animal facilities where experiments were performed are fully accredited by the French Ministry of Agriculture (authorization No. D 54–547–10). While conducting the research described in this article, investigators adhered to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals promulgated by the European Parliament and of the Council (DIRECTIVE 2010/63/EU, 2010). The study, referenced as APAFIS#3950-201602051 1372481, was approved by the ethics committee at the Ministry of Education and Research. Adult female Long Evans rats (n=117) weighing approximately 250 g

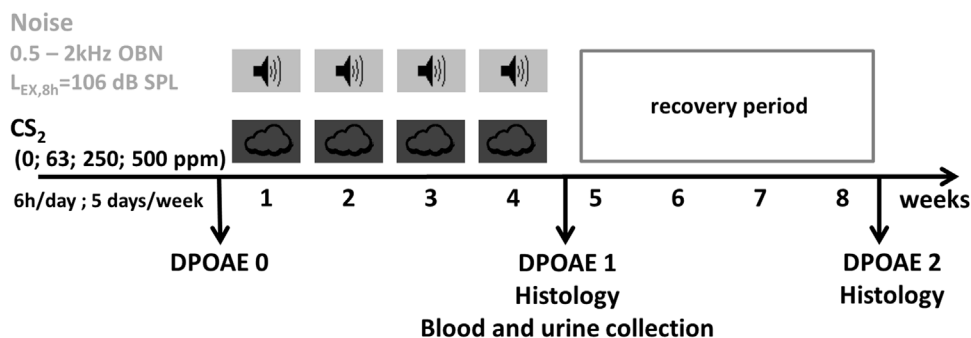


Fig. 1. Experimental protocol. Exposure to carbon disulfide (CS₂) and noise lasted 6 h/day, 5 days/week, for 4 weeks. The L_{EX,8h} for the noise was 105 dB SPL and the spectrum was an octave band noise (OBN) ranging from 0.5 to 2 kHz. The CS₂ concentration was 0, 63, 250 or 500 ppm. Hearing was tested using cubic distortion product oto-acoustic emissions (DPOAEs) prior to exposure (DPOAE0), at the end of exposure (DPOAE1), and 4 weeks after exposure (DPOAE2). Blood and urine samples were collected at the end of the exposure period. Histological analyses were performed at the end of the exposure period and 4 weeks post-exposure.

were used in all experiments. Animals were purchased from Janvier breeders (Le Genest St Isle, St Berthevin, 53941, France). Rats were 8-weeks-old when they arrived at the animal facility, and they were acclimatized for 10 weeks before starting experiments. Thus, all animals were 18-weeks-old at the start of experiments. Animals were housed two per cage (1032 cm² × 20 cm height) on irradiated cellulose BCell8 bedding (ANIBED, Pontvallain, France). A 12:12 h light: dark cycle (07:30–19:30) was maintained in the facility, room temperature was 22 ± 2 °C, and relative humidity 55 ± 10%. Food and tap water were available *ad libitum*, except during exposure. The background noise level in the animal facilities was around 43.5 dB (A). Animals were weighed weekly and overall toxicity was assessed.

2.2. Protocol

An overall picture of the experimental design is shown in Fig. 1.

Animals were exposed to a low-frequency continuous noise with or without concomitant exposure to CS₂. The noise spectrum ranged from 0.5 to 2 kHz, with an equivalent daily noise exposure (L_{EX,8h}) of 105 dB SPL. Animals were distributed among four exposure groups coupled with four control groups (Table 1). Each exposed group was simultaneously exposed to noise and CS₂ at 0, 63, 250 or 500 ppm. Exposure lasted for 6 h per day, 5 consecutive days per week over a total of 4 weeks.

Rats' hearing was tested using cubic DPOAEs prior to exposure (DPOAE0), at the end of the exposure period (DPOAE1), and 4 weeks post-exposure (DPOAE2). Blood samples were collected from eight rats in each CS₂-exposed group and from 18 control animals at the end of the exposure period to analyze the circulating CS₂ concentration. Urine samples were also collected to analyze TTCA concentrations. Following exposure, 31 animals were sacrificed to perform light microscopy analysis (LM) and immunohistochemistry (IHC) (Table 1). The other 86 animals were allowed to recover for 4 weeks in the animal facility. At the end of the experiment, the cochleae were harvested from all animals to perform morphological observations: LM, IHC, cochleogram based on succinate dehydrogenase labeling (SDH), and scanning electron microscopy (SEM) (Table 1).

2.3. Anesthesia

Light general anesthesia was required to record DPOAEs in rats. Animals were anesthetized by a single injection of a mixture of ketamine/xylazine (45/5 mg/kg). Body temperature was continuously monitored throughout the procedure using a rectal probe connected to a system maintaining a body temperature between 34 and 36 °C.

For blood collection, rats were anesthetized with 5% isoflurane gas and maintained with 3% isoflurane. The gas was administered

through a vaporizer (Isotec 4, Ohmeda), fed by a generator (O2 Millennium 5 Concentrator, Respirationics).

For tissue collection, rats were deeply anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (75/5 mg/kg) (i.p.) before decapitation.

2.4. Hearing testing

Hearing was tested by measuring DPOAEs. Before recording DPOAEs, an otoscopic examination was performed to verify that the external ear canal was not obstructed by wax and that there was no infection in the middle-ear. The device and methodology used to record DPOAEs are described in detail in Carreres Pons et al., 2017. Briefly, six pairs of primary tones (f1–f2) were delivered to the left ear: (3–3.6), (4–4.8), (5–6), (8–9.6), (14.6–17.5), and (21.2–25.4) kHz. The f1 to f2 ratio for these primaries was always 1.2 (Henley et al., 1990), and the level difference (L1–L2) was equal to 14 dB. To simplify the presentation of results hereafter, each pair of primaries will be indicated only by the f2.

Hearing was tested just prior to exposure (DPOAE0), at the end of exposure (DPOAE1) and 4 weeks after exposure (DPOAE2). The amplitude shift (AS) measured at the end of exposure was calculated based on the difference between measurements (DPOAE1– DPOAE0). The Permanent Amplitude Shift (PAS) was calculated by determining the difference between DPOAE2 and DPOAE0 measurements.

2.5. Carbon disulfide exposure

During exposure, all rats (controls, noise, CS₂- or noise + CS₂-exposed) were housed in individual cells within an inhalation chamber designed to sustain a dynamic, adjustable airflow (5–6 m³.h⁻¹). The chambers were maintained at a negative pressure of no more than 3 mm H₂O. Input air was filtered and conditioned to a temperature of 22 ± 1 °C and relative humidity of 55 ± 10%.

CS₂ was generated using a thermoregulated glass streamer. The solvent was delivered by a pump and instantaneously vaporized upon contact with the heated surface of the glass streamer. The vapor was carried forward with an additional airflow through the streamer, into the main air inlet pipe of the exposure chambers. Rats were exposed to 63, 250 or 500 ppm CS₂, 6 h per day for 5 consecutive days over 4 weeks. Control animals (n=52) were always ventilated with fresh air.

The exposure levels were determined from samples of the chamber's atmosphere collected using glass tubes packed with Carboxen 1000 40/60 mesh (Supelco). CS₂ was desorbed from the adsorbent with methylene chloride (DCM). Methyl-ethyl-ketone (MEK) was added as an internal standard (IS) and samples were analyzed on a gas chromatograph/mass spectrometer (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu). CS₂ samples were assayed on a 30 m × 0.25 mm (1 μm film thickness) Rtx-1701 column (with integra-guard) (Restek), using helium as the carrier gas at a linear velocity of 45 cm/s. The column temperature program was: 40 °C for 3 min followed by an increase to 100 °C at a rate of 20 °C/min. The sample (1 μL) was injected in split mode with a split ratio of 1/30. The temperatures for the injection port, transfer line and ion source were set to 240 °C, 250 °C and 200 °C, respectively. The MS was operated by electron ionization (70 eV) in selected ion monitoring mode, tracking ions 43 (for IS) and 76 (for CS₂). These analyses allowed daily calibrations to be performed. During exposure, a benchtop mass spectrometer (OmniStar GSD 320 O2) with yttrium-iridium filament (Pfeiffer vacuum) was also used to continuously follow the stability of vapor generation throughout the exposure period.

Table 1

Number of control and exposed animals used in each experiment. CS₂: carbon disulfide. LF: low-frequency noise. DPOAE: cubic distortion product oto-acoustic emissions. LM: light microscopy. IHC: immunohistochemistry. SEM: scanning electron microscopy. SDH: cochleogram based on succinate dehydrogenase labeling. T0: before exposure. T1: at the end of exposure. T2: 4 weeks after exposure.

	Total	DPOAE			LM		IHC		SEM	SDH
		T0	T1	T2	T1	T1	T2	T2		
LF + 0 ppm CS₂	30	12			5	4	6	4	4	7
LF + 63 ppm CS₂	8	8			/	/	4	/	/	4
LF + 250 ppm CS₂	20	11			4	4	3	3	2	4
LF + 500 ppm CS₂	7	7			/	/	3	/	/	4
Control	52	30			6	8	14	7	4	13

2.6. Noise exposure

One loudspeaker with two drivers was positioned in the ceiling of the chambers. The continuous noise lasted for 6 h at 106 dB SPL ($L_{Ex,8h} = 105$ dB). The spectrum was a pink noise filtered on three octave bands ranging from 0.5 to 2 kHz, which corresponds to the lowest hearing sensitivity in rats. Animals were individually placed in compartmentalized cages to avoid any acoustic screens due to inter-individual interaction. As a result, the acoustic field was homogenous inside the chamber (± 1 dB between the different cells of the cage). Moreover, the animals were positioned according to a daily rotating scheme to minimize between-subject differences.

2.7. Blood sample collection and blood analysis

Blood CS_2 concentrations were measured at the end of exposure. While atmospheric concentrations were maintained constant in the inhalation chambers, rats were removed individually using an airlock. Blood was collected from the tail vein in 8 rats from the CS_2 exposure groups and from 18 control animals. As mentioned previously, animals were anesthetized with isoflurane gas during blood collection. The rats' tail tip was first warmed in water, at 39 °C, before blood collection. Blood samples (~ 0.8 mL) were dispensed into 2-mL heparinized vials and frozen at -20 °C until analysis.

Blood samples were acidified with 250 μ L HCl (2%) to release bound CS_2 and stirred for 10 min after the addition of 10 μ L of an IS solution (1.5 g/L MEK in DCM) (Lam and DiStefano, 1986). Samples were extracted with 500 μ L DCM. After shaking (for 30 min) and centrifugation (at 3220g and -4 °C for 20 min), the DCM layer was analyzed using the same chromatographic conditions as described for atmospheric monitoring. In these conditions, linearity was demonstrated between the limit of quantification ($=0.3$ μ g) and 15 μ g CS_2 ; the limit of detection for the method was around 0.1 μ g, accuracy was less than -12.4% and precision was close to 15%.

2.8. Urine collection and TTCA analysis

At the end of exposure, 8 animals per group and 18 controls were placed in individual metabolic-type stainless steel cages with free access to food and water from 3:00 pm to 9:00 am the following day. During this 18-h period, urine was collected and refrigerated by a cooling system surrounding the collection tubes. Urine samples were frozen immediately after collection and stored at -20 °C until the day of analysis, when they were thawed just before use.

The TTCA concentration in urine was determined using an automated column-switching high-performance liquid chromatography system (Simon and Nicot, 1993). Briefly, dilute urine was purified on an anion-exchange column, the fraction of interest was transferred for isocratic analysis on a cyano-amino column. TTCA was detected by measuring UV absorption at 275 nm.

In these conditions, linearity was demonstrated between the limit of quantification ($=0.15$ mg/L) and 50 mg/L; the limit of detection was below 0.05 mg/L; recovery exceeded 95% and within- and between-day precision were less than 1% and 4%, respectively.

2.9. Histological analyses

At the end of the noise and noise-plus- CS_2 exposures, cochleae were harvested from 14 control rats, 9 noise-exposed rats and 8 animals exposed to 250 ppm CS_2 + noise for histological analyses (Table 1). The other animals ($n = 86$) were returned to the animal

facility for a 4-week recovery period before the final histological analyses.

2.9.1. Light microscopy analyses

Immediately following exposure or after the 4-week post-exposure recovery period, animals were deeply anesthetized with ketamine/xylazine mixture (75/5 mg/kg) (i.p.) before decapitation and rapid removal of the cochleae. Both the round and the oval windows were opened and perfused with 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer. Cochleae were immersed in the same fixative for 15 days at 4 °C, then rinsed in cacodylate buffer and post-fixed for 1 h in 1% osmium tetroxide. Cochleae were drilled to obtain a thin layer of cochlear bone. Samples were decalcified and then dehydrated in graded concentrations of ethanol up to 100%, placed in (50/50) resin/propylene oxide, (75/25) resin/propylene oxide, and embedded in 100% resin (Epon/Araldite). After polymerization at 60 °C, semi-thin sections (2.5 μ m) were cut parallel to the mid-modiolar plane, stained with cresyl violet and observed using an Olympus BX41 light microscope.

2.9.2. Immunohistochemistry

At the end of exposure or following the 4-week post-exposure recovery period, deeply anesthetized animals were perfused by an intracardiac injection of heparinized saline solution followed by 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS). Cochleae were removed, perfused through the oval and round windows and immersed in the same fixative for 24 h. Samples were stored at -20 °C in a cryoprotective solution (glycerol 34.5%, ethylene glycol 30%, PBS 20%, water milliQ 15.5%) until labeling. Cochleae were drilled and dissected under a light microscope to remove the cochlear bone capsules, stria vascularis, tectorial and Reissner membranes. Organs of Corti were cut into three parts: the apical, medial and basal turns. Samples were rinsed and immersed in a blocking solution (5% donkey serum and 0.2% triton X-100 in PBS 1x) for 2 h at room temperature. They were then incubated overnight at 4 °C with the primary antibody solution: rabbit anti-myosin VIIa (25–6790, Proteus Biosciences, Ramona, CA, USA; 1:200) to visualize hair cells, and mouse anti-NF200 (N0142, Sigma, Kappelweg, Schnelldorf, Germany; 1:400) to label neurofilaments. After rinsing tissues in 0.2% triton X-100 in PBS (3×15 min), samples were incubated (2×1 h30 at room temperature) in the secondary antibody solution: Alexa-488 donkey anti-rabbit (A21206, Invitrogen, Paisley, United Kingdom; 1:500) + Alexa-555 donkey anti-mouse (A31570, Invitrogen, Paisley, United Kingdom; 1:500) in 0.2% triton in PBS 1x. Samples were finally rinsed several times before mounting between slide and cover slip in Antifade[®] for observation using a Leica TCS-SL confocal microscope.

2.9.3. Scanning electron microscopy

At the end of the experiment, animals were perfused under deep anesthesia by an intracardiac injection of heparinized saline solution followed by 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer. Cochleae were removed from the skull, perfused and immersed in the same fixative for 24 h at 4 °C. They were then rinsed and immersed in 1% osmium tetroxide, 0.2 M cacodylate buffer for 1 h. Samples were drilled and dissected to expose the organ of Corti. After dehydration in graded ethanol solutions, ending with 100% ethanol, the samples were further treated with a critical-point dryer using liquid CO_2 , followed by sputter-coating with gold. Samples were observed and images acquired with a JEOL7400F scanning electron microscope.

2.9.4. Cochleogram

After 4 weeks of recovery, deeply anesthetized animals were sacrificed and cochleae were quickly removed. The two windows

were opened and perfused with succinate dehydrogenase (SDH) solution (0.05 M sodium succinate, 0.05 M phosphate buffer and 0.05% tetranitroblue tetrazolium). Samples were incubated for 1 h in the SDH solution at 37 °C before fixing with 4% paraformaldehyde in PBS for at least 24 h. Subsequently, the cochleae were drilled and the organs of Corti were dissected into three parts and mounted in glycerin on glass slides. All hair cells with detectable SDH staining under a light microscope (Olympus BX41) were counted from the apex to the base of the organ of Corti. Cochleograms were produced for each animal using custom software based on the frequency-place map established by Müller (1991). Cochleograms were used to quantify hair cell loss as a function of distance from the apex of the cochlea.

2.10. Statistical analysis

A one-way ANOVA was used to analyze the statistical significance of variations in DPOAE amplitudes between exposed and control rats at each frequency. At the end of the exposure, the variations corresponded to $AS = [DPOAE1 - DPOAE0] - K1$. The constant K1 was taken as the average of $[DPOAE1 - DPOAE0]$ calculated for the relevant control group. For the AS values at 3.6 kHz, a "Tobit" model was used to determine the mean and standard deviation of hearing loss, while also providing an estimate of the significance of differences between the control and exposed groups. This model makes it possible to take the censored DPOAE values, close to or in the background noise into account. After the 4-week recovery period, variations were computed as $PAS = [DPOAE2 - DPOAE0] - K2$. Where the constant K2 was taken as the average of $[DPOAE2 - DPOAE0]$ calculated for the relevant control group. Statistical results were expressed as follows: $F(df_b, df_r) = F\text{-ratio}$; $p = p\text{ value}$, in which df_b is the number of degrees of freedom between groups, and df_r is the number of residual degrees of freedom. A one-way ANOVA was also used to analyze weight variation (after exposure – before exposure) between groups. A multiple-range test was run to compare variations between groups. This test was performed using the Bonferroni method. Finally, a one-way ANOVA was used to analyze the TTCA concentration and CS₂ blood concentration between groups at the end of exposure. A multiple-range test was run to compare these variations between groups. This test was performed using the Bonferroni method.

The standard deviation, SD, is indicated throughout the article as an indicator of the variability of data distribution. The threshold for statistical significance was set to 5%.

3. Results

3.1. General health

Animals' body weight only decreased in the groups exposed to 250 and 500 ppm of CS₂. The weight differences recorded between all the CS₂-exposed groups and the other groups (control and noise groups) were significant [$F(4, 116) = 18.68$; $p < 0.001$] at the end of the exposure. Animals exposed to 500 ppm lost weight (-6.6 ± 2.2 g), whereas controls put on weight ($+8.0 \pm 0.8$ g). All rats ($n = 117$) were in good health prior to anesthesia according to the standard definition presented by Morton and Griffiths, 1985.

3.2. CS₂: atmospheric vs. blood concentrations

The relationship between atmospheric CS₂ concentrations and blood CS₂ concentrations measured at the end of exposure is plotted in Fig. 2. Blood samples were collected just after the end of the exposure period from eight CS₂-exposed rats and 18 control rats. Significant differences [$F(3, 41) = 121.78$; $p < 0.001$] were

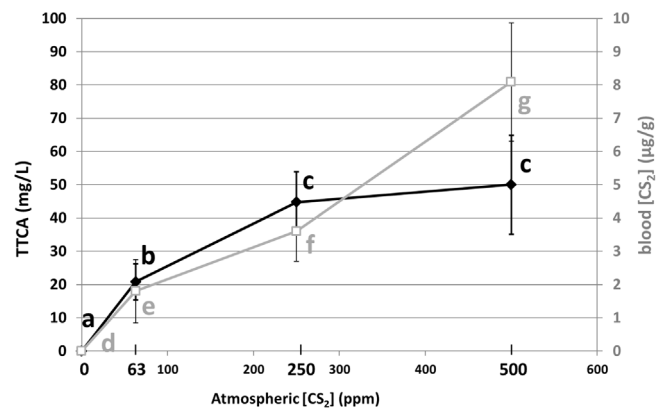


Fig. 2. Relationship between atmospheric CS₂ concentrations (ppm) and blood CS₂ or urinary TTCA concentrations. Right y-axis: blood CS₂ concentration (µg/g); left y-axis: urinary TTCA concentration (mg/L). CS₂: carbon disulfide, TTCA: 2-Thio-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid. Statistical comparison was based on the Bonferroni method, and differences are represented by letters. Groups with the same letter are not significantly different, whereas those with different letters are. a,b,c: TTCA. d,e,f, g: CS₂ blood burden.

found between groups: 63 ppm CS₂ (1.8 ± 1.0 µg/g), 250 ppm CS₂ (3.6 ± 0.9 µg/g) and 500 ppm CS₂ (8.1 ± 1.8 µg/g). CS₂ concentrations in all samples from control rats were below the limit of detection for the method. The Bonferroni test indicated significant differences between the different groups, with blood CS₂ concentrations increasing as a function of the atmospheric CS₂ concentrations.

3.3. Atmospheric CS₂ vs. urinary TTCA concentrations

Fig. 2 also shows the relationship between the main urinary metabolite (TTCA) as measured at the end of the exposure period, and the relevant atmospheric CS₂ concentrations. Urine samples were collected from 8 rats and 18 control rats for 18 h post-exposure. A statistically significant difference was observed between groups [$F(3, 41) = 90.63$; $p < 0.001$]. In addition, a significant difference was shown between rats exposed to 63 ppm CS₂ (20.8 ± 5.4 mg/L) and rats exposed to a higher doses of CS₂. In contrast, no significant difference was found between groups exposed to 250 ppm (44.7 ± 9.2 mg/L) and 500 ppm (50 ± 14.8 mg/L).

3.4. Hearing tests

3.4.1. Continuous noise exposure

Exposure to continuous noise with a $L_{EX,8h}$ of 105 dB SPL caused significant decreases in the DPOAE amplitudes measured between 3.6 and 6 kHz. The upper frequencies of the DPOAE variation were one octave higher than the three-octave band noise spectrum used for the exposure (0.5, 1 and 2 kHz). The maximum variation in AS was obtained at 4.8 kHz (-13 ± 7 dB), whereas variations in PAS were similar at 3.6 and 4.8 kHz (-5 ± 4 dB) (Fig. 3). The AS value at 3.6 kHz was calculated by a "Tobit" model to maintain information from censored DPOAE measurement values which were too close to or included in the background noise. Prior to exposure, the DPOAE amplitudes at 3.6 kHz were lower (approximately 12 dB) than those measured at other frequencies. Further DPOAE amplitude reduction following the exposure protocol made it impossible to measure a DPOAE value above the background noise for many of the rats. Therefore, the DPOAE could not be precisely measured at 3.6 kHz in the rat having suffered the greatest hearing loss. Therefore, the minimal AS values were used in a "Tobit" test to estimate the hearing loss at this frequency. The same procedure

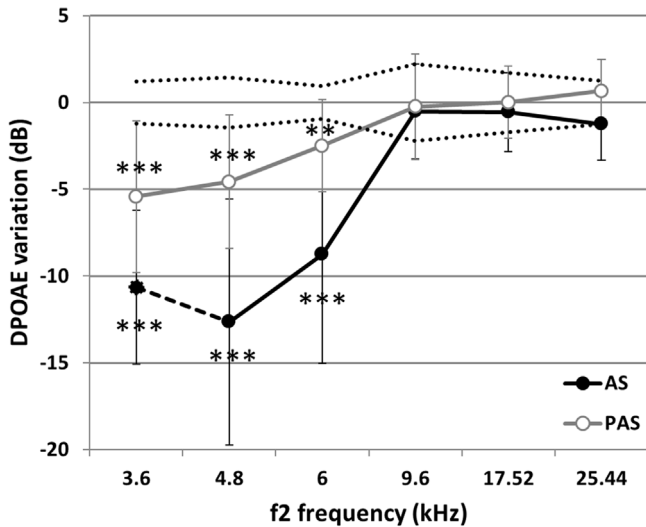


Fig. 3. DPOAE variations in the low-frequency noise group (LF). Black line: AS = [DPOAE1–DPOAE0]_{Expo} – [DPOAE1–DPOAE0]_{Ctrl}. Gray line: PAS = [DPOAE2–DPOAE0]_{Expo} – [DPOAE2–DPOAE0]_{Ctrl}. Values correspond to mean ± SD. Dotted lines represent the variability in the AS control group (SD). ** p < 0.01, *** p < 0.001, significantly different from the mean for the control group, Bonferroni test.

was used for AS values at 3.6 kHz for all groups. After 4 weeks without noise, all rats had recovered making the measurement possible at all frequencies.

3.4.2. 63 ppm CS₂ + noise exposure

Significant AS and PAS values were measured from 3.6 to 9.6 kHz. A slight, but not significant (p=0.15), increase in AS was noted at 9.6 kHz. The profile of the curves shown in Fig. 4 was similar to that obtained without CS₂, i.e., upon exposure to noise alone (Fig. 3). The amplitude shifts measured at 4.8 and 6 kHz were slightly (but not significantly) lower than those measured in the group exposed to noise alone.

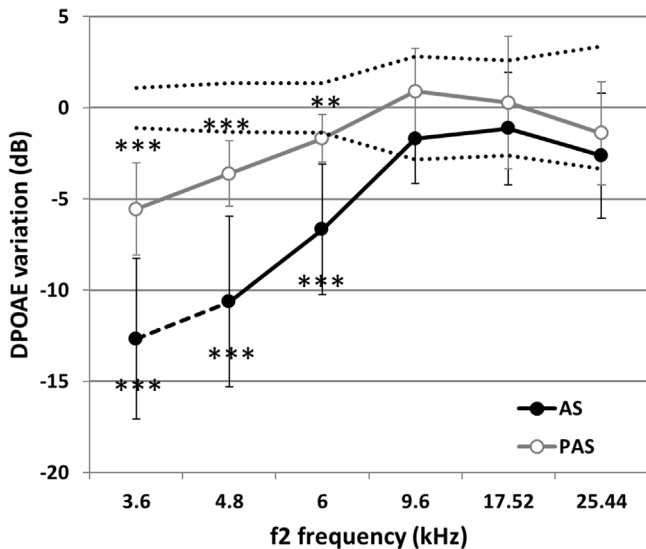


Fig. 4. DPOAE variations in the group exposed to 63-ppm CS₂ plus low-frequency noise. Black line: AS = [DPOAE1–DPOAE0]_{Expo} – [DPOAE1–DPOAE0]_{Ctrl}. Gray line: PAS = [DPOAE2–DPOAE0]_{Expo} – [DPOAE2–DPOAE0]_{Ctrl}. Values correspond to mean ± SD. Dotted lines represent the variability in the AS control group (SD). ** p < 0.01, *** p < 0.001, significantly different from the mean for the control group, Bonferroni test.

3.4.3. 250-ppm CS₂ + noise exposure

Compared to control animals (unexposed rats), the AS for the group exposed to 250-ppm CS₂ + noise were significant from 3.6 to 9.6 kHz (Fig. 5). As a result, the frequency range affected by the AS was more extensive than that observed with exposure to noise alone (Fig. 3), and the tendency observed with the 63 ppm CS₂ + noise group was confirmed.

However, after the 4-week recovery period, the frequency range affected by PAS was identical to that obtained in the noise-only exposure group: from 3.6 to 6 kHz (Fig. 5). Consequently, the extension of the window of damaged frequencies was temporary.

The DPOAE variations generated by 250 ppm CS₂ + noise were lower at 4.8 and 6 kHz than those measured in the noise group (Fig. 3), in particular for AS values.

3.4.4. 500 ppm CS₂ + noise exposure

The data obtained with 500 ppm CS₂ + noise (Fig. 6), and with 250 ppm + noise (Fig. 5), were similar. The AS calculated from DPOAE measured at the end of exposure were significant from 3.6 to 9.6 kHz compared to the values determined for the control group, but the degree of significance was higher at 9.6 kHz than that recorded with the 250 ppm + noise group.

After the 4-week recovery period, the PAS based on DPOAE measurements were only significant in the frequency window ranging from 3.6 to 6 kHz. Variations in DPOAE and their statistical significance were slightly greater for the 500 ppm + noise exposure than for the 250 ppm + noise exposure condition.

As for the 250 ppm + noise group, the DPOAE variations of 500 ppm CS₂ + noise group at 4.8 and 6 kHz were lower than those measured in the group exposed to noise alone.

3.5. Histological analyses

3.5.1. Immunohistochemistry

Cochleae from all animals immunolabeled with anti-myosin VIIa and anti-neurofilament antibodies had similar morphological features throughout all cochlear segments at the end of the exposure period and after recover. As shown in Fig. 7, three rows of

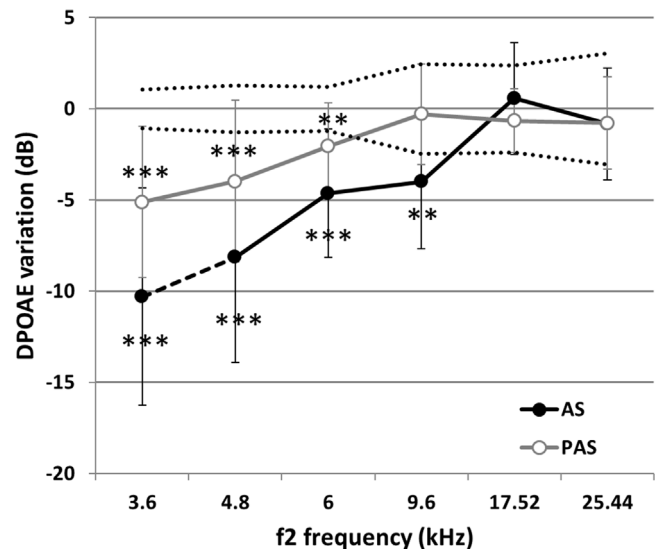


Fig. 5. DPOAE variations in the 250-ppm CS₂ plus low-frequency noise group. Black line: AS = [DPOAE1–DPOAE0]_{Expo} – [DPOAE1–DPOAE0]_{Ctrl}. Gray line: PAS = [DPOAE2–DPOAE0]_{Expo} – [DPOAE2–DPOAE0]_{Ctrl}. Values correspond to mean ± SD. Dotted lines represent variability in the AS for the control group (SD). ** p < 0.01, *** p < 0.001, significantly different from the mean for the control group, Bonferroni test.

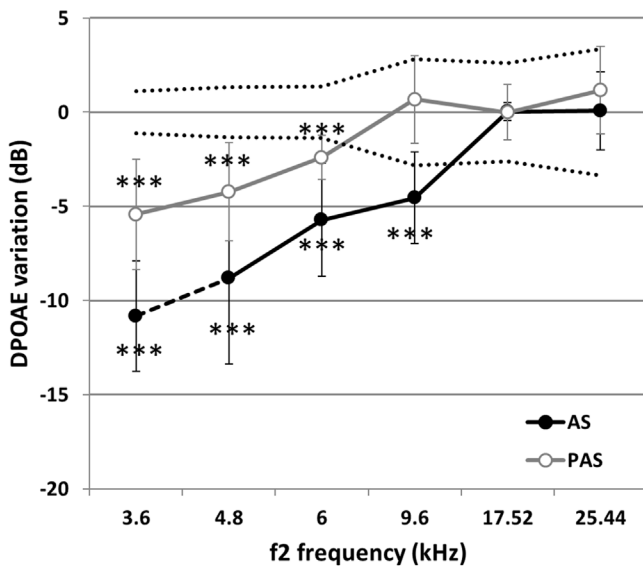


Fig. 6. DPOAE variations in the 500-ppm CS₂ plus low-frequency noise group. Black line: AS = [DPOAE1–DPOAE0]_{Expo} – [DPOAE1–DPOAE0]_{Ctrl}. Gray line: PAS = [DPOAE2–DPOAE0]_{Expo} – [DPOAE2–DPOAE0]_{Ctrl}. Values correspond to mean ± SD. Dotted lines represent variability in the AS control group (SD). *** p < 0.001, significantly different from the mean for the control group, Bonferroni test.

OHCs and one row of inner hair cells could be identified thanks to the anti-myosin VIIa antibody. No loss of hair cells related to any treatment was observed. The anti-neurofilament antibody consistently labeled the afferent terminals contacting the inner hair cells, and no differences were observed between exposed (Fig. 7A) and control (Fig. 7B) animals, either following exposure or after the recovery period. Neither the noise nor the CS₂ + noise co-exposure caused overt effects in the distribution of afferents and their neurofilament content.

3.5.2. Light microscopy

The organ of Corti and the spiral ganglion were examined in semi-thin sections from epoxy-resin-embedded specimens. In all sections, the morphology was similar to that described in the

literature for control adult rats. In the organ of Corti, the inner hair cells, three rows of OHCs, Deiters' cells and Hensen's cells were observed with normal morphological features. Normal morphology was maintained for control group (Fig. 8C) and for all exposure groups, including rats exposed to 500 ppm-CS₂ + noise (Fig. 8A), and all cochlear regions, including the apical turn of the cochlea, which is the region dedicated to the discrimination of low-frequencies. The organ of Corti was no different at the end of exposure and after the 4-week post-exposure recovery period. Moreover, the spirals ganglion images of control rats (Fig. 8D) were similar to those of exposed rats (Fig. 8B). No damage to the spiral ganglion cells was induced by exposure to noise or co-exposure to CS₂ + noise. Therefore, the cochleae remained morphologically intact regardless of the exposure conditions and the moment of observation.

3.5.3. Cochleogram

After the recovery period, the cochleograms obtained for the control (Fig. 9) and exposed groups were similar. Regardless of the group considered, very small numbers of hair cells were lost along the organ of Corti. For all the groups, loss of inner hair cells and of hair cells from the first row of OHC never exceeded 1%, and in the second and third rows of OHC losses of 1 or 2% were recorded.

Fig. 10 shows an average cochleogram obtained from four rats exposed to low-frequency continuous noise plus 500-ppm CS₂. Similar cochleograms were obtained for all the other groups tested, including controls (Fig. 9). Although the hearing loss induced by the low-frequency noise was significant, no cell loss was visible on the cochleograms. Like for exposure to noise alone, co-exposure to noise and solvent did not visibly alter the cochleogram (Fig. 10).

The absence of some OHCs seen at the extreme base (over 50 kHz) reported in the cochleogram is not due to CS₂, but to the morphology of the organ of Corti. The organ of Corti is narrow in this region, so inner hair cells appear first, followed by the first, second, and finally the third row of OHCs.

3.5.4. Scanning electron microscopy

Auditory sensory epithelia were observed by scanning electron microscopy in control rats and in rats exposed to low-frequency noise alone and in rats co-exposed to both noise and 250-ppm of

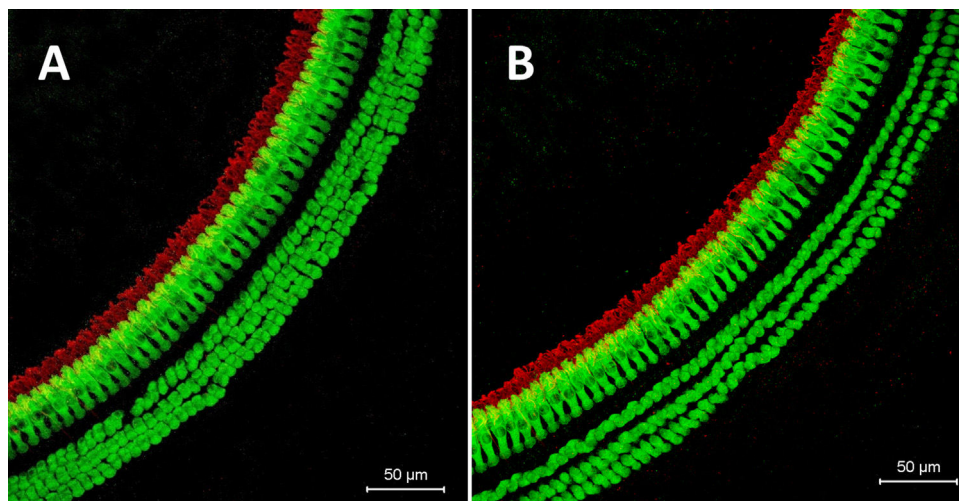


Fig. 7. Representative image of the auditory sensory epithelia showing the organ of Corti immunolabeled with the rabbit anti-myosin VIIa antibody (green) and the mouse anti-neurofilament 200 (red). Yellow color corresponds to overlapping of the green and red signals. The images show organs of Corti from the middle turn around 6 and 7 kHz of a rat from the group exposed to 250 ppm of CS₂ plus noise for 4 weeks (A) and a control rat (B). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

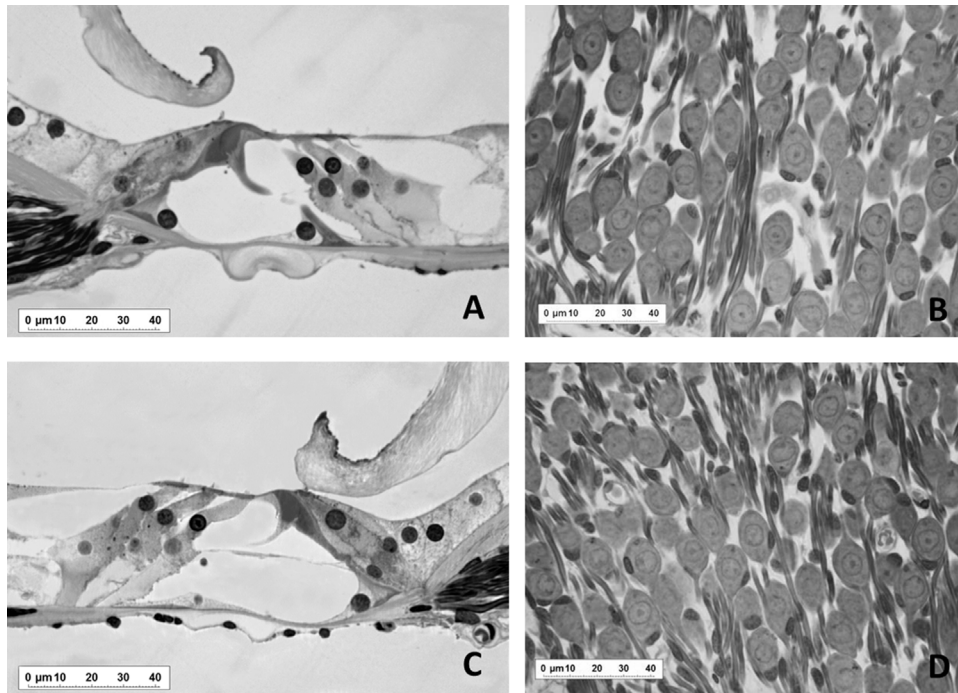


Fig. 8. Representative image of the auditory sensory epithelia from a rat co-exposed to CS₂ plus noise. The light microscopy image was acquired at the end of the recovery period. Image of an organ of Corti (A) and apical spiral ganglion (B) from a rat exposed to 500-ppm CS₂ plus noise for 4 weeks. Image of an organ of Corti (C) and apical spiral ganglion (D) from a control rat.

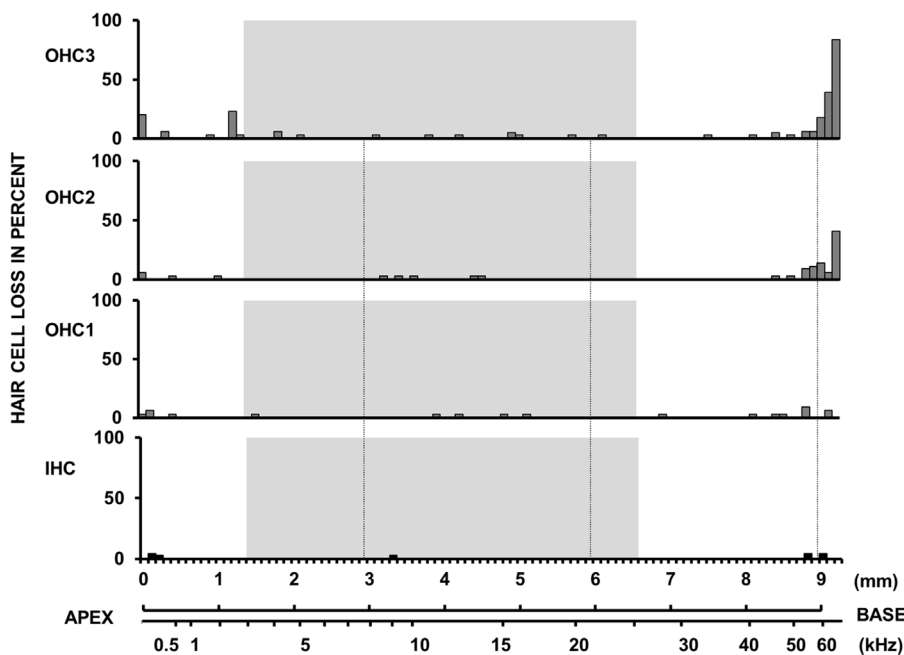


Fig. 9. Average cochleogram (n = 4/group) from control group 4 weeks after recovery period. X-axis – upper trace: distance (mm) along the spiral course of the organ of Corti – lower trace: frequency-map. Y-axis: percent hair cell loss. IHC: Inner hair cells; OHC1 first row of outer hair cells, OHC2 second row of outer hair cells, OHC3 third row of outer hair cells. The gray area indicates the frequency range explored using DPOAE-based hearing tests.

CS₂ (but not other concentrations). Regardless of the group, no evidence of injury to stereociliae was observed (Fig. 11B,C).

In fact, samples from all these animals looked like control samples (Fig. 11A). These data demonstrated that neither the low-frequency noise nor the combination of noise and CS₂ caused injury to stereociliae.

4. Discussion

Following exposure to noise and/or solvent, all rats were in good health and showed no signs of suffering: no prostration, food intake was normal, and animals' fur had a good-looking aspect. Some effects on body weight were observed, with decreased

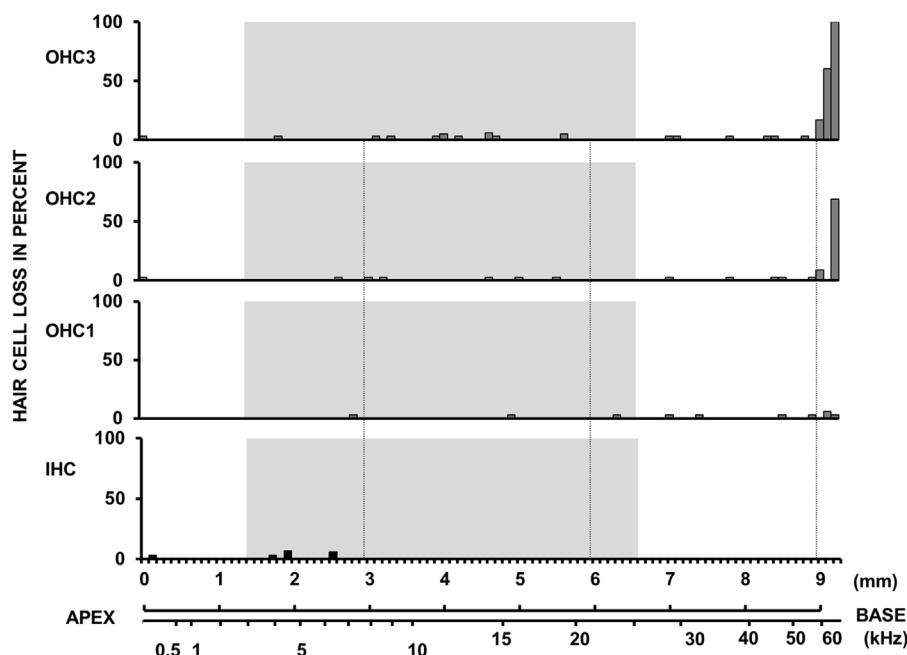


Fig. 10. Average cochleogram ($n=4/\text{group}$) 4 weeks after exposure to low-frequency continuous noise plus 500-ppm of CS_2 . X-axis – upper trace: distance (mm) along the spiral course of the organ of Corti – lower trace: frequency-map. Y-axis: percent hair cell loss. IHC: Inner hair cells; OHC1 first row of outer hair cells, OHC2 second row of outer hair cells, OHC3 third row of outer hair cells. The gray area indicates the frequency range explored using DPOAE-based hearing tests.

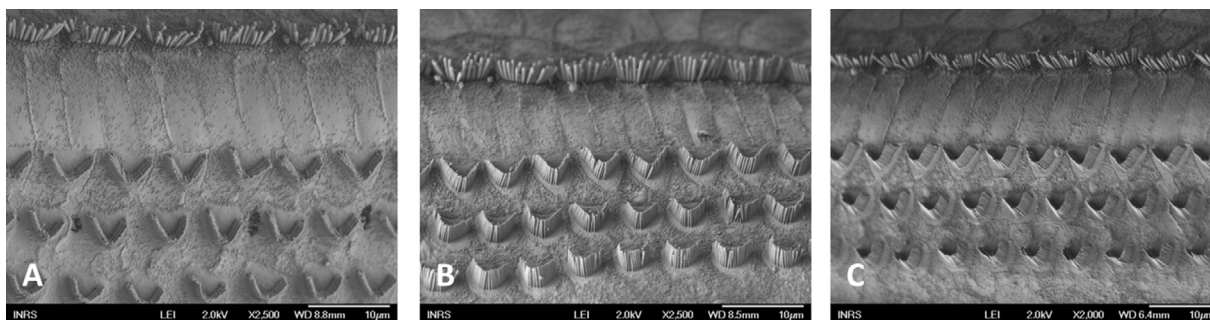


Fig. 11. Scanning electron micrographs of organs of Corti from Long Evans rats at approximately 9 kHz. (A): Organ of Corti (X 2500) from a control animal showing the organization of stereociliae on the outer hair cells and inner hair cells. (B): Organ of Corti (X 2500) from a rat exposed to low-frequency noise. $L_{\text{EX,8h}}$ 105 dB SPL, 6 h per day, 5 days per week for 4 weeks. (C): Organ of Corti (X 2000) from a rat co-exposed to noise and CS_2 (250-ppm). Low-frequency noise ($L_{\text{EX,8h}}$ of 105 dB SPL) plus 250-ppm of CS_2 , 6 h per day, 5 days per week for 4 weeks.

weight only in groups exposed to 250 and 500 ppm of CS_2 . The greatest weight loss was observed at 500 ppm, at -6.6 ± 2.2 g. In contrast, control animals put on weight ($+8.0 \pm 0.8$ g). In general, 2.6% total bodyweight was lost following exposure to 500 ppm CS_2 , which is a reasonable proportion. These data are consistent with the scientific literature, where weight loss caused by exposure to CS_2 has previously been reported (Hirata et al., 1992; Rebert and Becker, 1986).

In the current study, the actual CS_2 exposure was assessed by determining CS_2 concentrations in blood, and TTCA in urine. The metabolite provides a specific and sensitive measurement of exposure to CS_2 (Campbell et al., 1985; Drexler et al., 1995), and is used today as a relevant biological indicator of occupational exposure to CS_2 (Thienpont et al., 1990). The data obtained showed an increase in blood CS_2 concentration, and in the urinary concentration of TTCA which was proportional to the atmospheric CS_2 concentration.

In terms of the metabolite, the increase in TTCA between 250 and 500 ppm of CS_2 was only 12%, even though the atmospheric

CS_2 concentration doubled. In contrast, a 115% increase in TTCA was observed between 63 and 250 ppm of CS_2 (a 4-fold increase in exposure). These results suggested saturation of the metabolic pathway for CS_2 conjugation at higher atmospheric concentrations. But the strong increase in blood concentration from 250 ppm (Fig. 2) leads us to suspect that all the metabolic pathways were saturated in our animals. This saturation is in agreement with previous observations (Kivistö et al., 1995; Moorman et al., 1998). Indeed, Kivistö et al., 1995, demonstrated that urinary excretion of TTCA in rats exposed to 50 or 500 ppm for 6 h was not affected by pre-treatment with P-450 enzyme inducers or glutathione depletors. In addition, Moorman et al., 1998, showed that the circulating CS_2 concentration in rats exposed by inhalation to 500 and 800 ppm for 13 weeks compared to animals exposed to 50 ppm was higher than would be predicted if the relationship between atmospheric concentration and received dose were directly proportional.

The spectrum of the noise to which animals were exposed was spread out over the three octave bands (frequency ranged from

0.35 to 2.8 kHz). Just after the exposure period, a hearing loss was recorded over a frequency window ranging from the lowest frequencies measurable with DPOAEs (3.6 kHz) up to 6 kHz (Fig. 3). This hearing loss extended to more than one octave beyond the spectrum of the noise exposure, and was thus broader than expected. Indeed, it has been reported that the mid-frequency-induced hearing loss is located half an octave above the noise spectrum (Campo et al., 2011; McFadden, 1986). After a 4-week recovery period, the frequency window for the hearing loss was identical, although the magnitude decreased around 5 dB. Thus, there was partial recovery of the peripheral auditory capacity. Interestingly, this hearing loss was not associated with histopathological damage. At the end of the exposure period, no evidence of excitotoxicity was observed. Thus, we found no alteration at the level of neurofilament expression in the afferent terminals associated with the IHC, nor hair cell loss. No vacuolization underneath the inner hair cells reflecting excitotoxicity was observed at the end of the exposure period. The density of the cellular bodies and their morphological features were comparable in control and exposed rats (whatever the exposure group). In addition, the stereociliae had a perfectly normal aspect. While DPOAEs are a specific indicator of global OHC function (Avan et al., 2001), no histopathological changes were found to explain the decrease in DPOAE amplitudes.

This unexpected result could be explained by a number of mechanisms. First, a slight mechanical decoupling of the stereociliae from the tectorial membrane (Zwislocki, 1984) or a modification in the stiffness of the stereociliar rootlets could have affected the mechanosensory process of transduction at the level of the OHCs (Liberman and Dodds, 1987). Alternatively, a dysfunction in the feedback control loop of the OHC could have caused reorganization of the synapses underneath the hair cells of the organ of Corti (Liberman and Kujawa, 2017) for both types of neuron terminations or an alteration of the efferent fibers (90% of which are connected to OHC). In both of these cases, the number of cellular nuclei and fibers would remain unchanged, despite the inefficacy of the auditory peripheral system.

At the end of the exposure period, the auditory deficits measured at noise-injured frequencies (3.6, 4.8 and 6 kHz) in co-exposed animals were lower than those recorded in rats exposed to noise alone. This effect of CS₂ was already observable at 63 ppm. This observation may be somewhat unexpected, but we know that, in the case of other solvents, moderate concentrations can have a neuropharmacological effect which prevails over their cochleotoxic effects (Campo et al., 2014; Carreres Pons et al., 2017). This neuropharmacological effect consists in a significant decrease in the threshold of noise/sound required to trigger the middle-ear reflex, one of these functions of which is to reduce the acoustic energy reaching the cochlea.

The neuropharmacological effect of CS₂ on the middle-ear reflex was assessed with 63 ppm, which is 12 times the European threshold limit value and only 3 times the American TWA; the effect becomes obvious at 250 ppm.

However, CS₂ is not known to be a cochleotoxic agent like aromatic solvents, but is more likely to be an ototoxic agent causing a retrocochlear pattern of hearing loss (Hodgkinson and Prasher, 2006; Vyskocil et al., 2012). In the present experiment, neuropharmacological effects were detectable at all concentrations, which is not the case with cochleotoxic solvents (Campo et al., 2014).

Compared to the effects of noise alone, which were restricted to a window up to 6.3 kHz, co-exposure to CS₂ plus noise resulted in a dose-dependent broadening of the window of injury, with frequencies up to 9.6 kHz affected. At 63 ppm, the 2-dB deficit at 9.6 kHz was not significant, but the tendency was nevertheless clear. Interestingly, at the end of the 4-week recovery period, the

frequency range injured in the co-exposed groups was identical to that in the group exposed to noise alone. Therefore, the extension of the injury to a broader frequency range upon exposure to CS₂ appears to be a temporary phenomenon. Temporary hearing loss due to CS₂ exposure has previously been reported in rats (Hirata et al., 1992) and may also occur in humans (Hirata et al., 1996).

The enlargement of the window of affected frequencies could be explained by a central effect, and more specifically the efferent pathway which could alter the function of the peripheral sound receptor. It is noticeable that impaired frequencies neighbored the noise-injured frequencies (9.6 kHz vs. 6 kHz). Consequently, it is possible that CS₂ alters the metabolism of the nerve cells involved in the discrimination of acoustic frequencies through the so-called tonotopic process.

5. Conclusions

CS₂ can potentiate the effects of noise over a broader frequency range than noise alone. The phenomenon is temporary and does not seem to generate permanent supplementary auditory deficits. No morphological change was revealed at the level of the inner ear, which means that the functional deficits recorded in the present study could not be explained by major injury to the organ of Corti, or the ganglion neurons.

However, in the present study, exposure to CS₂ lasted only 4 weeks, which is quite short compared to other studies reporting neurotoxic effects of CS₂ at the level of the auditory pathways. In case of longer exposure, during an occupational career, the effect could be permanent as related by epidemiological studies. It is clear that a follow-up of the workers co-exposed to noise and CS₂ should be taken into consideration in hearing conservation programs.

The results obtained reinforce the need to consider co-exposures when determining occupational threshold limits.

Funding

This work was supported by the French Research and Safety Institute for the Prevention of Occupational Accidents and Diseases (INRS, France) and by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) – FEDER (grant number BFU2015-66109-R) and the Generalitat of Catalonia (grant number SGR 943).

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors would like to thank Marie-Joseph Décret, Lionel Dussoul and Laurine Douteau for their help with rat handling and husbandry and Aurélie Remy for her contribution to the statistical analyses.

The confocal microscopy studies were performed at the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB). We thank Benjamín Torrejon-Escribano for advice on confocal imaging.

References

- Avan, P., Bonfils, P., Mom, T., 2001. Correlations among distortion product otoacoustic emissions, thresholds and sensory cell impairments. *Noise Health* 3, 1–18.
- Beauchamp, R.O., Bus, J.S., Popp, J.A., Boreiko, C.J., Goldberg, L., 1983. A critical review of the literature on carbon disulfide toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 11, 169–278. doi:<http://dx.doi.org/10.3109/10408448309128255>.

- Bohne, B.A., Harding, G.W., 2000. Degeneration in the cochlea after noise damage: primary versus secondary events. *Am. J. Otol.* 21, 505–509.
- Burdick, C., 1982. Hearing Loss from Low-frequency Noise. .
- Campbell, L., Jones, A.H., Wilson, H.K., 1985. Evaluation of occupational exposure to carbon disulphide by blood, exhaled air, and urine analysis. *Am. J. Ind. Med.* 8, 143–153.
- Campo, P., Venet, T., Rumeau, C., Thomas, A., Rieger, B., Cour, C., Cosnier, F., Parietti-Winkler, C., 2011. Impact of noise or styrene exposure on the kinetics of presbycusis. *Hear. Res.* 280, 122–132. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2011.04.016.
- Campo, P., Morata, T.C., Hong, O., 2013. Chemical exposure and hearing loss. *Dis. Mon. DM* 59, 119–138. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.disamonth.2013.01.003.
- Campo, P., Venet, T., Thomas, A., Cour, C., Brochard, C., Cosnier, F., 2014. Neuropharmacological and cochleotoxic effects of styrene. Consequences on noise exposures. *Neurotoxicol. Teratol.* 44, 113–120. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2014.05.009.
- Carreres Pons, M., Chalansonnet, M., Venet, T., Thomas, A., Nunge, H., Merlen, L., Cosnier, F., Llorens, J., Campo, P., 2017. Carbon disulfide potentiates the effects of impulse noise on the organ of Corti. *Neurotoxicology* 59, 79–87. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.02.003.
- Chang, S.-J., Shih, T.-S., Chou, T.-C., Chen, C.-J., Chang, H.-Y., Sung, F.-C., 2003. Hearing loss in workers exposed to carbon disulfide and noise. *Environ. Health Perspect.* 111, 1620–1624.
- Chen, G.-D., Henderson, D., 2009. Cochlear injuries induced by the combined exposure to noise and styrene. *Hear. Res.* 254, 25–33. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2009.04.005.
- Clerici, W.J., Fechter, L.D., 1991. Effects of chronic carbon disulfide inhalation on sensory and motor function in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 249–255.
- Cox, C., Que Hee, S.S., Lynch, D.W., 1996. Urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA) as the major urinary marker of carbon disulfide vapor exposure in rats. *Toxicol. Ind. Health* 12, 81–92. doi:http://dx.doi.org/10.1177/074823379601200105.
- DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL OF 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Off. J. Eur. Union.**
- Dannhof, B.J., Bruns, V., 1993. The innervation of the organ of Corti in the rat. *Hear. Res.* 66, 8–22.
- Drexler, H., Göen, T., Angerer, J., 1995. Carbon disulphide. II. Investigations on the uptake of CS₂ and the excretion of its metabolite 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid after occupational exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 67, 5–10.
- Göen, T., Schramm, A., Baumeister, T., Uter, W., Drexler, H., 2014. Current and historical individual data about exposure of workers in the rayon industry to carbon disulfide and their validity in calculating the cumulative dose. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 87, 675–683. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00420-013-0910-9.
- Gottfried, M.R., Graham, D.G., Morgan, M., Casey, H.W., Bus, J.S., 1985. The morphology of carbon disulfide neurotoxicity. *Neurotoxicology* 6, 89–96.
- Henley, C.M., Owings, M.H., Stagner, B.B., Martin, G.K., Lonsbury-Martin, B.L., 1990. Postnatal development of 2f1-f2 otoacoustic emissions in pigmented rat. *Hear. Res.* 43, 141–148.
- Hirata, M., Ogawa, Y., Okayama, A., Goto, S., 1992. Changes in auditory brainstem response in rats chronically exposed to carbon disulfide. *Arch. Toxicol.* 66, 334–338.
- Hirata, M., Ogawa, Y., Goto, S., 1996. A cross-sectional study on nerve conduction velocities among workers exposed to carbon disulphide. *Med. Lav.* 87, 29–34.
- Hodgkinson, L., Prasher, D., 2006. Effects of industrial solvents on hearing and balance: a review. *Noise Health* 8, 114–133.
- Johnson, B.L., Boyd, J., Burg, J.R., Lee, S.T., Xintaras, C., Albright, B.E., 1983. Effects on the peripheral nervous system of workers' exposure to carbon disulfide. *Neurotoxicology* 4, 53–65.
- Kivistö, H., Elovaara, E., Riihimäki, V., Aitio, A., 1995. Effect of cytochrome P450 isozyme induction and glutathione depletion on the metabolism of CS₂ to TTCA in rats. *Arch. Toxicol.* 69, 185–190.
- Knobloch, K., Stetkiewicz, J., Wrońska-Nofer, T., 1979. Conduction velocity in the peripheral nerves of rats with chronic carbon disulphide neuropathy. *Br. J. Ind. Med.* 36, 148–152.
- Kobel, M., Le Prell, C.G., Liu, J., Hawks, J.W., Bao, J., 2016. Noise-induced cochlear synaptopathy: past findings and future studies. *Hear. Res.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2016.12.008.
- Kotseva, K., Braeckman, L., De Bacquer, D., Bulat, P., Vanhoorne, M., 2001. Cardiovascular effects in viscose rayon workers exposed to carbon disulfide. *Int. J. Occup. Environ. Health* 7, 7–13. doi:http://dx.doi.org/10.1179/107735201800339713.
- Kurabi, A., Keithley, E.M., Housley, G.D., Ryan, A.F., Wong, A.C.-Y., 2016. Cellular mechanisms of noise-induced hearing loss. *Hear. Res.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2016.11.013.
- Lam, C.W., DiStefano, V., 1986. Characterization of carbon disulfide binding in blood and to other biological substances. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 86, 235–242.
- Liberman, M.C., Dodds, L.W., 1987. Acute ultrastructural changes in acoustic trauma: serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates. *Hear. Res.* 26, 45–64.
- Liberman, M.C., Kujawa, S.G., 2017. Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: manifestations and mechanisms. *Hear. Res.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2017.01.003.
- Llorens, J., 2013. Toxic neurofilamentous axonopathies—accumulation of neurofilaments and axonal degeneration. *J. Intern. Med.* 273, 478–489. doi:http://dx.doi.org/10.1111/joim.12030.
- Müller, M., 1991. Frequency representation in the rat cochlea. *Hear. Res.* 51, 247–254.
- McFadden, D., 1986. The curious half-Octave shift: evidence for a basalward migration of the traveling-Wave envelope with increasing intensity. In: Salvi, R. J., Henderson, D., Hamernik, R.P., Colletti, V. (Eds.), *Basic and Applied Aspects of Noise-Induced Hearing Loss*. Springer, US, Boston MA, pp. 295–312. doi:http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4684-5176-4_21.
- Moorman, M.P., Sills, R.C., Collins, B.J., Morgan, D.L., 1998. Carbon disulfide neurotoxicity in rats: II. Toxicokinetics. *Neurotoxicology* 19, 89–97.
- Morata, T.C., 1989. Study of the effects of simultaneous exposure to noise and carbon disulfide on workers' hearing. *Scand. Audiol.* 18, 53–58.
- Morton, D.B., Griffiths, P.H., 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet. Rec.* 116, 431–436.
- Moser, T., Predoehl, F., Starr, A., 2013. Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. *Otol. Neurotol. Off. Publ. Am. Otol. Soc. Am. Neurotol. Soc. Eur. Acad. Otol. Neurotol.* 34, 995–1004. doi:http://dx.doi.org/10.1097/MAO.0b013e3182814d4a.
- Newhook, R., Meek, M.E., 2002. Carbon Disulfide, Concise International Chemical Assessment Document. World Health Organization, Geneva.
- Pappolla, M., Penton, R., Weiss, H.S., Miller, C.H., Sahenk, Z., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P., 1987. Carbon disulfide axonopathy. Another experimental model characterized by acceleration of neurofilament transport and distinct changes of axonal size. *Brain Res.* 424, 272–280.
- Partanen, T., Hernberg, S., Nordman, C.H., Sumari, P., 1970. Coronary heart disease among workers exposed to carbon disulphide. *Br. J. Ind. Med.* 27, 313–325.
- Pouyatos, B., Gearhart, C.A., Fechter, L.D., 2005. Acrylonitrile potentiates hearing loss and cochlear damage induced by moderate noise exposure in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 46–56. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.015.
- Rebert, C.S., Becker, E., 1986. Effects of inhaled carbon disulfide on sensory-evoked potentials of Long-Evans rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8, 533–541.
- Riihimäki, V., Kivistö, H., Peltonen, K., Helpiö, E., Aitio, A., 1992. Assessment of exposure to carbon disulfide in viscose production workers from urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid determinations. *Am. J. Ind. Med.* 22, 85–97.
- Rolecki, R., Tarkowski, S., 2000. Draft Document for Carbon Disulfide. Lodz, The Nofer Institute of Occupational Medicine.
- Sulsky, S.I., Hooven, F.H., Burch, M.T., Mundt, K.A., 2002. Critical review of the epidemiological literature on the potential cardiovascular effects of occupational carbon disulfide exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 75, 365–380. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00420-001-0309-x.
- Takebayashi, T., Omae, K., Ishizuka, C., Nomiya, T., Sakurai, H., 1998. Cross sectional observation of the effects of carbon disulphide on the nervous system, endocrine system, and subjective symptoms in rayon manufacturing workers. *Occup. Environ. Med.* 55, 473–479.
- Thienpont, L.M., Depourcq, G.C., Nelis, H.J., De Leenheer, A.P., 1990. Liquid chromatographic determination of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid isolated from urine by affinity chromatography on organomercurial agarose gel. *Anal. Chem.* 62, 2673–2675.
- Vanhoorne, M.H., Ceulemans, L., De Bacquer, D.A., De Smet, F.P., 1995. An epidemiologic study of the effects of carbon disulfide on the peripheral nerves. *Int. J. Occup. Environ. Health* 1, 295–302. doi:http://dx.doi.org/10.1179/oe.1995.1.4.295.
- Venet, T., Campo, P., Thomas, A., Cour, C., Rieger, B., Cosnier, F., 2015. The tonotopicity of styrene-induced hearing loss depends on the associated noise spectrum. *Neurotoxicol. Teratol.* 48, 56–63. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2015.02.003.
- 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. doi:http://dx.doi.org/10.1177/0748233711425067.
- Wang, Y., Hirose, K., Liberman, M.C., 2002. Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 3, 248–268. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s101620020028.
- Zwislocki, J.J., 1984. How OHC lesions can lead to neural cochlear hypersensitivity. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 97, 529–534. doi:http://dx.doi.org/10.3109/00016488409132931.

Combined exposure to carbon disulfide and low-frequency noise reversibly affects vestibular function

Running title: Carbon disulfide and noise effects on balance

Monique Chalansonnet^{1,*}, Maria Carreres-Pons^{1,3}, Thomas Venet¹, Aurélie Thomas¹, Lise Merlen¹, Carole Seidel¹, Frédéric Cosnier¹, Hervé Nunge¹, Benoît Pouyatos¹, Jordi Llorens^{3,4}, Pierre Campo^{1,2}

¹Institut National de Recherche et de Sécurité. Rue du Morvan. CS 60027. F-54519 Vandœuvre Cedex. France

²DevAH EA 3450 – Développement, Adaptation et Handicap. Régulations cardio-respiratoires et de la motricité-Université de Lorraine. F-54500 Vandœuvre. France

³Departament de Ciències Fisiològiques and Institute of Neurosciences, Universitat de Barcelona, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

⁴Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

* Corresponding author: Institut National de Recherche et de Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, F-54519 Vandœuvre Cedex, France.
E-mail address: monique.chalansonnet@inrs.fr

Acronyms

CS₂: carbon disulfide

VOR: vestibulo-ocular reflex

PRN: post-rotatory nystagmus

PCR: Polymerase chain reaction

dB(A): A-weighted decibel

Highlights

1. Co-exposure to low-frequency noise and carbon disulfide temporarily perturbs vestibular function.
2. Carbon disulfide alone causes a reversible decrease of post-rotatory nystagmus saccade number; low-frequency noise alone has no effect.
3. No evidence of carbon disulfide-induced peripheral vestibulotoxicity was found.
4. Carbon disulfide may trigger reversible central neurochemical effects that impair the vestibulo-ocular reflex.

Abstract

Chronic occupational exposure to carbon disulfide (CS₂) has debilitating motor and sensory effects in humans, which can increase the risk of falls. Although no mention of vestibulotoxic effects is contained in the literature, epidemiological and experimental data suggest that CS₂ could cause low-frequency hearing loss when associated with noise exposure. Low-frequency noise might also perturb the peripheral balance receptor through an as-yet unclear mechanism. Here, we studied how exposure to a low-frequency noise combined with 250-ppm CS₂ affected balance in rats.

Vestibular function was tested based on post-rotary nystagmus recorded by a video-oculography system. These measurements were completed by behavioral tests and analysis of the cerebellum to measure expression levels for gene expression associated with neurotoxicity. Assays were performed prior to and following a 4-week exposure, and again after a 4-week recovery period. Functional measurements were completed by histological analyses of the peripheral organs.

Nystagmus was unaltered by exposure to noise alone, while CS₂ alone caused a moderate 19% decrease of the saccade number. In contrast, co-exposure to 250-ppm CS₂ and low-frequency noise decreased both saccade number and duration by 33% and 34%, respectively. After four weeks, recovery was only partial but measures were not significantly different from pre-exposure values.

Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis of cerebellar tissue revealed a slight but significant modification in expression levels for two genes linked to neurotoxicity in CS₂-exposed animals. However, neither histopathological changes to the peripheral receptor nor behavioral differences were observed. Based on all these results, we propose that the effects of CS₂ were due to reversible neurochemical disturbance of the efferent pathways managing post-rotatory nystagmus. Because the nervous structures

involving the vestibular function appear particularly sensitive to CS₂, post-rotary nystagmus could be used as an early, non-invasive measurement to diagnose CS₂ intoxication as part of an occupational conservation program.

Key-words

Carbon disulfide; Low-frequency noise; Post-rotatory nystagmus; Rat; Vestibular system.

1. Introduction

Carbon disulfide (CS₂) is a lipophilic solvent used in the production of viscose rayon and in agriculture (Rolecki and Tarkowski, 2000); it is also a metabolic product of the therapeutic drug disulfiram, used to treat chronic alcoholism (Goh and Morgan, 2017; Strume, 1965). Chronic exposure to CS₂ is linked to several symptoms including neuropsychiatric, motor and sensory disturbances (Sułkowski et al., 1992) as well as vascular complications (Chang et al., 2007; Wood, 1981). Similar symptoms have been observed in both animals (Hoffmann and Müller, 1990) and humans (Kotseva et al., 2001). Today, CS₂ is classed as a neurotoxic compound capable of causing distal axonopathies (Graham et al., 1995; Llorens, 2013; Pappolla et al., 1987). In addition, CS₂-induced low-frequency hearing loss and effects on balance have been reported in humans (Chang et al., 2003; Morata, 1989; Sułkowski et al., 1992). However, we currently lack information on possible vestibulo- or cochleo-toxic effects.

Since the 1980s, a small number of animal studies have shown that noise, and more specifically low-frequency noise, is detected by, and perturbs, the vestibular receptor (Cazals et al., 1982; Tamura et al., 2012). Therefore, both solvents and noise could affect balance. Because solvents have been shown to potentiate the cochleo-traumatic effects of noise (Campo, 2015; Morata et al., 1993), it appeared necessary to study the impact of co-exposure to CS₂ and low-frequency noise on the vestibular system, and thereby on balance.

Vestibular function can be assessed by measuring the vestibulo-ocular reflex (VOR). In an attempt to compensate for rotation of the head, the VOR generates eye movement to stabilize the image on the retina. During the acceleration phase of rotation, these eye movements generate nystagmus, a cyclic activity composed of a slow phase that is the result of the VOR, and a rapid phase, or resetting saccade, which is controlled by the central nervous system and brings the eyes back to the initial position before beginning a new cycle. Nystagmus is the

result of the vestibular nuclei receiving afferent signals from semicircular canals, and sending efferent signals to the abducens and oculo-motor nuclei, which control eye movements (Goldberg et al., 2013). The cerebellum plays an essential role in optimizing all classes of reflexes, it guarantees the precision of ocular movements to optimize visual performance and is central to both real-time control and long-term calibration and learning (Beh et al., 2017).

Odkvist et al., 1979 were the first to describe use of the VOR to assess the toxicity of solvent toward the vestibular system. These authors observed alterations to the VOR in both rabbits and humans after exposure to solvents. A decade later, Nylén et al., 1991 and Niklasson et al., 1993 used the same technique to detect impaired balance in rats. These results demonstrate that exposure to solvents can perturb the balance function, and that the amplitude of the effect can be assessed by VOR measurements.

One manifestation of the VOR is the post-rotary nystagmus (PRN). The PRN is the nystagmus observed after the end of a sustained rotation, due to inertial movement of the endolymph, the fluid in the inner ear that plays a critical role in vestibular transduction. PRN analyses have been proposed to detect brainstem and cerebellar disorders (Angelaki et al., 1995, 1996; Wennmo et al., 1981), and as a clinical test to investigate possible toxic effects of drugs on the vestibular system (Song et al., 1997). For example, PRN was used to study how metals affect balance (Mameli et al., 2001, 2006).

In addition to eye movements, the vestibular system also controls posture and body movement. In laboratory rodents, vestibular dysfunction leads to altered motor behavior and defects in several reflex responses. A number of behavioral tests have been validated to assess vestibular function by examining this behavior (Boadas-Vaello et al., 2005, 2017; Llorens et al., 1993; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997; Soler-Martín et al., 2007)

An extensive literature search revealed no animal studies of the effects of CS₂ on the vestibular system, or of the effects of simultaneous exposure to noise and CS₂. Therefore, we chose to assess functional perturbation of the central and peripheral vestibular systems in Long Evans rats using PRN and behavioral tests. Rats were exposed daily (6 hours) to 250-ppm CS₂ and/or noise for 4 weeks. The CS₂ concentration, which is equivalent to about 40 times the European threshold limit value (TLV, 5 ppm over 8 hours, *i.e.*, 6.6 ppm over 6 hours), was selected based on a preliminary dose-response study, as it was the lowest dose inducing PRN changes when combined with low-frequency noise. Finally, the effects of the exposure on the vestibular receptors were assessed by histological analyses, and effects on cerebellar mRNA expression were measured by quantitative RT-qPCR.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

The animal facilities are fully accredited (authorization n° D 54-547-10) by the French Ministry of Agriculture. While conducting the research described in this article, investigators adhered to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals promulgated by the European parliament and council (DIRECTIVE 2010/63/EU, 2010). The study, referenced as APAFIS#3950-201602051 1372481, was approved by the Ministry of Education and Research. Adult female Long Evans rats (n=133) weighing approximately 250 g were used in all experiments. Animals were purchased from Janvier breeders (Le Genest St Isle, St Berthevin, France). Rats were 8 weeks old when they arrived at the animal facility and they were acclimatized to the laboratory conditions for several weeks before starting experiments (animals were 18 weeks old at the beginning of experiments). They were housed two per cage (1032 cm² x 20 cm height) on irradiated cellulose BCell8 bedding (ANIBED, Pontvallain, France). A 12:12 h light:dark cycle (07:30-19:30) was maintained along with a constant temperature of 22±2 °C and relative humidity of 55±10%. Food and tap water were available *ad libitum*, except during exposure. The background noise level in the animal facility was approximately 43.5 dB(A). Animals were weighed weekly and monitored for overall toxicity, as defined by Morton and Griffiths, 1985.

2.2 Protocol

An overview of the experimental protocol is shown in Figure 1.

Insert Figure 1 about here

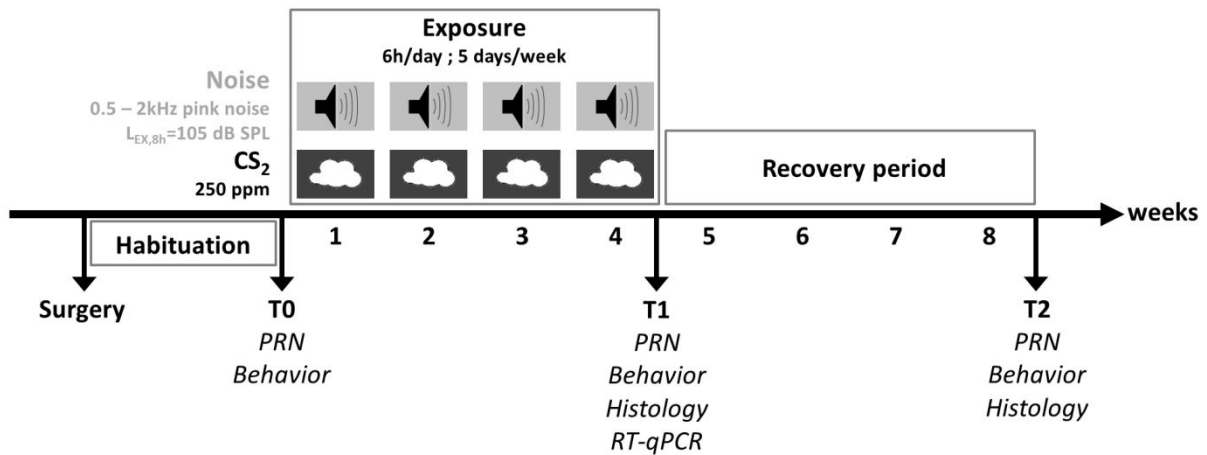


Figure 1. Experimental protocol. Animals were exposed to 250-ppm carbon disulfide (CS₂) and noise 6 h/day, 5 days/week, for 4 weeks. The noise exposure was a pink noise filtered over three octave bands at 0.5, 1 and 2 kHz at a dose of $L_{EX,8h} = 105$ dB SPL. Vestibular function was measured based on post-rotary nystagmus (PRN) and behavioral tests (tail-lift and air-righting) prior to exposure (T0), following exposure (T1), and 4 weeks post-exposure (T2). Histological analyses were done at the end of the exposure and post-exposure periods. RT-qPCR: real-time quantitative polymerase chain reaction.

Animals were exposed to 250-ppm CS₂ alone, or to a low-frequency continuous noise with or without CS₂. The $L_{EX,8h}$ of the noise was 105 dB SPL. The spectrum was a band-pass filtered over three octave bands at 0.5, 1 and 2 kHz. Exposure lasted 6 h per day over 5 consecutive days for 4 weeks. The number of controls and exposed animals are presented in Table 1.

Method	PRN	Behavior	LM	IHC	Scanning electron microscopy	RT-qPCR	Total number of animals
Time-points	T0 / T1 / T2	T0 / T1 / T2	T1 T2	T1 T2	T2	T1	
Controls	41	20	10 10	10 6	6	8	65
CS ₂	8	8	5 5	5 3	0	0	16
Noise	12	8	0 0	0 0	4	0	30
CS ₂ + Noise	13	8	4 4	4 3	4	8	22

Table 1. Number of control and exposed animals used in the different experimental conditions. Several experimental techniques were performed on the same animals. CS₂: carbon disulfide; PRN: post-rotary nystagmus; IHC: immunohistochemistry; LM: light microscopy; RT-qPCR: real-time quantitative polymerase chain reaction; T0: prior to exposure; T1: right after exposure; T2: 4-week post-exposure.

Vestibular function was measured based on PRN and behavioral tests. These tests were performed prior to and after exposure, and 4 weeks post-exposure. Thirty eight animals were sacrificed at the end of the exposure period to allow morphological analyses and perform immunohistochemistry (Table 1). The remaining 62 animals were left in their home cage to recover for 4 weeks. At the end of the experiment, all animals received a deep dose of anesthesia and were euthanized to collect the brain and the vestibular sensory epithelia.

2.3 Anesthesia

Prior to surgery, rats were anesthetized by a single injection of a mixture of ketamine/xylazine (45/5 mg/kg). Body temperature was monitored throughout the procedure using a rectal probe connected to a system maintaining a body temperature between 34 and 36 °C. For tissue collection, rats were deeply anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (75/5 mg/kg).

2.4 Surgical procedure

To immobilize the animal during the PRN procedure, a screw nut was placed on the skull. Surgery was performed two weeks before performing measurements. An incision of about 1.5 cm long was made in the skin over the vertex under sterile conditions. The skull was cleared by cutting through the connective tissue, scraped, and devitalized by applying silver nitrate. A thin layer of cyanoacrylate glue was spread on the dried skull to affix the screw nut to the bone. The nut was then embedded in dental cement (Taab 2000®). Rats were isolated during the recovery period and monitored closely for two weeks.

2.5 Habituation period

One week after surgery, the animals were progressively habituated to the PRN procedure. The first step consisted in a simple manipulation of the rats. Then, they were immobilized in a dark room with a soft snuggle-restraint device leaving the head free. The final step was to immobilize the head using the screw. In total, the habituation phase lasted 10 days before starting PRN measurements.

2.6 Post-rotatory nystagmus test

Experiments were carried out during daylight hours in a darkroom. The test apparatus consisted of a dark circular arena (102.5 cm diameter) containing a horizontal turntable. A system to hold a rat was fixed on the turntable, centered 88 mm from the rotation axis. As a result, the rat was rotated around its own body axis (located approximately between its shoulder blades). The metal plate, cylinder, turntable, camera holder and all the other custom equipment were made at INRS (France).

To stabilize the animal's head during rotation, it was held with a screw placed on a metal bar in the center of the turntable. The head was fixed at 30 ° with the nose pointing down to horizontally align the lateral semicircular canals. The turntable could rotate 360 °. The maximal acceleration and deceleration were 870 °/s². The rotatory stimulation lasted 40 seconds at 90 °/s. After rotation, horizontal movement of the left pupil was recorded in the dark using an RK-826PCI eye tracker, which is a high-resolution infra-red camera recording system (240 Hz sampling rate; ISCAN, Inc. 21 Cabot Road Woburn, MA 01801 USA), placed in a holder on the wall. The VOR parameters recorded were the number and duration of saccades (see Fig. 2C-E). Occasionally, the rat temporarily closed its eyes during the post-rotation period, preventing continuous capture. In these cases, it was impossible to count the saccade number, but its duration could still be measured. This explains the differences in numbers of animals included in the PRN saccade number and duration data presented in the results.

2.7 Behavioral tests

Two motor reflex tests suitable for the quantitative evaluation of vestibular dysfunction in rats were used (Martins-Lopes et al., 2017)

(1) The tail-lift reflex test consists in lifting the rat by the tail and observing their behavior: healthy rats exhibit a “landing” response with forelimb extension, whereas rats

suffering from vestibular dysfunction bend ventrally, sometimes “crawling” up toward their tails. The angle between the vertex/tail root line and the vertex/nose line was captured by high-speed video recordings (GoPro hero 4 black edition) and analyzed using Kinovea software.

(2) The air-righting reflex test consists in dropping the animals in supine position from a height of 40 cm onto a foam cushion. Healthy rats can right themselves in the air, whereas vestibular dysfunction prevents righting. The duration of the air-righting movement was measured by video recordings using the same equipment as the tail-lift reflex test.

2.8 Carbon disulfide

During exposure, all rats (controls, noise, CS₂-, or noise + CS₂-exposed) were housed in individual cells within an inhalation chamber designed to sustain a dynamic, adjustable airflow (5-6 m³.h⁻¹). The chambers were maintained at a negative pressure of no more than 3 mm H₂O. Input air was filtered and conditioned to a temperature of 22±1 °C and relative humidity of 55±10%. CS₂ was generated using a thermoregulated glass streamer. The solvent was delivered by a pump and instantaneously vaporized upon contact with the heated surface of the glass streamer. The vapor was carried forward with an additional airflow through the streamer, into the main air inlet pipe of the exposure chambers. Rats were exposed to 250 ppm CS₂, 6 h per day for 5 consecutive days over 4 weeks. Control animals (n=65) were always ventilated with fresh air. The exposure levels were determined from samples of the chamber's atmosphere collected using glass tubes packed with Carboxen 1000 40/60 mesh (Supelco). CS₂ was desorbed from the adsorbent with methylene chloride. Methyl-ethyl-ketone was added as an internal standard (IS) and samples were analyzed on a gas chromatograph/mass spectrometer (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu). CS₂ samples were assayed on a 30 m × 0.25mm (1 µm film thickness) Rtx-1701 column (with integra-guard)

(Restek), using helium as the carrier gas at a linear velocity of 45 cm/sec. The column temperature program was 40 °C for 3 min followed by an increase to 100 °C at a rate of 20 °C/min. The sample (1 µL) was injected in split mode with a split ratio of 1/30. Temperatures for the injection port, transfer line and ion source were set to 240 °C, 250 °C and 200 °C, respectively. The mass spectrometer was operated by electron ionization (70 eV) in selected ion monitoring mode, tracking ions 43 (for IS) and 76 (for CS₂). Daily calibrations were performed. During exposure, a benchtop mass spectrometer (OmniStar GSD 320 O2) with yttrium-iridium filament (Pfeiffer vacuum) was also used to continuously monitor the stability of vapor generation throughout the exposure period.

2.9 Noise exposure

The system used, methodology and type of noise are described in Venet et al., 2017. Briefly, noise exposure was performed within inhalation chambers. Rats were housed in individual cells inside the exposure chambers. The animals were exposed to noise in line with the schedule presented in Figure 1. The noise exposure lasted 6 h per day at 106 dB SPL. The noise was a filtered pink noise covering three octave bands ranging from 0.5 to 2 kHz. These frequencies correspond to the lowest range audible to rats, for which sensitivity is poor.

2.10 Histological analyses

At the end of exposure, or at the end of the recovery period, the vestibular sensory epithelia (utricle, saccule and three cristae ampullaris) and the Scarpa ganglion were harvested from control and exposed rats for histological analysis. See Table 1 for details of animal numbers.

Morphological analysis

Cochleae were removed and vestibules fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer at 4 °C for one week before dissection under a light binocular microscope. Specimens were rinsed in cacodylate buffer, post-fixed for 1 h in 1% osmium tetroxide and dehydrated in graded concentrations of ethanol up to 100%. They were then embedded in

resin (Epon/Araldite). After polymerization at 60 °C, embedded samples were cut to produce thin sections (2.5 µm) before staining with cresyl violet and observation under an Olympus BX41 optical microscope.

Immunohistochemistry

Vestibules were opened and immersed overnight in 4% paraformaldehyde at 4 °C. The sensory epithelia were isolated and stored at -20 °C in a cryoprotective solution (34.5% glycerol, 30% ethylene glycol, 20% PBS, 15.5% distilled water) until labeling. For labeling, samples were rinsed and immersed in a blocking solution (20% donkey serum and 4% triton X-100 in PBS) for 90 min at room temperature before staining for 48 h at 4 °C with the primary antibody solution. Primary antibodies - a rabbit anti-myosin VIIa (25-6790, Proteus biosciences USA; 1:500) to visualize hair cells, and mouse anti-NF200 (N0142, Sigma Germany; 1:800) to visualize the neurofilaments in the afferent terminals - were prepared in PBS with 1% donkey serum and 0.1% triton X-100. After rinsing in PBS (4 x 10 min), the tissues were incubated overnight in darkness at room temperature with a secondary antibody solution: Alexa-488 donkey anti-rabbit (A21206, Invitrogen, United Kingdom; 1:500) + Alexa-555 donkey anti-mouse (A31570, Invitrogen, United Kingdom; 1:500) in 0.1% triton in PBS. Samples were rinsed several times and immersed in liquid gelatin (solid gelatin, 30% Bovine Serum Albumin, 20% sucrose in PBS) overnight at 4 °C, before embedding in solid gelatin with 9% glutaraldehyde. Blocks were post-fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS at 4 °C, and transverse sections (40 µm) were cut using a Leica VT1000 M vibrating blade microtome. Sections were mounted with Mowiol 4-88, and observed under a Leica TCS-SL confocal microscope.

Scanning electron microscopy

Cochleae were removed to expose vestibules to fixative (2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer) for 48 hours at 4 °C. Samples were then rinsed and immersed for 1 h in 1%

osmium tetroxide in 0.2 M cacodylate buffer, rinsed once again and transferred to ethanol 70% for dissection to keep only the sensory epithelia. After dehydrating with graded ethanol concentrations up to 100% ethanol, samples were dried in a critical-point dryer using liquid CO₂. They were finally sputter-coated with gold before observation under a JEOL7400F scanning electron microscope.

2.11 Gene expression analysis by RT-qPCR

Total RNA from cerebellar tissue was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen™ #15596026). Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed with iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) applying the following temperature cycle: 5 min at 25 °C, 30 min at 42 °C and 5 min at 85 °C.

Initially, a ready-made rat neurotoxicity PCR array (SAB Target List H96, Biorad) was used to screen for significant changes of expression among 86 genes involved in neurotoxic responses. cDNA from 3 to 4 rats from co-exposed and control groups were pooled in a solution containing 2x SsoAdvanced™ Universal Supermix (Biorad) and RNase-free water. The solution (20 µL) was deposited in each well. Real-time PCR was performed on a CFX96 Touch™ (BioRad) with the following temperature protocol: 2 min at 95 °C, 40 x (5 s at 95 °C and 30 s at 60 °C). The fold-change for each target gene was expressed as the level for exposed animals vs. control animals after normalization for levels of three housekeeping genes (*Gapdh*, *Tbp* and *Hprt*). Only genes for which RNA expression levels were significantly different between exposed and control samples were re-analyzed by RT-qPCR for each individual animal.

For individual assays, real-time RT-qPCR was performed on a CFX96 Touch™ (BioRad) with iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad) and primePCR™ primers according to the accompanying protocol. No template control was performed on PCR mixtures. For amplification, the following cycle was used: 5 min at 95 °C, 35 x (15 s at 95 °C and 60 s at

60 °C). The fold-change for target genes was expressed as the level for exposed animals with respect to control animals after normalization for three housekeeping genes (*β-actin*, *Rpl13* and *Hprt*, sequences available on request).

Only the data from the RT-qPCR performed on individual animals is shown in the results section.

2.12 Statistical analyses

All data (weight, PRN, behavioral results) were statistically analyzed with repeated-measure two-way ANOVAs with “treatment” as between-subject factor and “time” as within-subject factor using Prism V7.03 (GraphPad. Software Inc., La Jolla, CA). Statistical results are expressed as follows: F(dfb, dfr)= F-ratio; p = p value, in which dfb is the number of degrees of freedom between groups, and dfr is the number of residual degrees of freedom. Bonferroni post-hoc comparisons were performed for each treatment group versus T0.

PRN data were expressed as a percentage of baseline (T0) values because of the extensive inter-individual variability of these measurements. Due to a skewed distribution of the RT-qPCR results for one gene, data were expressed as median [Q1; Q3], with Q1 and Q3 corresponding to 25 and 75% quartiles, respectively, and a non-parametric Mann-Whitney test was used to assess significance. All other data were expressed as mean ± SEM. The threshold for statistical significance was set at 95%.

3. Results

3.1 General health

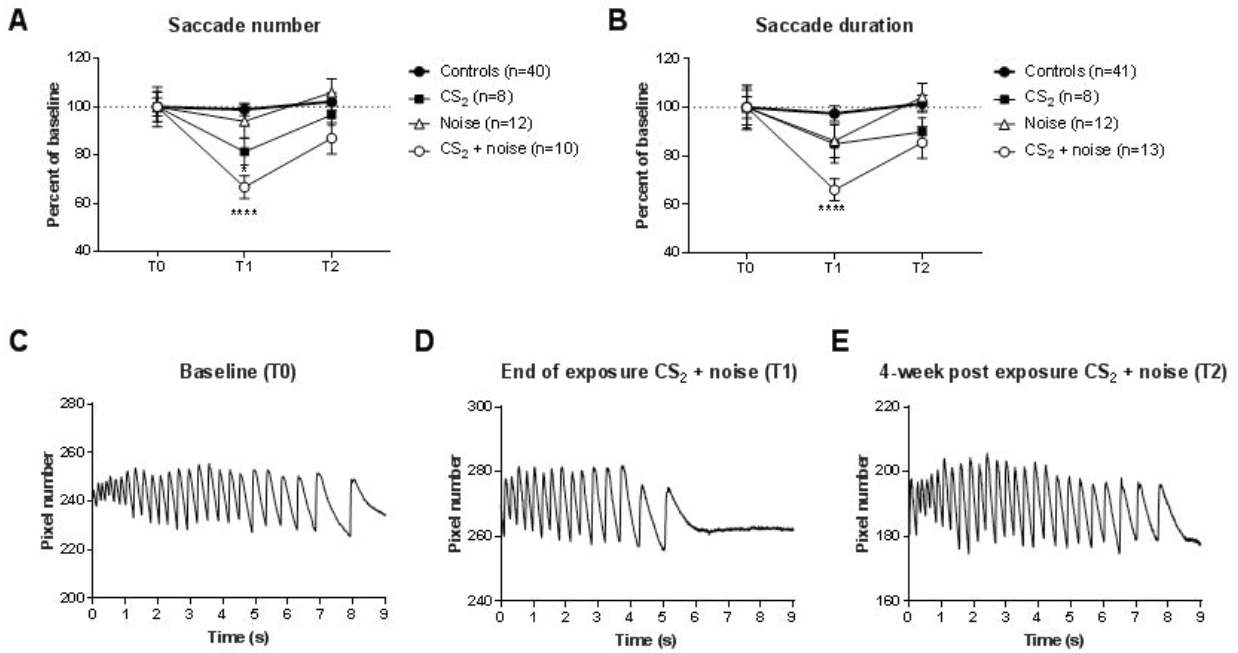
Over the 4 weeks of exposure, the weights of the animals exposed to CS₂ or CS₂ + noise remained stable between T0 and T1 (+0.5 g), while controls and animals exposed to noise alone gained an average of 8 g. The “treatment” x “time” interaction was $F(3, 77) = 11.83$; $p < 0.0001$. However, according to the surveillance protocol, none of the rats showed signs of suffering during exposure. During the 4 weeks following the end of exposure, the animals exposed to CS₂ and CS₂ + noise gained more weight (+31 g) than controls or subjects exposed to noise alone (+16 g). As a result, there were no differences in weight between treatment groups at the end of the experiment [$F(3,53) = 2.376$; $p = 0.0804$].

3.2 Post-rotatory nystagmus

Figure 2 shows the average saccade number (A) and duration (B) measured for the different experimental groups before (T0), right after exposure (T1) and after 4 weeks’ recovery (T2). The interaction between “treatment” and “time” was significant (two-way ANOVA) for saccade number [$F(6, 138) = 4.446$; $p = 0.0004$] and duration [$F(6, 140) = 3.328$; $p = 0.0043$], and these two parameters remained stable at all time-points in controls and animals exposed to noise alone. Although exposure to CS₂ alone did not alter the duration of saccades (Fig. 2B), it decreased their number significantly at T1 ($p = 0.024$ vs. T0; Fig. 2A). At T2, differences from baseline values were not significant for either parameter.

In contrast, co-exposure to CS₂ and noise resulted in significantly decreased saccade numbers and duration at T1 (-33%, $p < 0.0001$ and -34%, $p < 0.0001$, respectively). These two measures partially recovered over the 4 weeks following exposure, and the difference from baseline values was no longer significant (number: $p = 0.051$; duration: $p = 0.061$).

Representative PRN traces acquired for the same animal at the three time-points, showing the effect of exposure to noise and CS₂, are shown in Figure 2C-E.

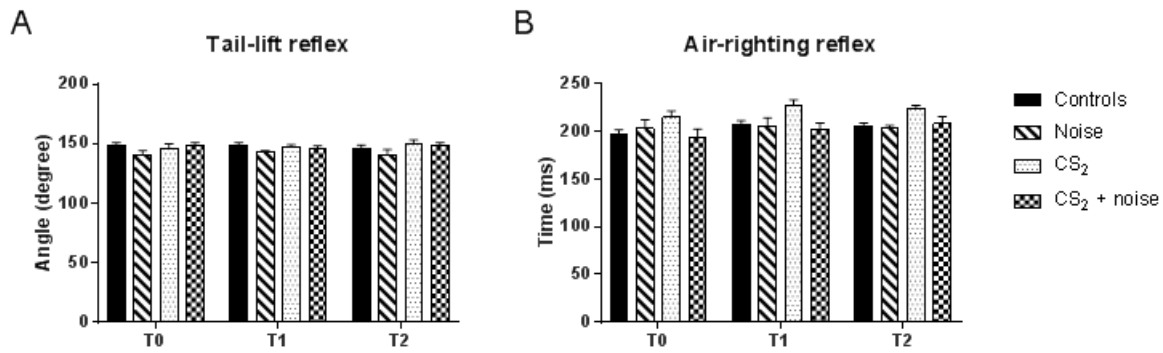


Insert Figure 2 about here

Figure 2. Exposure to CS₂ + noise for 4 weeks significantly, but reversibly, alters post-rotatory nystagmus (PRN). Saccade number (A) and duration (B) measured for each experimental group at T0, T1 and T2 expressed as percent of baseline. Data are mean \pm SEM. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, significantly different from the T0 mean, Bonferroni test. Representative PRN traces recorded in a co-exposed animal prior to exposure (C), following 4 weeks of exposure (D) and after the 4-week recovery period (E).

3.3 Behavioral tests

The results of two tests to assess the integrity of the vestibular function (tail-lift reflex and air-righting reflex) are shown in Figure 3. None of the exposed groups showed altered performance, whatever the time point considered. The “treatment” x “time” interaction was not statistically significant for the tail-lift reflex [$F(6, 44) = 0.6221$, $p = 0.71$; Fig. 3A], or the air-righting reflex [$F(6, 76) = 0.42$, $p = 0.87$; Fig. 3B].

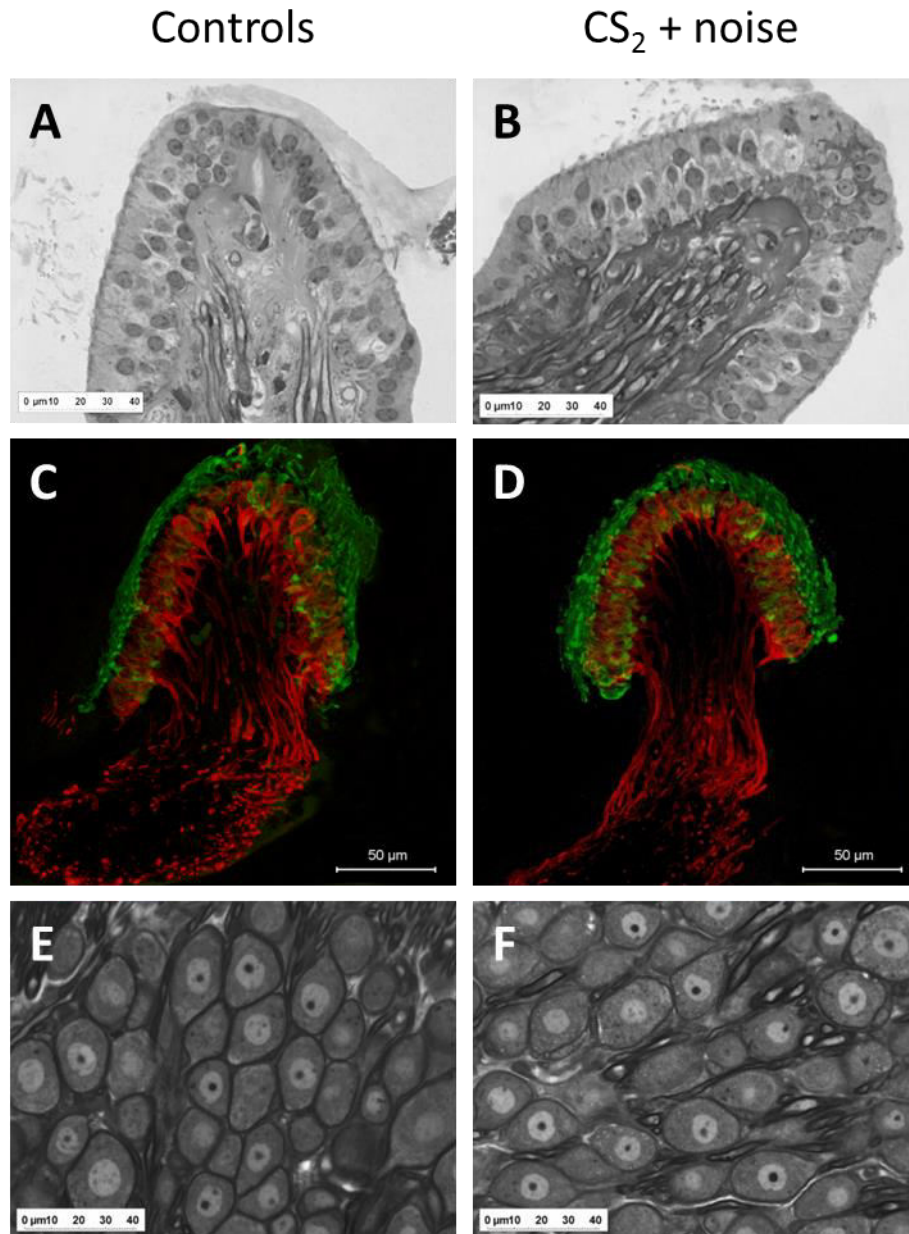


Insert Figure 3 about here

Figure 3. Behavioral parameters are not affected by exposure to noise, CS₂ or a combination of both. Vestibular function was assessed prior to (T0), at the end (T1), and 4-week after exposure (T2) by tail-lift (A) and air-righting reflex tests (B). Data are mean \pm SEM.

3.4 Histological analyses

Qualitative observations of *cristae ampullaris* harvested at T1 showed no morphological alteration in any of the experimental groups. Representative semi-thin sections from controls (Fig. 4A) and animals exposed to CS₂ + noise (Fig. 4B) had a normal sensory epithelium and no morphological impairment was observed. Immunohistochemical staining for myosin VIIa and neurofilament in the *crista ampullaris* appeared similar in controls (Fig. 4C) and co-exposed animals (Fig. 4D) at T1, and T2 (data not shown). Co-exposure was not associated with any obvious loss of hair cells, any alteration to the distribution of fibers or to their neurofilament content. Scarpa ganglion cells (Fig. 4E and F) were observed 4 weeks after the end of exposure (T2). No overt cell loss or morphological alteration was observed following co-exposure. *Stereociliae* on hair cells also appeared undamaged, as observed by scanning electron microscopy performed on samples from T2 (data not shown). The same histopathological analyses displayed in Fig. 4A-D were also performed on saccule and utricle, and a similar lack of alteration was found in exposed animals (data not shown).

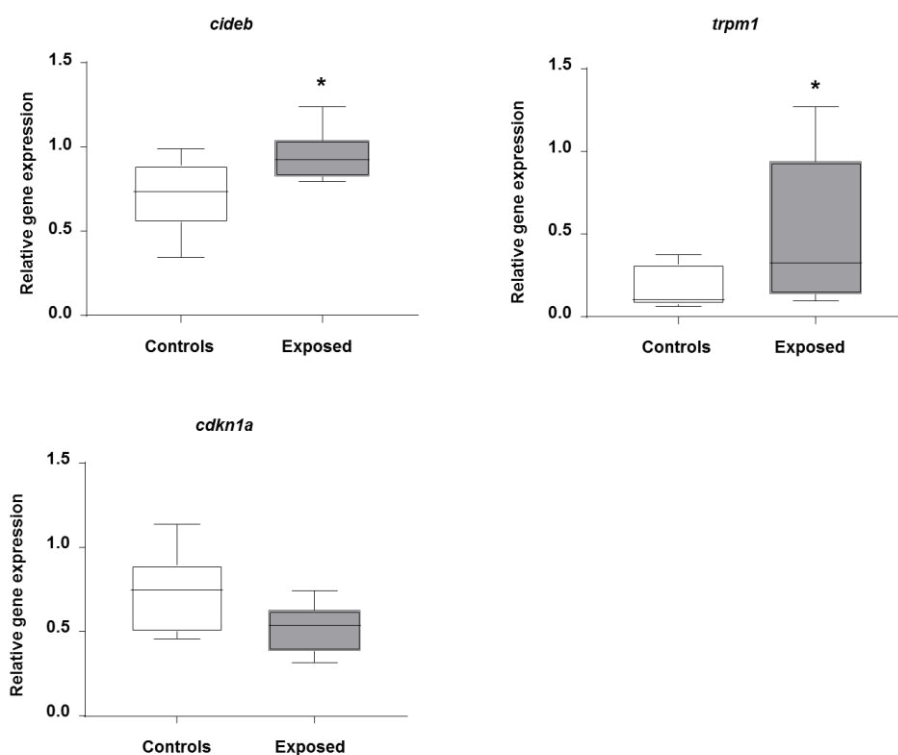


Insert Figure 4 about here

Figure 4. CS₂ plus noise (right panels) induces no histological changes compared to control conditions (left panels). Representative histological images are shown. The light microscopy *crista* images were acquired following exposure (T1) from a control (A) and a co-exposed rat (B). Representative *crista* sections labeled with antibodies directed against myosin VIIa (green) and neurofilaments (red), from control (C) and co-exposed (D) animals at the end of exposure (T1). Light microscopy images of Scarpa ganglion neurons from a control rat (E) and from an exposed animal (F) at the end of the recovery period (T2).

3.5 RT-qPCR

To examine the toxicity of co-exposure to CS₂ and noise at the level of the central nervous system, mRNA levels were analyzed in the cerebellum for three genes linked to neurotoxicity. Moderate but significant increases in mRNA levels for *cideb* (p=0.0205) - mainly implicated in apoptotic cell death - and *trpm1* (p=0.0401) - coding for a calcium-permeable cation channel - were observed in the cerebellum of exposed animals. In contrast, the mRNA level for cell cycle inhibitor *cdkn1a* tended to be reduced in exposed animals compared to controls (p=0.0541, Figure 5).



Insert Figure 5 about here

Figure 5: Expression levels for *cideb*, *trpm1* and *cdkn1a* altered by exposure to CS₂ plus noise. Expression levels were analyzed by RT-qPCR. Expression levels for β -actin, *Rpl13* and *Hprt* were used to normalize values. Results correspond to median [Q1; Q3] for 8 animals. * indicates p<0.05 vs. control according to a Mann-Whitney test.

4. Discussion & Conclusions

In this study, the toxicity of CS₂, alone or in combination with low-frequency noise, on the vestibular system was assessed by measuring how exposures affected the PRN, the results of behavioral tests and histological observations and expression levels in the cerebellum for genes linked to neurotoxicity.

To assess the toxicity of a compound, such as CS₂, on a sensory system, physiological evaluation is the gold standard. To facilitate data interpretation, the methods employed to assess the adverse effects of exposure must be easily translatable from animals to humans, and share the same analytical rationale. In the case of the vestibular system, comparison between humans and rodents is facilitated by its evolutionary conservation (Day and Fitzpatrick, 2005). However, the vestibular system is intrinsically complex to study, and direct evaluation is difficult (Llorens et al. 2018). For this reason, vestibular function is generally indirectly assessed, for example by measuring the VOR.

VOR measurements are considered a suitable method to study disorders induced by toxic compounds in humans and animals, because perturbation of this reflex can be considered an early marker of adverse effects on the sensory/motor functions of the vestibular system, even in the absence of clinical signs. In addition, analysis of the VOR can be used to monitor how balance is controlled by both central and peripheral nervous structures (Cohen, 1984; Moschovakis, 1997; Pompeiano, 2006). Nevertheless, only a few studies have used the VOR to evaluate the toxicity of industrial chemicals (solvents, heavy metals, etc.) toward the vestibular system (Niklasson et al., 1993; Nylén et al., 1991; Tham et al., 1982), and even fewer have measured PRN (Larsby et al., 1986; Mameli et al., 2001, 2006).

The results of this study showed that a concentration of 250 ppm of CS₂ associated with low-frequency noise can temporarily alter the PRN, therefore disrupting the vestibular system. More precisely, combined exposure decreased the number of saccades and shortened the PRN duration. The simplest explanation for these changes is that the intensity of stimulus required to trigger the nystagmus is increased. Although the effect disappeared 4 weeks after the end of exposure, higher CS₂ concentrations may result in permanent impairment.

Our results confirm that the vestibular system is sensitive to CS₂, adding evidence to reports showing that solvents or drugs can target the different components of this sensory system (Angelaki et al., 1995, 1996; Song et al., 1997; Yokel, 2000). In general, saturated halogenated hydrocarbons tend to depress the VOR, whereas unsaturated compounds or those containing a benzene core excite it (Odkvist et al., 1985). VOR effects have been reported for styrene, toluene, trichloroethylene and trichloroethane (Larsby et al., 1986; Niklasson et al., 1993; Tham et al., 1982), and metals such as lead and aluminum (Mameli et al., 2001, 2006) in rats, as well as with exposure of rodents to antiepileptic (phenytoin) or anticancer drugs (cisplatin) (Mameli et al., 1986; Takimoto et al., 2016).

Regardless of the exposure conditions, our results showed no significant alteration in two behavioral endpoints known to depend on the vestibular system, *i.e.*, the air-righting reflex (Ossenkopp et al., 1990) and the tail-lift reflex (Llorens et al., 1993). In addition, histological analysis of the peripheral vestibular system revealed no obvious damage: no hair cell loss, no damage to stereocilia, no loss of ganglion cells, and a normal distribution of nerve terminals. These normal behavioral and morphological results suggest that the functional modifications of the PRN observed in the animals exposed to CS₂ alone or CS₂ + noise were due to central disruption of balance control, as previously suggested by Kowalska et al., 2000 and Sułkowski et al., 1992. In a previous study, examining the effect of CS₂ and noise on the

auditory system, we also observed a temporary exacerbation of the effect of noise when combined with CS₂, suggesting that this phenomenon was due to action of the solvent on the central nervous system (Venet et al., 2017).

In line with this “central” hypothesis, we detected significant overexpression of two genes - *cidebl*, involved in neuronal apoptosis (Inohara et al., 1998), and *trpm1*, involved in calcium-related excitotoxic mechanisms (Kraft and Harteneck, 2005; Lau and Tymianski, 2010) - and a trend for decreased expression of *cdkn1a*, an anti-apoptotic gene (Gartel and Tyner, 2002). Although the extent of changes to expression levels does not indicate a major neurotoxic insult due to exposure to 250-ppm CS₂ for 4 weeks, it nevertheless suggests cerebellar dysfunction. Among the functions of the cerebellum, the regulation of “velocity storage” is related to the control of balance. “Velocity storage” is believed to prolong the semicircular canal’s afferent signal, therefore extending the duration of the PRN (see Baumann et al., 2015 for review). We hypothesize that CS₂ could modify cerebellar neurotransmission controlling this velocity storage, although from our data we cannot provide a more precise explanation. Our observations are similar to those of Mameli et al., 2006, who described a reduction of PRN parameters following chronic intoxication with aluminum chloride. Like many authors (Angelaki et al., 1995, 1996; Song et al., 1997; Yokel, 2000), we conclude that PRN represents a sensitive indicator of neurotoxicity for a range of pollutants and drugs, regardless of their individual mechanisms of action.

The effects of CS₂ alone were consistently smaller than those obtained in animals exposed to CS₂ in combination with low-frequency noise, while low-frequency noise alone left PRN parameters unaltered. Hence, there is a true interaction between noise and CS₂.

How and where this interaction takes place is unclear. Since noise is unlikely to disrupt central nuclei involved in the PRN, it is reasonable to suggest that its interaction with CS₂ occurs within the peripheral organ. Despite the fact that no morphological injury to the *cristae ampularis* was observed following exposure to noise, subtle physiological changes may nevertheless have occurred in the vestibule. For instance, low-frequency noise has been shown to cause a transient increase in the volume of the endolymph (Flock and Flock, 2000; Salt, 2004), although the underlying mechanism is not well understood (Salt and Hullar, 2010).

Our data confirm that CS₂ alone is not ototoxic, but because of its effect on the central nervous system it can temporarily disrupt the vestibular system, specifically control of the VOR. It is important to note that the duration and dose of CS₂ exposure in our work was relatively low compared to other studies, where CS₂ was used at between 200 ppm and 800 ppm over 11 to 15 weeks (Clerici and Fechter, 1991; Hirata et al., 1992; Rebert and Becker, 1986). The dose used in the present study was moderate with regard to the occupational TLV (40-fold higher than the current European TLV), and thus may better reflect potential occupational situations. The experimental results presented here reinforce those obtained by Morata, 1989 studying workers exposed to CS₂ (30 ppm) and noise (86-89 dBA). These authors reported earlier and more accentuated balance problems in co-exposed workers compared to workers exposed to noise alone.

Taken together, these human and animal data strongly suggest that preventive actions (personal protective equipment, improvement to processes and ventilation, etc.) should be recommended for workers who may be co-exposed to CS₂ and noise in order to reduce combined exposure as far as possible.

Funding

This work was supported by the French Research and Safety Institute for the Prevention of Occupational Accidents and Diseases (INRS, France) and by the Spanish Ministry for the Economy and Competitiveness (MINECO) - FEDER (grant number BFU2015-66109-R) and the Generalitat of Catalonia (grant number 2014 SGR 943).

Conflict of interest

The authors have no competing interests to declare.

Acknowledgments

The authors would like to thank Marie-Jo Décret, Lionel Dussoul and Laurine Douteau for their help with animal handling and husbandry. We are also grateful to Benjamín Torrejon-Escribano, from the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB), for his help with the confocal microscopy. We acknowledge Aurélie Rémy, who performed the statistical analyses, Sylvie Sébillaud, who helped with the PCR experiments, and Benoît Cossec, for revision and suggestions on this manuscript.

References

- Angelaki, D.E., Hess, B.J., Arai, Y., Suzuki, J., 1996. Adaptation of primate vestibuloocular reflex to altered peripheral vestibular inputs. I. Frequency-specific recovery of horizontal VOR after inactivation of the lateral semicircular canals. *J. Neurophysiol.* 76, 2941–2953. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.5.2941>
- Angelaki, D.E., Hess, B.J., Suzuki, J., 1995. Differential processing of semicircular canal signals in the vestibulo-ocular reflex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 7201–7216.
- Baumann, O., Borra, R.J., Bower, J.M., Cullen, K.E., Habas, C., Ivry, R.B., Leggio, M., Mattingley, J.B., Molinari, M., Moulton, E.A., Paulin, M.G., Pavlova, M.A., Schmahmann, J.D., Sokolov, A.A., 2015. Consensus paper: the role of the cerebellum in perceptual processes. *Cerebellum Lond. Engl.* 14, 197–220. <https://doi.org/10.1007/s12311-014-0627-7>
- Beh, S.C., Frohman, T.C., Frohman, E.M., 2017. Cerebellar Control of Eye Movements. *J. Neuro-Ophthalmol. Off. J. North Am.* 37, 87–98. <https://doi.org/10.1097/WNO.0000000000000456>
- Boadas-Vaello, P., Riera, J., Llorens, J., 2005. Behavioral and Pathological Effects in the Rat Define Two Groups of Neurotoxic Nitriles. *Toxicol. Sci.* 88, 456–466. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi314>
- Boadas-Vaello, P., Sedó-Cabezón, L., Verdú, E., Llorens, J., 2017. Strain and Sex Differences in the Vestibular and Systemic Toxicity of 3,3'-Iminodipropionitrile in Mice. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 156, 109–122. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw238>
- Campo, P., 2015. Les ototoxiques exacerbent les surdités induites par le bruit.pdf. *Env. Risque Sante* 14, 125–134.
- Cazals, Y., Aran, J.M., Erre, J.P., 1982. Frequency sensitivity and selectivity of acoustically evoked potentials after complete cochlear hair cell destruction. *Brain Res.* 231, 197–203.
- Chang, S.-J., Chen, C.-J., Shih, T.-S., Chou, T.-C., Sung, F.-C., 2007. Risk for hypertension in workers exposed to carbon disulfide in the viscose rayon industry. *Am. J. Ind. Med.* 50, 22–27. <https://doi.org/10.1002/ajim.20409>
- Chang, S.-J., Shih, T.-S., Chou, T.-C., Chen, C.-J., Chang, H.-Y., Sung, F.-C., 2003. Hearing loss in workers exposed to carbon disulfide and noise. *Environ. Health Perspect.* 111, 1620–1624.
- Clerici, W.J., Fechter, L.D., 1991. Effects of chronic carbon disulfide inhalation on sensory and motor function in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 249–255. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(91\)90069-9](https://doi.org/10.1016/0892-0362(91)90069-9)
- Cohen, B., 1984. Examination of the vestibular system and of the vestibular-ocular reflex. Oosterveld WJ Ed *Otoneurology* John Wiley Sons Chichester 87–109.
- Day, B.L., Fitzpatrick, R.C., 2005. The vestibular system. *Curr. Biol. CB* 15, R583–586. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.053>
- DIRECTIVE 2010/63/EU, 2010. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union.*
- Flock, A., Flock, B., 2000. Hydrops in the cochlea can be induced by sound as well as by static pressure. *Hear. Res.* 150, 175–188.
- Gartel, A.L., Tyner, A.L., 2002. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 1, 639–649.

- Goh, E.T., Morgan, M.Y., 2017. Review article: pharmacotherapy for alcohol dependence - the why, the what and the wherefore. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 45, 865–882. <https://doi.org/10.1111/apt.13965>
- Goldberg, M.E., Walker, M. F., Hundspeth, A. F., 2013. The Vestibular System, in: Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J. (Eds.), *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Education, New York, NY, pp. 917–934.
- Graham, D.G., Amarnath, V., Valentine, W.M., Pyle, S.J., Anthony, D.C., 1995. Pathogenetic Studies of Hexane and Carbon Disulfide Neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 91–112. <https://doi.org/10.3109/10408449509021609>
- Hirata, M., Ogawa, Y., Okayama, A., Goto, S., 1992. Changes in auditory brainstem response in rats chronically exposed to carbon disulfide. *Arch. Toxicol.* 66, 334–338. <https://doi.org/10.1007/BF01973628>
- Hoffmann, P., Müller, S., 1990. Subacute carbon disulfide exposure modifies adrenergic cardiovascular actions in rats. *Biomed. Biochim. Acta* 49, 115–120.
- Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X., Núñez, G., 1998. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J.* 17, 2526–2533. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.9.2526>
- Kotseva, K., Braeckman, L., De Bacquer, D., Bulat, P., Vanhoorne, M., 2001. Cardiovascular Effects in Viscose Rayon Workers Exposed to Carbon Disulfide. *Int. J. Occup. Environ. Health* 7, 7–13. <https://doi.org/10.1179/107735201800339713>
- Kowalska, S., Sułkowski, W., Sińczuk-Walczak, H., 2000. Assessment of the hearing system in workers chronically exposed to carbon disulfide and noise. *Med. Pr.* 51, 123–138.
- Kraft, R., Harteneck, C., 2005. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch.* 451, 204–211. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1428-0>
- 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. (Stockh.)* 101, 422–428.
- Lau, A., Tymianski, M., 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 460, 525–542. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0809-1>
- Llorens, J., 2013. Toxic neurofilamentous axonopathies– accumulation of neurofilaments and axonal degeneration. *J. Intern. Med.* 273, 478–489. <https://doi.org/10.1111/joim.12030>
- Llorens, J., Dememes, 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>
- Llorens, J., Rodríguez-Farré, E., 1997. Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 117–127.
- Llorens, J., Callejoa, A., Greguskea, E., Marotoa, A., Cutillas, B., Martins-Lopes, V., 2018. Physiological assessment of vestibular function and toxicity in humans and animals. *Neurotoxicology*, in press.
- Mameli, O., Caria, M.A., Melis, F., Solinas, A., Tavera, C., Ibba, A., Tocco, M., Flore, C., Sanna Randaccio, F., 2001. Neurotoxic effect of lead at low concentrations. *Brain Res. Bull.* 55, 269–275.
- Mameli, O., Caria, M.A., Melis, P., Zambenedetti, P., Ramila, M., Zatta, P., 2006. Effect of aluminum consumption on the vestibulo-ocular reflex. *Metab. Brain Dis.* 21, 86–104. <https://doi.org/10.1007/s11011-006-9010-9>

- Mameli, O., Tolu, E., Melis, F., Caria, M.A., Sechi, G.P., Riu, P.L.D., 1986. Postrotatory Nystagmus During Phenytoin Treatment. *Epilepsia* 27, 385–390. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1986.tb03557.x>
- Martins-Lopes, V., Bellmunt, A., Boadas-Vaello, P., Llorens, J., 2017. Effective assessment of ototoxic-induced vestibular deficits by video analysis of anti-gravity reflexes in rats, in: 17th National Congress of the Spanish Society of Neuroscience Abstracts Book. p. 560.
- Morata, T., 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.
- Morata, T.C., 1989. Study of the effects of simultaneous exposure to noise and carbon disulfide on workers' hearing. *Scand. Audiol.* 18, 53–58.
- Morton, D.B., Griffiths, P.H., 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet. Rec.* 116, 431–436.
- Moschovakis, A.K., 1997. The neural integrators of the mammalian saccadic system. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 2, d552-577.
- 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. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(93\)90034-L](https://doi.org/10.1016/0892-0362(93)90034-L)
- 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. (Stockh.)* 111, 36–43.
- Odkvist, L., Bergholtz, L., Larsby, B., Tham, R., Eriksson, B., Edling, C., 1985. Solvent-induced central nervous system disturbances appearing in hearing and vestibulo-oculomotor test. *Clin. Ecol.* 3(3), 149–153.
- 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.
- Ossenkopp, K.P., Prkacin, A., Hargreaves, E.L., 1990. Sodium arsenite-induced vestibular dysfunction in rats: effects on open-field behavior and spontaneous activity in the automated digiscan monitoring system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36, 875–881.
- Pappolla, M., Penton, R., Weiss, H.S., Miller, C.H., Sahenk, Z., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P., 1987. Carbon disulfide axonopathy. Another experimental model characterized by acceleration of neurofilament transport and distinct changes of axonal size. *Brain Res.* 424, 272–280.
- Pompeiano, O., 2006. The vestibulo-ocular and the vestibulospinal reflexes: noradrenergic influences on the plastic changes which affect the cerebellar cortex during vestibular adaptation. *Arch. Ital. Biol.* 144, 197–253.
- Rebert, C.S., Becker, E., 1986. Effects of inhaled carbon disulfide on sensory-evoked potentials of Long-Evans rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8, 533–41.
- Rolecki, R., Tarkowski, S., 2000. Draft document for carbon disulfide. Lodz Nofer Inst. Occup. Med.
- Salt, A.N., 2004. Acute endolymphatic hydrops generated by exposure of the ear to nontraumatic low-frequency tones. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 5, 203–214. <https://doi.org/10.1007/s10162-003-4032-z>
- Salt, A.N., Hullar, T.E., 2010. Responses of the ear to low frequency sounds, infrasound and wind turbines. *Hear. Res.* 268, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.06.007>

- Soler-Martín, C., Díez-Padrisa, N., Boadas-Vaello, P., Llorens, J., 2007. Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs, and frogs. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 96, 123–132. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl186>
- Song, B.B., Anderson, D.J., Schacht, J., 1997. Protection from gentamicin ototoxicity by iron chelators in guinea pig in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 369–377.
- Strume, J.H., 1965. Metabolism of disulfiram and diethyldithiocarbamate in rats with demonstration of an in-vivo ethanol-induced of inhibition of the glucuronic acid conjugation of the thiol. *Biochem. Pharmacol.* 14, 393–410.
- Sułkowski, W.J., Kowalska, S., Sobczak, Z., Józwiak, Z., 1992. The statokinesiometry in evaluation of the balance system in persons with chronic carbon disulphide intoxication. *Pol. J. Occup. Med. Environ. Health* 5, 265–276.
- Takimoto, Y., Imai, T., Kondo, M., Hanada, Y., Uno, A., Ishida, Y., Kamakura, T., Kitahara, T., Inohara, H., Shimada, S., 2016. Cisplatin-induced toxicity decreases the mouse vestibulo-ocular reflex. *Toxicol. Lett.* 262, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.09.009>
- Tamura, H., Ohgami, N., Yajima, I., Iida, M., Ohgami, K., Fujii, N., Itabe, H., Kusudo, T., Yamashita, H., Kato, M., 2012. Chronic Exposure to Low Frequency Noise at Moderate Levels Causes Impaired Balance in Mice. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039807>
- Tham, R., Larsby, B., Eriksson, B., Bunnfors, I., Odkvist, L., Liedgren, C., 1982. Electronystagmographic findings in rats exposed to styrene or toluene. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 93, 107–112.
- Venet, T., Carreres-Pons, M., Chalansonnet, M., Thomas, A., Merlen, L., Nunge, H., Bonfanti, E., Cosnier, F., Llorens, J., Campo, P., 2017. Continuous exposure to low-frequency noise and carbon disulfide: Combined effects on hearing. *Neurotoxicology* 62, 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.06.013>
- Wennmo, C., Henriksson, N.G., Pyykkö, I., Schalén, L., 1981. Eye-velocity programming in brain-stem disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 374, 774–783.
- Wood, R.W., 1981. Neurobehavioral toxicity of carbon disulfide. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 3, 397–405.
- Yokel, R.A., 2000. The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology* 21, 813–828.

Résumé :

Le disulfure de carbone (CS_2) est utilisé dans la fabrication de cellulose et des fibres de viscosse. Les co-expositions avec le bruit sont fréquentes. Il a été démontré que l'exposition professionnelle au CS_2 peut causer des pertes auditives dans les basses fréquences (BF) et des troubles de l'équilibre en présence de bruit. Cependant les effets du CS_2 sur la cochlée et le vestibule sont aujourd'hui inconnus.

L'objectif général de ce travail de thèse est d'étudier, chez le rat, les effets du CS_2 et des bruits riches en BF sur les systèmes auditif et vestibulaire afin de déterminer :

(1) si la toxicité du CS_2 est centrale et/ou périphérique, et si elle est exacerbée par une co-exposition au bruit ;

(2) si les effets délétères du CS_2 sur les fonctions auditive et vestibulaire sont temporaires ou permanents ;

(3) la pertinence des valeurs limites d'exposition professionnelle au bruit ($L_{EX,8h}$) et au CS_2 ($VLEP_{,8h}$) et la VLEP à court terme (VLEP-CT) dans le contexte de co-expositions.

Pour répondre à ces questions, des rats Long Evans ont été exposés à différentes concentrations de CS_2 et des bruits riches en BF. Les effets temporaires et permanents de ces expositions ont été estimés par des mesures des fonctions vestibulaires (nystagmus post-rotatoire et tests comportementaux) et cochléaires (produits de distorsion acoustique). Des analyses histologiques de l'oreille interne et des analyses de biologie moléculaire relatives à l'expression de gènes de neurotoxicité dans le tronc cérébral et le cervelet ont également été réalisées.

Les principaux résultats sont les suivants :

(1) l'exposition des rats au CS_2 à partir de 250 ppm a élargi la plage de fréquence touchée par le bruit de BF, mais a diminué la perte auditive dans la gamme affectée par le bruit. Ce dernier effet est plus marqué lorsque les expositions au CS_2 sont intermittentes (pics à 250 ppm pendant 15 min/h = 10 x VLEP-CT) que lorsqu'elles sont continues (63 ppm = 10 x $VLEP_{,8h}$) ;

(2) le CS_2 à partir de 250 ppm a engendré une diminution de la durée du nystagmus et du nombre de saccades, cet effet étant exacerbé en présence de bruit BF. Ces effets sont réversibles au bout de 4 semaines à 250 ppm, mais ils persistent à 500 ppm. A une dose de 63 ppm pendant 6 h (10 x $VLEP_{,8h}$) ou 250 ppm pendant 15 min/h (10 x VLEP-CT), aucune perturbation du nystagmus n'a été observée ;

(3) les analyses comportementales et histologiques (vestibule et cochlée) ainsi que la quantification des marqueurs dans le cerveau n'ont pas révélé de perturbations neurotoxiques.

Dans les conditions expérimentales de cette étude, le CS_2 n'apparaît pas ototoxique chez le rat. Cependant, il peut exacerber les effets temporaires du bruit sur les deux systèmes (extension des dommages vers les hautes fréquences et raccourcissement de la durée du nystagmus).

En termes de prévention, les résultats suggèrent que la $VLEP_{,8h}$ du CS_2 offre une marge de sécurité satisfaisante en environnement bruyant, car nous avons observé des effets significatifs sur les PDA (Produit de Distorsion Acoustique) et le nystagmus seulement à partir de 250 ppm pendant 6 h (soit 40 x $VLEP_{,8h}$). A l'inverse, il a suffi de 15 min/h d'exposition au CS_2 à 250 ppm (10 x VLEP-CT) pour obtenir des pertes de PDA différentes que celles mesurées avec le bruit seul. Ceci nous amène à nous interroger sur la pertinence de la valeur de VLEP-CT pour CS_2 en cas de co-exposition avec le bruit.

Les données de cette étude ne nous permettent pas de connaître le mécanisme précis d'interaction du CS_2 avec le bruit, cependant l'absence de modifications histologiques des récepteurs périphériques comme celle de marqueurs de neurotoxicité dans le cerveau suggèrent une modification neurochimique temporaire des arcs réflexes efférents (cellules ciliées, réflexe de l'oreille moyenne, réflexe vestibulo-oculaire).

Summary

Carbon disulfide (CS₂) is a solvent used in the manufacture of cellulose, viscose fibers and sponges. Co-exposures to CS₂ and noise are common. Occupational exposures to CS₂ have been shown to cause low-frequency hearing loss and balance disorders when noise was also present. However, the effects of CS₂ on the cochlea and the vestibule are still unknown today.

The general objective of this work was to study, in a rat model, the effects of CS₂ and low frequency noises on the auditory and vestibular systems in order to determine:

- (1) whether the toxicity of CS₂ is central and / or peripheral, and whether it is aggravated by co-exposure to noise;
- (2) if the toxicity of CS₂ is equivalent and / or comparable at the level of the auditory system and the vestibular system;
- (3) if the deleterious effects of CS₂ on auditory and vestibular functions (if any) are temporary or permanent;
- (4) whether the functional adverse effects of exposures are representative of the histopathological damage (if any).;
- (5) the adequacy of occupational exposure threshold limit values for noise ($L_{EX, 8h}$) and CS₂ ($TWA_{8h} = 5$ ppm and $TWA_{CT} = 25$ ppm in Europe) in the context of co-exposures.

To answer these questions, Long Evans rats were exposed to different concentrations of CS₂ and low-frequency noises. The temporary and permanent effects of these exposures were evaluated by measurements of vestibular functions (post-rotatory nystagmus and behavioral tests) and cochlear functions (ototacoustic emissions). Moreover, histological analyses of the inner ear and a quantification of the expression of neurotoxicity genes in the cerebellum were performed.

The main results are the following:

- (1) Exposure to CS₂ at 250 ppm broadened the frequency range affected by low frequency noise, but decreased hearing loss in the range affected by the noise (below 6 kHz). This latter effect was more accentuated when the CS₂ exposures were intermittent.
- (2) Exposure to CS₂ shortened the duration and decreased the number of saccades of the nystagmus, these effects being exacerbated when low frequency noise was also present. At low CS₂ concentrations, we observed a complete recovery during the 4 weeks following the end of exposure, but these effects persisted at the highest concentration (500ppm).
- (3) The behavioral and histological analyses (vestibule and cochlea), as well as the quantification of the neurotoxic markers in the cerebellum, did not reveal any major change.

In the experimental context of this study, CS₂ did not appear ototoxic in rats since no histological impairment of the inner ear was observed. However, due to a probable action on the central nervous system, it could exacerbate the temporary effects of noise on both systems (extension of PDA losses to high frequencies and greater the decrease in nystagmus parameters).

In a prevention point of view, these results suggest that the TWA_{8h} of CS₂ offers a satisfactory safety margin in noisy environment since significant effects on PDA and nystagmus were only observed at and above 250 ppm for 6h ($40 \times TWA_{8h}$). On the other hand, only 15 min/h exposure to CS₂ at 250 ppm ($10 \times TWA_{CT}$) resulted in different PDA losses than for noise alone. This leads us to question the level of protection offered by the TWA_{CT} for CS₂ in case of co-exposure with noise.

The data of this study do not allow us to know the precise mechanism of interaction of CS₂ with the noise. However the absence of histological modifications in the peripheral receptors, of behavioral changes, as well as the lack of major changes in markers of neurotoxicity in the brain, suggest a temporary neurochemical modification of the efferent reflex arcs (hair cells, middle ear reflex, vestibulo-ocular reflex).