

ANALYSE HISTOLOGIQUE D'EXPLANTS VESTIBULAIRES POUR ÉVALUER LA TOXICITÉ DE PRODUITS CHIMIQUES

Aurélie THOMAS, Valentin TALLANDIER, Stéphane BOUCARD, Lise MERLEN,
Monique CHALANSONNET, Benoît POUYATOS

aurelie.thomas@inrs.fr

*Laboratoire d'Ototoxicité et Neurotoxicité, Institut National de Recherche et de
Sécurité, 1 rue du Morvan - CS 60027 - 54519 Vandœuvre cedex, France*

doi.org/10.25830/afh.rfh.2020.32.65.82

HISTOLOGICAL ANALYSIS OF VESTIBULAR EXPLANTS TO ASSESS TOXICITY OF CHEMICALS

ABSTRACT

Many epidemiologic and experimental studies have shown that occupational exposures to aromatic solvents can induce hearing deficits in both humans and laboratory rodents. Although the end-organ of balance, the vestibular labyrinth, is in the inner ear, and has morphological and functional similarities with the cochlea, no information is available on the adverse effects of solvents on this receptor. However, epidemiological data suggest that solvent exposure can generate balance disorders, which might increase the risk of falls. In this paper, we describe the methods for assessing peripheral vestibulotoxicity using cultured vestibular samples (utricle and ampullae) collected from newborn rats. After a few days in culture, these sensory tissues become spheres filled with endolymph, which we call "cysts". Endolymphatic potassium concentration measurements and histopathological observations were performed to understand the toxic mechanisms and identify the cellular targets of a chemical exposure, an aromatic solvent in this case. The model was tested using molecules with known effects: ouabain, a blocker of Na⁺/K⁺ ATPase pumps, gentamicin, a cytotoxic antibiotic for vestibular hair cells, and finally styrene, an aromatic solvent used in industry with well-known cochleotoxic properties.

KEY WORDS

Vestibular explant, endolymph, vestibulotoxicity, aromatic solvents

RESUME

De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales ont montré que les expositions professionnelles à des solvants peuvent engendrer des troubles de l'audition chez l'Homme comme chez le rongeur de laboratoire. Alors que l'organe périphérique de l'équilibre, le labyrinthe vestibulaire, se trouve dans l'oreille interne, et qu'il présente des similarités morphologiques et fonctionnelles avec la cochlée, aucune information n'est disponible sur les effets néfastes des solvants sur ce récepteur. Pourtant, des données épidémiologiques suggèrent que des expositions professionnelles aux solvants peuvent engendrer des troubles de l'équilibre pouvant être à l'origine de chutes. Dans cet article, nous décrivons les méthodes permettant d'évaluer la vestibulotoxicité périphérique en utilisant un modèle de « cyste » : sphère remplie d'endolymphe obtenue à partir d'échantillons de vestibule (utricules et ampoules) prélevés sur des rats nouveau-nés avant d'être mis en culture. La mesure de la concentration endolymphatique en potassium et l'étude histopathologique des « cystes » permettent de comprendre les mécanismes de toxicité et d'identifier les cibles cellulaires lors d'une exposition à un produit chimique, un solvant aromatique en l'occurrence. Les caractéristiques fonctionnelles et morphologiques des cystes obtenus à partir d'utricules et d'ampoules sont observées puis la fonctionnalité du modèle est évaluée à l'aide de molécules dont les effets sont connus : l'ouabaïne, un bloqueur des pompes Na^+/K^+ ATPase, la gentamicine un antibiotique cytotoxique pour les cellules ciliées vestibulaires, et enfin le styrène, un solvant aromatique utilisé en milieu industriel et dont les propriétés cochléotoxiques sont bien connues.

MOTS CLES

Explant vestibulaire, endolymphe, vestibulotoxicité, solvants aromatiques

INTRODUCTION

Les propriétés ototoxiques des solvants aromatiques sont aujourd'hui bien connues grâce à des études épidémiologiques réalisées chez des travailleurs exposés et des recherches expérimentales menées chez des rongeurs de laboratoire. Ces dernières ont montré une forte corrélation entre les pertes auditives et les dommages au niveau des cellules sensorielles de la cochlée après inhalation de vapeurs de solvants (1). Localisés dans l'oreille interne, la cochlée et le labyrinthe vestibulaire présentent des similarités morphologiques et fonctionnelles. En effet, ces deux organes sont composés de cellules ciliées sensorielles permettant la transduction mécano-électrique et de cellules sécrétrices responsables de la composition biochimique des liquides de l'oreille interne (2). La cochlée et le labyrinthe vestibulaire renferment un même liquide, l'endolymphe, fortement concentré en ions potassiques (environ 140 mM) constituant le moteur électrochimique de la transduction mécano-électrique (3). Compte tenu de ces similarités, et de la cochléotoxicité des solvants, nous nous sommes interrogés sur le potentiel toxique des solvants aromatiques sur le système vestibulaire périphérique.

Même si très peu d'informations sont disponibles dans la littérature scientifique, les différentes études publiées suggèrent un effet des solvants aromatiques sur l'équilibre : les expositions professionnelles à ces substances peuvent générer des pertes d'équilibre et des risques de chutes (4). Des études épidémiologiques et des expérimentations réalisées chez l'animal concluent également à un effet délétère sur le système vestibulaire (5). Cependant, aucune donnée ne permet d'établir si ces solvants agissent sur les voies centrales ou le labyrinthe vestibulaire, ni d'identifier des cellules cibles potentielles (6).

Un modèle *in vitro*, développé à partir d'explants vestibulaires de rats nouveau-nés, est utilisé pour étudier la vestibulotoxicité périphérique des solvants aromatiques (7, 8). Ce modèle, aussi appelé « cyste », contient un liquide qui, comme l'endolymphe, est riche en potassium (K^+) et a la particularité de préserver toutes les cellules des structures vestibulaires impliquées dans le cycle du K^+ . Ces cellules continuent ainsi à exprimer différents canaux et à faire fonctionner des pompes qui permettent l'efflux (canaux de mécano-transduction des cellules sensorielles) et l'influx du potassium dans le cyste (pompe Na^+/K^+ ATPase et NKCC1 des cellules sécrétrices).

Partant de l'hypothèse que cette concentration potassique reflète la fonctionnalité des cellules épithéliales vestibulaires, la vestibulotoxicité périphérique est évaluée en mesurant la concentration en K^+ dans le cyste après exposition aux solvants aromatiques. Dans cette étude, le modèle « cyste » d'utricules est élargi aux explants d'ampoules (crêtes ampullaires) prélevés chez des rats nouveau-nés. Dans un premier temps, pour valider le modèle, les cystes sont traités avec des molécules dont les effets sont connus dans la littérature. L'ouabaine est un compétiteur du K^+ qui agit au niveau du site extracellulaire de la pompe Na^+/K^+ ATPase (8). La gentamicine, un antibiotique de type aminoglycoside, est choisie pour son effet cytotoxique sur les cellules ciliées vestibulaires (9). Dans un second temps, le styrène, un solvant aromatique connu pour provoquer des pertes de cellules ciliées cochléaires (1, 10, 11) est testé sur le modèle. Des analyses histologiques sur le cyste, associées aux mesures fonctionnelles, sont réalisées afin d'expliquer le mécanisme d'action de ces molécules et de s'assurer que la mesure de la concentration en K^+ est un biomarqueur fonctionnel valide. Ce modèle pourrait ainsi servir de test de criblage pour évaluer le potentiel vestibulotoxique d'agents chimiques industriels.

MATERIELS ET METHODES

Animaux

Les protocoles expérimentaux impliquant des animaux sont réalisés conformément à la réglementation en vigueur (directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques). Les femelles Long-Evans provenant des laboratoires Janvier (Route des Chênes secs 53940 Le Genest Saint Isle, France) sont réceptionnées au 15^{ème} jour de gestation et hébergées en cages individuelles jusqu'à la mise bas. La nourriture et l'eau de boisson sont distribuées à volonté. Des carrés de ouate de cellulose sont placés dans la cage pour le nid.

Culture des cystes

La méthode de culture des cystes est celle décrite précédemment par Gaboyard *et al.* (7) pour les explants d'utricules. Le même procédé est utilisé dans cette étude pour les explants d'ampoules. Les rats nouveau-nés (1 à 4 jours *post-partum*)

sont décapités et les structures vestibulaires (ampoules et utricules) disséquées sous loupe binoculaire dans du milieu Leibovitz's L-15. Les explants sont placés sur des lamelles en verre préalablement coatées avec de la laminine (10 µg/ml) puis chaque échantillon est recouvert de Matrigel® (Corning®). Les échantillons sont mis en culture dans du milieu (DMEM-F12 + 2% de N2) et maintenus à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Après un à deux jours, les utricules et les ampoules se referment et forment une vésicule sphérique, appelée « cyste », renfermant le compartiment endolympmatique. Les cystes sont maintenus en milieu de culture pendant plusieurs jours pour maturation (**Figure 1**).

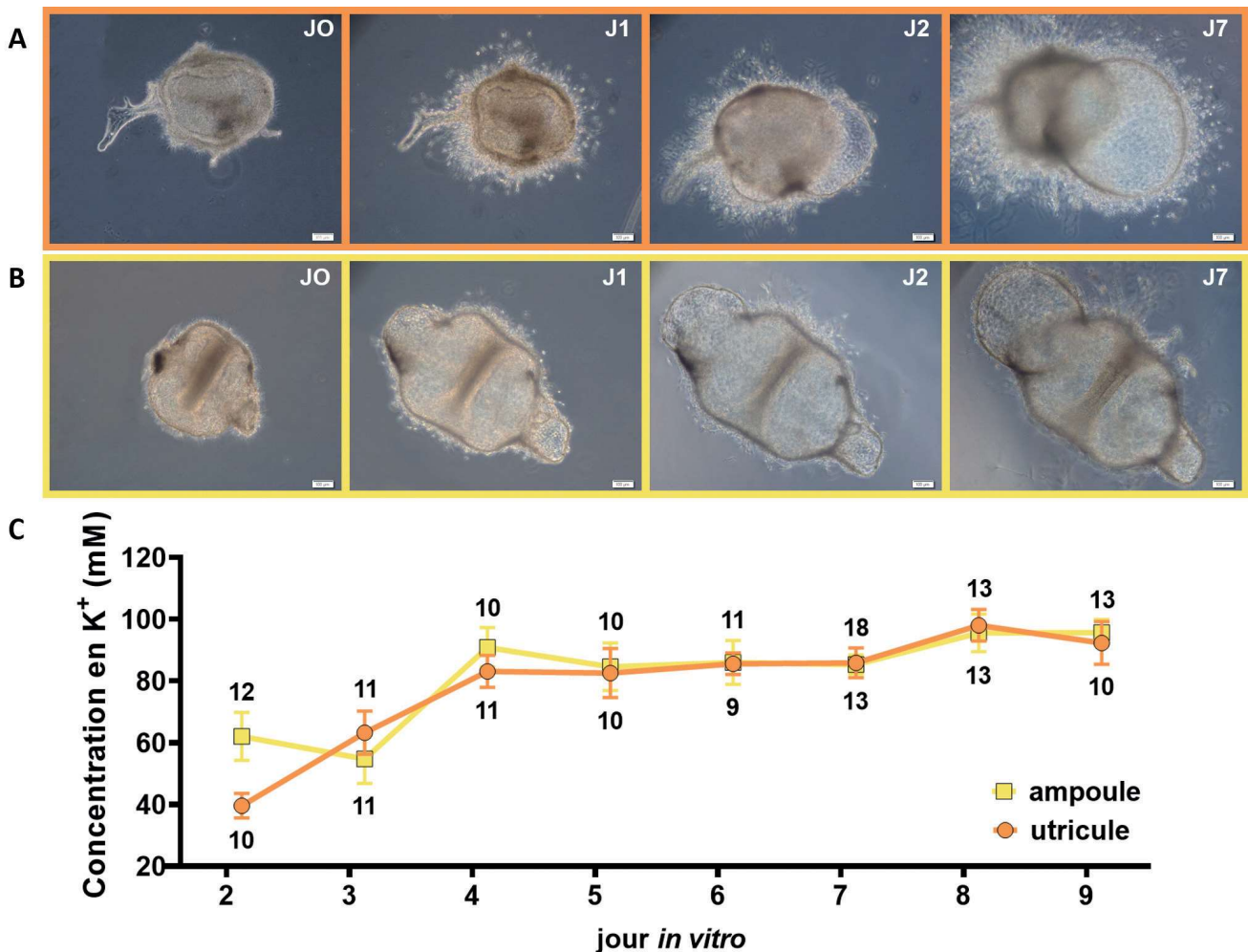


Figure 1 : Développement morphologique et fonctionnel des explants vestibulaires.

Photographies en microscopie optique de cystes d'utricules (A) et d'ampoules (B) de J0 à J7 *in vitro*.

(C) Accumulation du potassium (K⁺) endolympmatique d'explants vestibulaires de rats nouveau-né (1 à 4 jours *post-partum*) de J2 à J9 *in vitro*. Chaque point représente la moyenne ± erreur type. Le nombre d'échantillons par point est indiqué au-dessus (ampoules) et en-dessous (utricules) de chaque courbe correspondante. J = nombre de jours *in vitro*.

Les traitements

Les différents traitements sont ajoutés directement dans le milieu de culture des cystes à une concentration de 1 mM, la même concentration utilisée par Bartolami *et al.* (8). La mesure de la concentration en K^+ endolymphatique a lieu à la fin du traitement, au 7^{ème} jour de culture après le prélèvement. Les temps de traitement sont choisis en fonction du mode d'action des différentes molécules testées. L'ouabaine, inhibiteur de la pompe Na^+/K^+ ATPase, est mise en contact pendant 2 h avec les cystes au 7^{ème} jour de culture. La gentamicine, qui agit directement sur les cellules ciliées, est ajoutée dès le premier jour de culture, avant que le cyste ne se referme, ce qui représente un traitement de 7 jours. Le styrène est testé à deux temps différents, un temps court de 2 h pour étudier son effet pharmacologique (ajouté au 7^{ème} jour de culture) et un temps plus long de 72 h pour son effet cytotoxique (du 4^{ème} au 7^{ème} jour de culture). Seul le traitement à l'ouabaine est expérimenté sur des cystes provenant d'ampoules dans le but de vérifier si ceux-ci répondent de la même façon que les cystes d'utricules. A chaque groupe « traité » correspond un groupe « témoin » dans lequel les cystes sont mis en contact (2 h, 72 h ou 7 jours) avec le véhicule ayant servi à la préparation du traitement.

La mesure de K^+

La mesure de la concentration en K^+ dans le cyste est réalisée par une méthode électrophysiologique précédemment décrite par Bartolami *et al.* (8). La concentration est déterminée à l'aide d'une microélectrode sélective aux ions K^+ . Des capillaires en verre borosilicatés sont étirés, imperméabilisés et chauffés pour former des microélectrodes. La pointe de la microélectrode est remplie avec une membrane échangeuse d'ions K^+ (Potassium ionophore I réf. : 99373, Sigma-Aldrich) et le tube avec une solution contenant 150 mM de KCl. Une fois son impédance vérifiée, la microélectrode est reliée à un électromètre amplificateur différentiel, lui-même connecté à un ordinateur pour suivre le signal électrique. Avant et après chaque mesure dans le compartiment endolymphatique, une gamme étalon est réalisée avec des solutions de concentrations décroissantes de KCl (150 ; 100 ; 75 ; 50 ; 20 et 10 mM). La mesure du cyste est réalisée sous microscope optique. La concentration potassique du compartiment endolymphatique est déterminée à partir de la relation concentration en K^+ (mM) / voltage (mV).

Les valeurs de concentration en K^+ des échantillons traités et témoins sont

comparées à l'aide d'un test de Student, quand les variances de nos mesures sont homogènes, ou avec un test de Mann Whitney dans le cas contraire. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur type sans combiner les valeurs mesurées dans les cystes d'utricules avec celles provenant d'ampoules. Le seuil de significativité statistique est établi à $p = 0,05$.

Histologie des cystes

Coupes semi-fines en résine

La taille des cystes (diamètre inférieur à 1 mm) est une contrainte pour leur manipulation qui se fait entièrement sous loupe binoculaire tout au long du processus de fixation et d'enrobage. Immédiatement après la mesure de la concentration en K^+ , les cystes sont plongés 24 h dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon cacodylate de sodium 0,2 M à pH 7,2. Après deux rinçages dans ce même tampon, les échantillons sont post-fixés une heure avec une solution de tétraoxyde d'osmium à 1% dans le tampon cacodylate de sodium 0,2 M puis rincés à nouveau. Enfin, les échantillons sont conservés dans une solution d'éthanol 70%.

Les cystes sont ensuite déshydratés dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (70 à 100%) puis inclus dans de la résine de façon progressive en commençant par un mélange 50/50 oxyde propylène/résine pendant 1 h puis, 25/75 oxyde de propylène/résine à nouveau 1 h pour finir dans la résine pure toute une nuit. La résine est constituée d'un mélange de DDSA à 55,8%, d'Epon à 25,3%, d'Araldite à 15,2%, de dibutylphtalate à 2% et de 2,4,6-triméthylaminométhyl phénol à 1,7%. La résine est polymérisée en deux temps : 15 h à 30°C suivies de 24 h à 60°C. Les blocs sont rectifiés à l'aide d'un appareil de dégrossissage (Ultratrim Reichert, Leica) jusqu'à l'apparition de l'épithélium sensoriel. Des coupes de 2,5 μm sont alors réalisées avec un ultramicrotome (UC7, Leica) et déposées dans une goutte de bleu de toluidine (0,25 mg/mL). Après séchage, les échantillons sont montés entre lame et lamelle dans un milieu aqueux (Aquatex[®], Merck) puis observés en microscopie optique.

Microscopie électronique à balayage (MEB)

Pour l'observation des stéréocils en MEB, les échantillons suivent les mêmes étapes que précédemment jusqu'à l'éthanol 70%. À ce stade, il est nécessaire de retirer la membrane qui referme le cyste ainsi que tout le Matrigel[®] afin de ne laisser que

l'épithélium sensoriel. À partir de cette étape, toutes les solutions doivent être filtrées à 0,22 µm pour ne pas polluer l'échantillon. Les cystes sont alors placés dans des capsules poreuses de 0,30 µm (réf. : 16771331242, Leica) qui permettent la diffusion des solvants et déshydratés dans l'éthanol de 80 à 100%. Les échantillons sont ensuite séchés dans un appareil à point critique qui utilise du CO₂ liquide (EM CPD300, Leica), montés sur un adhésif double face en carbone conducteur reposant sur un plot en laiton puis métallisés à l'or pendant 150 s à l'aide d'un métalliseur (108 Auto, Cressington). Les échantillons sont conservés sous vide jusqu'à observation en MEB (JSM 7400F, Jeol) à 2 kV.

Coupes paraffine et immunohistochimie de la caspase 3 clivée

Après extraction du Matrigel®, les cystes sont fixés dans du formaldéhyde à 4% tamponné à pH 6,9 durant 24 h. Après trois rinçages au PBS, les échantillons translucides sont rapidement trempés dans l'encre histologique, rincés à nouveau puis stockés à 4°C dans de l'éthanol à 70%. Les cystes sont ensuite déshydratés dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (70 à 100%). Après une étape d'éclaircissement au xylène, les échantillons sont imprégnés puis enrobés dans de la paraffine de type 9 (Richard-Allan Scientific™). Des coupes de 4 µm sont obtenues à l'aide d'un microtome (HM340E, Microm), déposées sur lames SuperFrost® Plus et séchées à 37°C. Le déparaffinage des coupes est réalisé dans des bains de xylène suivi de la réhydratation dans des bains d'éthanol de 100 à 80% puis dans l'eau ultrapure.

Un démasquage antigénique est effectué pendant 5 min à 120°C dans un tampon Na-citrate (10 mM, pH 6). Suivent deux étapes permettant de réduire le marquage non spécifique : la neutralisation des peroxydases endogènes avec du H₂O₂ à 3% puis le blocage antigénique par du sérum normal de chèvre. Le tampon de lavage utilisé entre les différentes étapes est du TBST (Tris Buffered Saline Tween, pH 7,6, 20 mM Tris, 0,1% Tween-20). L'anticorps primaire anti-caspase 3 clivée (réf.: 9664, CellSignaling) est incubé une nuit à 4°C. Après rinçage, un polymère de détection marqué à la peroxydase est déposé sur les coupes pendant 30 min à température ambiante (réf.: 8114, SignalStain® BoostDetectionReagent (HRP, Rabbit), CellSignaling). La révélation à la 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (réf. : D5905, Sigma) est suivie d'une contre-coloration à l'hémalun de Mayer (réf. : 1.09249, Merck).

RESULTATS

Evolution morphologique des cystes au cours du temps

Afin de comparer l'évolution morphologique des explants d'utricule et d'ampoule, des photos des échantillons en culture sont prises chaque jour, du jour de prélèvement (J0) jusqu'au 7^{ème} jour de culture (J7) à l'aide d'un microscope optique relié à une caméra (**Figure 1A et B**). A J1, les structures présentent des cellules fusiformes en périphérie, pouvant s'apparenter à des fibroblastes. L'explant d'ampoule commence à gonfler et une petite vésicule apparaît. L'explant d'utricule, quant à lui, ne présente une vésicule qu'à partir de J2. Pour les deux types de structures, la vésicule grossit progressivement jusqu'à J5 où elle semble atteindre une taille maximale.

Suivi de la concentration potassique

Pour suivre l'évolution de la concentration potassique au cours du temps, des explants d'utricule et d'ampoule sont mis en culture et leur concentration en K⁺ est mesurée chaque jour entre J2 et J9 sur quelques échantillons (**Figure 1C**). La mesure n'est possible qu'à partir de J2, lorsque la taille de la vésicule est suffisante pour insérer la microélectrode ion-sensitive. Une accumulation progressive de potassium endolymphatique est mesurée entre J2 et J4, puis la concentration se stabilise entre J4 et J7 avant d'augmenter légèrement à J8 et J9. Ces valeurs de K⁺ et ce profil d'accumulation dans le cyste d'utricule sont similaires aux études précédemment réalisées sur ce même modèle (8). A J2, la concentration en K⁺ est supérieure dans l'explant provenant de l'ampoule à celle provenant de l'utricule, ce qui confirme que la vésicule se forme plus précocement dans le cas des ampoules. A J7, les concentrations de K⁺ sont équivalentes pour les deux types de structures : $85,8 \pm 4,8$ mM pour les cystes provenant d'utricules et $85,3 \pm 3,1$ mM pour ceux provenant d'ampoules. Compte tenu de ces constats, les mesures de K⁺ des cystes traités avec les molécules de référence se font toujours au 7^{ème} jour de culture.

Caractéristiques histologiques

Les coupes histologiques effectuées sur des cystes témoins (n = 14 utricules + 6 ampoules) montrent que les cellules des cystes présentent les mêmes caractéristiques morphologiques que celles d'utricule et d'ampoule de rongeur décrits

dans la littérature (7, 12) (**Figure 2**). Dans l'épithélium sensoriel (**Figure 2B et E**), les mêmes types cellulaires sont retrouvés avec notamment des cellules ciliées de type I (piriformes), de type II (cylindriques) coiffées de leurs stéréocils ainsi que des cellules de soutien (**Figure 2B**). Au niveau de la zone sécrétrice, se situent les cellules sombres et transitionnelles, exprimant fortement la pompe Na^+/K^+ ATPase (**Figure 2C et F**).

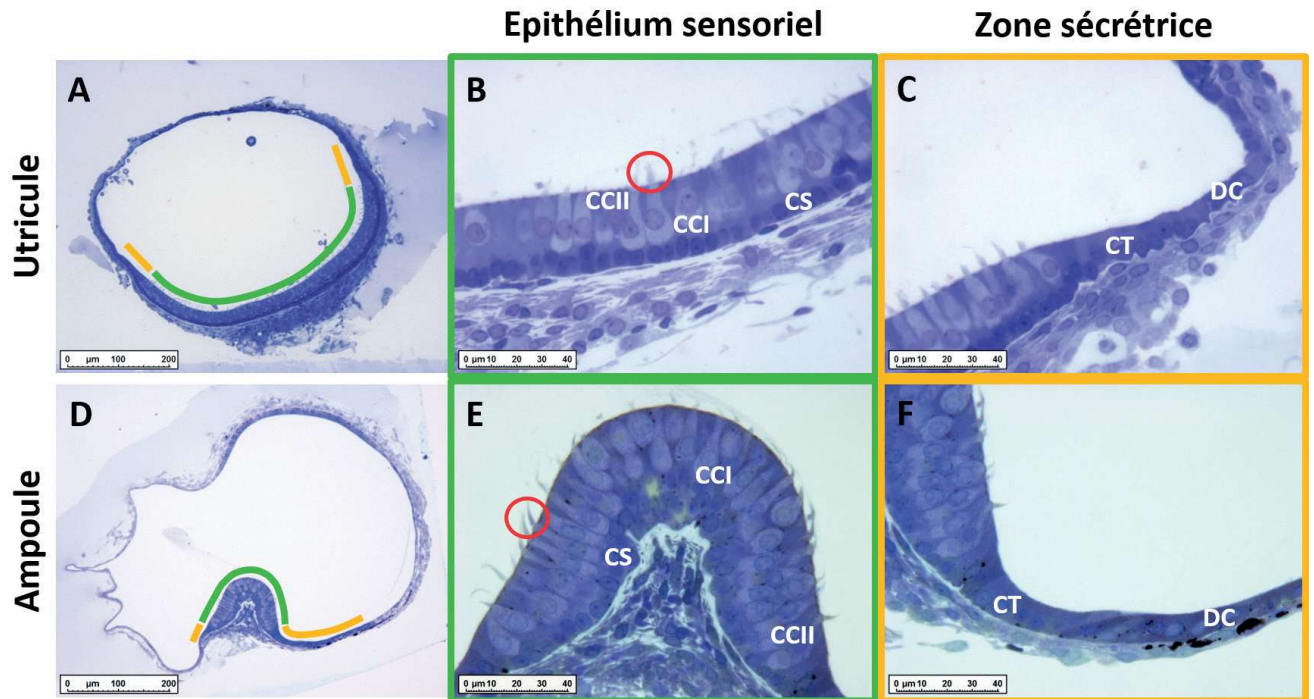


Figure 2 : Caractéristiques morphologiques des cystes.

Photographies en microscopie optique de coupes semi-fines de cystes témoins provenant d'utricules et d'ampoules. (A et D) Vue générale du cyste avec l'épithélium sensoriel délimité en vert et la zone sécrétrice en jaune. (B et E) Agrandissement de l'épithélium sensoriel. (C et F) Agrandissement de la zone sécrétrice. CCI : cellule ciliée de type I ; CCII : cellule ciliée de type II ; CS : cellule de soutien ; DC : cellule sombre (*dark cell*) ; CT : cellule transitionnelle. Cercles rouges : stéréocils d'une cellule ciliée.

Effet des traitements sur la concentration en K^+

Ouabaine

Après un traitement de 2 h à l'ouabaine, inhibiteur de la pompe Na^+/K^+ ATPase, la concentration de K^+ endolymphatique baisse significativement ($p < 0,001$) dans les deux types de structures par rapport à la concentration des cystes témoins (**Figure 3A**). Pour les cystes provenant d'utricules, la concentration de K^+ diminue

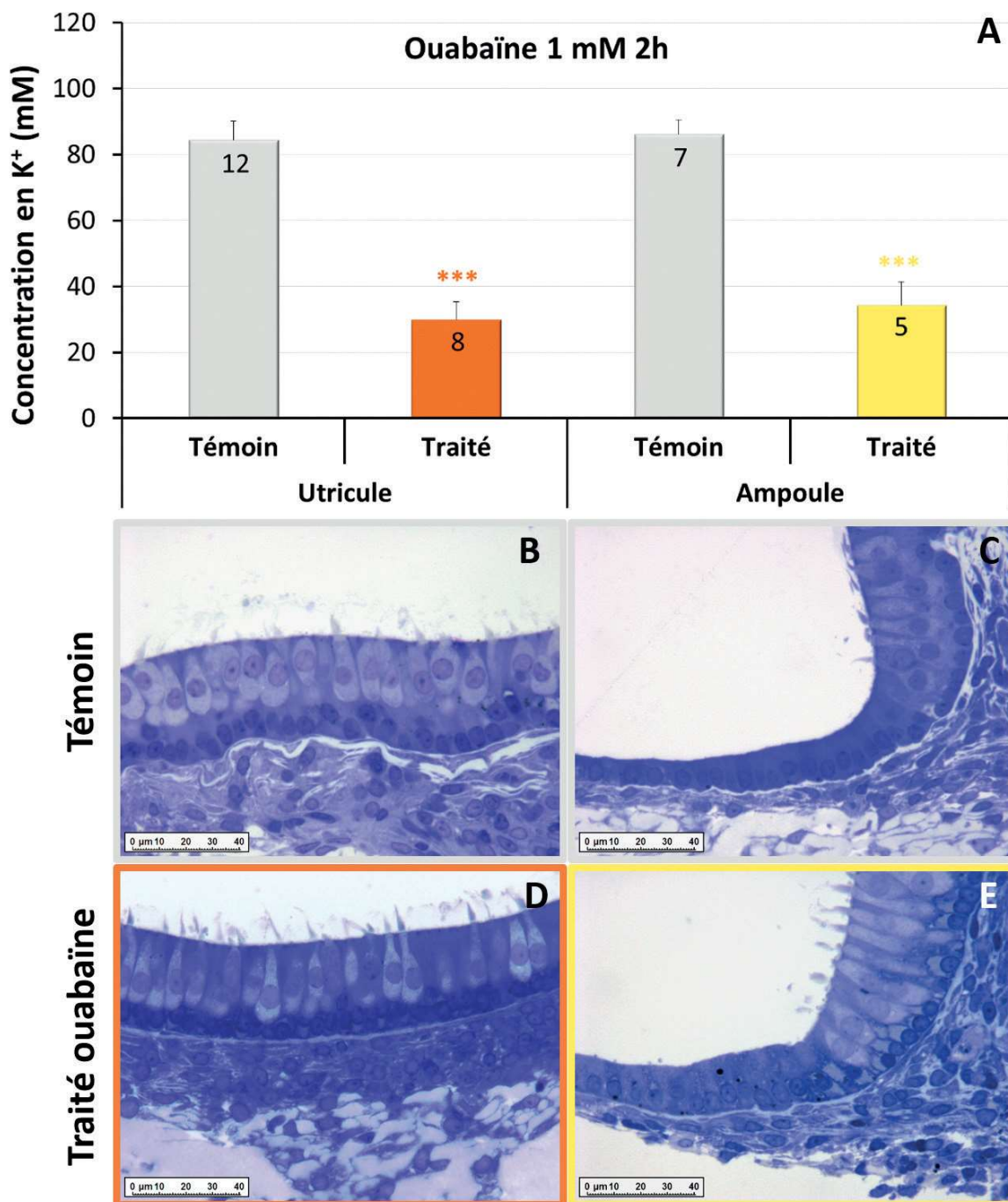


Figure 3 : Effet d'un traitement à l'ouabaïne sur les cystes.

L'ouabaïne est administrée à une concentration de 1 mM pendant 2 h à des cystes au 7^{ème} jour de culture.

(A) Chaque barre d'histogramme représente la moyenne \pm erreur type. Le chiffre indiqué dans chaque barre indique le nombre d'échantillons par groupe. Les astérisques représentent une différence significative du groupe traité par rapport à son groupe témoin (***) $p < 0,001$; test de Student).

(B-E) Photographies en microscopie optique de coupes semi-fines de l'épithélium sensoriel de cystes provenant d'utricules (B et D) et d'ampoules (C et E) avec des échantillons témoins (B et C) et traités (D et E).

de 65% (groupe témoin : $84,4 \pm 5,8$ mM ; groupe traité : $29,9 \pm 5,5$ mM), et de 60% (groupe témoin : $86,1 \pm 4,4$ mM ; groupe traité : $34,3 \pm 7,0$ mM) pour ceux provenant d'ampoules. Les coupes histologiques effectuées sur des cystes traités (n = 5 utricules + 5 ampoules) présentent les mêmes caractéristiques morphologiques que celles des cystes témoins (n = 4 utricules + 6 ampoules) pour les deux types d'échantillons (**Figure 3B à E**).

Gentamicine

La gentamicine, provoque une baisse drastique ($p < 0,001$) de la concentration de K^+ contenue dans le cyste après 7 jours de traitement, soit une diminution de 93% par rapport au groupe témoin (groupe témoin : $93,5 \pm 3,8$ mM ; groupe traité : $6,7 \pm 0,48$ mM) (**Figure 4A**). En histologie, sur les coupes semi-fines (n = 3 traités + 5 témoins), les échantillons traités présentent des cellules ciliées avec des noyaux rétrécis ou au contraire gonflés, tandis que les noyaux des cellules de soutien sont majoritairement gonflés. Les stéréocils des cellules ciliées ont quasiment disparus et certaines cellules ciliées présentent une extrusion du contenu de leur cytoplasme par rapport au plateau cuticulaire. Le tissu sous-épithélial semble également atteint avec la présence de noyaux condensés (**Figure 4C et D**). En MEB (n = 2 traités + 2 témoins), les faisceaux de stéréocils ont presque disparu, le seul encore présent sur la photo présente des stéréocils fusionnés (**Figure 4F et G**). En immunohistochimie (n = 5 traités + 4 témoins), le marquage brun intense au niveau des cellules ciliées et des cellules de soutien témoigne de la présence de caspase 3 clivée après 7 jours de traitement à la gentamicine (**Figure 4I et J**).

Styrène

Après une exposition au styrène, les effets sur la concentration en K^+ endolymphatique sont visibles dès 2 heures de traitement (**Figure 5A**). Une baisse significative est mesurée pour les deux temps de contact, avec une diminution de 49% (groupe témoin : $82,0 \pm 4,8$ mM ; groupe traité : $41,7 \pm 11,6$ mM) de la concentration en K^+ dans le groupe traité 2 h par rapport au groupe témoin ($p = 0,020$) et de 74% (groupe témoin : $80,6 \pm 4,5$ mM ; groupe traité : $21,0 \pm 5,9$ mM) après 72 h de traitement ($p < 0,001$). En histologie, le traitement de 2 h de styrène provoque déjà des dégâts cellulaires avec notamment la présence de noyaux condensés et gonflés ainsi que des vacuoles dans le cytoplasme dans tous les types cellulaires. Des stéréocils sont encore visibles à la surface du plateau cuticulaire (**Figure 5C et D**).

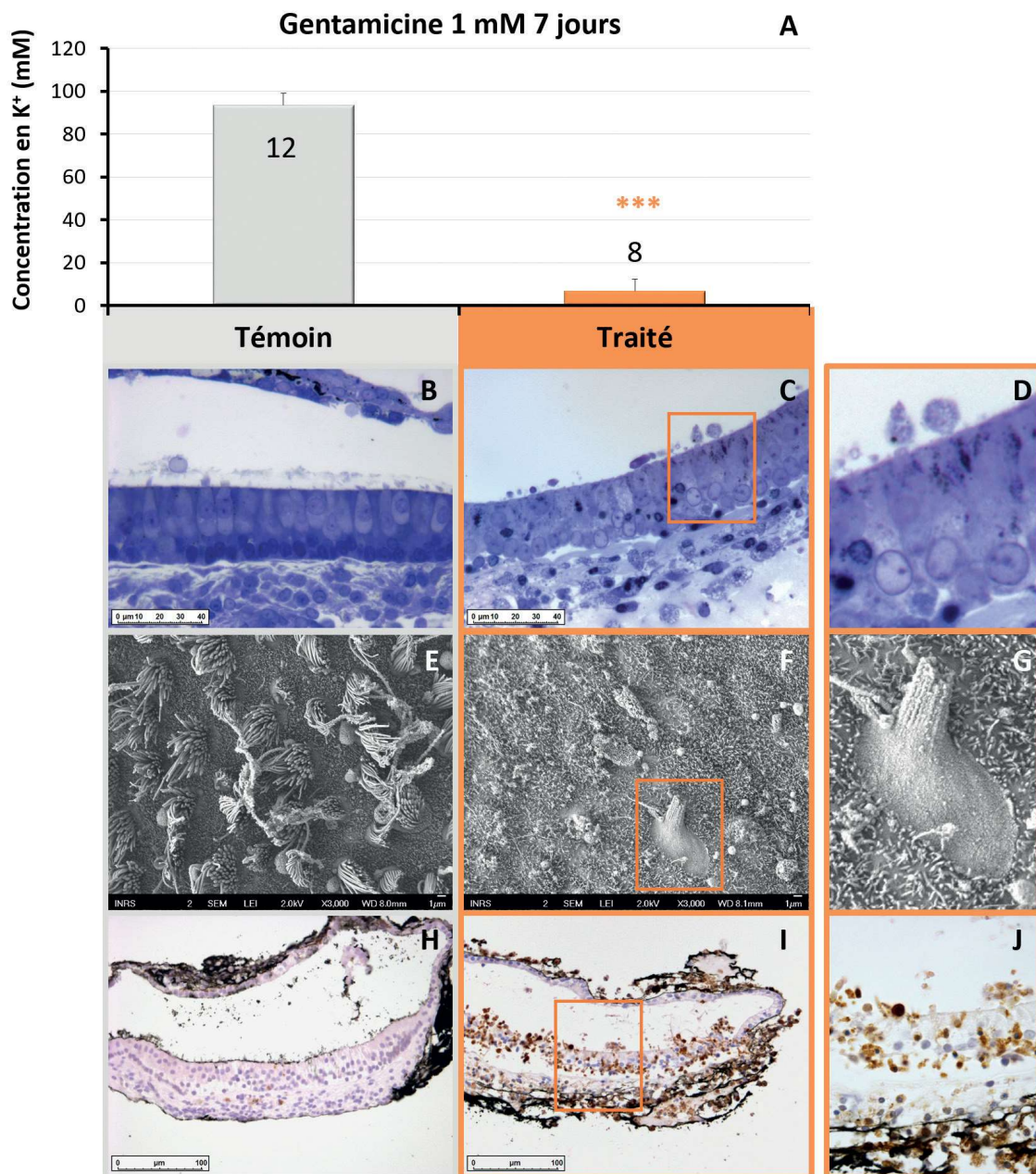


Figure 4 : Effet d'un traitement à la gentamicine sur des cystes provenant d'utricules.

La gentamicine est ajoutée au milieu dès le 1^{er} jour de culture. Une quantité équivalente de véhicule est ajoutée dans le milieu des cystes témoins.

(A) La mesure de la concentration en K⁺ a lieu au 7^{ème} jour de culture. Chaque barre d'histogramme représente la moyenne ± erreur type. Le chiffre, dans ou au-dessus de chaque barre, indique le nombre d'échantillons par groupe. Les astérisques représentent une différence significative du groupe traité par rapport au groupe témoin (***) p < 0,001 ; test de Student).

Les analyses histologiques sont effectuées juste après la mesure de la concentration en K⁺. (B à D) Microscopie optique de coupes semi-fines de l'épithélium sensoriel de cystes provenant d'utricules. (E à G) Microscopie électronique à balayage de la surface de l'épithélium sensoriel des échantillons. (H à J) Microscopie optique de coupes de cystes après marquage immunohistochimique de la caspase 3 clivée. Les échantillons témoins sont sur la partie gauche (B, E et H) tandis que les échantillons traités à la gentamicine sont au milieu (C, F et I) avec leur agrandissement respectif sur la partie droite (D, G et J).

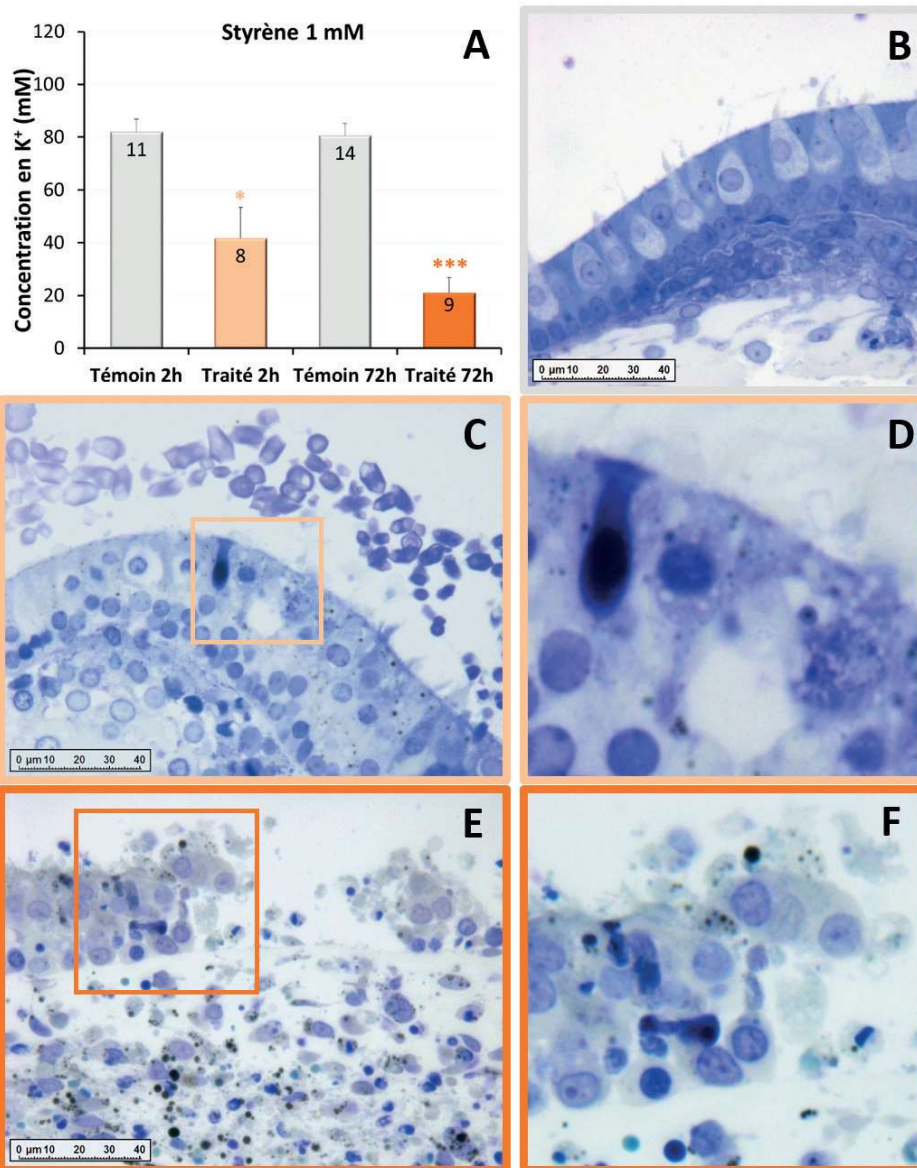


Figure 5 : Effet d'un traitement au styrène.

Le styrène est ajouté directement au milieu de culture, au 4^{ème} jour de culture pour les traitements de 72 h, et au 7^{ème} jour pour ceux de 2 h.

(A) Chaque barre d'histogramme représente la moyenne \pm erreur type. Le chiffre dans chaque barre indique le nombre d'échantillons par groupe. Les astérisques représentent une différence significative du groupe traité par rapport au groupe témoin relatif (* $p < 0,05$; test de Mann Whitney ; *** $p < 0,001$; test de Student). (B à F) Microscopie optique de coupes semi-fines de l'épithélium sensoriel de cystes provenant d'utricules témoin (B), traité 2 h au styrène (C et D) et 72 h au styrène (E et F).

Le traitement de 72 h ne permet pas de préserver l'intégrité tissulaire, toutes les cellules sont en mort cellulaire (**Figure 5E et F**). Le marquage immunohistochimique de la caspase 3 (non montré) ne montre pas d'apoptose chez les cystes traités pendant 72 h.

DISCUSSION

Ce modèle *in vitro* permet d'obtenir des cystes dont les caractéristiques fonctionnelles et morphologiques se rapprochent des structures *in vivo* par la présence de toutes les cellules sensorielles et sécrétrices et par celle d'un liquide proche de l'endolymphe d'un animal adulte. A J7, les concentrations en K^+ dans les cystes provenant d'ampoule et d'utricule sont comparables (environ 85 mM).

L'effet pharmacologique de l'ouabaine sur la pompe Na^+/K^+ ATPase est mesurable après 2 h de traitement : l'entrée de K^+ à l'intérieur du cyste est largement diminuée par rapport aux échantillons témoins sans pour autant provoquer d'anomalie histologique. Ces résultats sont retrouvés aussi bien pour les cystes provenant d'utricules que ceux provenant d'ampoules.

Après 7 jours de traitement, la gentamicine provoque une chute de la concentration en K^+ et des dégâts histologiques considérables sont constatés au niveau des cystes provenant d'utricules. La présence de noyaux condensés et la mise en évidence de la caspase 3 clivée en immunohistochimie indiquent que la majorité des cellules sensorielles et de soutien sont apoptotiques. Certaines cellules semblent également en extrusion, un des trois phénomènes, avec l'apoptose et la nécrose, qui conduisent à la disparition des cellules ciliées de l'épithélium sensoriel (13). Enfin, les stéréocils ont presque intégralement disparu, corroborant ainsi des travaux menés *in vivo* concluant à la vestibulotoxicité périphérique de la gentamicine (14).

L'exposition au styrène provoque une baisse d'environ 50% de la concentration en K^+ à l'intérieur des cystes après 2 h de traitement. A 72 h, cette baisse atteint près de 75%. Ce solvant perturbe donc l'équilibre potassique de l'endolymphe dans ce modèle. En histologie, les modifications morphologiques des cellules du cyste montrent que les cellules vestibulaires sont en souffrance, ce qui pourrait être la cause de la baisse de la concentration potassique. L'absence de caspase 3 après un traitement de 72 h laisse à penser qu'il ne s'agit pas de mort cellulaire par apoptose. Ces résultats indiquent que ce solvant cochléotoxique est probablement vestibulotoxique.

CONCLUSION

La mesure de la concentration en K^+ semble être un bon indicateur de la fonctionnalité des cellules du cyste. Les analyses histologiques confirment les effets toxiques des molécules de référence sur ce modèle. Des études en cours au laboratoire permettront de comparer la sensibilité des cystes provenant d'utricules et d'ampoules après exposition à des solvants aromatiques. L'intérêt sera donc de disposer de 8 échantillons (1 utricule et 3 ampoules par oreille) à partir d'un seul rat nouveau-né et ainsi de réduire le nombre d'animaux à utiliser conformément à la règle des 3R en matière d'expérimentation animale. Cependant, ce modèle *in vitro*, développé à partir de rats nouveau-nés, ne prétend pas remplacer des études toxicologiques menées chez l'animal entier car il ne tient pas compte des transformations métaboliques des molécules toxiques par l'organisme. Il pourrait néanmoins être utilisé comme test de criblage pour étudier l'impact d'autres produits industriels sur la fonctionnalité du labyrinthe vestibulaire et ainsi cibler les molécules à investiguer *in vivo*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. LATAYE R, CAMPO P, BARTHELEMY C, LOQUET G, BONNET P. Cochlear pathology induced by styrene. *Neurotoxicol.Teratol.*, 2001, **23** (1), 71-9.
2. HIBINO H, NIN F, TSUZUKI C, KURACHI Y. How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflugers Arch. - Eur.J.Physiol.*, 2010, **459** (4), 521-33.
3. CHABBERT C. Anatomie et physiologie du vestibule - PDF. *EMC - Oto-rhino-laryngologie*, 2015, **0** (0), 1-9.
4. VOURIOT A, HANNHART B, GAUCHARD GC, BAROT A, LEDIN T, MUR J-M, *et al.* Long-term exposure to solvents impairs vigilance and postural control in serigraphy workers. *Int.Arch.Occup.Environ.Health*, 2005, **78** (6), 510-5.
5. HODGKINSON L, PRASHER D. Effects of industrial solvents on hearing and balance: a review. *Noise Health*, 2006, **8** (32), 114-33.
6. GANS RE, RAUTERKUS G, Vestibular Toxicity: Causes, Evaluation Protocols, Intervention, and Management. *Semin. Hear.*, 2019, **40** (2), 144-53.

7. GABOYARD S, CHABBERT C, TRAVO C, BANCEL F, LEHOUELLEUR J, YAMAUCHI D, *et al.* Three-dimensional culture of newborn rat utricle using an extracellular matrix promotes formation of a cyst. *Neuroscience*, 2005, **133** (1), 253-65.
8. BARTOLAMI S, GABOYARD S, QUENTIN J, TRAVO C, CAVALIER M, BARHANIN J, *et al.* Critical Roles of Transitional Cells and Na/K-ATPase in the Formation of Vestibular Endolymph. *J.Neurosci.*, 2011, **31** (46), 16541-9.
9. FORGE A, LI L. Apoptotic death of hair cells in mammalian vestibular sensory epithelia. *Hear.Res.*, 2000, **139** (1-2), 97-115.
10. CHEN G-D, CHI L-H, KOSTYNIAK PJ, HENDERSON D. Styrene induced alterations in biomarkers of exposure and effects in the cochlea: mechanisms of hearing loss. *Toxicol. Sci.*, 2007, **98** (1), 167-77.
11. FETONI AR, ROLES R, PACIELLO F, ERAMO SLM, GRASSI C, TROIANI D, *et al.* Styrene enhances the noise induced oxidative stress in the cochlea and affects differently mechanosensory and supporting cells. *Free Radic.Biol.Med.*, 2016, **101**, 211-25.
12. NICOLAS M, DEMÊMES D, MARTIN A, KUPERSHMIDT S, BARHANIN J. KCNQ1/KCNE1 potassium channel in mammalian vestibular dark cells. *Hear.Res.*, 2001, **153**, 132-45.
13. SEOANE A, DEMÊMES D, LLORENS J. Relationship between insult intensity and mode of hair cell loss in the vestibular system of rats exposed to 3,3'-iminodipropionitrile: Mode of Hair Cell Loss in the Rat Inner Ear. *J.Comp.Neurol.*, 2001, **439** (4), 385-99.
14. LANG H, LIU C. Apoptosis and hair cell degeneration in the vestibular sensory epithelia of the guinea pig following a gentamicin insult. *Hear.Res.*, 1997, **111** (1-2), 177-84.