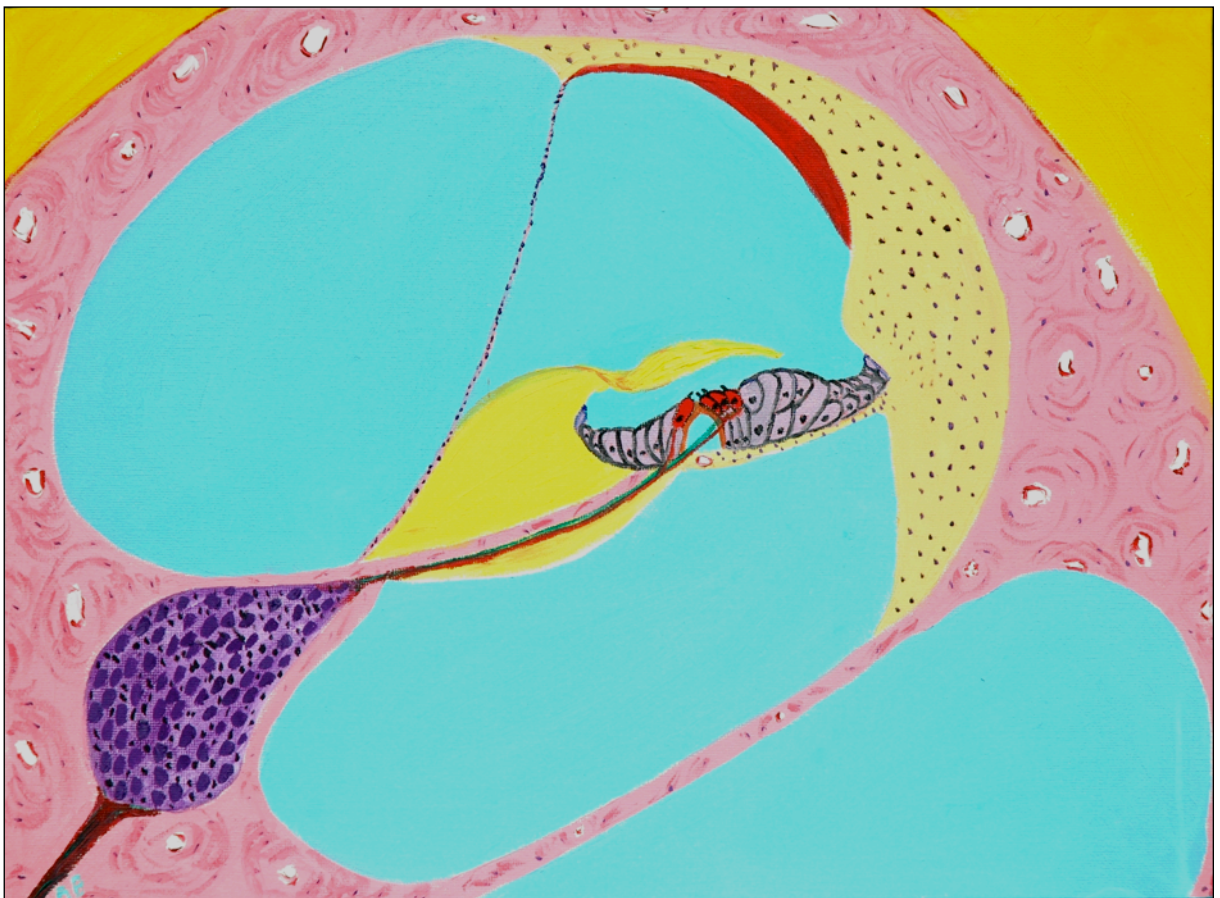


Mécanismes et Thérapies des Surdités Neurosensorielles



*Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
Biomédicales et Pharmaceutiques*

Dr. Anne-Lise ML POIRRIER

14 Septembre 2010

Promoteur : Pr. Brigitte MALGRANGE

Illustration de couverture : Arlette Brose, huile sur toile

Remerciements

Au commencement était le goût du risque. Le Professeur Brigitte MALGRANGE, directrice du GIGA-Neurosciences, a relevé le défi de superviser un projet de recherche sur l'ototoxicité in vivo dans un laboratoire de neurobiologie du développement. Avec dynamisme et ouverture d'esprit, elle a dirigé cette thèse malgré les limitations techniques et les impératifs de ma pratique clinique. Elle a réussi l'exercice délicat d'orienter mes choix vers plus de réalisme scientifique, tout en accordant une liberté inestimable à mes axes de recherche. Avec tact, elle a tenté de dessiner pour chacun de mes projets un cadre pragmatique et efficace. Elle a pu valoriser mes observations, optimistes ou non, avec une très grande réactivité. Elle est la pierre angulaire de mes recherches.

Tous mes travaux ont été portés par le Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS). Ils ont également bénéficié du soutien du Fonds Léon Frédéricq de l'Université de Liège.

Au rythme des collaborations, des associations, des rencontres, le laboratoire du GIGA-Neurosciences est né, en même temps que le projet de cette thèse, ouvrant plus largement nos horizons et nos possibilités d'investigation. J'ai abondamment profité de cette infrastructure exceptionnelle, alliant modernité technique et échanges multiples. Parmi les pères de ce laboratoire, je tiens à remercier le Professeur Gustave MOONEN, actuellement doyen de notre faculté, dont le mode de fonctionnement repose sur la confiance, la diversité et la motivation.

Le Professeur Philippe LEFEBVRE a accompagné mes recherches avec un enthousiasme et une foi infaillible. Il a toujours cru en mes projets et mon travail. Son soutien m'a donné des ailes. Le Professeur Jacques BALTHASART a suivi mes recherches au fil des comités de thèse avec ses conseils et interrogations pertinentes.

Jamais l'idée de me lancer dans la recherche n'aurait cependant éclot sans la curiosité, la passion et le souci de comprendre qui ont baignés le liquide amniotique de ma formation médicale à l'ombre du Professeur Jean SCHOENEN. A cette époque, le laboratoire de Neuroanatomie existait encore rue des Pitteurs. Son équipe extraordinaire a forgé ma manière d'aborder les problèmes et laissera son empreinte sur ma pratique future (les docteurs Rachelle FRANZEN, Sylvie MULTON, Delphine BOUHY, Linda CHABALLE, et surtout les docteurs Félix SCHOLTES et Martin SCHOLSEM qui ont guidé mes premiers pas en recherche, en chirurgie du rat, mais aussi dans la relation d'amour entre le chercheur et l'animal). Au même titre, le Professeur Jean-Paul MISSON restera de ceux qui ont largement inspiré mes méthodes de travail, entre tolérance, respect, courage et humanisme.

J'ai été initiée à l'étude du comportement animal avec les macaques du Professeur Alim-Louis BENABID de Grenoble (Unité INSERM 318, Université Joseph Fourier), en particulier auprès du Docteur Napoleon TORRES, toujours respectueux et attentif au confort des animaux d'expérience. Je dois l'apprentissage de la chirurgie de la cochlée et des potentiels évoqués auditifs chez le cobaye à l'équipe du Professeur Jean-Luc PUEL de Montpellier qui m'a accueillie les bras ouverts (Unité Inserm 583, Hôpital Saint Eloi). De manière remarquable, le Docteur Jing WANG a partagé avec moi, plus que son savoir et son savoir-faire, le gîte et le couvert, pendant mon séjour à Montpellier. Le Docteur François LALLEMEND, du Karolinska Institute (Stockholm), a inspiré l'ensemble de mes recherches lors de son doctorat dans notre institut de Physiologie. En particulier, il est l'initiateur des recherches sur l'activation de la protéine kinase C dans le ganglion spiral. Le Docteur Tae-Soo KIM de Kyoto, m'a apporté son expertise dans la chirurgie des canaux semi-circulaires de la souris (Kyoto University Graduate School of Medicine). J'ai hérité de son

matériel chirurgical de pointe et notre laboratoire continue de profiter, longtemps après son départ, de ses investissements. Le Docteur Renaud VANDENBOSCH de l'université d'Ottawa a accompagné et encouragé 4 années de recherches lors de son doctorat dans notre centre.

Il m'a été particulièrement agréable de travailler avec Le Professeur Pierre DRION, directeur de notre animalerie universitaire, qui est resté disponible, compréhensif et compétent face aux menus problèmes qui émaillent le travail *in vivo*. Luc DUWEZ, son bras droit, était toujours patient et à l'écoute.

Le Docteur Joël PINCEMAIL (Département de chirurgie cardio-vasculaire, CHU Sart-Tilman) a participé aux études sur les radicaux libres avec érudition, persévérance et esprit critique. Le Docteur Pascale HUBERT, du laboratoire GIGA-Cancer, a dépensé temps et conseils pour la mise au point des modèles de culture cellulaire.

Ils figurent sur la seconde page de ces remerciements pour des raisons chronologiques, et pourtant, de part l'importance de leur contribution directe à l'élaboration de cette thèse, ils mériteraient la première place. Ils sont les véritables artisans de ces recherches. Arlette BROSE a réalisé de nombreuses expériences (immuno-histochimie, histologie, dissection) de ce travail et certaines illustrations de ce mémoire. Outre sa patience, son talent et sa disponibilité, et elle a été un encouragement constant et une bouffée d'oxygène bienvenue. Priscilla VAN DEN ACKERVEKEN a partagé les joies et les peines de ces expériences et a réalisé nombre d'entre elles, *in vivo* comme *in vitro*. Son amour des animaux, son perfectionnisme et la qualité de son travail sont impressionnants. Ayant rejoint la famille des doctorants, je lui souhaite la poursuite fructueuse de nos nombreux projets. Patricia ERNST a réalisé les cultures cellulaires avec efficacité et émotion.

Véronique PACOLET, audiométriste au service d'ORL et d'audiophonologie du CHU Sart-Tilman, m'a aidée à mettre au point les potentiels évoqués auditifs chez le rongeur et a réalisé les études des otoémissions acoustiques. Jean-Caude COLLEE, du département d'Anesthésie-Réanimation du CHU Sart-Tilman, a gracieusement accepté de mettre ses doigts de fée au service du bien-être de nos rongeurs. Laurent MASSOTTE (laboratoire de pharmacologie, GIGA-Neurosciences) a toujours été disponible pour tous les soucis techniques inévitables avec du matériel chirurgical confectionné et adapté sur mesure.

J'exprime toute ma gratitude à mes compagnons Marie-Laure VOLVERT, Jean DEFOURNY, Sylvain FLAMANT, Morgan BODSON, Pierre BEUKELAERS et le Docteur Lina MALINOUSKAIA pour les discussions constructives, les suggestions et leur soutien permanent. Les Docteurs Laurent NGUYEN et Laurence BORGS ont participé à ce travail par leurs conseils et leurs améliorations dans le fonctionnement du laboratoire.

Une dédicace toute spéciale aux Docteurs Ingrid BREUSKIN, Lionel LEJEUNE et Audrey MAUDOUX qui ont partagé avec moi le défi, l'enthousiasme et les déceptions d'être à la fois médecin et chercheur. Un clin d'œil au Docteur Sébastien BARRIAT que je n'ai pas encore réussi à convaincre de rejoindre notre cercle.

Enfin, j'ai une dette envers ceux qui ne pourront pas lire ces remerciements. De nombreux animaux de laboratoire ont participé à ce travail avec courage, dévouement et tendresse. En particulier, de chaleureuses pensées à Roméo, Scaevola, Pham-Tuân, Josquin, Huguenot, Ramses et Coriolan (souris Balb/c), Gabriel et Goliath (cobayes), et Sharkey (rat Wistar). Ils m'ont appris le réconfort, l'humilité et l'optimisme. Je ne peux malheureusement les citer tous, et si on écrivait pour chacun leurs noms et leurs actions, le monde entier ne pourrait, je pense, contenir les livres qu'ont écrit.

Résumé

Au cours de ces années de Doctorat, nous avons étudié les effets ototoxiques de certains médicaments et les moyens de prévenir les surdités neuro-sensorielles qu'ils peuvent induire. Parmi ces molécules, nous nous sommes concentrés sur les plus couramment utilisées en pratique clinique : les antibiotiques de la famille des aminoglycosides et le cisplatine, un agent anti-cancéreux. L'introduction de notre travail replace la surdité dans son contexte de santé publique. En particulier, nous décrivons pourquoi les médicaments ototoxiques sont utilisés et dans quelles circonstances. Nous présentons la structure de l'oreille interne et nous tentons d'expliquer sa vulnérabilité aux molécules ototoxiques. Nous abordons ensuite les moyens de prévention et/ou de traitement de ces atteintes neuro-sensorielles pharmaco-induites. Outre les moyens classiques de prévention, que sont les facteurs trophiques et les antioxydants, nous décrivons de nouvelles voies d'approche que sont les voies de signalisation impliquant la protéine kinase C ou la cascade d'activation RhoA/ROCK.

La présentation de notre travail original s'articule autour de deux parties. Dans la première partie, nous rapportons les résultats obtenus au cours de notre étude de la toxicité des aminoglycosides et du cisplatine chez la souris et le cobaye *in vivo*. Nous avons mis en évidence une différence de vulnérabilité significative entre ces deux espèces face à l'agression ototoxique. Cette différence existe au niveau fonctionnel, mis en évidence par l'étude des potentiels évoqués auditifs, et au niveau anatomique, étudié en histologie et en immunohistochimie. Nous en discutons les implications en recherche et en pratique clinique.

Dans la seconde partie, nous étudions les moyens de prévenir cette surdité *in vivo* et *in vitro*. Nous avons utilisé un modèle de surdité par aminoglycoside chez le cobaye. Nous avons testé et validé une technique de perfusion intra-cochléaire *in vivo*. Nous avons observé les effets de deux molécules expérimentales : la Bryostatine 1, un activateur de la protéine kinase C, et un inhibiteur de la voie RhoA-ROCK. L'effet protecteur de ces molécules est actuellement limité au ganglion spiral, dont la survie est essentielle à tout traitement d'implantation prothétique et de réadaptation. Nous discutons des perspectives en médecine humaine dans notre conclusion.

Mots Clés

Aminoglycoside, audition, bryostatine 1, cisplatine, cobaye, cochlée, ototoxicité, protéine kinase C, Rho kinase, souris, Y-27632.

Summary

In this work, we focused our attention on the effects of main ototoxic drugs – i.e. aminoglycosides and cisplatin – in mammals. We identified new avenues for the prevention of this toxicity. In the introduction, we described how and why ototoxic drugs are used. We then described potential otoprotective strategies in neurosensory deafness. Among them, trophic factors and antioxidant molecules have been widely used. New otoprotective approaches do exist, implying the protein kinase C or RhoA/ROCK signalling.

Our original work was presented in two parts. In the first part, we reported the *in vivo* effects of aminoglycosides and cisplatin in two mammalian species: mice and guinea pigs. Contrarily to guinea pigs, evidence of mice resistance to ototoxicity was found at a functional level, assessed by auditory brainstem responses, and at an anatomical level, studied by immunohistochemistry. We discussed the implication of such differences in research and in clinical practice.

In the second part, we studied the effect of two potential otoprotective molecules: Bryostatine 1, an activator of the protein kinase C, and Y-27632, a Rho kinase inhibitor. We showed that these molecules are protecting spiral ganglion neurons both *in vitro* and *in vivo*. Survival of spiral ganglion neurons is crucial in the management and rehabilitation of deafness. The potential perspectives of these results in human medicine were discussed.

Keywords

Aminoglycoside, hearing, bryostatin 1, cisplatin, guinea pig, cochlea, ototoxicity, protein kinase C, Rho kinase, mouse, Y-27632.

Abréviations

AG : aminoglycoside
BDNF : brain-derived neurotrophic factor
CREB : cAMP response element binding
Cyt c : cytochrome c
DAG : diacylglycérol
EGF : Epidermal Growth Factor
ERK : extracellular-regulated kinase
FGF : Fibroblast Growth Factor
FOXO : Forkhead classe O
GDNF : Glial cell-Derived Neurotrophic Factor
GSH : glutathion
GSK3 : glycogène synthase kinase 3
GSSG : glutathion oxydé
GST : glutathion-S-transférase
IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1
JNK : c-Jun-N-terminal kinases
LIMK : Lin11, Isl1 & Mec3 kinases
L-NAME : L-N(omega)-Nitroarginine méthyl ester
MAPK : mitogen-activated protein kinases
MEK : mitogen extracellular-regulated kinase
MLC-P : myosin light chain phosphorylée
NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NOS : nitric oxide synthase
NOX : NADPH oxydase
NT-3 : neurotrophine-3
PAK : p21-activated kinase
PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase
PIP2 : phosphatidylinositol-biphosphate
PKC : protéine kinase C
ROCK : Rho kinase
ROS : reactive oxygen species
RSK : kinase ribosomale S6
SOD : superoxide dismutase
TGF α : Transforming Growth Factor α
TGF β 1 : Transforming Growth Factor β 1
Trk B/C : récepteur tyrosine kinase B/C
TRVP1 : transient receptor potential vanilloïd 1

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	12
1. La surdité aujourd'hui	13
1.1 Les étiologies des surdités neurosensorielles	
1.2 Les conséquences des surdités neurosensorielles	
2. Les médicaments ototoxiques dans la pratique médicale	16
2.1 Les Aminoglycosides	
2.2 Le Cisplatine	
3. La structure de l'oreille interne	20
4. Les mécanismes d'ototoxicité	24
4.1 L'Ototoxicité des Aminoglycosides	
4.2 L'Ototoxicité du Cisplatine	
5. Les stratégies d'otoprotection	31
5.1 Les facteurs trophiques	
5.1.1 Les facteurs trophiques et les cellules ciliées	
5.1.2 Les facteurs trophiques et les neurones auditifs	
5.2 Les antioxydants	
5.3 La bryostatine 1	
5.4 Le Y-27632 et l'inhibition de la voie Rho/Rock	
6. Les objectifs de ce travail	44
PREMIERE PARTIE	45
Modèles de surdité chez l'animal	
1. Les médicaments ototoxiques : différence de sensibilité entre le Cobaye et la Souris	46
1.1 Introduction	
1.2 Matériel et Méthode	
1.3 Résultats	
1.4 Discussion	
1.5 Conclusion	
DEUXIEME PARTIE	67
Protection de l'oreille interne par des agents pharmacologiques exogènes	
1. La Bryostatine-1	68
1.1 Introduction	
1.2 Matériel et Méthode	
1.3 Résultats	
1.4 Discussion	
1.5 Conclusion	
2. Le Y-27632 (anti-ROCK)	81
2.1 Introduction	
2.2 Matériel et Méthode	
2.3 Résultats	
2.4 Discussion	
2.5 Conclusion	
CONCLUSIONS	91
REFERENCES	97

INTRODUCTION

1. La surdité aujourd'hui

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la surdité est définie par la perte complète ou partielle de la capacité auditive d'une ou des deux oreilles. L'altération peut être légère, modérée, sévère ou profonde¹². Classiquement, les atteintes sont de deux types : surdité de transmission et surdité de perception (ou neurosensorielle). Les surdités de transmission sont liées à une affection de l'oreille externe ou moyenne. Ce type de pathologie otologique est souvent curable médicale­ment ou chirurgicalement, à condition que l'accès aux soins de santé soit assuré. Les surdités neurosensorielles quant à elles sont en général liées à une atteinte de l'oreille interne et parfois du nerf auditif. Ce type d'altération de l'audition est souvent irréversible. Actuellement, en l'absence de traitement curatif, la surdité neurosensorielle nécessite une r  ducation, moyennant une prothèse auditive. La surdité neurosensorielle peut être profonde, bilatérale, et avoir de graves répercussions sur l'intégration sociale, l'éducation, l'accès à une profession, à la santé et l'espérance de vie du patient¹³. Notre travail s'est concentré sur les surdités neurosensorielles, qui représentent aujourd'hui 80% des surdités dans le monde^{12,14}.

1.1 Les étiologies des surdités neurosensorielles

La surdité neurosensorielle recouvre une large variété de pathologies. Elle peut survenir à la naissance (surdité héréditaire ou congénitale) ou être acquise ultérieurement. Les facteurs de risque de surdité à la naissance ont été clairement établis et sont régulièrement mis à jour par le *Joint Committee on infant Hearing*¹⁵⁻¹⁷ : infection congénitale (rubéole, syphilis, CMV, herpès simplex, toxoplasmose, varicelle-zona, HIV)¹⁸⁻²⁰, poids de naissance inférieur à 1500 grammes, pr  maturit  ²¹⁻²³, hypoxie péri-natale^{24,25}, hyperbilirubin  mie²⁶, administration de médicaments ototoxiques à la mère durant la grossesse²⁷, séjour en soins intensifs n  onataux^{15,24}, méningite bactérienne, signes et symptômes d'un syndrome potentiellement associé à une surdité, anomalie crânio-faciale, ou antécédent de surdité familiale¹⁵⁻¹⁷. Un grand nombre de gènes peuvent être mutés et être à l'origine d'une surdité plus ou moins profonde, syndromique ou non²⁸⁻³¹. La mutation la plus fréquente est celle de la connexine 26, une protéine intervenant dans les échanges ioniques de l'organe de Corti³²⁻³⁴.

Indépendamment des facteurs de risque, le dépistage systématique de la surdité chez les nouveau-nés dans les pays industrialisés permet une prise en charge précoce des enfants sourds ou malentendants³⁵⁻³⁸. La faisabilité d'un tel dépistage est actuellement à l'étude dans les pays en développement, mais se heurte à de nombreuses difficultés, en particulier, le manque d'uniformité des structures de soins à la naissance³⁹⁻⁴¹.

Les surdités neurosensorielles acquises relèvent également de plusieurs mécanismes. Des maladies infectieuses⁴² telles que la méningite⁴³, la rougeole, les oreillons⁴⁴ et les infections otologiques^{45,46} peuvent être cause de déficience auditive, pendant l'enfance et ultérieurement. L'utilisation de médicaments ototoxiques à tout âge, y compris d'antibiotiques ou d'antipaludéens, est une cause importante de surdité^{47,48}, en particulier dans les pays en développement où ils sont davantage utilisés en raison de leur faible coût et de leur efficacité^{48,49}. Un traumatisme sonore, lié par exemple à l'utilisation professionnelle d'appareils bruyants, à une exposition à de la musique ou d'autres bruits forts, comme des tirs d'arme à feu ou des déflagrations, peut provoquer une surdité⁵⁰. Le vieillissement entraîne une perte auditive progressive (presbyacousie)⁵¹⁻⁵³. Avec le vieillissement de la population mondiale, la presbyacousie est devenue la principale cause de surdité de l'adulte⁵⁴. Il s'agit d'une étiologie multifactorielle (exposition à des traumatismes sonores répétés, affections métaboliques et vasculaires, stress oxydant). Les autres causes de surdité acquises sont les traumatismes physiques (fracture du rocher ou la chirurgie de la base du crâne), les affections dysimmunitaires et métaboliques, les pathologies vasculaires ou tumorales. Selon les estimations de l'OMS, 50% des surdités sont attribuables à des causes évitables¹². Notre travail se concentrera sur les surdités pharmaco-induites.

1.2 Les conséquences des surdités neurosensorielles

278 millions de personnes dans le monde souffrent de surdité modérée ou profonde bilatérale, dont 80% vivent dans des pays à revenu faible ou intermédiaire¹². Le nombre des personnes atteintes augmente, principalement sous l'effet de l'accroissement démographique mondial et de l'allongement de l'espérance de vie. La surdité a pour conséquence une lourde charge sociale et économique sur les patients, les familles, les communautés et les pays^{13,55}. Par exemple, la surdité a un impact économique plus important que l'épilepsie, la sclérose en plaques, les traumatismes de la moelle épinière, les affections neuro-vasculaires, les maladies

de Parkinson et de Huntington réunis ; elle affecte, au moins, 4 fois plus de personnes⁵⁶. L'altération de l'audition chez l'enfant s'accompagne souvent d'un retard de développement de la parole, du langage et des aptitudes cognitives, pouvant se traduire par des retards d'apprentissage et des difficultés scolaires¹³. Son impact dépend du niveau et du type de surdité, ainsi que de l'âge auquel elle apparaît, spécialement si elle apparaît avant l'âge d'acquisition du langage⁵⁷. La surdité chez l'adulte a un impact négatif sur les fonctions cognitives^{58,59}, l'employabilité⁶⁰, la vie de famille⁶¹, l'estime de soi⁶² et la qualité de vie⁶²⁻⁶⁴. Elle favorise l'isolement social⁶⁵ et la dépression⁶⁶⁻⁶⁸.

La prise en charge de la surdité passe par la prévention, le dépistage précoce, la rééducation et la recherche. La recherche est actuellement axée vers la compréhension des mécanismes des lésions neurosensorielles et la mise au point de nouvelles stratégies de traitement. La lutte contre la surdité est intégrée dans le cadre général OMS de prévention des maladies chroniques et de lutte contre ces maladies⁶⁹.

2. Les médicaments ototoxiques dans la pratique médicale

De nombreux médicaments ont des effets secondaires ototoxiques, avec pour cible principale les cellules ciliées sensorielles de l'oreille interne⁷⁰. Les principaux sont les antibiotiques de la famille des aminoglycosides, certains diurétiques de l'anse comme le furosémide, les salicylés, les anti-paludéens, et certains agents anti-cancéreux dont le plus connu est le cisplatine. Dans ce travail, nous nous concentrerons essentiellement sur les antibiotiques de la famille des aminoglycosides, éventuellement potentialisés par un diurétique, et sur le cisplatine. En effet, ce sont les molécules les plus utilisées parmi les ototoxiques et qui provoquent le plus souvent une surdité chez l'homme comme chez l'animal^{71,72}.

2.1 Les aminoglycosides

Les aminoglycosides sont des antibiotiques de plus en plus utilisés dans le monde en raison de l'émergence de souches bactériennes résistantes aux autres antibiotiques⁷³. La streptomycine a été le premier aminoglycoside découvert à partir d'une souche de *Streptomyces griseus* par Schatz et Waksman en 1943. Cette découverte a mérité le prix Nobel de Médecine en 1952⁷⁴. Longtemps utilisée,

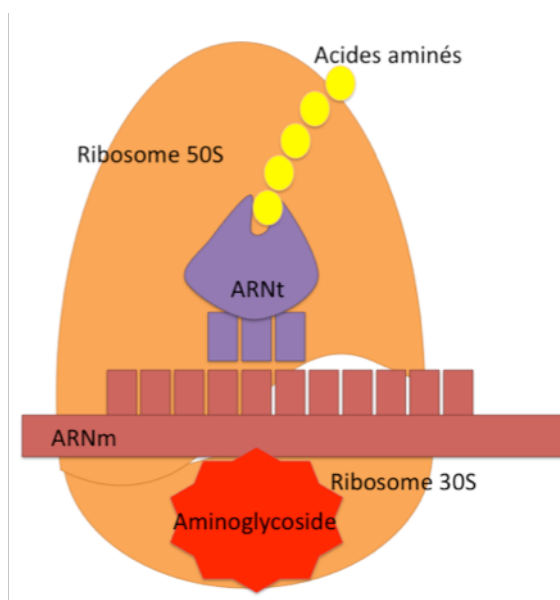


Figure 1:

Liaison de l'aminoglycoside à la sous-unité 30S du ribosome bactérien et perturbation de la traduction des ARNm bactériens en protéines. L'accumulation de protéines aberrantes est responsable de l'effet anti-bactérien.

notamment dans le traitement de la tuberculose, elle a été progressivement abandonnée dans les pays industrialisés en raison de sa toxicité. Elle retrouve un intérêt depuis 2006 avec l'émergence de souches de tuberculose extrêmement résistantes⁷⁵. Depuis leur découverte, plusieurs aminoglycosides ont été synthétisés. Ils partagent une structure commune composée d'un anneau aminocyclitol saturé par des groupes aminés et hydroxyl⁷⁶⁻⁷⁹.

Les aminoglycosides se lient au ribosome bactérien (sous-unité 30S) et perturbent la synthèse des protéines bactériennes (Figure 1). Leur activité bactéricide est rapide et concentration-dépendante, suivie d'un effet post-antibiotique prolongé de plusieurs heures⁸⁰. Leur spectre d'activité est large sur les germes Gram négatifs aérobies, certains cocci Gram positifs et les bacilles acido- alcool-résistants (mycobactéries)⁷⁶⁻⁷⁹. Leur biodisponibilité est pratiquement nulle *per os*. Ainsi, ils sont utilisés en injection intraveineuse ou intramusculaire. Ils ne sont pas métabolisés et sont éliminés par filtration glomérulaire rénale. Leur indice thérapeutique (rapport entre la dose thérapeutique et la dose toxique) est étroit et ces antibiotiques nécessitent un suivi des concentrations sanguines⁸⁰. Ce monitoring n'est pas disponible dans tous les pays. Les aminoglycosides sont souvent utilisés en une seule injection par jour pour accroître leur efficacité antibactérienne (concentration-dépendante) et réduire leur toxicité (dépendante notamment du nombre d'expositions). Ils sont rarement recommandés en monothérapie en raison de leur toxicité trop élevée. Dans nos pays, ils sont de plus en plus utilisés en association avec d'autres antibiotiques (bêta-lactamines, vancomycine) contre les infections hospitalières graves dues à des bactéries Gram-négatives multi-résistantes (entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*). En particulier, dans les unités de soins intensifs néonataux, ils font partie du traitement de première intention des infections invasives à Bacille Gram-négatif. Dans les pays industrialisés, un traitement court est privilégié pour éviter les effets toxiques.

Dans les pays en développement, où on observe une recrudescence des cas de tuberculose et en particulier de tuberculose multi-résistante, ils font partie de l'arsenal thérapeutique au long cours. Leur faible coût en fait un allié de choix pour le médecin de terrain^{81,82}. Selon les estimations de l'OMS, un tiers de la population mondiale est contaminée par le bacille tuberculeux, *Mycobacterium tuberculosis* (ou BK, Bacille de Koch). La tuberculose est souvent une maladie sans début bien marqué et à évolution chronique et progressive⁸³. Le traitement est long (au moins 6 mois) et comporte une combinaison de médicaments incluant souvent un ou plusieurs aminoglycosides en fonction des résistances aux antibiotiques. En 2008-

2009, un nombre record de cas de tuberculose multi-résistante a été déclaré à l’OMS : le nombre de nouveaux cas est estimé à un demi-million par an⁸¹. La tuberculose pharmacorésistante est responsable d’une mortalité plus élevée et est nettement plus difficile et plus chère à soigner que la tuberculose pharmacosensible. Elle requiert un traitement plus agressif et plus long, par fluoroquinolones et aminoglycosides, en particulier la kanamycine et l’amikacine⁸⁴.

2.2 Le cisplatine

Le cisplatine est un agent anti-cancéreux apparenté aux agents alkylants, dont le mécanisme d’action anti-cancéreux résulte d’une interaction directe avec l’ADN cellulaire. Le cisplatine lie les bases puriques de l’ADN et forme des liaisons irréversibles entre les différents brins d’ADN et entre les deux chaînes de la double hélice^{80,85-87}(Figure 2). La réplication de l’ADN et sa transcription en ARN sont inhibées. Cet effet aboutit à l’inhibition de la multiplication cellulaire, principalement dans les tissus à activité mitotique élevée. Le cisplatine est surtout utilisé actuellement dans les cancers du poumon, du sein, de l’estomac, de la vessie, de la tête et du cou et du testicule⁸⁰. En particulier, les cancers du poumon, du sein et de l’estomac sont parmi les plus fréquents et les plus meurtriers des cancers dans le monde⁸⁸. Plus de 70% des décès par cancer surviennent dans les pays à faible revenu ou à revenu intermédiaire. D’après les projections, leur nombre devrait augmenter de 45% entre 2007 et 2030 pour atteindre 12 millions de décès en 2030 à l’échelle mondiale⁸⁸. Cette augmentation est en partie due à l’accroissement et au vieillissement de la population. Il est donc probable qu’un agent anticancéreux aussi efficace, disponible et bon marché que le cisplatine sera de plus en plus utilisé dans le monde. Les effets secondaires majeurs du cisplatine sont la néphrotoxicité, la surdité neurosensorielle, et la neurotoxicité⁸⁰. La toxicité rénale est quasi constante et nécessite un protocole d’hydratation intraveineuse et éventuellement l’utilisation d’un diurétique de type furosémide. Ce diurétique a également un effet ototoxique propre^{89,90}, rarement significatif lorsqu’il est utilisé seul à dose thérapeutique, mais qui peut entraîner une surdité à doses plus élevées et en association avec d’autres toxiques comme le cisplatine⁹¹. Les patients en cours de chimiothérapie anticancéreuse sont également plus vulnérables aux infections, en particulier en raison de l’immunosuppression chimio-induite. Ils sont donc plus susceptibles de nécessiter un traitement par antibiotique parfois ototoxique. L’ototoxicité cumulée sera alors importante.

Les mécanismes d'ototoxicité du cisplatine et des aminoglycosides (activation de la voie JNK, génération de radicaux libres) sont détaillés à la section 4.

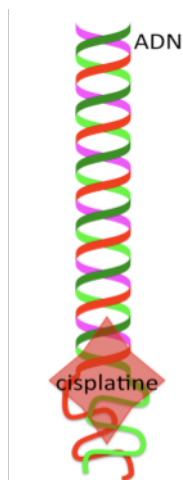


Figure 2:

Liaison du cisplatine sur les bases puriques de l'ADN et induction d'une variation de la conformation locale de la double hélice d'ADN, inhibant la réplication.

3. La structure de l'oreille interne

Les médicaments ototoxiques ont pour cible des cellules spécifiques de l'oreille interne. L'oreille est anatomiquement composée de trois parties. L'oreille externe et l'oreille moyenne sont responsables de la conduction des sons vers l'oreille interne, qui sert de récepteur sensoriel et de transmetteur du signal vers le système nerveux central. Une atteinte de l'oreille externe ou moyenne provoque une surdité de transmission. Une atteinte de l'oreille interne, cochléaire ou rétro-cochléaire est responsable d'une surdité de perception ou neurosensorielle. Les médicaments ototoxiques peuvent également atteindre le système vestibulaire, partie de l'oreille interne responsable de l'équilibre et composée d'un organe otolithique et des canaux semi-circulaires. Notre étude se concentre sur la portion auditive de l'oreille interne, c'est-à-dire la cochlée.

Chez l'être humain, l'oreille interne commence à se différencier à la fin de la troisième semaine gestationnelle, où la placode otique se développe à partir de l'ectoderme superficiel. Les cellules ciliées, les cellules de soutien, les neurones auditifs et le nerf auditif dérivent de cette placode otique. Durant la quatrième semaine gestationnelle, la placode otique s'invagine pour devenir la vésicule otique.

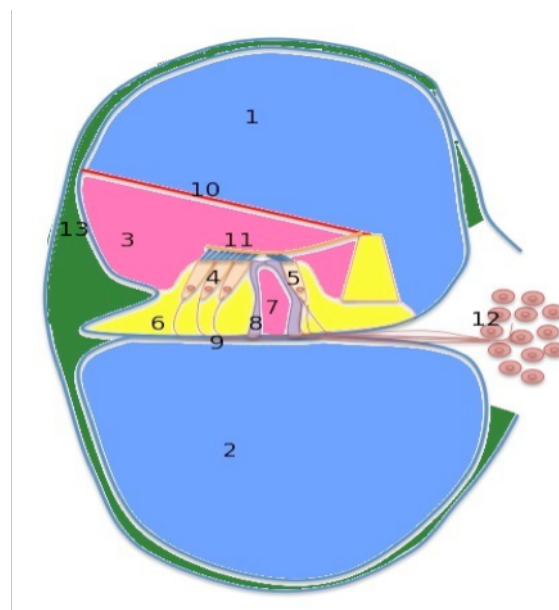


Figure 3 : Coupe à travers la cochlée.

1. Rampe vestibulaire. 2. Rampe tympanique. 3. Canal cochléaire. 4. Cellules ciliées externes. 5. Cellule ciliée interne. 6. Cellules de soutien. 7. Tunnel de Corti. 8. Cellule pilier. 9. Membrane basilaire. 10. Membrane de Reissner. 11. Membrane tectoriale. 12. Ganglion spiral. 13. Strie vasculaire.

Les cellules ciliées de l'organe de Corti et les cellules de soutien commencent à s'organiser en un épithélium complexe et polarisé. L'organe de Corti est constitué dans la 7^e semaine gestationnelle⁹². L'organe de Corti est le récepteur sensoriel proprement dit de l'oreille interne. Il contient, entre autres, les cellules ciliées internes qui transforment l'onde sonore en signal électrique pour les neurones du ganglion spiral.

La cochlée mature est un organe creux composé d'une structure osseuse et membraneuse, qui chez les mammifères a une forme spiralée. Tout le long des tours de spire sont alignées les cellules ciliées formant l'organe de Corti⁹³. Les cellules ciliées sont organisées le long d'une membrane, la membrane basilaire, qui sépare la cochlée en 2 chambres : 1/ la rampe tympanique qui vient au contact de la face inférieure de la membrane basilaire et 2/ le canal cochléaire qui contient les cellules ciliées à la face supérieure de la membrane basilaire (figure 3). La rampe tympanique comprend la périlymphe, riche en sodium (140 mmol/l) et pauvre en potassium (3 mmol/l)^{5,94,95}. Le canal cochléaire baigne les cellules sensorielles dans l'endolymphe, dont la composition se différencie de la périlymphe essentiellement par sa richesse en potassium (150 mmol/l) et sa pauvreté en sodium (1 mmol/l).

Les cellules ciliées sont composées d'une rangée de cellules ciliées internes (\pm 3500 cellules) et de trois rangées de cellules ciliées externes (\pm 20000 cellules). Les cellules ciliées internes font synapses avec les neurones primaires de la voie auditive (innervation afférente). Les cellules ciliées externes, ayant des propriétés contractiles et permettant la modulation du signal transmis, font synapses essentiellement avec les neurones issus de la voie efférente cochléaire. Entre les cellules ciliées internes et externes se situent des cellules de soutien appelées cellules piliers, constituant le tunnel de Corti. Elles sont intégrées dans un réseau d'autres cellules de soutien : cellules de Deiters, cellules de Hensen et cellules de Claudius. Les cellules ciliées sont des cellules polarisées, avec une partie apicale coiffée de stéréocils en contact avec la membrane tectoriale et une partie basale en contact avec des fibres nerveuses afférentes et efférentes quittant l'organe de Corti au travers de la membrane basilaire. Au dessus du canal cochléaire, et séparée par la membrane de Reissner, se trouve la rampe vestibulaire, composée de périlymphe comme la rampe tympanique. La strie vasculaire, intégrée dans la face latérale du canal cochléaire et composée d'un réseau capillaire important, comprend des cellules spécialisées dans le maintien de la composition ionique de l'endolymphe (Figure 3). Ces cellules, appelées cellules marginales, sécrètent le potassium de l'endolymphe au travers de deux transporteurs basolatéraux, la

pompe $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{ATPase}$ et le cotransport $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^-$, et d'un canal potassique apical (IsK/KvLQT1)⁹⁶.

Les vibrations sonores sont transmises à la périlymphe puis aux membranes basilaire et tectoriale, ce qui entraîne une déflexion des stéréocils des cellules ciliées. Cette déflexion des stéréocils contrôle l'ouverture de canaux ioniques sensibles au stimulus mécanique⁹⁷. Par exemple, au niveau des cellules ciliées internes, la flexion horizontale des stéréocils vers l'extérieur provoque une dépolarisation cellulaire, qui entraîne ensuite une augmentation de la décharge dans les fibres afférentes du nerf auditif. Les cellules ciliées internes sont organisées de manière tonotopique avec un encodage préférentiel des hautes fréquences (longueur d'onde courte) à la base de la cochlée et des basses fréquences à la partie apicale du limaçon⁹⁸. Ceci explique qu'une atteinte de la base de la cochlée, plus sensible aux agressions ototoxiques, entraînera une surdité prédominant pour les hautes fréquences⁹⁹.

Le ganglion spiral est une structure nerveuse située dans l'axe de la cochlée et comprenant les neurones auditifs. Les neurones de type I forment 90 à 95% de l'ensemble des neurones auditifs. Leur prolongement périphérique, myélinisé, vient se connecter à une cellule ciliée interne. En moyenne, une cellule ciliée interne forme des synapses avec 10 neurones de type I. Les neurones de type II, plus petits et non myélinisés, ont un prolongement périphérique qui se ramifie pour se connecter à plus de 10 cellules ciliées externes¹⁰⁰. Les neurones du ganglion spiral envoient des axones vers les noyaux cochléaires du tronc cérébral. Ces axones forment le nerf auditif et sont organisés de manière tonotopique pour encoder la fréquence, la durée et l'intensité des signaux transmis.

A partir des noyaux cochléaires, les axones des voies auditives primaires, issus des noyaux cochléaires ventral et dorsal, croisent la ligne médiane et établissent des synapses dans le noyau olivaire supérieur controlatéral. Les voies auditives primaires empruntent ensuite le lemniscus latéral pour atteindre le tubercule quadrijumeau inférieur, puis le corps genouillé interne bilatéralement et enfin le cortex auditif (circonvolution transverse de Heschl). La voie auditive primaire est évaluée par l'étude des potentiels évoqués du tronc cérébral, qui enregistre l'activité électrique générée par les différents relais le long de la voie auditive primaire (Figure 4). Les ondes évoquées dans les 10 premières secondes après stimulation auditive correspondent aux différents relais synaptiques. Ils nous ont permis d'étudier l'audition des animaux d'expérience. Il existe en outre un riche réseau de connexions bilatérales, distribuées dans le tronc cérébral, l'hypothalamus, le

thalamus et le cortex, qui assurent une projection bilatérale des informations auditives. Il existe également des voies descendantes issues du cortex auditif et du colliculus inférieur qui innervent les niveaux des voies auditives situés plus bas¹⁰¹.

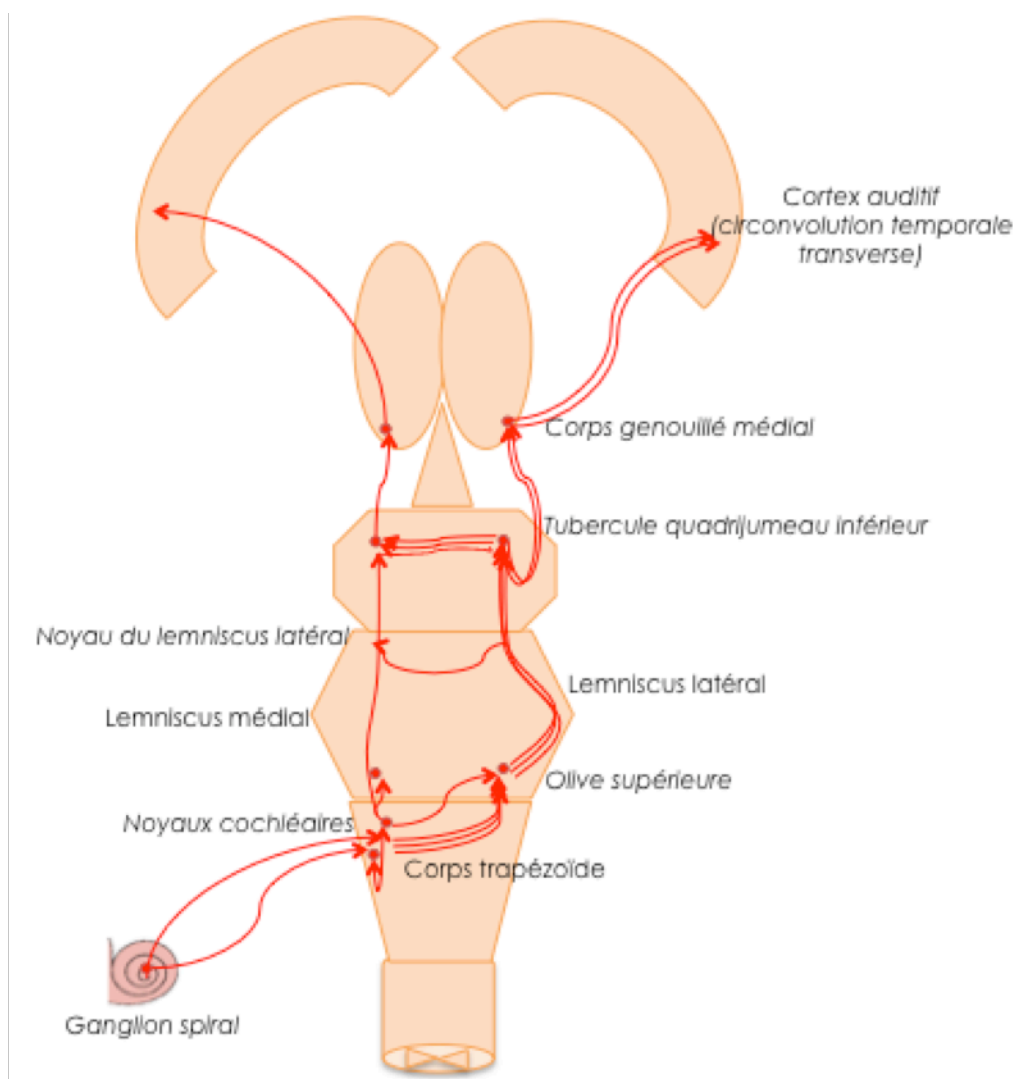


Figure 4:

Schématisation des voies auditives afférentes. Le premier relais, constitué par le ganglion spiral, établit des synapses avec les noyaux cochléaires du bulbe du tronc cérébral. A partir de ce 2^e relais, la plupart des axones croisent la ligne médiane et arrivent dans l'olive supérieure (3^e relais). Les axones empruntent alors le lemniscus latéral pour arriver aux tubercules quadrijumeaux inférieurs du mésencéphale (4^e relais). Ils projettent ensuite sur les corps genouillés internes ou médians du thalamus, 5^e et dernier relais avant le cortex cérébral (Cette figure est inspirée du cours de Neuroanatomie du Professeur Schoenen).

4. Les mécanismes d'ototoxicité

Les molécules ototoxiques ont pour cible principale les cellules ciliées de l'organe de Corti. Il existe un gradient de sensibilité baso-apical de ces cellules ciliées : la base est plus vulnérable que l'apex de la cochlée¹⁰². Il existe également une différence de sensibilité entre les cellules ciliées externes et internes : les cellules ciliées externes sont plus fragiles et sont les premières à montrer des signes de souffrance^{71,103}. Cette variation de vulnérabilité des cellules de l'oreille interne pourrait être due à un potentiel d'oxydo-réduction différent, impliquant dès lors une sensibilité différente aux radicaux libres¹⁰⁴.

La vulnérabilité des cellules cochléaires peut également être différente d'une espèce à l'autre. Les cellules ciliées aviaires ont la propriété de régénérer après une lésion^{105,106}. Même au sein des mammifères, la toxicité pharmacologique peut être différente en raison d'un métabolisme différent, d'une pharmacocinétique différente et d'une biodisponibilité différente¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. La première partie de notre travail se concentre sur l'étude de l'ototoxicité chez les mammifères et les différences de vulnérabilité. Ceci est particulièrement important en recherche lorsqu'il faut établir un modèle animal d'ototoxicité. Nous nous limiterons dans ce travail à la toxicité d'un aminoglycoside et du cisplatine.

4.1 L'ototoxicité des aminoglycosides

L'ototoxicité des aminoglycosides est liée à une cascade de réactions complexes et à la génération d'un excès de radicaux libres⁷². La pénétration des aminoglycosides dans l'oreille interne n'est pas exactement corrélée avec le taux sérique ou périlymphatique d'antibiotique, mais plutôt avec la dose totale administrée¹¹⁰ et la période de temps pendant laquelle le taux sérique est élevé¹¹¹. Les aminoglycosides pénètrent tous les types cellulaires de la cochlée¹¹², mais ceux-ci ont une vulnérabilité intrinsèque différente¹¹³.

Les aminoglycosides ont une structure polycationique et sont capables de lier tous les sites anioniques des membranes cellulaires. Ils sont donc attirés électriquement par la partie apicale, chargée négativement, des cellules ciliées, et sont endocytés¹¹⁴. La fixation de l'aminoglycoside à la membrane est probablement médiée par un récepteur de nature encore inconnue¹¹⁵. L'endocytose subséquente¹¹⁵ semble dépendante de la myosine VIIA^{116,117}, une protéine

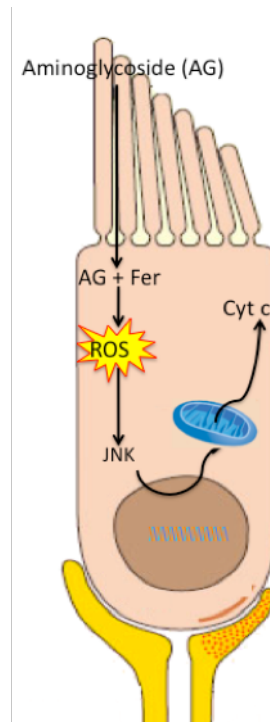


Figure 5:

Mécanismes d'ototoxicité des aminoglycosides dans les cellules ciliées externes et internes. Les aminoglycosides (AG) forment un complexe intracellulaire hautement réactif avec le fer, capable de générer des espèces libres de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species). Ils ont également un effet inhibiteur sur des enzymes anti-oxydantes (catalase) et un effet activateur sur des enzymes oxydantes (NO synthase, NADPH oxydase). L'accumulation des espèces réactives de l'oxygène aboutit à l'activation d'une famille de protéines kinases sensibles au stress comme les MAPK (Mitogen-activated protein kinases) et les JNK (c-Jun-N-terminal kinases). L'activité de ces enzymes est accompagnée d'une élévation du calcium intracellulaire et de la libération de cytochrome c (Cyt c) par la mitochondrie, menant à l'apoptose cellulaire.

impliquée dans le trafic membranaire.

Les aminoglycosides peuvent également pénétrer dans la cellule ciliée par les canaux ioniques sensibles au stimulus mécanique des stéréocils¹¹⁸.

A l'intérieur de la cellule ciliée, les modifications morphologiques précoces sont une augmentation des lysosomes et une prolifération du réticulum endoplasmique¹¹⁹. Les aminoglycosides s'accumulent dans des vésicules lysosomales jusqu'à rupture de ces dernières et se déversent dans le cytoplasme¹²⁰, où ils sont hautement toxiques. Les aminoglycosides forment des complexes avec le fer^{121,122}. Ces complexes catalysent la formation d'espèces réactives de l'oxygène¹²²⁻¹²⁴. En outre, les aminoglycosides inhibent l'activité de la catalase, une enzyme importante dans l'arsenal antioxydant des cellules. Ils activent la NO synthase inducible et promeuvent la production de peroxyde d'azote¹²⁵. L'activité de la NADPH oxydase, produisant l'anion réactif superoxyde, semble également favorisée par

l'administration d'aminoglycosides¹²⁶.

L'équipe de Hirose a directement mis en évidence l'accumulation de radicaux libres dans les cellules ciliées externes en 1997¹²⁷ et cette accumulation a été confirmée récemment¹²⁸. Le gradient baso-apical de vulnérabilité aux aminoglycosides a été démontré *in vivo* et *in vitro* et semble être corrélé à une différence de sensibilité aux radicaux libres¹⁰⁴. L'importance du fer et des radicaux libres dans l'ototoxicité des aminoglycosides est largement illustrée par les nombreuses études utilisant des chélateurs du fer et/ou des antioxydants comme otoprotecteurs (voir la section 5 sur l'otoprotection).

L'accumulation des espèces réactives de l'oxygène favorise l'activation de protéines G comme Ras et de GTPases comme Rac. Ceci aboutit à l'activation d'une famille de protéines kinases sensibles au stress comme les MAPK (Mitogen-activated protein kinases) et les JNK (c-Jun-N-terminal kinases). L'activité de ces enzymes est accompagnée d'une élévation du calcium intracellulaire et de la libération de cytochrome c par la mitochondrie, menant à l'apoptose^{72,129,130} (figure 5).

Les polyphosphoinositides membranaires sont un cas particulier. Ils constituent une part quantitativement mineure mais fonctionnellement très importante des membranes cellulaires, étant à l'origine du diacylglycerol, de l'inositol triphosphate et de l'acide arachidonique, lui-même précurseur des prostaglandines et prostacyclines. Ils ont une affinité extrêmement élevée pour les aminoglycosides et il existerait une corrélation entre le potentiel ototoxique des aminoglycosides et leur affinité pour les polyphosphoinositides membranaires¹³¹. L'acide arachidonique, en particulier, agit comme donneur d'électrons permettant la formation de radicaux libres^{123,132}. L'administration chronique d'aminoglycosides modifie les voies de signalisation des phosphoinositides dans les cellules ciliées au dépend des voies pro-survie phosphatidylinositol-trisphosphate/akt¹³³.

D'autres mécanismes de toxicité ont été décrits comme une excitotoxicité mimant celle du glutamate^{134,135}.

Plusieurs facteurs ont été mis en évidence pour expliquer la vulnérabilité intrinsèque des cellules ciliées externes aux aminoglycosides : leur faible potentiel d'oxydo-réduction¹⁰⁴, l'absence de translocation médiée par les radicaux libres du NFκB dans le noyau¹³⁶, cette dernière étant présente dans les cellules cochléaires résistantes aux aminoglycosides comme les cellules de soutien. L'aggravation des lésions des cellules ciliées externes par leur innervation efférente est sujette à débat¹³¹.

La perte des cellules ciliées externes est rapidement suivie par la perte des cellules ciliées internes, par les mêmes mécanismes. Après lésion des cellules ciliées sensorielles, on observe une rétraction axonale des neurones du ganglion spiral¹³⁷, puis une perte progressive des corps neuronaux^{138,139}. La mort neuronale provoquée par un traitement par aminoglycoside est liée à la perte du support neurotrophique provenant des cellules ciliées. La privation de facteurs neurotrophiques provoque une augmentation de la production de radicaux libres dans les cultures neuronales^{140,141} et en particulier dans les cultures de neurones du ganglion spiral¹⁴². L'accumulation de radicaux libres favorise les voies de signalisation intracellulaires pro-apoptotique au dépend des médiateurs de survie.

Contrairement à ce qui a été clairement établi chez les rongeurs, la mort neuronale consécutive à la perte des cellules ciliées reste un sujet de débat chez l'être humain¹⁴³⁻¹⁴⁵. Une toxicité neuronale directe des aminoglycosides chez l'humain est possible¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

La présentation clinique est une surdité neurosensorielle prédominant pour les hautes fréquences, qui peut être associée à un acouphène. Les otoémissions acoustiques mesurant la fonction des cellules ciliées externes sont altérées précocement^{148,149}. Les potentiels évoqués auditifs peuvent montrer une élévation du seuil auditif, une diminution de l'amplitude et une augmentation de latence de la réponse nerveuse¹⁵⁰. Une atteinte vestibulaire due aux aminoglycosides peut se manifester par une instabilité et, plus rarement, par un vertige accentué par les mouvements de tête^{110,131,151,152}.

4.2 L'ototoxicité du cisplatine

Le cisplatine ou cis-diaminedichloroplatine est composé d'un atome de platine, de deux atomes de chlore et de deux groupes aminés (Figure 6). Les composés thiol (contenant un groupe sulfhydryl SH) ont une haute affinité pour le cisplatine et ceux-ci ont été largement utilisés en otoprotection (voir la section 5 sur l'otoprotection). Dans un milieu pauvre en chlore (comme le milieu intracellulaire), une partie du cisplatine peut subir une transformation hydrolytique en un complexe hydraté (figure 6), considéré comme plus toxique que le cisplatine lui-même à cause de son instabilité et de sa capacité à former des radicaux libres^{71,153-155}.

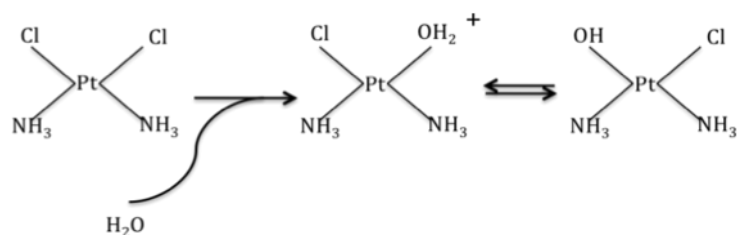


Figure 6:

Structure du cisplatine (à gauche), composé d'un atome de platine, de deux atomes de chlore et de 2 groupes aminés. A droite, hydrolyse du cisplatine en un complexe monohydraté, favorisée par un milieu pauvre en chlore (comme le milieu intracellulaire). La forme hydratée du cisplatine est considérée comme la clé de son action cytotoxique anti-néoplasique, mais aussi de son action néphrotoxique et ototoxique.

Plusieurs changements biochimiques suivent l'administration de cisplatine, dans plusieurs types cellulaires de la cochlée, en particulier dans les cellules ciliées externes, la strie vasculaire et les neurones du ganglion spiral⁷². La toxicité neuronale a lieu en parallèle avec les lésions de l'organe de Corti¹⁵⁶. On observe une diminution du glutathion intracellulaire et des enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et glutathion réductase). En même temps, il existe une augmentation des marqueurs de peroxydation des lipides (malondialdéhyde et aldéhyde-4-hydroxynonenal) intracellulaires^{71,72,157}. La NADPH oxydase de type 3 (NOX3), une NADPH oxydase exprimée spécifiquement dans l'oreille interne¹⁵⁸, voit son activité dramatiquement augmenter suite à un traitement par du cisplatine, produisant un excès d'anion superoxyde¹⁵⁹. Les défenses cellulaires sont rapidement dépassées avec l'épuisement du glutathion intracellulaire et des enzymes antioxydantes.

Il existe un parallélisme avec l'effet néphrotoxique du cisplatine. L'épithélium tubulaire rénal exprime l'enzyme NOX4, qui joue un rôle similaire dans les lésions rénales induites par le cisplatine¹⁶⁰. L'anion superoxyde joue un rôle très important dans les lésions des neurones auditifs, et sa neutralisation permet de protéger l'oreille interne¹⁶¹.

Un autre parallélisme avec les lésions de néphrotoxicité induites par le cisplatine est l'expression de la Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1), à la fois dans l'épithélium tubulaire rénal et dans les cellules ciliées cochléaires. KIM-1 semble jouer un rôle antioxydant dans ces deux tissus¹⁵⁹.

Le cisplatine induit également l'expression de la NO synthase inductible, responsable de la production de NO¹⁶². L'accumulation de NO et d'autres espèces réactives induit la libération du cytochrome c de la mitochondrie (figure 7) via

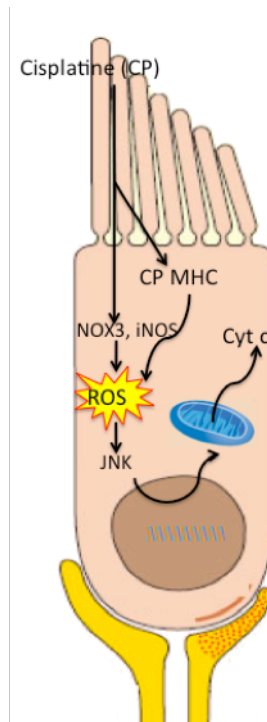


Figure 7:

Mécanismes d'ototoxicité du cisplatine dans les cellules ciliées externes et internes. Le cisplatine (CP) peut former un complexe monohydraté intracellulaire hautement réactif, capable de générer des espèces libres de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species). Il active des enzymes oxydantes comme la NADPH oxydase de type 3 (NOX3) et la NO synthase inductible (iNOS). L'accumulation des espèces réactives de l'oxygène aboutit à l'activation des JNK (c-Jun-N-terminal kinases). L'activité de ces enzymes est suivie d'une libération de cytochrome c (Cyt c) par la mitochondrie et de l'expression des caspases 3 et 9, menant à l'apoptose cellulaire.

l'activation de protéines de la famille de Bcl-2. L'activation subséquente des caspases 9 et 3 conduit ensuite la cellule à l'apoptose^{71,103}. Une étude récente a démontré que les espèces réactives de l'oxygène générées par le cisplatine favorisent l'activation du récepteur TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1), contribuant à une élévation du calcium intracellulaire et à l'apoptose des cellules exprimant ce récepteur, comme les cellules ciliées externes et les neurones du ganglion spiral¹⁶³.

Au niveau de la strie vasculaire, on observe un œdème et un gonflement des cellules marginales, puis un amincissement de la strie vasculaire¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Il existe également une augmentation de l'expression de la NO synthase inductible dans la strie vasculaire. Le NO généré réagit avec l'anion superoxyde pour former le radical hautement réactif peroxy-nitrite¹⁶⁵. L'apoptose est surtout observée dans les cellules marginales^{165,167,168} et est médiée par l'activation des caspase 3 et 9^{165,168}. Le transport du potassium n'est plus assuré et le potentiel endocochléaire diminue¹⁰³, comme après toute lésion de la strie vasculaire¹⁶⁹.

Chez l'être humain, des modifications histologiques au niveau de l'organe de Corti, du ganglion spiral et de la strie vasculaire, concordantes avec les études sur l'animal, ont été mises en évidence¹⁷⁰. Cliniquement, les plaintes les plus fréquentes sont des acouphènes, une hypoacousie pour les hautes fréquences se traduisant par des difficultés de compréhension en environnement bruyant et une difficulté à orienter un son. Les plaintes vestibulaires sont plus rares^{171,172}.

5. Les stratégies d'otoprotection

De nombreuses molécules ont déjà été testées pour protéger les cellules ciliées et/ou les neurones du ganglion spiral après une agression pharmacologique ou physique. Parmi celles-ci, les plus utilisées sont les facteurs trophiques et les antioxydants.

5.1 Les facteurs trophiques

Les facteurs trophiques agissent à de nombreux niveaux dans l'oreille interne : la prolifération, le développement, la polarité, l'homéostasie et la réponse aux dommages. L'utilisation pharmacologique des facteurs trophiques, dans un but préventif ou curatif, est donc une approche prometteuse. Leur demi-vie courte limite néanmoins leur efficacité.

5.1.1 Les facteurs trophiques et les cellules ciliées

Plusieurs facteurs trophiques ont été étudiés dans le développement et la réparation des cellules ciliées, car ils sont largement exprimés dans l'organe de Corti^{173,174}. Le TGF β 1 (Transforming Growth Factor β 1) et le GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor) appartiennent à la superfamille du TGF β . Le TGF β 1 permet la survie des cellules ciliées externes adultes en culture¹⁷³. Le GDNF a démontré une efficacité *in vitro* pour protéger les cellules ciliées contre la toxicité des aminoglycosides ou du cisplatine¹⁷⁵. *In vivo*, le GDNF prévient la perte des cellules ciliées provoquée par un aminoglycoside¹⁷⁵⁻¹⁷⁷, par un traumatisme sonore¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ ou par une ischémie cochléaire¹⁸¹. Son effet semble cependant délétère à haute concentration¹⁷⁸ et l'expression de récepteurs au GDNF n'a pas été mise en évidence dans l'organe de Corti¹⁸², ce qui laisse supposer un mécanisme d'action indirect¹⁸³. L'effet du GDNF ne se limite pas aux cellules ciliées, mais concerne également les neurones du ganglion spiral (voir section suivante).

Le basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF) appartient à la famille des FGFs, une famille de facteurs trophiques liant l'héparine. Les FGFs lient des récepteurs tyrosine-kinase de haute affinité, les FGF récepteurs (FGFRs). La liaison du ligand au récepteur induit la dimérisation puis l'auto-phosphorylation de ce dernier, permettant d'initier une cascade de signalisation intracellulaire. Les principales cascades potentiellement impliquées sont la voie Mitogen-activated protein kinase (MAPK), la voie des phosphatidylinositol-3 kinase/Akt, la voie de la phospholipase

C/protéine kinase C, et la voie Rac-cdc42-Rho. Ces voies de signalisation contrôlent la prolifération, la survie, la migration, l'adhésion cellulaire et l'expression de différents gènes^{184,185}. Après lésion d'une cochlée aviaire, qui a la propriété intéressante d'auto-réparation, on observe une augmentation de l'expression du basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF) et de son récepteur, permettant la réparation¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Le b-FGF a été utilisé avec efficacité chez les mammifères pour protéger les cellules ciliées dans des modèles de traumatisme sonore *in vitro*¹⁸⁹ et *in vivo*¹⁹⁰. Néanmoins, cet effet otoprotecteur n'est pas systématique¹⁹¹. En outre, une souris mutante n'exprimant pas de b-FGF n'est pas sourde¹⁹². Le rôle exact du b-FGF dans le développement et la réparation de l'oreille interne n'est donc pas encore tout à fait clair et semble varier entre les espèces. Dans la famille des FGFs, le a-FGF (acidic Fibroblast Growth Factor) est produit par les neurones du ganglion spiral et lie son récepteur (FGFR) dans l'organe de Corti^{193,194}. Parmi les FGFRs, le FGFR-3 est exprimé par les cellules de soutien de l'organe de Corti, ainsi que par les cellules ciliées externes dans certaines conditions^{193,194}. Le a-FGF permet de maintenir l'intégrité des cellules ciliées *in vitro*¹⁷³ et *in vivo* après un traumatisme sonore chez le rat¹⁹³, mais pas chez le cobaye¹⁹¹.

L'EGF (Epidermal Growth Factor) et le TGF α (Transforming Growth Factor α) sont des ligands de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) dans l'organe de Corti. Ils favorisent tous deux la survie des cellules ciliées *in vitro*¹⁹⁵⁻¹⁹⁷, mais cet effet n'est pas systématique pour le TGF α et pourrait dépendre de l'âge¹⁷³. Le TGF α et l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) *in vivo* permettent la survie des cellules ciliées vestibulaires après agression par un aminoglycoside¹⁹⁸. L'IGF-1 favorise par ailleurs la survie des cellules ciliées externes de l'organe de Corti *in vitro*¹⁷³.

L'érythropoïétine, une hormone glycoprotéique, est exprimée dans les cellules de soutien de l'organe de Corti, la strie vasculaire et le ligament spiral^{199,200}. Elle permet la survie des cellules ciliées internes et externes en culture après une lésion ischémique²⁰¹ ou une agression par un aminoglycoside²⁰².

Parmi les neurotrophines, la neurotrophine-3 (NT-3) permet de protéger les cellules ciliées externes *in vivo* chez le cobaye après un traumatisme sonore²⁰³. Par contre, le brain-derived neurotrophic factor (BDNF) n'a pas démontré d'effet pro-survie dans l'organe de Corti *in vitro*¹⁷³ ni *in vivo*²⁰³.

5.1.2 Les facteurs trophiques et les neurones auditifs

Au niveau des neurones du ganglion spiral, les neurotrophines, une famille de facteurs de croissance polypeptidiques, ont un rôle fondamental. Plus particulièrement, le brain-derived neurotrophic factor (BDNF) et la neurotrophine-3 (NT-3) permettent la survie des neurones du ganglion spiral en interagissant avec leurs récepteurs à haute affinité que sont respectivement les tyrosine kinase B (TrkB) et C (TrkC)²⁰⁴⁻²⁰⁷. La liaison extracellulaire du ligand induit la dimérisation, puis l'auto-phosphorylation du récepteur. La phosphorylation des sites tyrosine dans les régions juxtamembranaires et C-terminales induit la liaison de différentes protéines qui activent ensuite des cascades de signalisation : la voie Ras/MAPK et la voie phosphoinositide-3-kinase (PI3K/akt)¹. Ces cascades sont décrites dans la figure 8. Les neurotrophines jouent un rôle essentiel dans le développement de la cochlée et sa réponse face à une lésion. Leur fonction dépasse largement la prolifération et la survie cellulaire. Elles sont indispensables à la différenciation neuronale, l'expression de gènes, la guidance axonale, l'organisation du ganglion spiral et la synaptogenèse^{183,208,209}.

La plupart des neurones du ganglion spiral expriment les 2 récepteurs TrkB et TrkC²⁰⁸. Les neurotrophines sont exprimées par les cellules ciliées mais aussi par d'autres types cellulaires cochléaires, de manière dynamique en fonction du développement²¹⁰.

Le BDNF et la NT-3 ont été largement utilisés chez les rongeurs pour protéger les neurones du ganglion spiral suite à une agression sonore ou pharmacologique^{203,211-213}. Les souris mutantes n'exprimant pas les deux récepteurs ou les deux ligands perdent leurs fonctions vestibulaire et auditive^{214,215}. Les souris mutantes pour un récepteur ou une neurotrophine montrent des déficits plus spécifiques et permettent de distinguer la fonction du BDNF et de la NT-3 (revue par^{208,216}). Le gène *Brn-3c* régule l'expression du BDNF et de la NT-3, et sa mutation chez la souris entraîne une surdité²¹⁷. Outre le traitement par injection cochléaire de neurotrophines, la thérapie génique, par inoculation de virus surexprimant BDNF ou NT-3, permet d'assurer la survie neuronale après administration de molécules ototoxiques ou suite à la privation des neurones en facteurs trophiques (par exemple après la perte des cellules ciliées)²¹⁸. Malgré tous ces résultats concordants et encourageants, l'effet des neurotrophines après lésion de la cochlée semble limité par la diminution d'expression des récepteurs TrkB et TrkC²¹⁹.

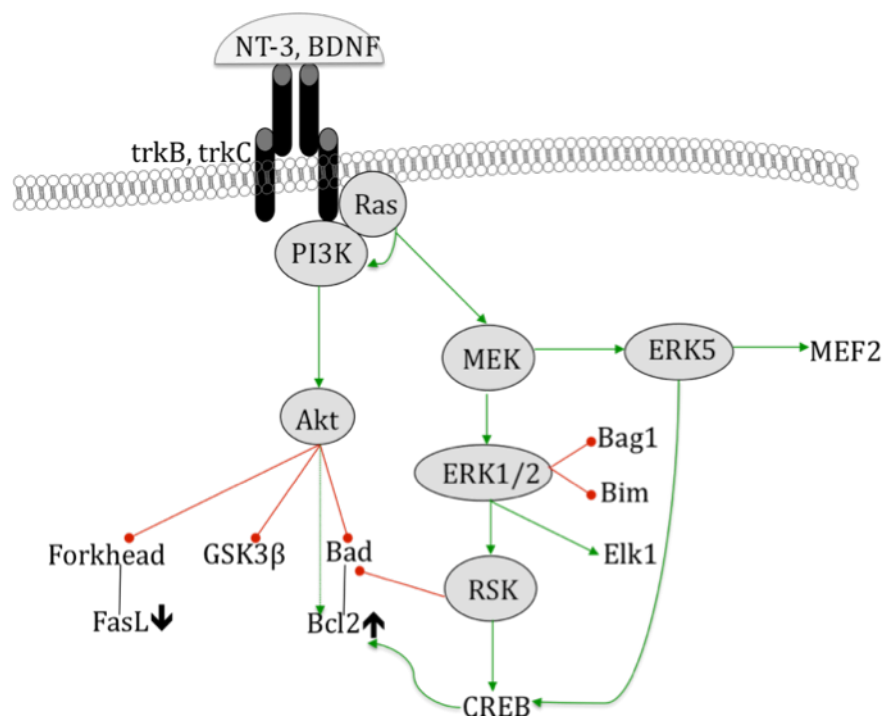


Figure 8 :

La liaison des neurotrophines au récepteur Trk stimule sa phosphorylation, ce qui recrute une série de protéines de signalisation. Ces protéines activent les voies PI3K et MEK/MAP kinase (Mitogen Extracellular-regulated Kinase/Mitogen Activated Protein kinase). Ces voies sont activées via la protéine Ras. Akt est le médiateur-clé de l'activité pro-survie de PI3K. Il inhibe par phosphorylation une série de facteurs pro-apoptotiques comme Bad, GSK3β (Glycogen Synthase kinase 3) et les facteurs de transcription de la famille Forkhead. La phosphorylation de Bad inhibe sa liaison à Bcl2, ce qui permet l'activation de ce dernier. L'inhibition des facteurs de transcription de la famille Forkhead permet la diminution de l'expression du Fas Ligand (FasL). La voie MAPK est initiée par l'activation de la protéine Ras, ce qui permet la phosphorylation de MEK par la protéine kinase Raf. MEK phosphoryle ensuite des MAP kinases : ERK 1, ERK2 et ERK5. Les ERK1/2 ont de nombreux substrats cellulaires dont la kinase ribosomale S6 (RSK). La RSK phosphoryle le facteur de transcription pro-survie CREB (C-AMP Response Element Binding). Dans certaines conditions d'activation, les ERK1/2 peuvent être transloquées dans le noyau où elles phosphorylent le facteur de transcription Elk-1 qui à son tour induit la transcription de gènes anti-apoptotiques. Elles peuvent également inhiber l'expression de Bag1 et Bim, des facteurs pro-apoptotiques. Les ERK5 ont deux substrats principaux : les facteurs de transcription MEF2, intervenant dans la survie neuronale, et la protéine CREB.

Le GDNF est également un facteur trophique important pour les neurones du ganglion spiral. Il agit sur de nombreuses populations neuronales du système nerveux central et périphérique^{220,221}. Il permet la survie des neurones cochléaires soumis à la toxicité du cisplatine¹⁷⁵. Il a démontré un effet protecteur chez les cobayes soumis à un traumatisme sonore¹⁸². L'inoculation dans la cochlée d'un vecteur adénoviral permettant l'expression de GDNF protège également les neurones contre la toxicité des aminoglycosides^{222,223}. L'effet protecteur n'est pas limité au type cellulaire neuronal, mais implique également les cellules ciliées (voir section précédente).

5.2 Les antioxydants

Les antioxydants sont une variété de molécules de petit poids moléculaire, agissant au niveau intra- ou extra- cellulaire comme piègeurs de radicaux libres. Les radicaux libres jouent un rôle prépondérant dans l'ototoxicité des aminoglycosides et du cisplatine (cfr. section 4).

Les cellules ciliées possèdent un potentiel d'oxydo-réduction qui leur permet de se défendre contre l'agression des radicaux libres. La diminution de ces défenses par l'infection, le stress, la malnutrition ou des toxiques augmente la vulnérabilité des cellules ciliées au stress oxydant¹²¹. A l'inverse, un effet protecteur a été démontré pour des antioxydants comme le glutathion^{224,225}, la vitamine E ou alpha-tocophérol²²⁶⁻²³¹, la D-méthionine^{232,233}, la L-acétylcystéine²³⁴⁻²³⁹, l'acide acétylsalicylique²⁴⁰⁻²⁴⁴, l'acide lipoïque²⁴⁵, les flavonoïdes végétaux²⁴⁶⁻²⁴⁸. La figure 9 reprend les principaux radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène agissant au niveau intracellulaire, ainsi que les principaux mécanismes de défense endogènes et exogènes utilisés en otoprotection. Les tableaux 1, 2 et 3 reprennent respectivement les antioxydants étudiés en otoprotection *in vivo* après administration d'un aminoglycoside (tableau 1), de dérivés du platine (tableau 2), ou suite à un traumatisme sonore (tableau 3).

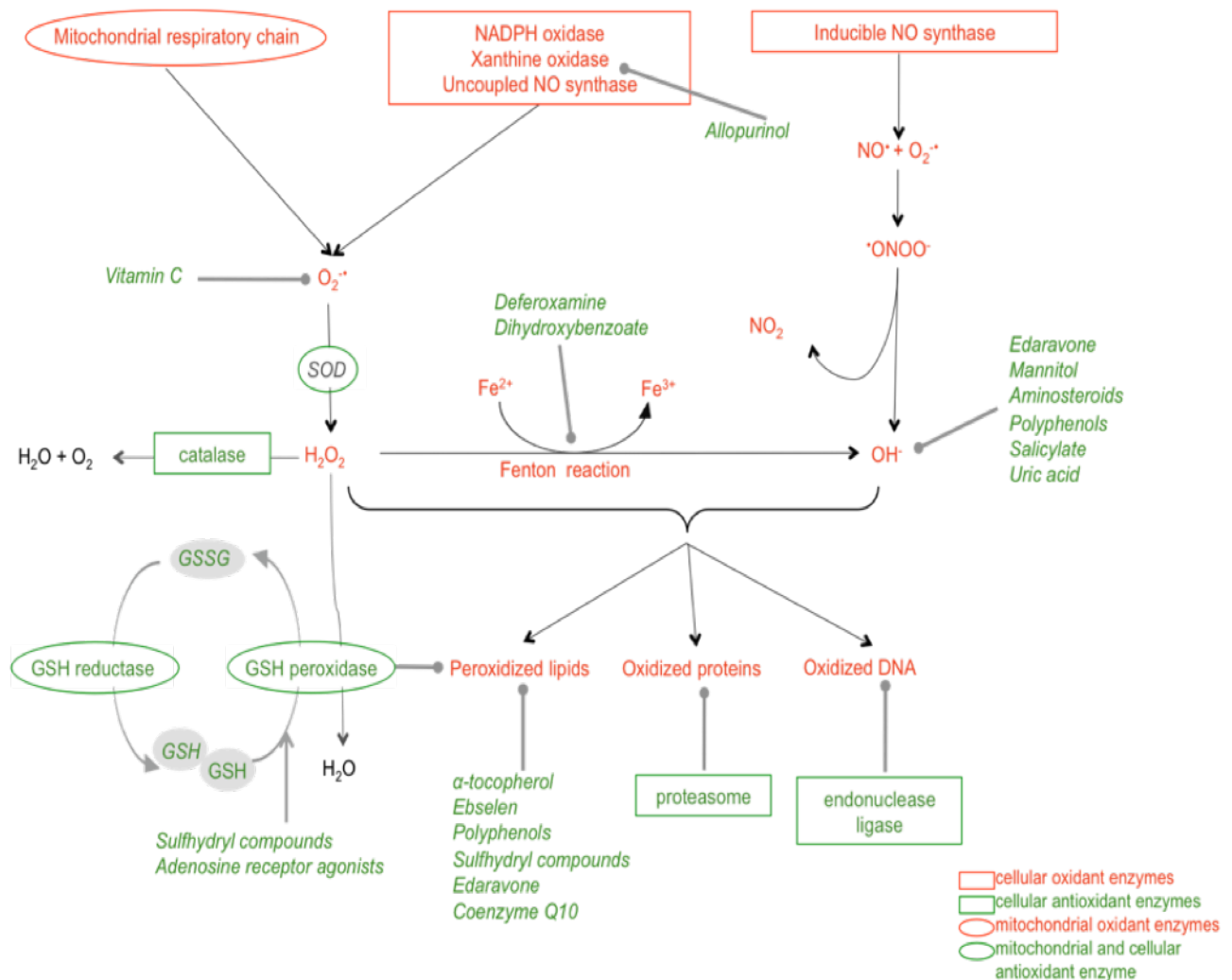


Figure 9: Voies principales de génération et de détoxification des espèces oxydantes dans la cochlée. Les enzymes et espèces oxydantes sont représentées en rouge. Les enzymes et substances antioxydantes sont représentées en vert. Après la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), l'enzyme superoxyde dismutase le convertit en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est ensuite converti en eau et oxygène par l'enzyme catalase. Les flèches grises émoussées représentent un effet inhibiteur protégeant du stress oxydant utilisé en otoprotection. L'oxydation du glutathion par la glutathion peroxydase permet le transfert d'électrons provenant des radicaux libres. Le stock de glutathion réduit (GSH) peut ensuite être reconstitué à partir du glutathion oxydé (GSSG) par l'enzyme glutathion réductase. Le NO produit par la NO synthase inducible peut réagir avec $O_2^{\bullet-}$ pour former l'anion peroxynitrite (ONOO⁻), hautement réactif. La production des espèces libres de l'oxygène génère des lipides peroxydés, des protéines oxydées et entraîne une oxydation de l'ADN.

Tableau 1 : Principaux antioxydants utilisés *in vivo* après administration d'un aminoglycoside

Type of antioxidant	Antioxidant molecule	Ototoxic drug	Animal	References	
Enzymes	adenoviral vectors for overexpression of catalase and SOD	kanamycin + ethacrynic acid	guinea pig	249	
Enzyme inhibitor	L-NAME (iNOs inhibitor)	gentamicin	guinea pig	250	
Vitamin	alpha tocopherol (vitamin E)	gentamicin	guinea pig	226,228,229	
Polyphenols	flavonoid fraction from <i>Drynaria fortunei</i>	gentamicin	guinea pig	246	
	ginkgo biloba extract	gentamicin	guinea pig	251	
	tanshinone	kanamycin	mouse	252	
Iron chelators	deferoxamine	gentamicin	guinea pig	253,254	
		neomycin	guinea pig	255	
	deferoxamine, dihydroxybenzoate	kamamycin, streptomycin	guinea pig	256	
	dihydroxybenzoate	gentamicin	guinea pig	150,254,257	
		kanamycin	mouse	258	
Sulfhydryl (thiol) compounds	N-acetyl-L-cysteine	gentamicin	human	238	
	amifostine	kanamycin	guinea pig	259	
	glutathione	gentamicin	guinea pig	224,260	
	lipoic acid	amikacin	guinea pig	245	
	D-methionine	amikacin	guinea pig	233	
		gentamicin	guinea pig	232	
		methylthiobenzoate, amifostine	gentamicin	guinea pig	254
		sodium thiosulfate	gentamicin	mouse	261
Other antioxidants	mannitol	gentamicin	guinea pig	150,254,256	
		kamamycin, streptomycin	guinea pig	256	
	ebselen	gentamicin	guinea pig	250	
	edaravone	tobramycin	rat	262	
	salicylate	gentamicin	guinea pig	244	
		gentamicin	human	263	

Les aminoglycosides forment un complexe avec le fer, avec pour conséquence la peroxydation des lipides de membrane des cellules ciliées^{122,123}. Leur toxicité est majorée par l'administration de fer^{264,265}. Les antioxydants de type chélateurs du fer ont été particulièrement utilisés après administration d'aminoglycosides^{253,255,258}. En outre, la plupart des antioxydants testés ont démontré une efficacité.

Tableau 2 : Principaux antioxydants utilisés *in vivo* après administration d'un dérivé du platine

Type of antioxidant	Antioxidant molecule	Ototoxic drug	Animal	References
Enzymes modulators	NOX3 SiRNA	cisplatin	rat	266
	Adenosine receptor agonists	cisplatin	chinchilla	267
	allopurinol (xanthine oxidase inhibitor)	cisplatin	rat	268
	aminoguanidine (iNOS inhibitor)	cisplatin	rat	269,270
	L-NAME (iNOS inhibitor)	cisplatin	guinea pig	271
Vitamins	alpha-tocopherol (vitamin E, trolox)	cisplatin	guinea pig	227,231,272
			rat	230
Polyphenols	CAPE (caffeic acid phenethyl ester)	cisplatin	rat	273
	ginkgo biloba extract	cisplatin	rat	274
Sulfhydryl (thiol) compounds	N-acetyl-L-cysteine	cisplatin	guinea pig	275
			rat	235
	amifostin	cisplatin	hamster	276
	diethyldithiocarbamate	cisplatin	rat	277,278
			hamster	279,280
	erdosteine	cisplatin	rat	281
	glutathione ester	cisplatin	rat	282
	lipoic acid	carboplatin	rat	283
			cisplatin	rat
	D-methionine	cisplatin	chinchilla	285
			guinea pig	286
			rat	233,287,288
	methylthiobenzoate	cisplatin	rat	278,289
	tiopronin	cisplatin	guinea pig	227,228
rat			290	
sodium thiosulfate	cisplatin	guinea pig	286,291-294	
		hamster	279,280	
		carboplatin	human	295
thiourea	cisplatin	guinea pig	296	
Others antioxidants	ebesen	cisplatin	rat	268,278
	salicylate	cisplatin	rat	242,243
			guinea pig	241
	lazaroids	cisplatin	guinea pig	297
	dexamethasone	cisplatin	guinea pig	298
			mouse	299
	etanercept (anti-TNF α)	cisplatin	mouse	300
			rat	301

Les composés thiol (contenant un groupe sulfhydryl SH) ont une haute affinité pour le cisplatine et sont capables de le piéger. Ces composés sont par exemple le thiosulfate de sodium ou la D-méthionine. Ils ont été largement utilisés en otoprotection (tableau 2).

Tableau 3 : antioxydants utilisés *in vivo* après traumatisme sonore

Type of antioxidant	Antioxidant molecule	Animal	References
Enzymes	SOD-PEG, CuZn-SOD	rat	302
		guinea pig	303
Enzymes modulators	adenosine receptor agonist (up-regulating antioxidant enzymes)	chinchilla	304,305
		rat	306
	allopurinol (xanthine oxidase inhibitor)	guinea pig	303,307
		rat	302
Vitamin	trolox	guinea pig	308
Iron chelators	deferoxamine	guinea pig	180
Sulfhydryl (thiol) compounds	N-acetyl-L-cysteine	rat	236
		guinea pig	309
		chinchilla	310
		guinea pig	311
	glutathione	guinea pig	233
	D-methionine	chinchillas	312
	oxothiazolidine carboxylate	guinea pig	313
	Other antioxidants	coenzyme Q10	guinea pig
mannitol		guinea pig	314,315
ebsele		guinea pig	316
salicylate		mouse	308,310
tempol		guinea pig	317
BN82270		guinea pig	318

5.3 La bryostatine 1

Les PKCs sont une famille de 12 enzymes sérine/thréonine kinases divisée en 3 sous-groupes : les PKCs conventionnelles (α , β I, β II, γ), les nouvelles PKCs (δ , ϵ , η , θ , μ) et les PKCs atypiques (ζ , λ , ι). Les sous-groupes diffèrent par leur dépendance aux cofacteurs et leur expression tissulaire. L'activation des PKCs conventionnelles est régulée par le calcium intracellulaire et le diacylglycérol (DAG). Les nouvelles PKCs sont indépendantes du calcium. Les PKCs atypiques sont indépendantes du calcium et du DAG, mais aussi de la plupart des activateurs des PKCs (esters de phorbol, bryostatine 1)³¹⁹⁻³²¹.

Une nouvelle voie de signalisation de survie et de neuritogenèse des neurones du ganglion spiral a été mise en évidence dans notre laboratoire³²². La protéine kinase C β 1 (PKC β 1) est spécifiquement exprimée dans les neurones du ganglion spiral et son activation permet de prévenir l'apoptose neuronale après privation en facteurs trophiques dans des cultures de ganglions spiraux de rats post-nataux³²². En effet, l'administration d'activateurs de PKC, les esters de phorbol et la bryostatine 1, permettent, *in vitro*, la survie neuronale et la neuritogenèse. Il a été démontré que ces effets dépendent de l'activation de PKC β 1³²².

Les esters de phorbols sont des inducteurs de tumeurs et leur utilisation en clinique n'est pas envisageable. Par contre, les nouveaux activateurs de PKC, dont le chef de file est la bryostatine 1, présentent un rapport bénéfice/risque élevé. Actuellement la bryostatine 1 est en phase II d'études cliniques comme agent anti-cancéreux³²³⁻³²⁵ et elle a démontré des effets neuroprotecteurs. En effet, la bryostatine 1 a déjà été utilisée *in vivo* dans plusieurs modèles animaux de maladie d'Alzheimer^{326,327}, d'ischémie cérébrale^{328,329}, d'évaluation de la mémoire^{330,331} et chez l'être humain, sur la stabilisation de l'humeur³³².

Suite à l'activation de la PKC β I, les cascades intracellulaires impliquant la PI3K et les MEK/ERK⁶ sont activées. L'identité des cibles cochléaires de ces kinases est à l'heure actuelle hypothétique. L'activation de la PI3K aboutit à la stimulation d'Akt (ou protéine kinase B) par sa phosphorylation^{333,334}. Comme décrit page 34, Akt inhibe par phosphorylation des substrats pro-apoptotiques, tels que Bad³³³, GSK3 β ³³⁵ ou les facteurs de transcription de la famille Forkhead classe O (FOXO), incluant FOXO1 (ou FKHR), FOXO3 (ou FKHL1) et FOXO4 (ou AFX)^{336,337}. De plus, Akt peut phosphoryler la protéine de liaison à l'élément de réponse sensible à l'AMP cyclique (CREB) induisant une augmentation de l'activité transcriptionnelle de CREB et notamment l'expression de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique³³⁸.

La voie MEK/ERK induit l'activation de ERK5 et ERK1/2 par phosphorylation³³⁹. Parmi les substrats de ERK1/2, la kinase ribosomale S6 (RSK) est principalement activée dans les cascades de survie neuronale. La phospho-RSK phosphoryle à son tour CREB. Les ERK1/2 participent à des voies de signalisation anti-apoptotiques (figure 8).

5.4 Le Y-27632 et l'inhibition de la voie Rho/ROCK

Les Rho (Ras Homologous) GTPases appartiennent à la superfamille des petites protéines Ras GTPases. Les plus connues sont RhoA, Rac1 et Cdc42. Elles existent sous deux formes distinctes : active, se liant au GTP, et inactive, se liant au GDP. Les Rho kinases (ROCK) sont des sérine/thréonine kinases constituant les principaux effecteurs des protéines Rho³⁴⁰⁻³⁴². La voie Rho/ROCK est ubiquitaire et joue un rôle crucial dans l'organisation de la polarité cellulaire, les interactions intercellulaires et entre les cellules et la matrice, le trafic membranaire, la régulation transcriptionnelle et la prolifération cellulaire^{7,9,343}.

La voie Rho/ROCK semble impliquée dans le fonctionnement de l'organe de Corti sain. Les Rho GTPases interviennent dans le développement des cellules ciliées et la morphologie des stéréocils³⁴⁴. La voie Rho/ROCK participe à la cascade de signalisation aboutissant à la régulation de l'électromotilité des cellules ciliées externes en réponse à une stimulation par l'acétylcholine^{345,346}. Cette régulation est cruciale pour la fonction d'amplificateur cochléaire jouée par les cellules ciliées externes. La mutation de protéines-cible des Rho GTPases provoque une surdité neurosensorielle. Par exemple, la mutation de la protéine Dia1 est responsable de la surdité neurosensorielle autosomale dominante non syndromique DFNA1³⁴⁷. La mutation de la myosine VII est responsable du syndrome de Usher de type 1B³⁴⁸⁻³⁵⁰.

La voie JNK est activée dans les cellules ciliées en souffrance en réponse à une agression par aminoglycoside^{129,130,351}. La voie Rho fait partie des activateurs de la voie JNK³⁵²⁻³⁵⁴. L'administration d'aminoglycosides *in vivo* est suivie par la formation de radicaux libres, l'activation des protéines Rho, et des modifications du cytosquelette, provoquant une dysfonction des cellules ciliées puis une mort cellulaire lorsque les mécanismes de défenses sont dépassés¹²⁶. La kanamycine (un aminoglycoside) augmente l'activité de Rac1 et augmente l'activité de la NADPH oxydase via Rac1¹²⁶. La kanamycine diminue l'activité de RhoA et l'expression de son effecteur p140mDia. Ces modifications surviennent bien avant la perte de fonction et la mort de cellules ciliées¹²⁶.

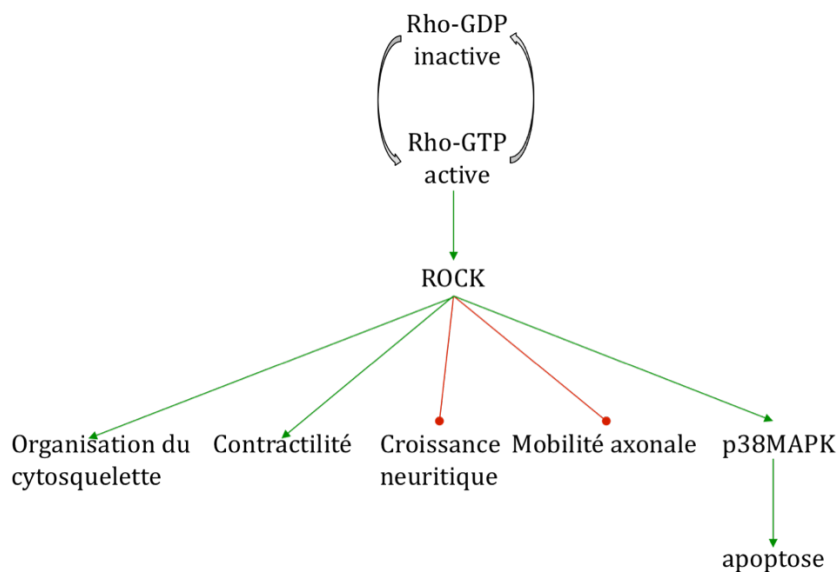


Figure 10 : la voie Rho/ROCK dans le système nerveux

L'inhibition de la voie Rho a démontré une protection des cellules ciliées postnatales de rat traitées par aminoglycoside en culture³⁵⁵. Cette protection n'a jamais été testée *in vivo*, ni sur des cellules ciliées matures.

Dans ce travail, nous nous concentrerons sur l'action de la voie Rho/ROCK au niveau du ganglion spiral. En effet, la voie Rho/ROCK est particulièrement importante au niveau du système nerveux. Les protéines Rho, qui sont d'importants régulateurs du cytosquelette d'actine, apparaissent également impliquées dans le développement neuronal, et plus particulièrement dans la régulation de la croissance axonale (guidage et élongation) et dendritique. La voie Rho/ROCK organise le cytosquelette, régule et guide la croissance axonale, la migration neuronale, la plasticité synaptique, le trafic membranaire et la neuritogenèse^{7,8,340,342,356,357}.

En particulier, elle semble participer à l'inhibition de la croissance neuritique après traumatisme du système nerveux central. L'inhibition des ROCK favorise la réparation axonale après traumatisme de la moelle épinière³⁵⁸⁻³⁶¹ ou du nerf optique³⁶²⁻³⁶⁵. L'inhibition des ROCK protège également des lésions cérébrales ischémiques³⁶⁶⁻³⁷⁴, diminue le dépôt de substance β -amyloïde responsable de la maladie d'Alzheimer³⁷⁵⁻³⁷⁹, et de protéine Huntingtine polyglutamique responsable de la maladie de Huntigton³⁸⁰⁻³⁸².

Les protéines Rho pourraient interagir avec la signalisation des neurotrophines. Par exemple, le NGF (nerve growth factor) inhiberait l'activité de RhoA et inversement,

l'activité de RhoA préviendrait la formation des neurites et la différenciation axonale en réponse au NGF^{10,383}. De la même manière, Rho inhibe la croissance neuritique en réponse aux neurotrophines BDNF et NT-3 dans les neurones trijéminaux¹⁰.

Enfin, la voie Rho/ROCK est impliquée dans le développement et l'apoptose neuronale. L'inhibition de la voie Rho/ROCK augmente la survie dans des cultures de neurones cérébelleux³⁸⁴, de neurones du ganglion rétinien³⁸⁵⁻³⁸⁷, ou de précurseurs neuronaux^{388,389}. Les inhibiteurs de la voie Rho/ROCK favorisent donc la survie neuronale et la neuritogenèse^{375,390}. Au niveau du ganglion spiral, la voie ROCK a peu été étudiée, mais il semble qu'elle puisse jouer un rôle essentiel dans la croissance axonale des neurones auditifs³⁹¹. L'étude des inhibiteurs des ROCK est actuellement en pleine expansion et montre un potentiel thérapeutique prometteur dans de multiples applications médicales^{392,393}.

6. Les objectifs de ce travail

Les objectifs de ce travail sont doubles. Dans la première partie, nous avons mis au point un modèle de surdité *in vivo* dans le but de reproduire l'ototoxicité pharmacologique induite observée en clinique, une cause de surdité de plus en plus fréquente chez l'homme. La toxicité pharmacologique peut varier d'une espèce à l'autre en raison de différences de métabolisme, de pharmacocinétique ou de biodisponibilité. Nous avons étudié l'ototoxicité chez 2 espèces de mammifères. Etablir un modèle fiable d'ototoxicité était la condition *sine qua non* pour démarrer des stratégies d'otoprotection.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons étudié deux stratégies d'otoprotection alternatives aux facteurs trophiques et aux antioxydants. Ces deux types de molécules ont déjà été largement étudiées dans la littérature et ont démontré une certaine efficacité, mais leur application en médecine humaine reste limitée. Nous avons administré la bryostatine 1 *in vivo* aux animaux rendus sourds par aminoglycoside. Nous avons comparé l'effet de la bryostatine 1 à celui des neurotrophines (contrôle positif) et à celui d'une solution saline de même composition ionique que la périlymphe (contrôle négatif). Le but de l'étude était de prévenir la dégénérescence neuronale secondaire à la destruction des cellules ciliées de l'organe de Corti par un aminoglycoside. Nous avons ensuite étudié l'action du facteur anti-ROCK Y-27632, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Comme pour la bryostatine 1, Nous avons comparé l'effet de Y-27632 à celui des neurotrophines (contrôle positif) et à celui d'une solution saline de même composition ionique que la périlymphe (contrôle négatif).

PREMIERE PARTIE
Modèles de surdité chez l'animal

1. Les médicaments ototoxiques : différence de sensibilité entre le Cobaye et la Souris

1.1 Introduction

Chez les mammifères, il existe de multiples étiologies de surdité^{394,395} et de nombreux modèles animaux ont été développés dans le but d'en comprendre la physiopathologie et de développer des stratégies d'otoprotection. Les modèles expérimentaux les plus utilisés sont l'ototoxicité pharmacologique ou le traumatisme sonore. Les médicaments ototoxiques les plus utilisés sont les aminoglycosides, les diurétiques de l'anse de Henlé et le cisplatine.

La kanamycine est un aminoglycoside dont l'accumulation dans l'oreille interne aboutit à l'apoptose des cellules ciliées externes puis internes comme nous l'avons décrit dans l'introduction^{131,396}. Les diurétiques de l'anse, comme le furosémide, agissent en modifiant les gradients ioniques entre la périlymphe et l'endolymphe. Ils induisent un œdème au niveau de l'épithélium de la strie vasculaire puis une perte de fonction des cellules ciliées^{397,398}. L'ototoxicité des aminoglycosides est potentialisée par l'administration de diurétiques de l'anse, notamment parce qu'ils favorisent une accumulation de l'antibiotique dans l'endolymphe. L'action ototoxique du cisplatine a lieu à la fois au niveau des cellules ciliées, des neurones du ganglion spiral, et de la strie vasculaire^{103,156}. La mort des cellules ciliées par apoptose est commune aux agressions par ces médicaments ototoxiques. La mort des cellules ciliées externes de la base de la cochlée, plus vulnérables, précède celle des cellules de l'apex de la cochlée. La mort des cellules ciliées externes précède celle des cellules ciliées internes. La mort neuronale peut survenir secondairement, par privation de facteurs trophiques sécrétés par les cellules ciliées^{72,103,110,160}.

Les modèles animaux ont joué un rôle crucial dans le développement de traitements otoprotecteurs. L'animal le plus utilisé est le cobaye^{72,399}. Nous avons voulu développer un modèle d'ototoxicité chez la souris, parce que cette espèce présente de nombreux avantages par rapport au cobaye. Avec une durée de gestation 3 fois plus courte et des portées plus importantes, la souris est un animal d'élevage plus facile et moins coûteux. Ceci rend les expérimentations plus flexibles parce qu'il est plus aisé d'obtenir un grand nombre d'animaux à un âge précis et à un moment donné. Etant plus compactes et moins exigeantes d'un point de vue alimentaire, leur hébergement est également plus simple. Par ailleurs, à cause de la fréquence des otites moyennes⁴⁰⁰, le cobaye est un animal fragile lorsqu'on s'intéresse à

l'audition. En outre, l'utilisation de la souris permet potentiellement des expériences sur des animaux transgéniques⁴⁰¹. La surdité implique de nombreux gènes et il existe chez l'homme des phénotypes de vulnérabilité différente aux médicaments ototoxiques⁴⁰²⁻⁴⁰⁵.

Dans le but de développer un modèle murin de surdité fiable et reproductible, nous avons étudié les effets de la kanamycine et du cisplatine sur la fonction auditive de souris jeunes adultes (âgées de 4 semaines) ou adultes (âgées de 9 semaines), et nous les avons comparés aux effets chez le cobaye. Nous avons étudié différentes doses d'ototoxique ainsi que l'association de kanamycine et de furosémide. Pour juger de la validité du modèle, nous avons choisi comme critère principal le seuil auditif mesuré par les potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral (primary endpoint). Nous avons ensuite analysé les effets histopathologiques (secondary endpoints).

1.2 Matériel et Méthodes

1.2.1 Procédures expérimentales

La kanamycine utilisée (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kanamycin sulphate, référence # K1377) est composée à plus de 95% de kanamycine A selon les données du fournisseur. Le furosémide (Lasix®) a été acheté chez Sanofi-Aventis (Diegem, Belgium) et le Cisplatine chez Sigma-Aldrich (Cis-Platinum (II) Diamine Dichloride, référence # P4394). En raison d'une inactivation possible du cisplatine par l'aluminium⁴⁰⁶, nous n'avons utilisé aucun matériel contenant de l'aluminium. Tous ces produits ont été mis en solution saline (NaCl 0,9%) pour les administrations systémiques, et dissous dans une solution de périlymphe artificielle (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM NaHCO₃, 11 mM glucose, pH 7.4) pour les administrations intra-cochléaires. Les animaux des groupes contrôles ont reçu une solution saline pour l'administration systémique, et une solution de périlymphe artificielle pour l'administration cochléaire.

Nous avons utilisé des souris mâles de la lignées BALB/c (en provenance de l'animalerie de notre université) et des cobayes mâles albinos Dunkin Hartley (Harlan, Horst, Hollande, référence HsdPoc:DH). Nous les avons hébergés dans l'animalerie centrale de notre université, avec un cycle nyctéméral de 24 heures et un accès libre à l'eau et à une nourriture adaptée. Toutes nos expériences ont été soumises à l'approbation du comité d'éthique animale de l'Université de Liège.

Les animaux ont été randomisés en 18 groupes détaillés dans le tableau 4. Au moment de l'administration du médicament ototoxique, les animaux étaient pesés et la dose administrée a été ajustée quotidiennement. Les souris étaient âgées de 4 et 9 semaines au début du traitement. Pour les souris de 9 semaines, nous avons voulu mesurer les effets d'une administration systémique sous-cutanée, les effets d'une association de furosémide et de kanamycine, et les effets d'une administration locale. Les cobayes étaient âgés de 9 semaines au début du traitement (4 groupes).

Tableau 4 : répartition des groupes d'animaux.

Espèce	Age	Traitement	Voie d'administration	n
Souris	4 semaines	Kanamycine "low dose" 700mg/kg, 2/j, 14 jours	intrapéritonéal	10
		Kanamycine "high dose" 1,4g/kg, 2/j, 14 jours	intrapéritonéal	20
		Cisplatine 2 mg/kg 1/j, 10 jours	intrapéritonéal	20
		Saline (NaCl 0,9%), 1/j, 10 jours	intrapéritonéal	10
	9 semaines	Kanamycine "low dose" 700mg/kg, 2/j, 14 jours	intrapéritonéal	12
			sous-cutané	5
		Kanamycine "high dose" 1,4g/j, 2/j, 14 jours	intrapéritonéal	12
			i.p. + i.v.	12
		Cisplatine 2 mg/kg 1/j, 10 jours	intrapéritonéal	10
		Cisplatine 2 mg/kg 1/j, 10 jours	sous-cutané	5
		Saline (NaCl 0,9%), 1/j, 10 jours	intrapéritonéal	10
		Kanamycine (5µl à la concentration de 100mg/mL)	intra-cochléaire	10
		Cisplatine (5µl à la concentration de 0,1mg/mL)	intra-cochléaire	10
		Périmyèle artificielle	intra-cochléaire	5
Cobaye	9 semaines	Kanamycine, 400mg/kg, 1/j, 7 jours	intrapéritonéal	15
		Cisplatine, 2mg/kg, 1/j, 10 jours	intrapéritonéal	16
		Saline, 1/j, 10 jours	intrapéritonéal	4
		Gentamicine (5µl à la concentration de 50mg/mL)	intracochléaire	5

Pour les administrations intra-cochléaires, nous avons utilisé l'abord de la fenêtre ronde^{407,408}. Les animaux étaient anesthésiés par 2% d'isoflurane dans un débit d'oxygène de 1L/minute. Ils étaient maintenus en décubitus latéral droit et la température corporelle était maintenue à 37°C par un tapis chauffant adapté. Le rocher gauche a été mis en évidence par un abord rétro-auriculaire, et la bulle tympanique dégagée. Nous avons ensuite trépané la bulle tympanique grâce à une foreuse à ultrasons (Honda ultrasonic minicutter, USW-335). Après mise en

évidence de la cochlée, nous avons inséré un cathéter de 26 gauge à travers la fenêtre ronde, connecté à sa partie proximale à un pousse-seringue Hamilton électrique (Eicom micro syringe pump ESP-32). Les molécules ototoxiques ou la périlymphe artificielle ont été perfusées avec un débit de 1 $\mu\text{L}/\text{minute}$ pendant 5 minutes. La cochlée a ensuite été fermée par une pièce de Gelfoam, et la bulle a été fermée par du cyanoacrylate (Colle Histoacryl, Deprophar, Bruxelles, Belgique) chez la souris, et par du ciment dentaire (Nextemp, Deprophar, Bruxelles, Belgique) chez le cobaye.

Les animaux ont été sacrifiés 35 jours après le début du traitement, à l'exception d'une série de souris et de cobayes sacrifiés après 15 jours dans le but d'observer l'apoptose sur les coupes histologiques. Nous avons utilisé pour cela 10 souris âgées de 4 semaines dans les groupes kanamycine intra-péritonéale « high dose » et cisplatine intra-péritonéal, et 8 cobayes des groupes kanamycine et cisplatine.

Dans chaque groupe (souris et cobayes), la survie a été analysée par la méthode de Kaplan–Meier^{409,410}. Nous avons comparé la survie entre les groupes par le test du log rank (GraphPad Prism 4.0 software, San Diego, CA, USA).

1.2.2 Critère de jugement principal : mesure de la fonction auditive

Nous avons mesuré la fonction auditive par l'étude des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral (ou ABR : Auditory Brainstem Responses). Une première mesure a été faite avant le début du traitement pour s'assurer d'une audition normale, puis une fois par semaine jusqu'au sacrifice. Les animaux ont été sédatisés par isoflurane 1,5% dans de l'oxygène à 1 L/min, un tapis chauffant électrique maintenant la température corporelle à 37°C. Les électrodes sous-cutanées ont été insérées au niveau du vertex (électrode active), de la mastoïde (électrode de référence), et de la patte arrière (terre). Des écouteurs insérés dans le conduit auditif externe produisaient les stimuli. Nous avons utilisé comme stimuli des clicks (impulsion sonore rectangulaire de 100 μs , distribuée entre 2 et 4 kHz) et des tons purs de 16kHz, fréquence la plus affectée par les ototoxiques^{235,243,276,411} (Intelligent Hearing System, Miami, FL, USA). Les stimuli pour chaque condition ont été présentés 1024 fois au rythme de 19.3 s⁻¹. Les stimuli ont été présentés de manière décroissante à partir de 100 dB SPL, par paliers de 10 dB, jusqu'à ce qu'aucune réponse ne soit détectable. Le seuil auditif (défini comme la plus faible intensité de stimulus capable d'évoquer une réponse), était ensuite précisé par variation du stimulus de 5 dB et vérifié à trois reprises dans toutes les conditions. La mesure hebdomadaire du seuil

auditif a été le critère de jugement principal de cette étude. Nous avons comparé la variation du seuil auditif entre les groupes au cours du temps en utilisant une analyse de variance à deux facteurs (traitement et temps) à l'aide du programme GraphPad prism (Graph Pad, San Diego, CA, USA). Nous avons ensuite réalisé les comparaisons post-hoc entre chaque groupe avec le test de Bonferroni. Les résultats étaient considérés comme statistiquement significatifs si la valeur de p calculée était inférieure à 0,05 à la fois pour l'ANOVA et les comparaison post-hoc (* si $P < 0,05$; ** si $P < 0,01$; *** si $P < 0,001$).

1.2.3 Critère de jugement secondaire : évaluation histologique

Après sacrifice des animaux, nous avons disséqué les os temporaux, et nous les avons fixés pendant 12 heures dans une solution de paraformaldéhyde à 4%, avant décalcification dans une solution d' EDTA (4% dans un tampon phosphate [PBS], pH = 6.4) pour une durée de 72 heures pour les os temporaux de souris ou de 2 semaines pour les os temporaux de cobayes. Les tissus ont ensuite été incubés 24 heures dans une solution de sucrose 20% dans le but de les cryoprotéger. Pour chaque animal ayant reçu un traitement systémique, l'oreille gauche a été dédiée aux coupes au cryostat pour la quantification neuronale (14 μ m d'épaisseur). L'oreille droite a été dédiée à l'observation des cellules ciliées par dissection, déroulement et montage des organes de Corti. Pour la dissection de l'oreille droite, nous avons enlevé la capsule otique sous contrôle d'un microscope opératoire. Nous avons ensuite détaché la cochlée et déroulé délicatement les différents tours de spire. Nous avons surtout analysé le tour basal de la cochlée, étant donné que c'est le plus sensible aux agressions ototoxiques^{104,131,412}.

Une série de coupes au cryostat ont été dédiées à la coloration au Bleu de Toluidine. Les coupes ont d'abord été incubées pendant 80 secondes dans un bain de Bleu de Toluidine (2 g/L dans un tampon Walpole [27 g/L acétate de sodium, 1.2% acide acétique dans de l'eau distillée, pH 7.4]), puis lavées par 2 bains successifs de 5 minutes de tampon Whalpole sans colorant. La coloration a ensuite été fixée dans une solution de 50 g/L de molybdate d'ammonium. Après rinçage par de l'eau distillée et séchage, les coupes ont été montées entre lame et lamelle (Safe Mount™, référence # 006 47520, Labonord, Templemars, France).

Pour l'immunofluorescence, les coupes de 14 μ m ou les organes de Corti *in toto* ont été perméabilisés par du PBS + 0.1% Triton X-100 pendant 5 minutes, puis incubés dans une solution de blocage (PBS + 0.3% Triton X-100 + 0.25% gélatine) pendant

30 minutes à température ambiante. Les échantillons ont ensuite été incubés avec un anticorps primaire spécifique des neurones dirigé contre la β III-tubuline (1/1000, clone TUJ1, Covance, Princeton, NJ, USA) ou avec un anticorps primaire dirigé contre la caspase-3 activée comme marqueur d'apoptose (1/1000, Promega, Madison, WI, USA). Après trois rinçage en PBS, les échantillons ont été incubés en présence d'un anticorps secondaire conjugué à la fluorescéine (1/500, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) et de la phalloïdine conjuguée à la tétraméthylrhodamine (1/1000, Sigma-Aldrich), pendant 1 heure à 37°C. Après trois rinçages au PBS, nous avons ajouté du TOPRO-3, une molécule présentant une haute affinité pour l'ADN afin de marquer les noyaux (1/2000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les échantillons ont ensuite été montés entre lame et lamelle avec le milieu de montage Vectashield hardset (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Les coupes et les organes de Corti ont été observés au microscope confocal FV1000 (Olympus, Aartselaar, Belgique). Pour les coupes du cryostat, nous avons observé les cellules ciliées, quantifié les neurones et objectivé la présence ou non de caspase-3 activée. Pour les organes de Corti, nous avons observé les cellules ciliées au tour basal de la cochlée.

Pour chaque animal, nous avons quantifié les neurones du ganglion spiral sur 4 coupes non-adjacentes passant par le milieu de la cochlée. Toutes les quantifications de neurones ont été effectuées en aveugle. Toutes les cellules immuno-positives pour la β III-tubuline ayant un noyau coloré au TOPRO-3 étaient considérées comme des neurones auditifs et ont été comptées à chaque tour de spire de la cochlée. Le nombre de neurones par mm^2 de ganglion spiral (moyenne \pm déviation standard) a été comparé entre chaque groupe (GraphPad Prism).

1.3 Résultats

1.3.1 Effet du traitement ototoxique sur la survie

Pour les traitements intracochléaires, la mortalité a été faible et essentiellement liée à l'anesthésie ou à des saignements per-opératoires. Nous ne pouvons pas attribuer cette mortalité au traitement ototoxique, raison pour laquelle nous ne l'avons pas quantifiée. Les injections sous-cutanées engendraient moins de mortalité que les injections intra-péritonéales. La figure 11 montre les courbes de survie de Kaplan-Meier pour nos groupes d'animaux recevant un traitement ototoxique intra-péritonéal et intraveineux. Chez les souris comme chez les cobayes, la survie était meilleure pour les animaux recevant une solution saline qu'un médicament ototoxique. Néanmoins, même pour des doses cumulatives élevées de molécules ototoxiques, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative entre les taux de survie des différents groupes (log rank $p > 0,05$). Nous avons donc utilisé dans cette étude des doses ototoxiques sublétales adéquates.

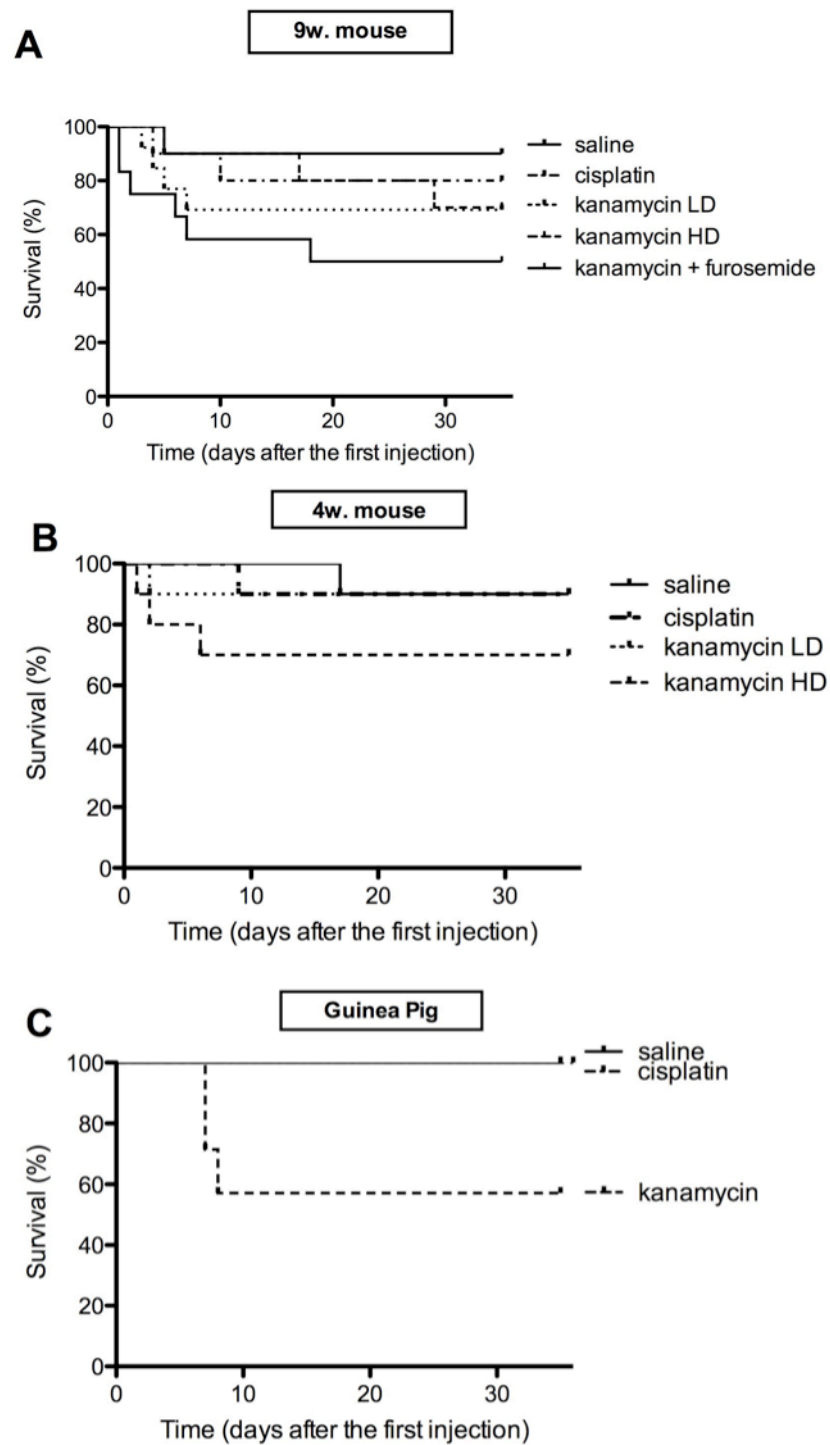


Figure 11 :

Courbes de survie de Kaplan-Meier pour les souris âgées de 9 semaines en début de traitement (**A**), pour les souris âgées de 4 semaines (**B**), et pour les cobayes (**C**) qui ont reçu des injections intrapéritonéales de solution saline (—), de cisplatine (---), de kanamycine « low dose » (LD, ----), de kanamycine « high dose » (HD, -.-.-), ou de kanamycine + furosémide (—). Aucune de ces courbes ne montrait de différence significative dans la survie par rapport aux autres (log rank $p = 0.3734$ pour les souris de 9 semaines, $p = 0.6841$ pour les souris de 4 semaines, $p = 0.6271$ pour les cobayes).

1.3.2 Effets du traitement ototoxique sur la fonction auditive

Nous avons mesuré les seuils auditifs toutes les semaines dans tous les groupes. Pour les animaux opérés (voie d'administration intra-cochléaire), les résultats ont été difficiles à interpréter en raison de la surdité de transmission liée à l'intervention. En effet, les animaux traités par solution de périlymphe artificielle (contrôle) ou par traitement ototoxique montraient une élévation importante des seuils auditifs après l'opération (Figure 12). Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les groupes contrôles et traités. Nous avons attribué cette surdité à un problème de transmission (présence de gelfoam, de colle cyanoacrylate et de ciment dans la caisse de l'oreille moyenne). L'analyse histologique chez les souris n'a pas montré de différence non plus entre les groupes. Aucune toxicité n'a été observée dans l'organe de Corti ni dans le ganglion spiral chez les souris traitées par ototoxique local. Nous avons par contre observé une perte de cellules ciliées et de neurones auditifs chez les cobayes traités par gentamicine locale. Néanmoins, en l'absence de groupe contrôle (administration locale de périlymphe artificielle), cette perte n'a pas été quantifiée. Nous ne détaillerons donc pas ces résultats.

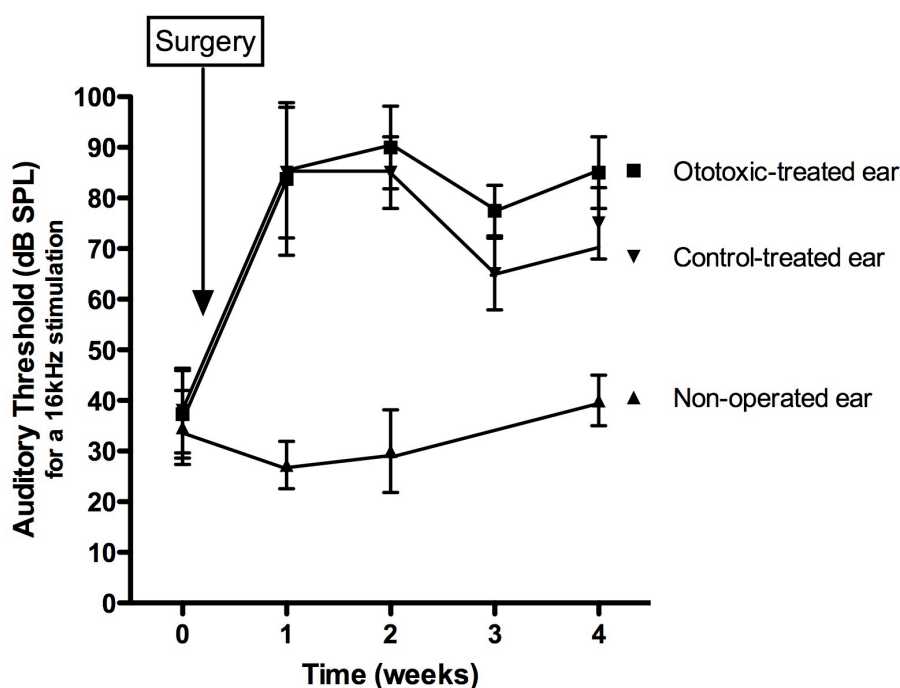


Figure 12 :

Seuils auditifs au cours du temps pour les oreilles des souris opérées et traitées par un toxique (■), opérées et traitées par la périlymphe artificielle (contrôle, ▼), et non opérées (▲). L'élévation de seuils auditifs semble plus attribuée à la chirurgie qu'au type de toxique utilisé.

Pour tous les groupes ayant reçu un traitement systémique, la mesure des seuils auditifs par ABR était beaucoup plus fiable. Les souris ou les cobayes traités par solution saline montraient des potentiels évoqués auditifs concordants avec les données de la littérature pour une audition normale chez ces animaux^{413,414} (Figures 13A et 13D). Aucun groupe de souris, quelque soit l'âge ou le traitement, n'a démontré d'élévation significative des seuils auditifs. Il n'y avait aucune différence entre les groupes, à aucun moment de l'expérience et pour tous les stimuli testés pour les souris de 4 et 9 semaines (Figures 13A-C et 13G). A l'inverse, les cobayes traités par molécule ototoxique, que ce soit le cisplatine ou l'aminoglycoside, ont montré une élévation importante des seuils auditifs, pour tous les stimuli testés (Figures 13E-F et 13H-I). Le seuil auditif moyen mesuré 5 semaines après le début du traitement était de 64.3 dB-SPL (\pm 15.9 dB) dans le groupe traité par kanamycine, de 61.9 dB-SPL (\pm 21.1 dB) dans le groupe traité par cisplatine, et de 31.2 dB-SPL (\pm 7.2 dB) dans le groupe contrôle. Le seuil auditif des cobayes traités par cisplatine s'élevait brutalement 2 semaines après le début du traitement (70.9 dB \pm 19.2 dB). En outre, nous avons observé la perte du réflexe de Preyer (battement du pavillon auditif observé à l'émission d'un son) deux semaines après le début de chaque traitement ototoxique (cisplatine ou kanamycine).

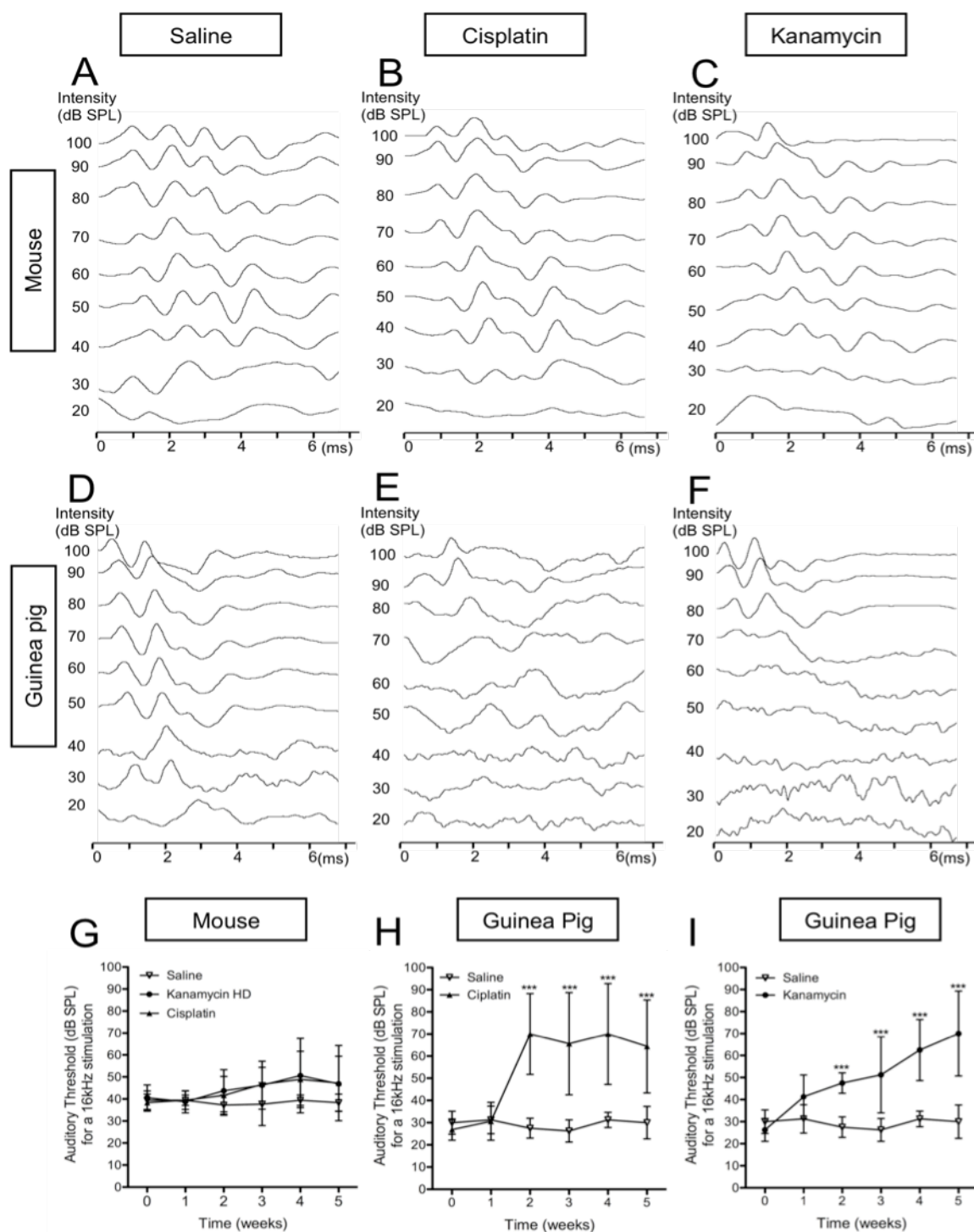


Figure 13 :

Exemples de potentiels auditifs du tronc cérébral (ABR) évoqués par des stimuli de type tons purs à la fréquence de 16 kHz, obtenus 5 semaines après le début du traitement, chez des souris âgées de 4 semaines (A-C) ou chez des cobayes (D-E). Il s'agit de courbes de 6 animaux, représentatives de leur groupe. Il n'y avait pas de différence mesurée par ABR chez les souris traitées par solution saline (A), cisplatine (B) ou de hautes doses de kanamycine (C). Par contre, chez les cobayes, le stimulus nécessaire pour évoquer une réponse du tronc cérébral était plus élevé après un traitement par cisplatine (E) ou par kanamycine (F), en comparaison au traitement par solution saline (D). G-I. Evolution des seuils auditifs moyens (\pm S.D) mesurés par ABR au cours du temps chez les souris de 4 semaines (G) et chez les cobayes traités par cisplatine (H) ou kanamycine (I). Chez les souris, les seuils auditifs ne varient pas au cours du temps dans le groupe traité par des hautes doses de kanamycine (cercle), cisplatine (triangle noir) ou solution saline (triangle inversé, G). Chez les cobayes, les animaux traités par cisplatine (triangle noir, H) ou kanamycine (cercle, I) montrent des seuils significativement plus élevés que les animaux traités par solution saline à partir de 2 semaines après le début du traitement.

1.3.3 Effets du traitement ototoxique sur l'organe de Corti

Chez les souris traitées par cisplatine, kanamycine ou kanamycine et furosémide, que ce soit au niveau systémique ou cochléaire, de même que chez les souris contrôles, les organes de Corti mis en évidence par la phalloïdine conjuguée à la rhodamine n'ont pas présenté d'anomalie. Nous avons objectivé trois rangées de cellules ciliées externes bien définies, en particulier à la base de la cochlée (Figures 14A-B pour les contrôles, figures 14D-E pour les souris traitées par cisplatine, et figure 14G-H pour les souris traitées par kanamycine). A l'inverse, les organes de Corti des cobayes traités par aminoglycoside ou par cisplatine montraient une perte importante de cellules ciliées externes, en particulier à la base de la cochlée (Figure 14F pour le cisplatine et Figure 14I pour la kanamycine).

Pour mettre en évidence l'apoptose dans l'organe de Corti, nous avons étudié la présence de caspase-3 activée, un marqueur précoce de l'apoptose cellulaire. Deux semaines après le début du traitement systémique par kanamycine ou par cisplatine, il n'y avait pas de marquage par l'anticorps anti-caspase-3 activée chez les souris (Figure 14J, toutes les images n'ont pas été montrées étant donné qu'il n'y avait pas de marquage). A l'inverse, nous avons mis en évidence la présence de caspase-3 activée chez les cobayes traités par kanamycine et par cisplatine dans l'organe de Corti, mais aussi dans le ligament spiral et la strie vasculaire (Figure 14K, immunomarquage en vert). Il n'y avait pas de marquage de la caspase-3 activée chez les cobayes traités par solution saline.

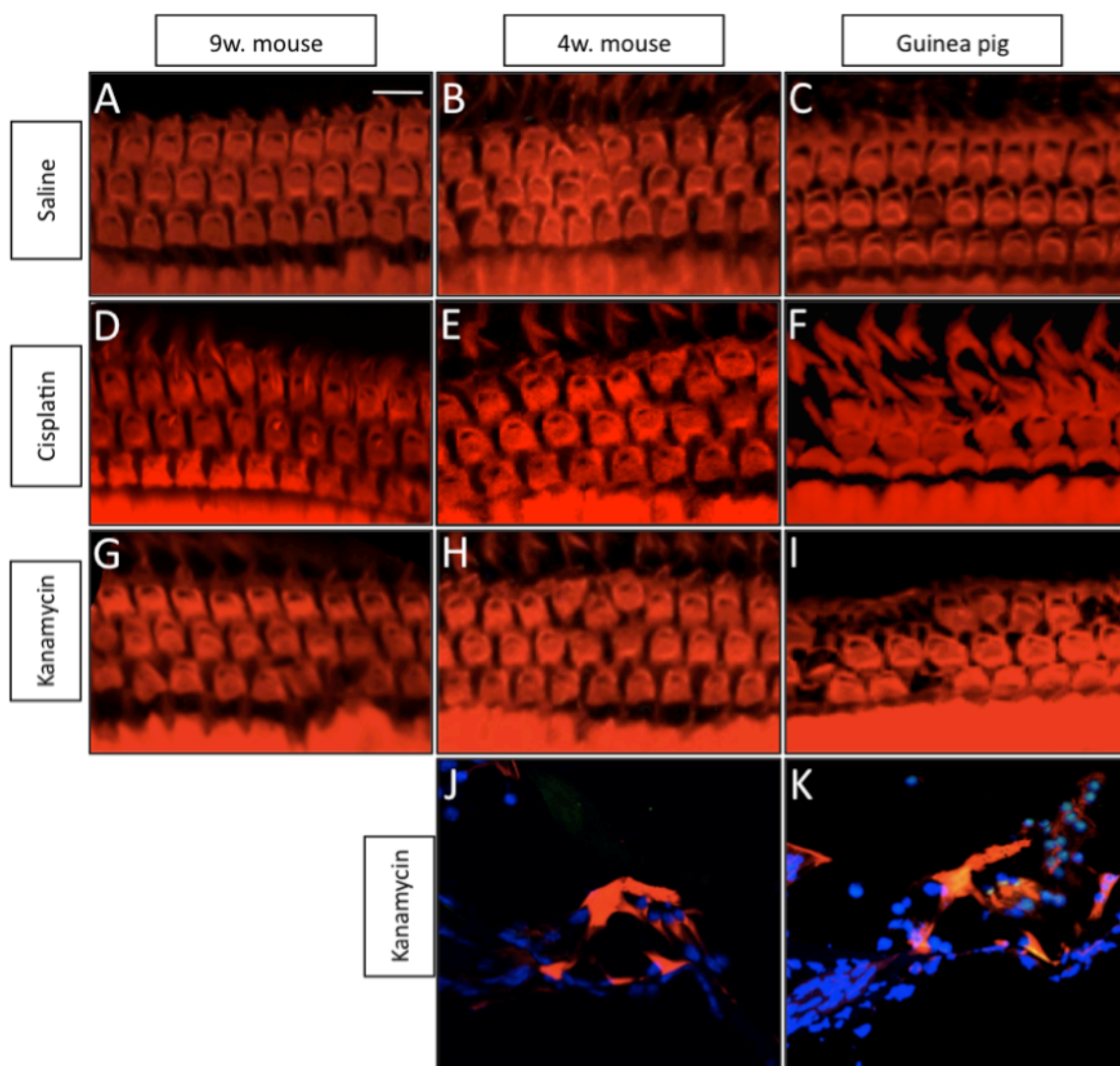


Figure 14 :

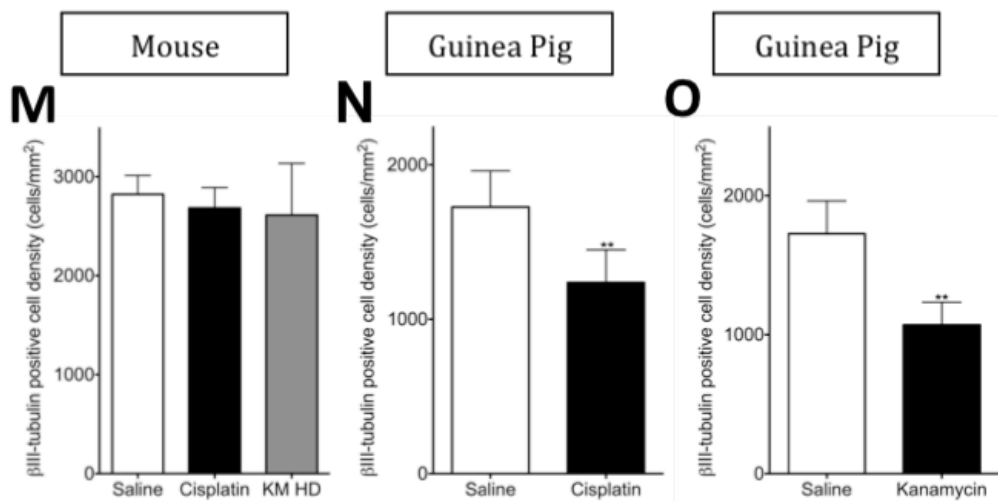
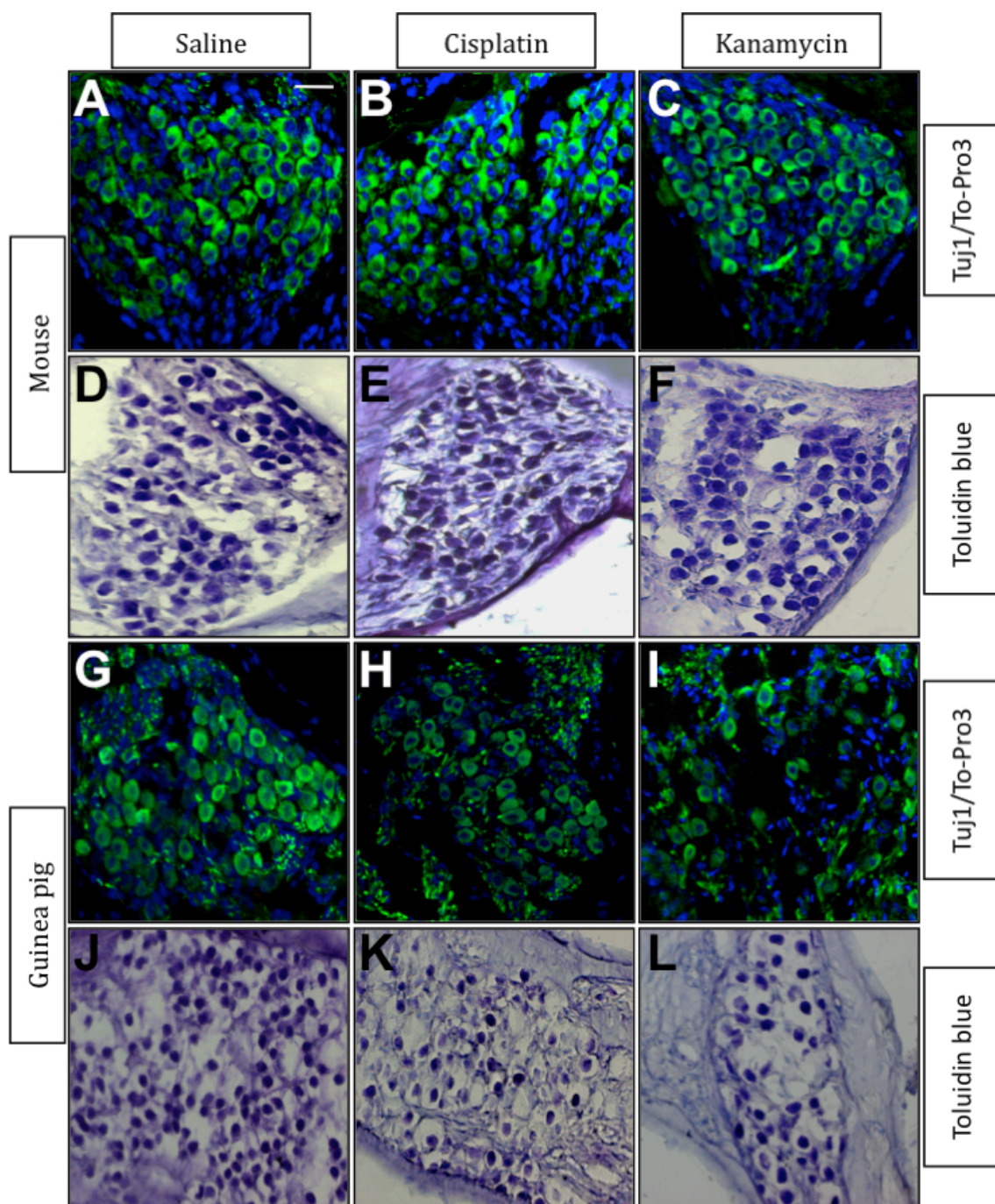
A-I. Cellules ciliées externes du tour basal de la cochlée dans les organes de Corti d'une souris de 9 semaines (A), une souris de 4 semaines (B), ou un cobaye (C) 35 jours après un traitement par solution saline. Les cellules ciliées externes de l'organe de Corti étaient intactes après un traitement par cisplatine ou kanamycine chez les souris de 9 semaines (respectivement D et G) et de 4 semaines (respectivement E et H). Par contre, nous avons observé une perte évidente des cellules ciliées externes après un traitement par cisplatine (F) ou kanamycine (I) chez les cobayes, principalement dans le tour basal de la cochlée. **J-K.** Immunomarquage de la caspase 3 activée (en vert), associée à la coloration nucléaire (TOPRO, en bleu) et la phalloïdine (en rouge) à la fin du traitement par kanamycine chez les souris (J) et les cobayes (K). La caspase 3 activée était présente dans l'organe de Corti, le ligament spiral et la strie vasculaire des cobayes. Barre d'échelle représentée dans l'image A = 10 μm pour les images A-I et 50 μm pour les images J-K.

1.3.4 Effets du traitement ototoxique sur les neurones du ganglion spiral

Pour objectiver une toxicité au niveau des neurones du ganglion spiral, nous avons utilisé une coloration au bleu de Toluidine et un immunomarquage de la β III-tubuline. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de lésion des neurones du ganglion spiral chez les souris, quel que soit leur âge, le type de traitement, la voie d'administration et la dose reçue (Figures 15A-F). Nous n'avons pas quantifié de différence de densité neuronale entre les groupes (Figure 15M). Nous ne montrons pas dans cette figure la quantification de tous les groupes, parce que ces données sont très répétitives (les ganglions spiraux sont similaires dans tous les groupes). A l'inverse, nous avons observé une réduction dramatique de la densité neuronale et une turgescence relative du cytoplasme neuronal chez les cobayes traités par kanamycine ou cisplatine en comparaison avec la densité neuronale dans les ganglions spiraux des cobayes traités par solution saline (Figures 15G-L). Cinq semaines après le début du traitement par cisplatine ou par kanamycine, nous avons objectivé une diminution significative de la densité neuronale dans le ganglion spiral ($P < 0.01$) par rapport à celle quantifiée dans le groupe traité par solution saline (Figures 15N-O). Par contre, nous n'avons pas observé de lésion au niveau des fibres afférentes neuronales de l'organe de Corti chez les cobayes traités par molécules ototoxiques (données non montrées sur la figure).

Figure 15 (page suivante) :

Coloration au bleu de Toluidine et immunomarquage de la β III-tubuline (en vert) avec coloration nucléaire au TOPRO-3 (en bleu) dans le ganglion spiral du premier tour de la cochlée sur des coupes passant par le milieu de la cochlée, 5 semaines après le début du traitement, chez des animaux représentatifs de chaque groupe parmi les souris de 4 semaines (**A-F**) et les cobayes (**G-L**). Aucune différence au niveau du ganglion spiral n'a été observée chez les souris ayant reçu une solution saline (**A, D**), du cisplatine (**B, E**) ou une dose élevée de kanamycine (**C, F**). Par contre, chez les cobayes, les neurones colorés au bleu de Toluidine et par l'immunomarquage de la β III-tubuline étaient plus nombreux dans les ganglions spiraux des animaux traités par solution saline (**G, J**) que dans ceux des animaux traités par cisplatine (**H, K**) ou kanamycine (**I, L**). Chez les cobayes traités par toxique, nous avons observé une diminution de la densité neuronale et une turgescence du cytoplasme. **M-O**. Quantification de la densité neuronale chez les souris de 4 semaines et les cobayes traités par cisplatine ou kanamycine. Pour chaque animal, nous avons considéré 4 coupes non contiguës passant par le milieu de la cochlée, et nous avons compté les toutes les cellules immunoréactives pour la β III-tubuline et comportant un noyau, considérées comme des neurones, en fonction de la surface du ganglion spiral. Chaque tour de cochlée a été quantifié séparément. La moyenne (\pm S.D) du nombre de neurones par mm^2 est représentée en histogramme. Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes de souris traitées par toxique ou par solution saline (**M**). Chez les cobayes, nous avons objectivé une diminution significative du nombre de neurones par mm^2 dans le ganglion spiral 5 semaines après le début du traitement par cisplatine (en noir, **N**) ou kanamycine (en noir, **O**). Barre d'échelle représentée dans la figure **A** = 50 μm pour les figures **A-L**.



1.4 Discussion

Notre étude a démontré des différences significatives de réponse aux médicaments ototoxiques entre les souris et les cobayes. Les souris BALB/c étaient clairement résistantes à des doses beaucoup plus élevées de kanamycine et de cisplatine que les cobayes. En outre, nous n'avons pas réussi à induire d'ototoxicité chez nos souris en associant des traitements ototoxiques (kanamycine et furosémide), ni en augmentant la dose de kanamycine, ni en administrant nos traitements directement dans l'oreille par voie chirurgicale.

Ces résultats sont discordants avec certaines données de la littérature (tableau 5). Cette discordance pourrait être expliquée par des différences environnementales ou génétiques entre les différentes souches de souris. Par exemple, le régime alimentaire pourrait jouer un rôle dans l'ototoxicité. La privation de nourriture, la carence en glutathion ou la supplémentation en fer amplifie la toxicité des aminoglycosides^{224, 264} ou du cisplatine²²⁵. En retour, une otoprotection significative peut être conférée par un régime alimentaire enrichi en antioxydants comme l' α -tocophérol²²⁶⁻²³⁰, la D-méthionine²³², ou la L-acétylcystéine^{234,235,238,239}. Nous avons utilisé dans nos expériences le régime alimentaire standardisé fourni par SAFE (Scientific Animal Food & Engineering, France). Ce régime contient 30 UI/Kg d' α -tocophérol, qui pourrait protéger en partie l'organe de Corti. Néanmoins, cette dose est 3 à 100 fois plus faible que les doses utilisées dans les études d'otoprotection^{226,227,229-231}. Les différences génétiques entre les lignées de souris pourraient également expliquer une différence de vulnérabilité aux molécules ototoxiques⁴¹⁵⁻⁴¹⁸. Une étude américaine a démontré en 2001 que la lignée BALB/c serait plus vulnérable aux aminoglycosides que d'autres lignées comme les souris C57bl ou CBA¹⁰⁸. Nous n'avons néanmoins pas réussi à mettre en évidence d'ototoxicité chez nos souris BALB/c. Une explication possible serait une différence entre les lignées européenne et américaine de souris BALB/c. Les souches américaine et européenne dérivent d'une même souche et ont été séparées en 1913, avec un risque potentiel de dérive génétique.

Tableau 5 : Données de la littérature concernant l'ototoxicité ou l'absence de toxicité *in vivo* chez la souris.

Animal		Toxic molecule		Type of toxicity	References
Strain	Age	Drug	Dose, rate, route	0: no ototoxicity reported A: hearing function impairment B: change in gene/protein expression C: hair cell loss D: spiral ganglion neurons loss	
C57	4w	gentamicin	200-300mg/kg/d, 28days, sc	0	108
			300mg/kg, 2/d, 14days, sc	0	
		kanamycin	700mg/kg/d, 6days, sc	0	
			1g/kg/d, 10days, sc	A (inconstant)	
C57, CBA, BALB		kanamycin	400-900mg/kg, 2/d, 15days, sc	A, C	
CBA	4w	kanamycin	700mg/kg, 2/d, 15days, sc	A, C	252
C57, CBA, BALB	4w	kanamycin	700mg/kg, 2/d, 14days, sc	B	419
CBA	4w	kanamycin	700mg/kg, 2/d, 14days, sc	B	420
CBA	4w	kanamycin	700mg/kg, 2/d, 7days, sc	B	136
albino Swiss	adult	gentamicin	5mg/kg/d, 30days, im	A, B	421
CBA	4w	kanamycin	700mg/kg, 2/d, 14days, sc	A, B, C	422
CBA	4w	kanamycin	700mg/kg, 2/d, 3-11days, sc	B	126
CBA	4w	kanamycin	700mg/kg, 2/d, 3-7days, sc	B	133
C57	4w	kanamycin	800mg/kg, 2/d, 15days, sc	A, C	423
CBA	2w	kanamycin	1g/kg, sc	B, C	424
	5w	+bumetamide	+0,05mg/kg, ip	0	
CBA	4w	kanamycin +furosemide	1g/kg, sc +400mg/kg, ip	B, C	425
C57	12w	kanamycin	100mg/kg, 2/d, 10days, ip	A	426
C57		gentamicin	120mg/kg, single dose, ip 120mg/kg/d, 19days, ip	A (transient)	427
C57		gentamicin	120mg/kg, single dose, ip 120mg/kg/d, 19days, ip	0	428
BALB x C57	4w	kanamycin	700mg/kg, 2/d, 14days, sc	A, C	429
C57 /BL6	2-5 m	kanamycin +furosemide	1g/kg, sc +400mg/kg, ip	C	430
CBA	22-26 m	cisplatin	2mg/kg/d, 12days, ip	D	431
BALB	7w	cisplatin	4mg/kg/d, 4days, ip	B	432
CBA	1-2 m	cisplatin	12mg/kg single dose, ip	0	299
			14-16mg/kg single dose, ip	A	

L'ototoxicité décrite peut concerner
A/ le niveau fonctionnel (perte auditive),
B/ le niveau moléculaire (expression de protéines ou de gènes),
ou le niveau cellulaire avec une perte de
C/ cellules ciliées ou
D/ neurones du ganglion spiral.

Abréviations :

C57: C57BL/6
BALB: BALB/c
CBA: CBA/J

W: week
M: month
D: day

Une première explication de la différence d'ototoxicité entre les cobayes et les souris pourrait résider dans le profil pharmacocinétique des aminoglycosides et du cisplatine. Les souris ont un métabolisme rapide et une clairance rénale élevée, impliquant que les taux plasmatiques des drogues ototoxiques restent bas^{433,434}. Toutes les études comparant plusieurs espèces mettent en évidence l'importance de la pharmacocinétique dans les différences observées après administration d'aminoglycoside⁴³⁵, de cisplatine⁴²⁸ ou d'autres agents ototoxiques⁴³⁶. L'excrétion urinaire est la voie principale d'élimination des dérivés du platine et des aminoglycosides chez toutes les espèces⁴³⁷⁻⁴³⁹. Chez les souris, la clairance plasmatique élevée permet une excrétion urinaire rapide^{433,434}, et donc une demi-vie sérique plus courte des molécules ototoxiques¹⁰⁸.

En outre, l'organe de Corti est protégé au sein des compartiments de l'oreille interne et il existe une barrière hémato-labyrinthique, qui protège les cellules ciliées de la même manière que la barrière hémato-encéphalique protège le système nerveux central. Cette barrière peut être grossièrement divisée en une barrière hémato-pérlabyrinthique et une barrière pérlabyrintho-endolabyrinthique, même si tous les aspects de cette division ne sont pas complètement élucidés (figure 16). La strie vasculaire est accessible directement à la circulation systémique. Cette dernière est l'obstacle le plus probable à l'entrée des drogues dans l'oreille interne. La toxicité du cisplatine et des aminoglycosides concerne plusieurs cibles cellulaires bien déterminées dans la cochlée^{72,440}, y compris les cellules marginales et intermédiaires de la strie vasculaire⁴⁴¹⁻⁴⁴³. Ces cellules, organisées en jonctions serrées, ont un rôle capital dans la formation de la barrière hémato-labyrinthique (figure 16)⁴⁴⁴. Une étude intéressante serait d'examiner si ces cellules partagent les mêmes propriétés chez les souris et les cobayes. Par exemple, l'expression des différentes claudines, protéines-clé des jonctions serrées et indispensables à l'audition⁴⁴⁵⁻⁴⁵⁰, n'a pas été comparée entre les différentes espèces^{451,452}. Une différence fonctionnelle à ce niveau pourrait encore expliquer la différence de vulnérabilité à l'agression ototoxique. La pénétration des aminoglycosides dans l'organe de Corti pourrait être moins importante chez la souris que chez le cobaye⁴⁵³. Cette différence pourrait être suffisante pour expliquer la différence d'ototoxicité dans les deux espèces¹⁶¹.

De surcroît, les médicaments ototoxiques affectent l'organisation des jonctions intercellulaires^{454,455}. Chez les cobayes, on observe une ré-organisation des jonctions serrées, des jonctions d'adhérence et du cytosquelette dans l'organe de Corti après application d'un aminoglycoside⁴⁵⁵. Chez la souris, la réorganisation des

jonction d'adhérence après lésion par un aminoglycoside semble différente⁴⁵⁶. Par exemple, les protéines qui établissent les contacts intercellulaires dans les jonctions d'adhérence sont les cadhérines, associées aux α - et β -caténines, qui elles-mêmes lient les filaments d'actine. On observe chez la souris une diminution de l'expression de l'E-cadhérine et de la β -caténine 24 heures après une agression ototoxique⁴⁵⁶. La transcription du gène de l'E-cadhérine est également inhibée par les facteurs de croissance⁴⁵⁷. Ces mêmes facteurs sont connus pour leur potentiel otoprotecteur⁴⁵⁸. La différence de vulnérabilité entre les espèces pourrait résider dans une différence d'expression ou de fonction d'une protéine de jonction. Néanmoins, les données concernant la composition protéique et la distribution des jonctions d'adhérence et des jonctions serrées dans l'organe de Corti, avant et après agression ototoxique, sont lacunaires.

Une dernière hypothèse serait une résistance intrinsèque plus élevée des cellules ciliées et des neurones du ganglion spiral chez la souris par rapport au cobaye. Plusieurs études ont démontré que le mécanisme commun de toxicité des aminoglycosides et du cisplatine est la génération d'espèces réactives de l'oxygène au sein de la cochlée^{72,103,110}. La machinerie enzymatique de détoxification des espèces libres de l'oxygène est différente d'une espèce de rongeur à l'autre⁴⁵⁹. Les souris BALB/c expriment largement l'enzyme superoxyde dismutase (SOD), qui bloque le stress oxydatif cellulaire⁴⁶⁰. La présence d'un taux élevé de SOD chez la souris BALB/c pourrait prévenir les effets ototoxiques des aminoglycosides et du cisplatine. Chez le cobaye par contre, il a été démontré que l'activité des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, enzymes du métabolisme du glutathion) diminue après administration d'un aminoglycoside⁴⁶¹. Cette hypothèse pourrait aussi être appliquée aux autres mécanismes de défense antioxydants. En réalité, les mécanismes d'ototoxicité et de défense cellulaire ne sont pas encore suffisamment compris pour pouvoir expliquer complètement les raisons d'une différence de vulnérabilité entre les espèces.

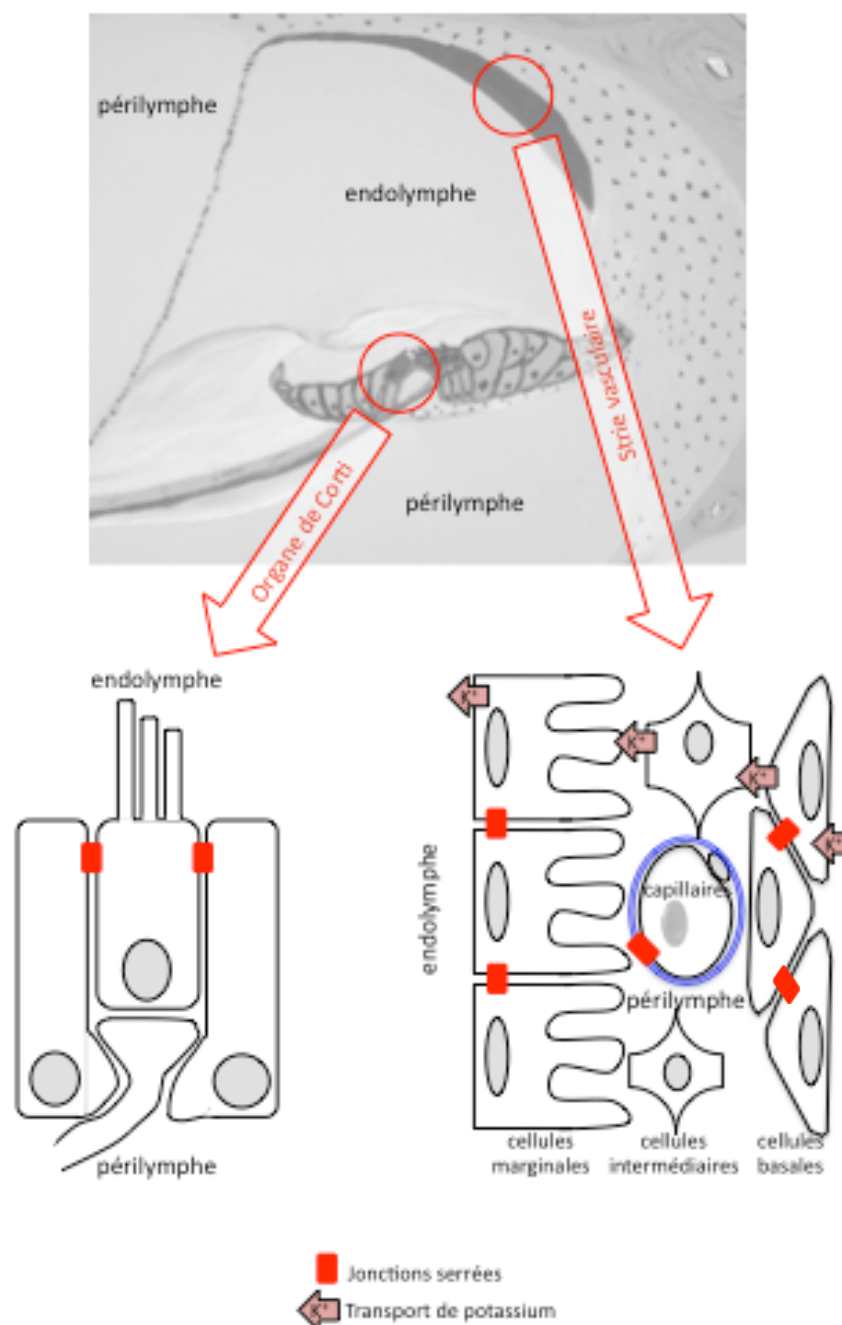


Figure 16 :

Représentation schématique de la barrière hémato-labyrinthique. Les cellules endothéliales des capillaires sanguins (en bleu) dans la cochlée sont caractérisées par des jonctions serrées (en rouge), qui participent à la formation de la barrière hémato-pérylimphatique. Dans les conditions physiologiques, cette barrière est imperméable aux macromolécules et de perméabilité variable aux petites molécules. La pérylimphe provient du plasma et sa composition est proche du plasma⁵. L'endolymphe est formée à partir de la pérylimphe après un enrichissement en potassium. Sa composition en potassium est proche de celle du milieu intracellulaire. Le potassium endolympatique entre dans les cellules ciliées lors de la transduction apicale et est relargué par les faces latérales des cellules ciliées. Il est transporté par les fibrocytes du ligament spiral puis par les cellules de la strie vasculaire pour finalement être excrété par les cellules marginales de la strie vasculaire dans l'endolymphe. Inversement, la strie vasculaire pompe le sodium hors de l'endolymphe. Des jonctions serrées, représentées en rouge, assurent l'étanchéité entre la pérylimphe et l'endolymphe (barrière pérylimpho-endolympatique).

1.5 Conclusion

Notre étude a démontré une nette différence dans la réponse de l'oreille interne à l'agression d'un médicament ototoxique. La résistance des souris à l'ototoxicité n'est pas attribuable à un problème technique, parce que les mêmes molécules administrées de la même manière aux cobayes ont induit une surdité et des lésions cellulaires claires, semblables à celles décrites dans la littérature. Notre étude démontre donc que le cobaye reste l'animal le plus fiable comme modèle de surdité neurosensorielle du mammifère adulte. Les modèles de surdité chez la souris adulte doivent être considérés avec prudence. En conséquence, dans la seconde partie de ce travail, nous avons abandonné l'idée d'utiliser un modèle murin de surdité chez l'adulte. Nous avons utilisé un modèle de surdité neurosensorielle déjà connu et démontré dans la littérature, utilisant une application locale de gentamicine chez le cobaye.

DEUXIEME PARTIE

**Protection de l'oreille interne par des agents pharmacologiques
exogènes**

1. La bryostatine 1

1.1 Introduction

La protection des neurones du ganglion spiral est primordiale pour préserver l'audition ou, à défaut, pour rendre une oreille sourde appareillable. Les facteurs trophiques ou facteurs de croissance sont indispensables à la survie, le développement, la polarité, l'homéostasie et la réponse aux agressions des neurones du ganglion spiral²⁰⁴⁻²⁰⁷. L'utilisation pharmacologique des facteurs trophiques, dans un but préventif ou curatif, est donc une approche prometteuse. Cependant, leur utilisation en clinique reste limitée pour plusieurs raisons : les facteurs trophiques sont des polypeptides à demi-vie très courte, sont sujets à une dégradation protéolytique rapide et peuvent induire des effets indésirables pléiotropes à cause de l'expression ubiquitaire de leurs récepteurs. La découverte de molécules non peptidiques qui possèdent des activités trophiques intrinsèques constituerait un progrès majeur.

Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont démontré que des activateurs de PKC, les esters de phorbol et la bryostatine 1, permettent, *in vitro*, la survie neuronale et la neuritogenèse. Ces effets dépendent de l'activation de PKC β 1³²².

L'activation des PKCs agit sur la maturation synaptique, la mémorisation, l'inhibition de l'apoptose neuronale, l'augmentation des neurotrophines et la diminution du taux de β -amyloïde, dont les agrégats sont en partie responsables de la maladie d'Alzheimer⁴⁶². Les activateurs de PKC sont néanmoins une arme à double tranchant. En effet, à partir d'une concentration donnée et pour un type cellulaire défini, l'action observée de ces activateurs est exactement l'inverse de l'action attendue. Ceci est dû à la nature biphasique de l'activation des PKCs. Les PKCs activées lient la membrane cellulaire, contrairement aux PKCs non activées, cytosoliques. Une fois liées à la membrane, les PKCs sont rapidement et préférentiellement dégradées. Ainsi, tous les activateurs de PKCs peuvent être à l'origine, à partir d'une certaine concentration, d'une régulation négative des PKCs^{462,463}.

La bryostatine 1 a un profil intéressant parce que son action de régulation négative de la PCK est moins importante que son effet activateur⁴⁶². Le but de notre étude était de valider *in vivo* les effets trophiques de cette nouvelle molécule sur les neurones du ganglion spiral observés *in vitro*. Nous avons utilisé un modèle animal

de dégénérescence neuronale secondaire à la destruction des cellules ciliées de l'organe de Corti par un aminoglycoside. Comme nous l'avons montré dans la première partie de ce travail, le modèle murin de surdité n'est pas un modèle suffisamment reproductible ni fiable¹⁰⁷. Nous avons donc utilisé des cobayes adultes, dont le modèle de surdité a été largement démontré dans la littérature. Nous avons choisi un mode d'administration prolongé d'une très faible quantité de bryostatine 1, afin de maintenir une activation prolongée de la PKC dans les neurones du ganglion spiral, tout en prévenant la régulation négative de la PKC. L'effet de la bryostatine 1 est maximal à la concentration de 1nM *in vitro*^{322,464}. *In vivo*, des études démontrent également une neuroprotection pour une dose faible de bryostatine 1 administrée pendant une période prolongée³²⁹.

Nous avons étudié les effets de la bryostatine 1 administrée localement pendant 1 mois après lésion cochléaire par un aminoglycoside chez des cobayes. Nous avons comparé l'effet de la bryostatine 1 à celui de la périlymphe artificielle (véhicule de la bryostatine, contrôle négatif) et à celui des neurotrophines associées à un inhibiteur de l'apoptose (contrôle positif). Nous avons utilisé le z-VAD-fmk, un inhibiteur de caspases, comme inhibiteur de l'apoptose. Les caspases sont les effecteurs de l'apoptose, et jouent un rôle fondamental dans la cochlée soumise à une agression⁴⁶⁵, en particulier une agression par un aminoglycoside⁴⁶⁶. La modulation de l'activité des caspases permet de modifier le destin cellulaire de manière expérimentale, et a déjà été utilisée dans des modèles d'otoprotection^{467,468}.

Le critère de jugement principal de cette étude était la densité neuronale du ganglion spiral après un mois de traitement. Nous avons également examiné les effets sur les neurites entre le ganglion spiral et l'organe de Corti.

1.2 Matériel et Méthode

1.2.1 Produits

L'aminoglycoside utilisé pour la lésion cochléaire était la gentamicine à la concentration de 50mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Gentamicin sulphate). La bryostatine 1, utilisée à la concentration de 1µM, était également fournie par Sigma-Aldrich. Nous avons également utilisé comme référence d'otoprotection les neurotrophines BDNF et NT-3 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), et l'inhibiteur de caspases z-VAD-fmk (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-O-methyl-fluoromethylketone, Promega, Madison, WI, USA). Les différents produits ont été mis en solution selon les instructions du fournisseur, puis dissous pour atteindre leur

concentration finale dans une solution de périlymphe artificielle (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM NaHCO₃, 11 mM glucose, pH 7.4). Pour le groupe contrôle négatif, seule la périlymphe artificielle a été administrée après l'aminoglycoside.

1.2.2 Animaux

Nous avons utilisé 21 cobayes mâles adultes albinos Dunkin Hartley (fournis par Harlan, Horst, The Netherlands, référence HsdPoc:DH). Nous les avons hébergés dans l'animalerie centrale de notre université, avec un cycle nyctéméral de 24 heures et un accès libre à l'eau et à une nourriture adaptée. Toutes nos expériences ont été soumises à l'approbation du comité d'éthique animale de l'Université de Liège.

1.2.3 Procédure chirurgicale et traitements

Les animaux ont été répartis de manière randomisée en 3 groupes. Pour chaque animal, seule l'oreille gauche a été opérée, l'oreille droite étant utilisée comme contrôle (oreille non opérée, non traitée). L'induction de l'anesthésie a été réalisée grâce à un mélange d'oxygène N25 (96%) et d'isoflurane (4%). Après induction, l'anesthésie a été maintenue tout au long de la procédure opératoire par un mélange d'oxygène N25 (98% à 98,5%) et d'isoflurane (1,5% à 2%) au débit de 1 L/minute. Deux animaux sont morts dans l'induction de l'anesthésie et n'ont été ni randomisés dans un groupe, ni pris en compte dans cette étude. L'ensemble de la procédure s'opérait dans des conditions aseptiques (masque, gants, désinfection, champs stériles).

L'abord de la cochlée était similaire à celui de notre étude sur l'ototoxicité (cfr. Première Partie, page 48). Ensuite, à la place d'une ouverture de la fenêtre ronde, nous avons réalisé une trépanation du promontoire. Après mise en évidence du promontoire, une ouverture a été réalisée à la base de la cochlée à l'aide d'une aiguille de 26 gauge. Nous avons inséré ensuite un cathéter, connecté à sa partie proximale à un pousse-seringue Hamilton électrique (Eicom micro syringe pump ESP-32). Ce montage permettait d'administrer dans l'oreille gauche de chaque cobaye 25µl de solution de gentamicine en 5 minutes (débit de 5µl/minute). Ensuite, nous avons inséré dans le même orifice cochléaire un cathéter relié à une mini-pompe osmotique (Mouse Jugular Catheter adjustable length 7701, et Osmotic Minipump Alzet 2004 0,25 µl/h-28days, Alzet, Cupertino, CA, USA). L'ensemble du

montage a été fixé au niveau de la cochlée par une colle cyanoacrylate (Histoacryl, Deprophar, Bruxelles, Belgique), et au niveau de la bulle tympanique par du ciment dentaire (Nextemp, Deprophar, Bruxelles, Belgique), La mini-pompe osmotique a été insérée dans le tissu sous-cutané, entre les deux omoplates. La cicatrice a ensuite été suturée en deux plans.

Selon les groupes, les mini-pompes osmotiques étaient remplies par les produits suivants en solution de périlymphe artificielle :

- Groupe expérimental : Bryostatine 1 (200 μ l à la concentration de 1 μ M ; n=10)
- Contrôle positif : BDNF, NT-3 et z-VAD-fmk (200 μ l aux concentrations respectives de 20ng/ml, 20ng/ml et 20 μ M ; n=6)
- Contrôle négatif : Périlymphe artificielle intra-cochléaire (200 μ l ; n=5)

Ces pompes osmotiques sont conçues pour délivrer 200 μ l de solution de manière continue en 28 jours, c'est-à-dire avec un débit de 0,25 μ l/heure.

1.2.4 Préparation des tissus

Après sacrifice des animaux, nous avons disséqué les os temporaux et nous les avons fixés durant une nuit dans une solution de paraformaldehyde à 4%, avant décalcification dans une solution d' EDTA (4% dans un tampon phosphate (PBS), pH = 6.4) pour une durée de 2 semaines. Les tissus ont ensuite été incubés 24 heures dans une solution de sucrose 20% dans un but de cryoprotection. Ils ont enfin été congelés pour pouvoir être coupés au cryostat en coupes de 14 μ m d'épaisseur.

1.2.5 Coloration au Bleu de Toluidine

Une série de coupes au cryostat ont été dédiées à la coloration au Bleu de Toluidine. Les coupes ont d'abord été incubées pendant 80 secondes dans un bain de Bleu de Toluidine (2 g/L dans un tampon Walpole [27 g/L acétate de sodium, 1.2% acide acétique, pH 7.4]), puis lavées par 2 bains successifs de 5 minutes de tampon Walpole sans colorant. La coloration a ensuite été fixée dans une solution de 50 g/L de molybdate d'ammonium. Après rinçage par de l'eau distillée et séchage, les coupes ont été montées entre lame et lamelle (Safe MountTM, référence # 006 47520, Labonord, Templemars, France).

1.2.6 Immunofluorescence

Notre technique d'immunofluorescence a été écrite dans la première partie de ce travail (cfr. Première Partie, page 50). Les coupes ont été observées avec notre microscope confocal Olympus FV1000. Notre critère de jugement principal était la densité neuronale du ganglion spiral après un mois de traitement. Nous avons également examiné les effets sur les neurites entre le ganglion spiral et l'organe de Corti.

1.2.7 Quantification des neurones du ganglion spiral

Notre technique de quantification des neurones du ganglion spiral a également été décrite dans la première partie de ce travail (comptage des cellules immuno-positives pour la β III-tubuline ayant un noyau coloré au TOPRO-3 sur 4 coupes non adjacentes passant par le milieu de la cochlée). Le nombre de neurones par mm^2 de ganglion spiral (moyenne \pm déviation standard) a été comparé entre chaque groupe en utilisant une ANOVA à 1 facteur (programme GraphPad Prism, San Diego, CA, USA).

1.3 Résultats

1.3.1 Validation de l'ototoxicité et de la perfusion cochléaire

Les cochlées gauches des animaux des trois groupes ont reçu de la gentamicine avant la perfusion par mini-pompe osmotique de la molécule potentiellement protectrice. Les cochlées droites n'ont pas été opérées et n'ont reçu aucun traitement. Après sacrifice, le positionnement correct du cathéter de perfusion cochléaire gauche a été vérifié. Lorsque ce positionnement n'était pas correct, l'animal a été exclu de l'étude. Ceci a été le cas d'un cobaye du groupe contrôle positif (BDNF, NT-3 et z-VAD-fmk). Après réalisation des coupes histologiques, le point d'insertion du cathéter était bien visible à faible grossissement (20x ; figure 17). Au fort grossissement (200x), nous avons observé une perte des cellules ciliées des oreilles opérées dans tous les groupes, témoignant d'une agression réelle par la gentamicine. Les oreilles non opérées avaient un aspect normal (figure 18).

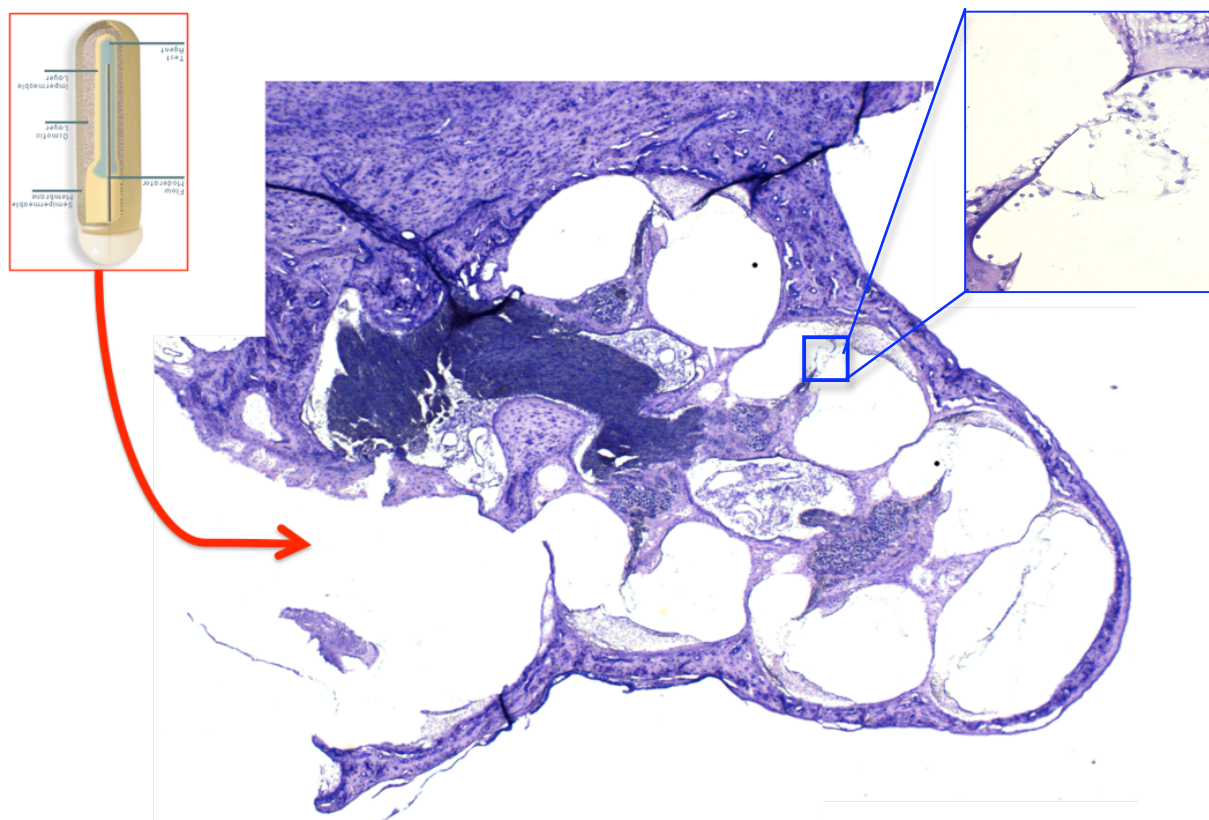


Figure 17 :

Coloration au bleu de Toluidine d'une cochlée opérée à faible grossissement (20x), où le point d'entrée du cathéter cochléaire est mis en évidence par une flèche rouge schématiquement reliée à la représentation d'une mini-pompe osmotique (échelle non respectée). En haut à droite, l'encart montre à fort grossissement (200x) l'organe de Corti, dont les cellules ciliées sont lésées dans toutes les oreilles opérées, quel que soit le groupe.

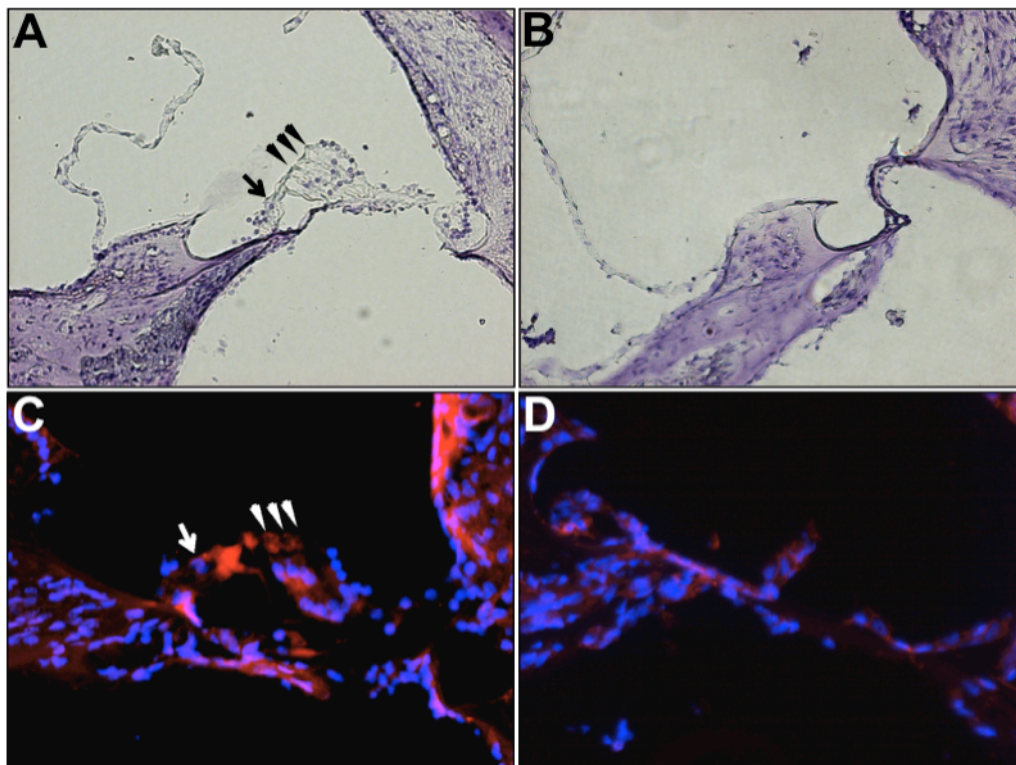


Figure 18 :

Organes de Corti au niveau du premier tour de spire de cochlées représentatives, colorés au bleu de toluidine (**A** et **B**) et à la phalloïdine avec une contre-coloration nucléaire (**C** et **D**). Les images **A** et **C** montrent l'organe de Corti d'une oreille non opérée, avec des cellules ciliées intactes (trois rangées de cellules ciliées externes désignées par des têtes de flèches et une rangée de cellules ciliées internes indiquée par une flèche). Les images **B** et **D** montrent la disparition des cellules ciliées dans l'organe de Corti d'une oreille opérée et traitée par la gentamicine. Quel que soit le traitement protecteur administré ensuite, il n'y avait pas de différence entre les groupes au niveau des cellules ciliées.

1.3.2 Effets de la perfusion cochléaire sur le ganglion spiral.

Pour observer les neurones du ganglion spiral, nous avons utilisé une coloration au bleu de Toluidine et un immunomarquage de la β III-tubuline. Nous avons mis en évidence une réduction dramatique de la densité neuronale des cochlées opérées dans le groupe traité par périlymphe artificielle (Figure 19, B et F). Par contre, dans les groupes traités pendant 28 jours par bryostatine 1 ou par le cocktail de BDNF, NT-3 et z-VAD-fmk, il existait une préservation neuronale à la fin du traitement (figure 19, C, D, G et H). Après quantification, la perte neuronale observée chez les cobayes traités par gentamicine puis par périlymphe artificielle est de 61,01 % par rapport à l'oreille non opérée. Chez les cobayes opérés par gentamicine puis par bryostatine 1 ou par neurotrophines et inhibiteur de caspases, la perte neuronale est évaluée respectivement à 29,13 % et à 40,17 %. Il existe une différence significative entre les groupes traités par une molécule protectrice et ceux traités par la périlymphe artificielle ($p < 0,05$). Ces résultats sont illustrés figure 20.

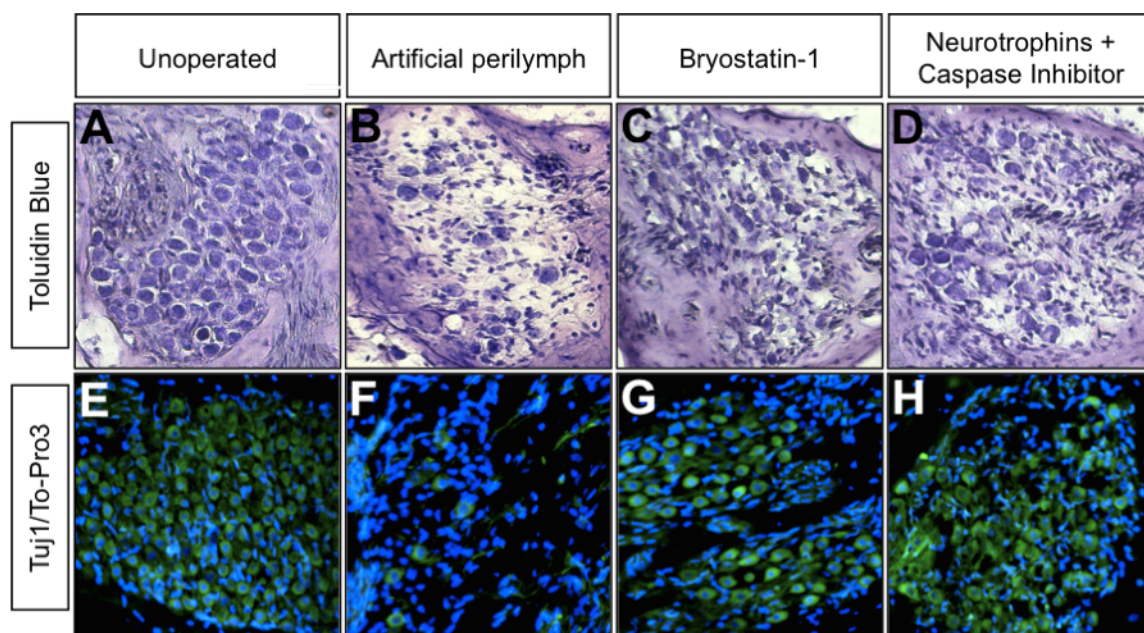


Figure 19 :

Ganglions spiraux au grossissement 200x, colorés au bleu de toluidine (A, B, C et D), et colorés par un immunomarquage de la β III-tubuline avec une contre-coloration nucléaire (E, F, G et H). Les images A et E montrent le ganglion spiral d'une oreille non opérée, avec des neurones intacts. Les images B et F montrent la raréfaction des neurones du ganglion spiral d'une oreille opérée ayant reçu de la gentamicine puis une solution de périlymphe artificielle pendant 1 mois. Les images C, D, G et H montrent une otoprotection avec une préservation relative de la densité neuronale lorsqu'on administre, pendant 1 mois après la gentamicine, de la bryostatine-1 (C et G) ou un cocktail de neurotrophines associées à un inhibiteur de l'apoptose (D et H).

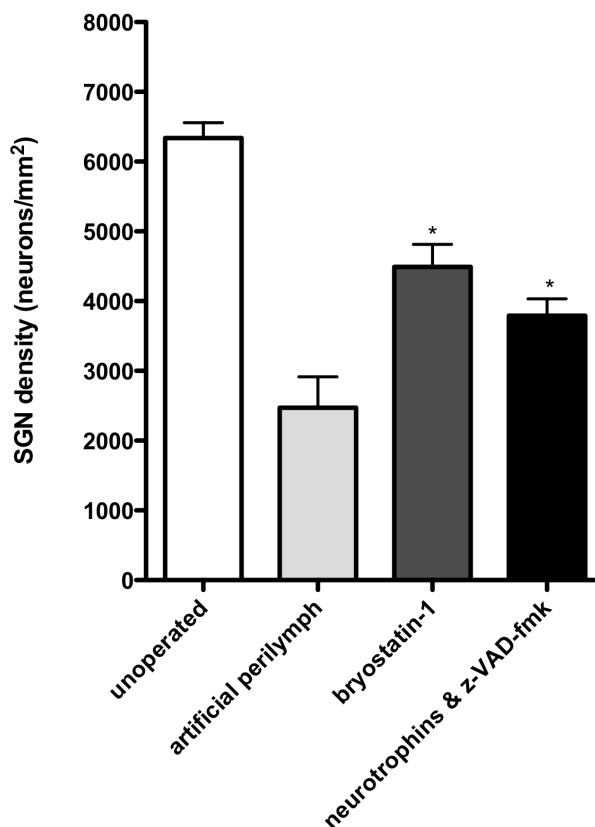


Figure 20 :

Quantification de la densité neuronale au niveau du premier tour de la cochlée après un mois de perfusion intracochléaire. En ordonnée, nous représentons le nombre de neurones par unité de surface, c'est-à-dire de cellules positives pour l'immunomarquage β III-tubuline ayant une coloration nucléaire (moyenne \pm erreur standard de la moyenne). En blanc est représentée la densité neuronale dans une cochlée non opérée. L'histogramme gris clair représente la densité neuronale après traitement par gentamicine puis périlymphe artificielle (perte neuronale de 61,01%) tandis que celui en gris foncé représente la densité neuronale après traitement par bryostatine 1 (perte neuronale de 29,13%, significativement plus faible qu'après traitement par périlymphe artificielle ; $p < 0,05$). L'histogramme noir correspond à la densité neuronale quantifiée après traitement par gentamicine puis par un cocktail de neurotrophines et d'inhibiteur de l'apoptose (perte neuronale de 40,17 %, significativement plus faible qu'après un traitement par périlymphe artificielle ; $p < 0,05$). Il n'y a pas de différence significative entre la perfusion cochléaire de bryostatine-1 et celle de neurotrophines et z-VAD-fmk.

1.3.3 Effets de la perfusion cochléaire sur les prolongements neuronaux

Nous avons observé les prolongements neuronaux marqués par un anticorps dirigé contre la β III-tubuline au niveau de l'organe de Corti. Sur les oreilles non opérées, on peut distinguer les prolongements neuronaux jusqu'à la base des cellules ciliées. Chez les animaux opérés ayant reçu de la gentamicine intra-cochléaire, quel que soit le traitement administré ensuite (pérylympe artificielle, neurotrophines, bryostatine 1), nous n'avons pas mis en évidence les prolongements neuronaux.

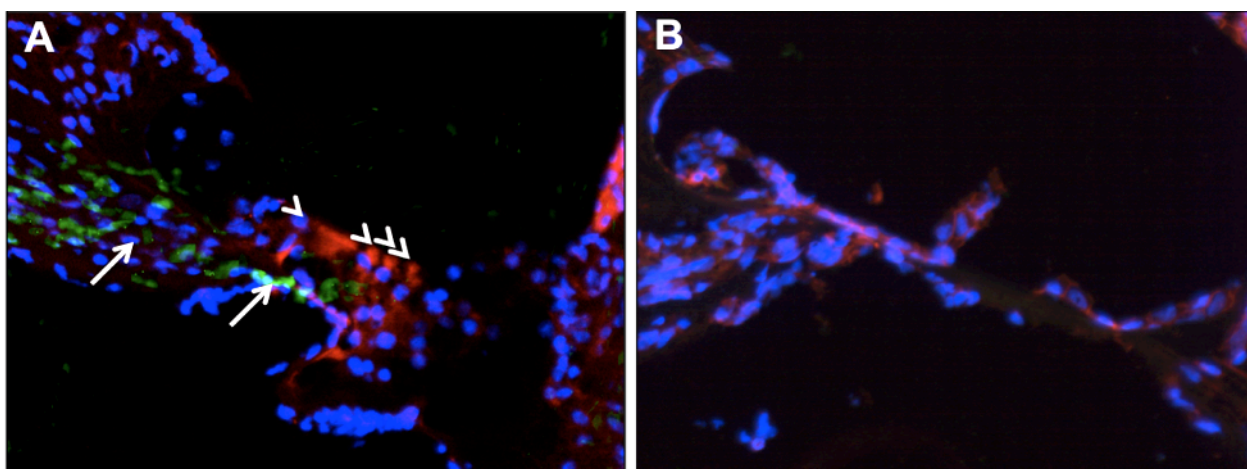


Figure 21 :

Immunomarquage β III-tubuline des prolongements neuronaux dans l'organe de Corti. **A** : organe de Corti d'une oreille non opérée. Les prolongements neuronaux, positifs pour l'immunomarquage β III-tubuline (en vert, indiqué par des flèches blanches), vont jusqu'aux cellules ciliées (colorées par la phalloïdine en rouge, et désignées par des têtes de flèches). Les noyaux sont marqués au TOPRO-3. **B** : organe de Corti d'une oreille opérée. Il n'y avait pas de différence significative entre les oreilles opérées quelque soit le traitement protecteur. Au niveau de l'organe de Corti, on ne retrouve plus de prolongements neuronaux positifs pour l'immunomarquage β III-tubuline. Il n'y a plus non plus de cellules ciliées. Ce résultat a été observé après administration de gentamicine intra-cochléaire, dans les groupes traités par pérylympe artificielle, Bryostatine-1, neurotrophines et inhibiteur de l'apoptose.

1.4 Discussion

Notre étude nous a permis d'établir 3 observations :

1. La gentamicine administrée localement chez le cobaye est ototoxique.
2. Il est possible d'administrer une molécule en perfusion continue dans la cochlée du cobaye.
3. La bryostatine 1 a un effet protecteur sur les neurones du ganglion spiral lorsqu'elle est administrée à faible dose de manière prolongée en intra-cochléaire.

Les cellules ciliées et les neurones du ganglion spiral meurent après injection locale de gentamicine. Les prolongements axonaux de ces neurones dégénèrent également. Nos résultats concordent avec les descriptions antérieures de l'ototoxicité de cet aminoglycoside lorsqu'il est administré localement chez le cobaye^{112,469-474}. En effet, il a été montré qu'après administration de gentamicine dans l'oreille de cobaye, la plupart des cellules ciliées meurent endéans 48 heures⁴⁷⁴. La perte neuronale s'observe dans le mois qui suit la perte des cellules ciliées^{469,475,476}. Les premiers signes de souffrance neuronale sont déjà observés une semaine après administration locale de gentamicine⁴⁷⁷, et les neurones du ganglion spiral meurent par apoptose⁴⁷².

Nous avons ensuite démontré qu'il était possible d'implanter une mini-pompe de perfusion cochléaire afin de délivrer une molécule otoprotectrice de manière continue et prolongée directement dans l'oreille interne. Cette technique a déjà été utilisée par d'autres équipes dont les résultats chirurgicaux sont similaires aux nôtres^{130,292,318,468,478-481}.

La bryostatine 1 n'a jamais été testée *in vivo* dans l'oreille interne. Elle n'a jamais non plus été testée *in vitro* sur des cochlées adultes. Nous connaissions son effet protecteur sur les corps neuronaux déafférentés du ganglion spiral de rats post-nataux, ainsi que sur leurs neurites³²². Cet effet est lié à l'activation de la protéine kinase C β I³²². Nous avons étudié pour la première fois l'effet de la bryostatine 1 administrée localement pendant 1 mois dans la cochlée de cobayes adultes après injection de gentamicine. Nous avons comparé l'effet de la bryostatine 1 à celui de la périlymphe artificielle (contrôle négatif) et à celui de molécules connues pour leur effet protecteur : les neurotrophines^{139,207,211,482-484} et un inhibiteur de caspases⁴⁶⁷.

En implantant la mini-pompe osmotique le jour même de l'administration de

gentamicine, nous nous assurons que les neurones du ganglion spiral sont enrichis en bryostatine 1 avant même que les premières lésions neuronales soient détectables. Ce n'est pas le cas des cellules ciliées, pour lesquelles les lésions sont plus précoces. Dans notre étude, nous n'avons pas démontré d'effet protecteur de la bryostatine 1 sur les cellules ciliées de l'organe de Corti. Par ailleurs, un effet de la bryostatine 1 sur les cellules ciliées n'avait jamais été démontré *in vitro*. Chez nos cobayes opérés, nous avons observé une disparition massive des cellules ciliées de l'organe de Corti, validant notre modèle de surdité. La densité neuronale observée chez les cobayes traités par bryostatine 1 est donc bien due à l'effet neuroprotecteur de la bryostatine 1 et non à un problème technique à l'origine d'un défaut d'ototoxicité, puisque l'organe de Corti était lésé chez tous nos cobayes opérés.

Au niveau du ganglion spiral, la bryostatine 1 a démontré un effet protecteur significatif sur le nombre de neurones, similaire à celui des neurotrophines et d'un inhibiteur de l'apoptose. Cet effet est concordant avec la neuroprotection observée *in vitro* sur des neurones de ganglion spiral de rats post-nataux³²². Les mécanismes d'action moléculaires sont actuellement hypothétiques. L'activation de la PKC pourrait être mise en évidence par une redistribution de la protéine au niveau membranaire (par immunofluorescence), car les PKCs activées lient la membrane plasmique. Nous pourrions également utiliser un inhibiteur de PKC ou un inhibiteur spécifique de PKC β 1 pour déterminer si l'effet neuroprotecteur serait aboli. Ceci prouverait l'implication de PKC dans la protection du ganglion spiral adulte *in vivo*.

L'activation de PKC pourrait aboutir à l'activation des 2 voies majeures de survie neuronales : la voie de la Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) et des Mitogen extracellular regulated kinase/extracellular regulated kinases (MEK/ERK)³²². Ceci a été démontré *in vitro*^{319,320} mais reste à démontrer *in vivo* dans notre modèle de dégénérescence neuronale suite à un traitement par aminoglycoside.

A l'inverse des effets sur les corps neuronaux, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence d'effet sur la neuritogenèse, contrairement aux résultats obtenus sur des cultures de neurones de ganglion spiraux ou de lignée neuronale PC12^{322,485}. Dans ce dernier cas, la bryostatine 1 n'est pas suffisante pour promouvoir la croissance neuritique à elle seule. Elle agit en synergie avec l'effet du NGF ou de la staurosporine^{486,487}. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas observé d'effet protecteur sur les neurites.

Il nous reste à déterminer si modifier le débit de perfusion ou la concentration en bryostatine 1, ou si administrer de la bryostatine 1 associée à d'autres facteurs, pourrait protéger l'innervation de l'organe de Corti. En effet, les activateurs de PKC ont une activité biphasique et lorsque leur concentration augmente, on observe une régulation négative de la PCK^{462,463}. Le choix de la dose administrée et de la période d'administration est donc particulièrement critique. De nouvelles expériences sont nécessaires pour optimiser ce traitement (courbe dose-réponse, durée du traitement).

1.5 Conclusion

La bryostatine 1 a un effet protecteur sur les neurones du ganglion spiral lorsqu'elle est administrée à faible dose de manière prolongée chez les cobayes adultes. Cet effet est probablement lié à une activation de la protéine kinase C, en particulier la PKC β 1. Les modalités et la dose d'administration chez l'homme doivent encore être déterminés.

2. L'inhibition de la voie Rho/ROCK

2.1 Introduction

Les petites protéines Rho GTPases sont des régulateurs essentiels de l'organisation cellulaire et du cytosquelette. Parmi celles-ci, RhoA est particulièrement impliquée dans la régulation de la croissance neuritique et l'apoptose/la survie neuronales^{7,8}.

Les effecteurs de RhoA sont l'homologue mammifère de diaphanous, mDia, et les Rho Kinases (ROCK)^{9,343}. De façon intéressante, p140mDia est un homologue du gène de surdité humaine DFNA1 (Dial chez la souris), une cible de Rho et un régulateur de la polymérisation de l'actine³⁴⁷.

Comme nous l'avons discuté dans l'introduction générale de ce travail, la voie Rho/ROCK est particulièrement importante dans le système nerveux central, notamment dans l'organisation du cytosquelette, la guidance axonale, la migration neuronale, la plasticité synaptique et la neuritogenèse^{7,8,340,342,356,357}. Elle interagit avec l'action des neurotrophines^{10,383}.

L'inhibition de la voie Rho/ROCK a démontré des effets neuroprotecteurs dans la moelle épinière³⁵⁸⁻³⁶¹, le nerf optique³⁶²⁻³⁶⁵, les lésions cérébrales ischémiques³⁶⁶⁻³⁷⁴, des modèles de maladie d'Alzheimer³⁷⁵⁻³⁷⁹ et de maladie de Huntington³⁸⁰⁻³⁸².

Enfin, les inhibiteurs de la voie Rho/ROCK augmentent la survie neuronale en culture et la neuritogenèse³⁸⁴⁻³⁸⁹. Au niveau du ganglion spiral, la voie ROCK a été peu étudiée, mais elle pourrait jouer un rôle essentiel dans la croissance axonale des neurones auditifs³⁹¹.

Le but de cette étude était de mettre en évidence les effets neuroprotecteurs éventuels d'un inhibiteur de ROCK, le Y-27632, tout d'abord *in vitro* dans des cultures de neurones auditifs, puis *in vivo* dans la cochlée de cobayes pendant 1 mois après une lésion par un aminoglycoside. Nous avons comparé l'effet du Y-27632 à celui de la périlymphe artificielle (véhicule du Y-27632, contrôle négatif) et à celui des neurotrophines et d'un inhibiteur de l'apoptose, le z-VAD-fmk (contrôle positif). Comme pour notre étude de la bryostatine 1, le critère de jugement principal de cette étude *in vivo* était la densité neuronale du ganglion spiral après un mois de traitement. Nous avons également examiné les effets sur les neurites entre le ganglion spiral et l'organe de Corti.

2.2 Matériel et Méthode

2.2.1 Produits

Le Y-27632, un inhibiteur de ROCK, nous a été fourni par Calbiochem (Schwalbach, Allemagne) et a été mis en solution à la concentration finale de 10 μ M. La gentamicine, les neurotrophines BDNF et NT-3, l'inhibiteur de caspases z-VAD-fmk et la périlymphe artificielle sont exactement les mêmes produits que décrits pour l'étude de la bryostatine 1.

2.2.2 Etude *in vitro*

Toutes nos expériences ont été soumises à l'approbation du comité d'éthique animale de l'Université de Liège. Des rats Wistar post-nataux (P4), élevés dans l'animalerie centrale de notre université, ont été euthanasiés et décapités. Nous avons prélevé les ganglions spiraux après dissection de l'os temporal dans une solution de PBS enrichie en glucose 6g/l. Les ganglions spiraux ont été mis en culture dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Life Technologies, Rockville, MD, USA). Selon les groupes, le milieu de culture a été enrichi en neurotrophines (BDNF et NT-3 à la concentration finale de 20ng/ml, contrôle positif, n=6), en Y-27632 (10 μ M, groupe expérimental, n=6), ou n'a pas été enrichi (contrôle négatif, n=6). Les cultures ont été maintenues en parallèle pendant 48 heures.

2.2.3 Etude *in vivo*

Nous avons utilisé 19 cobayes mâles adultes albinos Dunkin Hartley (fournis par Harlan, Horst, The Netherlands, référence HsdPoc:DH). Nous les avons utilisés exactement dans les mêmes conditions que celles décrites pour l'étude de la bryostatine 1. Les animaux ont été randomisés en 3 groupes de la même manière que pour l'étude de la bryostatine 1. La procédure chirurgicale était identique. Nous avons implanté des mini-pompes osmotiques délivrant dans la cochlée une solution à un débit constant (0,25 μ l/h pendant 28 jours). Selon les groupes, les solutions perfusées dans la cochlée étaient composées des produits suivants :

- Groupe expérimental : Y-27632 (200 μ l à la concentration de 10 μ M ; n=9)
- Contrôle positif : BDNF, NT-3 et z-VAD-fmk (200 μ l aux concentrations respectives de 20ng/ml, 20ng/ml et 20 μ M ; n=6)
- Contrôle négatif : Périlymphe artificielle intra-cochléaire (200 μ l ; n=5)

2.2.4 Analyse Immuno-histochimique

Pour l'étude *in vitro*, nous avons réalisé une immunofluorescence dirigée contre la β III-tubuline comme décrit au paragraphe 1.2. Pour l'étude *in vivo*, la préparation des tissus, la coloration au Bleu de Toluidine, l'immunofluorescence et la quantification des neurones du ganglion spiral ont été réalisés de la même manière que pour l'étude sur la bryostatine 1. Le nombre de neurones par mm² de ganglion spiral (moyenne \pm déviation standard) a été comparé entre chaque groupe en utilisant une ANOVA à 1 facteur (programme GraphPad Prism, San Diego, CA, USA).

2.3 Résultats

2.3.1 Etude *in vitro* de l'inhibition de ROCK sur la survie des neurones du ganglion spiral

Les neurones du ganglion spiral en culture meurent par apoptose en l'absence de supplémentation en facteurs trophiques^{322,488,489}. Après 48 heures de culture, nous avons observé une nette amélioration de la survie neuronale dans les cultures enrichies en Y-27632 (figure 22B) et en neurotrophines (figure 22C), en comparaison aux ganglions spiraux du groupe contrôle (figure 22A). La quantification neuronale après 48 heures de culture est représentée figure 23. La densité neuronale est significativement plus élevée avec un traitement par Y-27632 ($1334 \text{ neurones/mm}^2 \pm 151 \text{ neurones/mm}^2$) que sans traitement ($478 \text{ neurones/mm}^2 \pm 144 \text{ neurones/mm}^2$; $p < 0,01$).

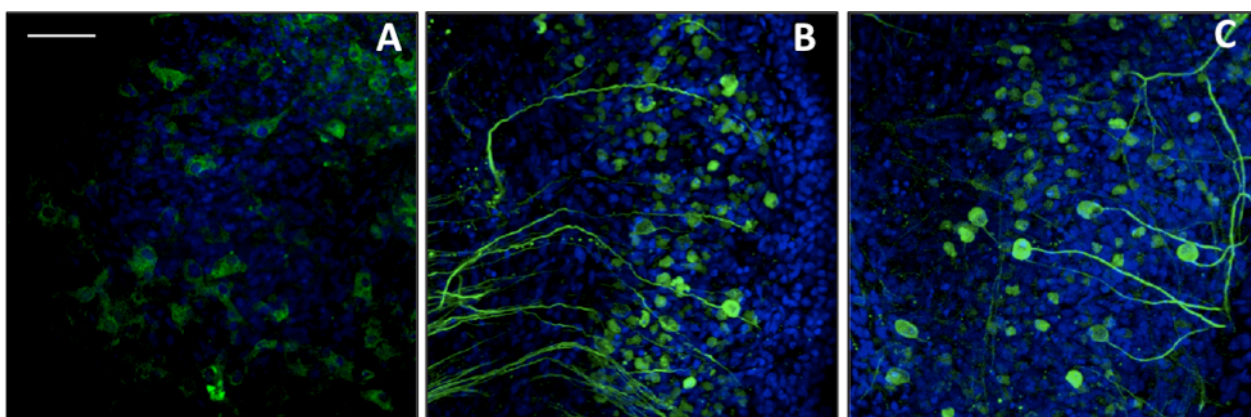


Figure 22 :

Immunomarquage β III-tubuline (en vert) des neurones de ganglions spiraux de rats post-nataux mis en culture pendant 48 heures. Les noyaux sont marqués au TOPRO-3 (en bleu). Les photos ont été prises au grossissement 400x. **A**. Il existe une perte de cellules positives pour la β III-tubuline dans les cultures non enrichies (contrôle négatif). La survie des cellules positives pour la β III-tubuline est meilleure dans les cultures enrichies en Y-27632 (**B**) et dans les cultures enrichies en neurotrophines BDNF et NT-3 (**C**, contrôle positif). On observe également une disparition quasi complète des prolongements neuronaux (neurites) dans les cultures non enrichies (**A**). Par contre, le Y-27632 et les neurotrophines préservent les prolongements neuritiques (**B**, **C**). Barre d'échelle représentée dans l'image **A** = 100 μm .

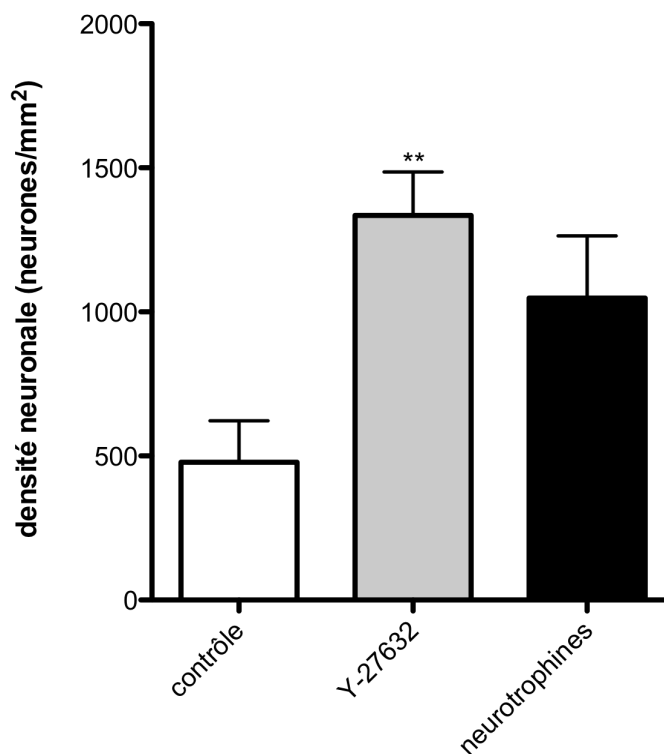


Figure 23 :

Quantification neuronale après 48 heures de culture de neurones du ganglion spiral de rats post-nataux (P4). La densité neuronale est significativement plus élevée dans les cultures enrichies en Y-27632, représentée par l'histogramme gris (1334 neurones/mm² ± 151 neurones/mm²) que dans les cultures contrôles, représentée par l'histogramme blanc (478 neurones/mm² ± 144 neurones/mm²; p<0,01). La densité neuronale dans les cultures enrichies en neurotrophines est représentée par l'histogramme noir (1048 neurones/mm² ± 216 neurones/mm²). N = 6 dans chaque groupe.

2.3.2 Etude *in vivo* de l'inhibition de ROCK

2.3.2.1 Effet sur la survie neuronale

Nous avons validé notre modèle d'ototoxicité et de perfusion cochléaire de la même manière que dans l'étude de la bryostatine 1. Nous avons exclu 1 cobaye du groupe contrôle positif et 1 cobaye du groupe Y-27632 pour mauvais positionnement du cathéter de perfusion cochléaire. Les neurones du ganglion spiral ont été observés après coloration au bleu de Toluidine et après immunomarquage pour la β III-tubuline. Nous avons quantifié le nombre de cellules positives pour la β III-tubuline avec une coloration nucléaire (TOPRO-3) par unité de surface pour définir la densité neuronale. Par rapport à la densité neuronale observée après un traitement par la gentamicine puis par périlymphe artificielle, où la densité neuronale chute dramatiquement, nous avons objectivé une relative protection du nombre de neurones chez les cobayes traités par Y-27632 et chez les cobayes traités par un cocktail de neurotrophines et d'inhibiteur de l'apoptose (BDNF, NT-3 et z-VAD-fmk). Après quantification, la perte neuronale observée chez les cobayes traités par

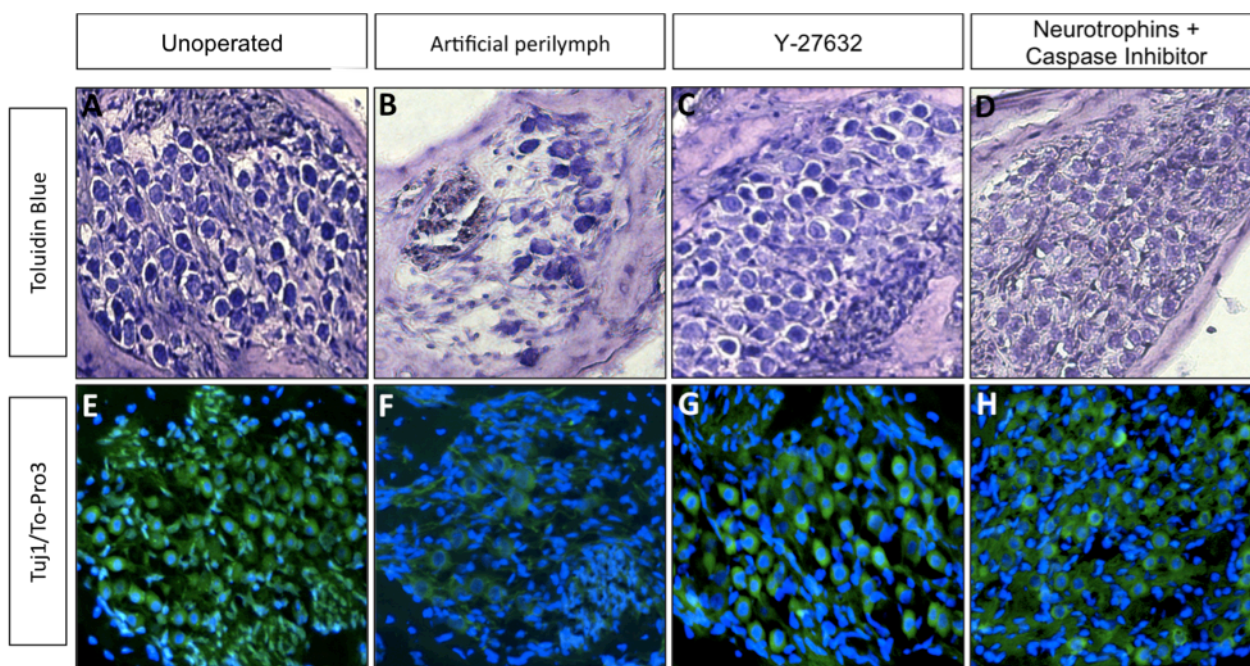


Figure 24 :

Coupes transversales de ganglions spiraux au grossissement 200x, colorés au bleu de toluidine (A, B, C et D), et colorés par un immunomarquage de la β III-tubuline avec une contre-coloration nucléaire (E, F, G et H). Les images A et E montrent le ganglion spiral d'une oreille non opérée, avec des neurones intacts. Toutes les autres photos ont été prises sur les cochlées opérées et ayant reçu de la gentamicine. Les images B et F montrent la raréfaction des neurones du ganglion spiral d'une oreille opérée ayant reçu de la gentamicine puis une solution de périlymphe artificielle pendant 1 mois. Les images C, D, G et H montrent une otoprotection avec une préservation relative de la densité neuronale lorsqu'on administre, pendant 1 mois après la gentamicine, l'inhibiteur de ROCK Y-27632 (C et G) ou un cocktail de neurotrophines associées à un inhibiteur de l'apoptose (D et H).

gentamicine puis par périlymphe artificielle est de 61,01 % par rapport à l'oreille non opérée. Chez les cobayes opérés par gentamicine puis par Y-27632 ou par neurotrophines et inhibiteur de caspases, la perte neuronale est évaluée respectivement à 20,28 % et à 40,17 %. Il existe une différence significative entre les groupes traités par une molécule protectrice et ceux traités par la périlymphe artificielle ($p < 0,05$). Ces résultats sont illustrés figure 24 et la quantification est représentée figure 25.

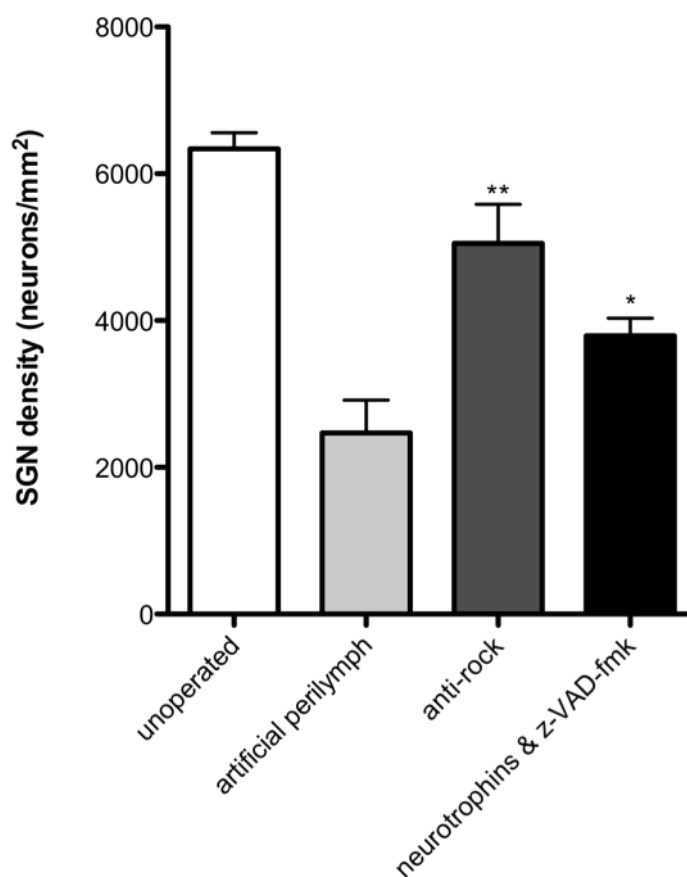


Figure 25 :

Quantification de la densité neuronale au niveau du premier tour de la cochlée après un mois de perfusion intracochléaire. En ordonnée, nous représentons le nombre de cellules positives pour l'immunomarquage β III-tubuline ayant une coloration nucléaire, par unité de surface (moyenne \pm erreur standard de la moyenne). L'histogramme blanc représente la densité neuronale quantifiée dans une cochlée non opérée. En gris clair est représentée la densité neuronale après traitement par gentamicine puis périlymphe artificielle (perte neuronale de 61,01%), tandis que la densité neuronale après traitement par l'inhibiteur de ROCK Y-27632 (perte neuronale de 20,28%, significativement plus faible qu'après traitement par périlymphe artificielle ; $p < 0,01$) est représentée en gris foncé. L'histogramme noir représente la densité neuronale après traitement par gentamicine puis par un cocktail de neurotrophines et d'inhibiteur de l'apoptose (perte neuronale de 40,17 %, significativement plus faible qu'après un traitement par périlymphe artificielle ; $p < 0,05$). Il n'y a pas de différence significative entre la perfusion cochléaire de Y-27632 et celle de neurotrophines et z-VAD-fmk.

2.3.2.2 Effets de la perfusion cochléaire sur les prolongements neuronaux et l'organe de Corti

Nous avons observé les prolongements neuronaux marqués par un anticorps dirigé contre la β III-tubuline entre le ganglion spiral et l'organe de Corti. Contrairement aux effets *in vitro*, nous n'avons pas réussi à démontrer une protection de ces prolongements neuronaux après un traitement par le Y-27632 ni par le cocktail de neurotrophines et de z-VAD-fmk. Chez tous les cobayes opérés et soumis à la gentamicine intra-cochléaire, quel que soit le traitement administré ensuite, nous avons mis en évidence une perte de l'innervation de l'organe de Corti. Par contre, dans les oreilles non opérées, les prolongements neuronaux étaient intacts.

Nous avons également observé les cellules ciliées de l'organe de Corti, mais nous n'avons pas réussi à établir un éventuel effet protecteur de Y-27632 ni par le cocktail de neurotrophines et de z-VAD-fmk. Les cellules ciliées des cobayes opérés soumis à la gentamicine ont disparu dans tous les groupes.

2.4 Discussion

Dans cette étude, nous avons démontré qu'un traitement par l'inhibiteur de ROCK Y-27632 a un effet protecteur sur la densité neuronale du ganglion spiral tant *in vitro* qu'*in vivo* après lésion par un aminoglycoside. Nous n'avons pas démontré d'effet protecteur sur les prolongements neuronaux ni sur les cellules ciliées de l'organe de Corti *in vivo*, mais il existait une protection évidente des prolongements neuritiques *in vitro*. Ces résultats concordent avec la prévention de l'apoptose après inhibition de la voie Rho/ROCK observée dans des cultures de neurones hippocampiques³⁸⁴, de neurones du ganglion rétinien³⁸⁵⁻³⁸⁷, ou de précurseurs neuronaux^{388,389}.

L'absence de protection des prolongements neuritiques *in vivo*, contrairement à plusieurs études réalisées au niveau de la moelle épinière³⁵⁸⁻³⁶¹ ou du nerf optique³⁶²⁻³⁶⁵, pourrait être expliquée par différentes raisons. La concentration du Y-27632 que nous avons choisie pourrait ne pas être adaptée. En outre, l'inhibition de la voie Rho/ROCK pourrait n'être protectrice que si elle a lieu avant la lésion neuronale. En effet, étant donné que le Y-27632 est perfusé dès le premier jour d'administration de l'aminoglycoside, il agit au niveau du ganglion spiral plusieurs jours voire plusieurs semaines avant la lésion des corps neuronaux^{472,474}. Par contre, les lésions neuritiques sont beaucoup plus précoces⁴⁷⁶ et il est possible que l'imprégnation en Y-27632 dans notre modèle de traitement ne soit pas encore suffisante à ce moment pour être efficace. Des expériences complémentaires seraient nécessaires *in vivo* et *in vitro* pour établir une courbe dose-réponse et optimiser le timing d'administration du Y-27632.

Une autre explication de l'absence de protection neuritique pourrait être que des mécanismes différents de l'activation Rho/ROCK soient impliqués dans la dégénérescence neuritique après lésion des cellules ciliées par un aminoglycoside. Plusieurs autres mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer la dégénérescence neuritique consécutive à la disparition des cellules ciliées^{477,490} : excitotoxicité du glutamate dans la phase précoce⁴⁹¹, puis privation en facteurs trophiques antérieurement sécrétés par les cellules ciliées^{488,489,492} et absence d'activité électrique neuronale^{493,494}. Les mécanismes exacts impliqués dans la protection neuronale conférée par le Y-27632 ne sont pas encore complètement élucidés.

Parallèlement aux études de protection, nous devrions compléter nos expériences par une étude de l'inocuité de l'inhibition de ROCK au niveau cérébral et de l'organe de Corti. En effet, la voie Rho/ROCK est importante pour le fonctionnement de

l'organe de Corti^{345,346} et du système nerveux central^{7,8}. L'inhibition de Rho pourrait également avoir un effet protecteur sur les cellules ciliées externes agressées par un aminoglycoside³⁵⁵.

L'augmentation de la survie des neurones du ganglion spiral *in vitro* et *in vivo* ouvre les portes de nouvelles associations thérapeutiques. Par exemple, les neurotrophines ont été largement utilisées pour la protection du ganglion spiral (voir notre introduction générale), mais leur effet reste limité et semble disparaître dès l'arrêt du traitement⁴⁸². Or, il existe des interactions entre la voie Rho/ROCK et l'action des neurotrophines. En particulier, Rho inhibe la croissance neuritique en réponse aux neurotrophines BDNF et NT-3 dans les neurones trijéminaux¹⁰. Ces neurotrophines sont nécessaires à la survie du ganglion spiral. Une association de ces neurotrophines avec le Y-27632 pourrait à la fois prolonger l'effet des neurotrophines et potentialiser celui du Y-27632. Cette éventualité prometteuse reste évidemment à démontrer.

2.5 Conclusion

Nous démontrons l'effet protecteur pour les neurones du ganglion spiral de l'inhibition de la voie Rho/ROCK. Les implications exactes de cette voie au niveau de l'oreille interne restent à démontrer. Par ailleurs, nous confirmons la toxicité de la gentamicine chez le cobaye et la possibilité d'administrer une molécule en perfusion continue dans la cochlée du cobaye.

CONCLUSIONS

Les recherches sur l'oreille des mammifères remontent au 19^e siècle⁹³, c'est-à-dire un siècle avant la découverte des médicaments ototoxiques, d'abord à visée thérapeutique^{495,496}, puis en tant que modèle de surdité chez l'animal⁴⁹⁷⁻⁴⁹⁹. Nos travaux s'inscrivent dans la même lignée. La première partie de ce travail démontre une discordance importante de vulnérabilité aux médicaments ototoxiques entre les mammifères. Les résultats électrophysiologiques obtenus concordent avec les résultats histologiques observés à la fois dans l'organe de Corti et le ganglion spiral. La concordance de ces différents niveaux d'observation, ainsi que le long délai de l'expérimentation (5 semaines), nous permettent de conclure que les souris ne sont pas un modèle d'ototoxicité fiable chez l'adulte. Par contre, elles pourraient être un modèle de résistance aux médicaments ototoxiques intéressant.

Les explications d'une telle résistance sont actuellement hypothétiques. Une clairance plus rapide des aminoglycosides plasmatique et cochléaire, ou une pénétration réduite des aminoglycosides dans la périlymphe et l'endolymphe peuvent expliquer l'absence de toxicité observée chez la souris. Néanmoins, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de toxicité non plus lors de nos administrations locales. Nos différentes techniques chirurgicales sont probablement imparfaites. Une seconde hypothèse expliquant la différence de vulnérabilité entre les espèces pourrait être une vulnérabilité intrinsèque des cellules ciliées et des neurones du ganglion spiral des cobayes. En particulier, les défenses contre les agressions des radicaux libres peuvent être différentes d'une espèce à l'autre et même d'un type cellulaire à l'autre. Les perspectives de recherche pour valider ces hypothèses sont nombreuses. La mesure des taux sériques et urinaires de cisplatine et d'aminoglycoside permettrait d'évaluer la pharmacocinétique de ces molécules. La mesure de la concentration de ces médicaments dans les tissus de l'oreille interne est par contre plus délicate étant donné le faible volume des échantillons. Cependant, une estimation est possible pour les aminoglycosides^{438,500-506} comme pour le cisplatine^{161,507}. Nous pourrions ensuite mettre en évidence l'ototoxicité précoce par génération de radicaux libres *in vitro*^{127,128,232,508-510} et *in vivo*^{511,512}.

Par ailleurs, plusieurs gènes peuvent être impliqués dans la résistance de la souris à l'agression : gènes codant pour des enzymes antioxydantes⁵¹³, des neurotrophines²¹⁶, ou des protéines du cytosquelette¹¹⁶. L'étude de l'ototoxicité chez des souris mutantes pour ces gènes permettrait de démontrer la participation de chaque protéine dans les défenses cellulaires contre les médicaments ototoxiques. Chez l'être humain, il existe un polymorphisme génétique et certains génotypes sont

susceptibles de développer une ototoxicité et de précipiter son évolution, que ce soit pour les aminoglycosides^{514,515} ou pour le cisplatine⁵¹⁶⁻⁵¹⁸. L'étude de ces génotypes permettrait de mieux dessiner les traitements en fonction de chaque patient. Une prise en charge adaptée au polymorphisme génétique est déjà possible pour les pathologies cancéreuses⁵¹⁹⁻⁵²², cardiovasculaires^{523,524} et métaboliques. Par exemple pour le cas dans cancers de la tête et du cou, une chimiothérapie alternative au cisplatine pourrait être proposée aux patients qui auraient une prédisposition à l'ototoxicité du cisplatine⁵²⁵⁻⁵²⁷.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons utilisé un modèle de surdité neurosensorielle chez le cobaye adulte par administration de gentamicine intracochléaire. Nous avons tout d'abord confirmé ce modèle de surdité neurosensorielle induite par un aminoglycoside chez le cobaye. Nous avons ensuite confirmé qu'il était possible d'administrer une molécule en perfusion continue dans la cochlée du cobaye. Nous avons administré de la périlymphe artificielle comme contrôle négatif et un mélange de neurotrophines (BDNF et NT-3) et d'inhibiteur de caspase (z-VAD-fmk) comme contrôle positif, ces molécules ayant déjà démontré un effet protecteur auparavant^{139,209,211,484,528-531}. Ce type d'étude permet d'évaluer les effets de molécules expérimentales dans l'oreille interne en les comparant à un contrôle négatif et à un contrôle positif. Une telle évaluation est très intéressante d'un point de vue clinique, parce que la perfusion de l'oreille interne est possible également chez l'être humain⁵³²⁻⁵³⁴. Par exemple, pour certaines formes de surdité neurosensorielle chez l'humain, l'administration locale de corticostéroïdes⁵³⁵⁻⁵⁴⁰ ou d'anticorps dirigé contre le TNF α ⁵⁴¹ a déjà démontré une efficacité. Cette voie d'administration est également utilisée dans certains cas de maladie de Ménière^{542,543}. L'adaptation de notre modèle animal à l'être humain est donc possible, moyennant une évaluation du timing d'administration, et du dosage en fonction de la concentration finale de la molécule administrée dans l'oreille interne⁵⁴⁴. Bien entendu, le mode de dégénérescence des neurones du ganglion spiral chez l'humain est très différent de ce qui est décrit chez l'animal^{143,144}, et nos expériences ne sont qu'un modèle tentant de reproduire un phénomène complexe.

La première molécule expérimentale que nous avons testée chez le cobaye adulte est la bryostatine 1, un activateur de PKC dont les effets neuroprotecteurs avaient été démontrés *in vitro*³²². Dans notre étude, la bryostatine 1 a un effet protecteur sur les neurones du ganglion spiral des cobayes adultes après lésion des cellules ciliées par un aminoglycoside. Nous avons choisi une dose faible et une

administration prolongée en raison de la nature biphasique des activateurs de PKC^{462,463}. La PKC activée lie la membrane cellulaire, contrairement à la PCK non activée, cytosolique. Une fois liée à la membrane, la PKC est rapidement et préférentiellement dégradée. Ainsi, si la concentration cochléaire de bryostatine 1 est trop élevée, elle régule négativement la PKC et son effet devient l'inverse de celui attendu. Nous avons utilisé une concentration similaire à celle utilisée *in vitro*³²². Cet effet biphasique sera important à prendre en compte lorsque nous évaluerons les doses à administrer en étude clinique. L'inhibition de PKC est actuellement uniquement préventive de la mort neuronale au niveau du ganglion spiral, mais une adaptation du dosage et du mode d'administration pourraient démontrer également un effet positif sur les neurites, comme cela a été démontré *in vitro*³²². A terme, nous pourrions intégrer la bryostatine 1 comme protecteur neuronal dans une stratégie de prise en charge de la surdité en l'associant à d'autres techniques de type pharmacologique, physique et de réadaptation. En effet, la préservation des neurones du ganglion spiral permet d'améliorer les gains de l'appareillage auditif cochléaire^{528,545-547} ou conventionnel⁵⁴⁸.

A ce jour cependant, la démonstration formelle d'un tel gain chez l'humain porteur d'un implant cochléaire reste difficile à démontrer^{549,550}. Agir à plusieurs niveaux est donc particulièrement important. La voie Rho/ROCK est impliquée dans l'organisation, le développement et l'involution du système nerveux central^{340-342,356,357}. Elle interagit avec les neurotrophines^{10,383} et joue également un rôle essentiel dans l'organe de Corti^{345,346}. Bien qu'elle n'ait jamais été étudiée dans un but d'otoprotection, elle semble une cible idéale. Notre étude a démontré l'effet protecteur de l'inhibition de la voie Rho/ROCK sur la densité neuronale du ganglion spiral tant *in vitro* qu'*in vivo* après lésion par un aminoglycoside. Ces résultats concordent avec l'action anti-apoptotique de l'inhibition de la voie Rho/ROCK observée dans des cultures de neurones hippocampiques³⁶⁶, de neurones du ganglion rétinien³⁸⁵⁻³⁸⁷, ou de précurseurs neuronaux^{388,389}. Par contre, nous n'avons pas démontré d'effet protecteur sur les prolongements neuronaux ni sur les cellules ciliées de l'organe de Corti. Une protection neuritique existe pourtant *in vitro* et avait été démontrée dans la moelle épinière³⁵⁸⁻³⁶¹ ou le nerf optique³⁶²⁻³⁶⁵. La posologie d'administration de notre inhibiteur Y-27632 n'était probablement pas appropriée. Les lésions neuritiques sont beaucoup plus précoces⁴⁷⁶ que les lésions neuronales^{472,474} dans le modèle d'ototoxicité induite par un aminoglycoside et il est possible que l'imprégnation en Y-27632 que nous avons obtenue ne soit pas encore suffisante à ce moment pour être efficace. Des expériences complémentaires

seraient nécessaires *in vivo* et *in vitro* afin de déterminer les mécanismes exacts impliqués dans la protection neuronale conférée par le Y-27632.

Par ailleurs, une exploration électrophysiologique manque à nos deux études. La bryostatine 1 et le Y-27632 permettent de maintenir la densité neuronale du ganglion spiral, mais nous n'avons pas démontré que cette protection était fonctionnelle. Bien entendu, il est peu probable que protéger uniquement le ganglion spiral soit suffisant pour maintenir une audition fonctionnelle (en raison de l'absence de cellules ciliées et de connexions neuritiques). Néanmoins, la mesure de potentiels évoqués du tronc cérébral, qui n'a pas été réalisée de manière systématique pour des raisons techniques (présence d'une surdité de transmission) serait intéressante. Cette étude est indispensable dans le cas de l'inhibition de la voie Rho/ROCK étant donné son rôle dans l'organe de Corti^{345,346}. L'enregistrement des otoémissions acoustiques ou des produits de distorsion des otoémissions permettrait de contrôler la fonction de ces cellules ciliées externes après perfusion d'un inhibiteur de ROCK.

Enfin, nous pourrions intégrer l'inhibition de la voie Rho/ROCK, l'activation de la PKC et le support neurotrophique dans une stratégie générale de protection des neurones du ganglion spiral. Il existe des interactions entre la voie Rho/ROCK et l'action des neurotrophines¹⁰. Une association de neurotrophines avec le Y-27632 et la bryostatine 1 pourrait à la fois prolonger l'effet des neurotrophines, potentialiser celui du Y-27632 et agir en synergie avec la bryostatine 1. L'ensemble des voies potentiellement impliquées est illustré sur la figure 26.

En conclusion, après avoir validé un modèle d'ototoxicité chez le cobaye, nous avons étudié de nouvelles molécules potentiellement otoprotectrices. L'effet protecteur est actuellement limité au ganglion spiral. La protection du ganglion spiral est un facteur essentiel à l'implantation prothétique d'un patient sourd^{545,547,551}. Ces nouvelles molécules pourraient être intégrées dans une prise en charge associant facteurs pharmacologiques, prothèses auditives et réadaptation pluri-disciplinaire⁵⁴⁵⁻

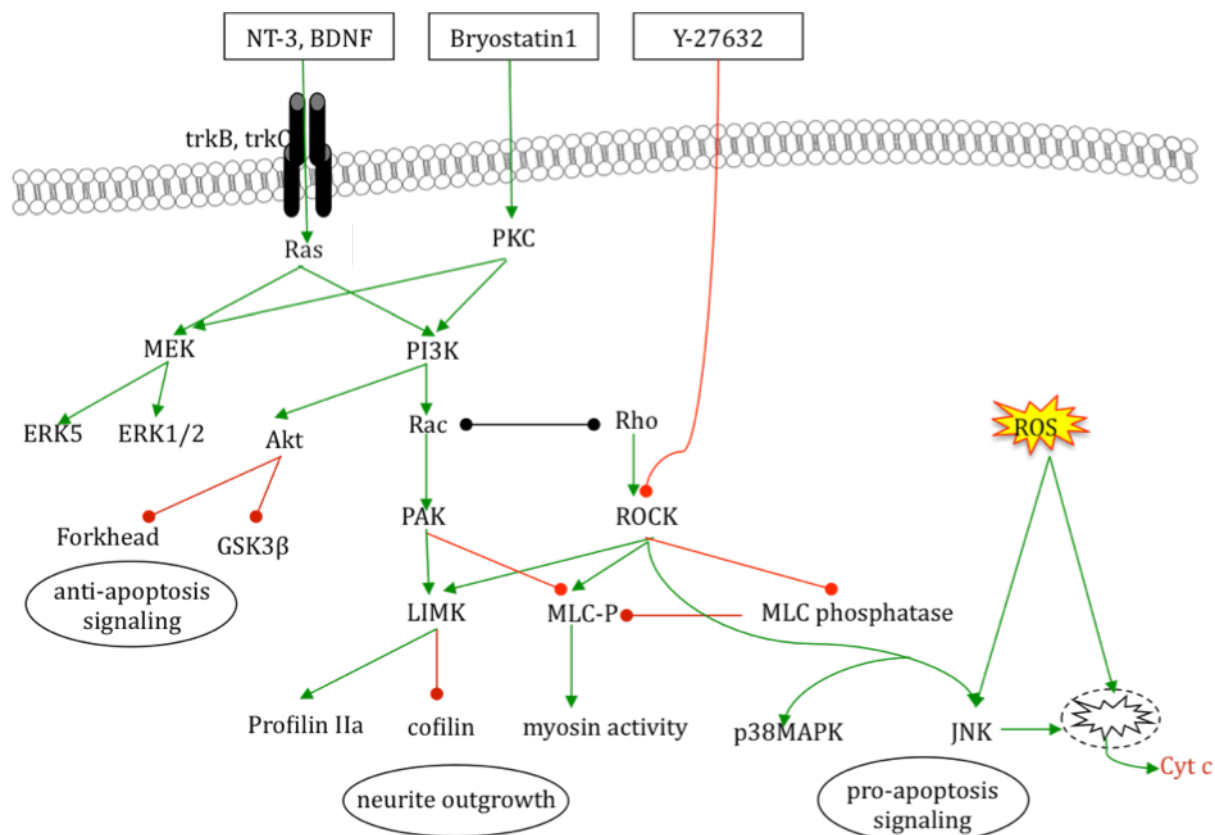


Figure 26 : voies de signalisation intracellulaires dans les neurones du ganglion spiral.

Les neurotrophines BDNF et NT-3 lient leur récepteur TrkB et TrkC et induisent sa phosphorylation, ce qui active les voies PI3K et MEK/ERK par l'intermédiaire de Ras¹. L'activation de ces voies aboutit à une signalisation intra-cellulaire pro-survie et au recrutement de Rac, un antagoniste de Rho². Rac favorise la croissance neuritique via l'activation de PAK (p21-activated kinase)^{3,4}. La bryostatine 1 est un activateur de la PKC dont les cibles comprennent également PI3K et MEK/ERK, participant à la signalisation pro-survie⁶. Le Y-27632 inhibe la voie Rho/ROCK. ROCK est un activateur des LIMK (Lin11, Isl1 & Mec3 kinases) et de la MLC-P (myosin light chain phosphorylée), limitant la croissance neuritique⁷⁻⁹. La voie Rho/ROCK joue un rôle antagoniste des neurotrophines¹⁰ et est impliquée dans la signalisation pro-apoptotique en activant les voies JNK et p38MAPK¹¹.

REFERENCES

1. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. 2000;10:381-391.
2. Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 1999;147:1009-1022.
3. Barber MA, Welch HC. PI3K and RAC signalling in leukocyte and cancer cell migration. *Bull Cancer* 2006;93:E44-52.
4. Ng J, Luo L. Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron* 2004;44:779-793.
5. Sterkers O, Saumon G, Tran Ba HP, Amiel C. K, Cl, and H₂O entry in endolymph, perilymph, and cerebrospinal fluid of the rat. *Am J Physiol*. 1982;243:F173-F180.
6. Maher P. How protein kinase C activation protects nerve cells from oxidative stress-induced cell death. *J Neurosci*. 2001;21:2929-2938.
7. Hall A, Lalli G. Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a001818.
8. Govek EE, Newey SE, Van Aelst L. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 2005;19:1-49.
9. BurrIDGE K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004;116:167-179.
10. Ozdinler PH, Erzurumlu RS. Regulation of neurotrophin-induced axonal responses via Rho GTPases. *J Comp Neurol* 2001;438:377-387.
11. Shimada H, Rajagopalan LE. Rho-kinase mediates lysophosphatidic acid-induced IL-8 and MCP-1 production via p38 and JNK pathways in human endothelial cells. *FEBS Lett* 2010;584:2827-2832.
12. WHO. Fact Sheet n°300, 2006:1-2.
13. Mackenzie I, Smith A. Deafness--the neglected and hidden disability. *Ann Trop Med Parasitol* 2009;103:565-571.
14. Pascolini D, Smith A. Hearing Impairment in 2008: A compilation of available epidemiological studies. *Int J Audiol* 2009:1-13.
15. Year 2007 position statement: Principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. *Pediatrics* 2007;120:898-921.
16. Year 2000 position statement: principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. Joint Committee on Infant Hearing, American Academy of Audiology, American Academy of Pediatrics, American Speech-Language-Hearing Association, and Directors of Speech and Hearing Programs in State Health and Welfare Agencies. *Pediatrics* 2000;106:798-817.
17. Joint Committee on Infant Hearing 1994 Position Statement. American Academy of Pediatrics Joint Committee on Infant Hearing. *Pediatrics* 1995;95:152-156.
18. Chau J, Atashband S, Chang E, Westerberg BD, Kozak FK. A systematic review of pediatric sensorineural hearing loss in congenital syphilis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009;73:787-792.
19. Brown ED, Chau JK, Atashband S, Westerberg BD, Kozak FK. A systematic review of neonatal toxoplasmosis exposure and sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009;73:707-711.
20. Westerberg BD, Atashband S, Kozak FK. A systematic review of the incidence of sensorineural hearing loss in neonates exposed to Herpes simplex virus (HSV). *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008;72:931-937.
21. Cristobal R, Oghalai JS. Hearing loss in children with very low birth weight: current review of epidemiology and pathophysiology. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93:F462-468.
22. Marlow ES, Hunt LP, Marlow N. Sensorineural hearing loss and prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;82:F141-144.
23. Wang CJ, Elliott MN, McGlynn EA, Brook RH, Schuster MA. Population-based assessments of ophthalmologic and audiologic follow-up in children with very low birth weight enrolled in Medicaid: a quality-of-care study. *Pediatrics* 2008;121:e278-285.
24. Hille ET, van Straaten HI, Verkerk PH. Prevalence and independent risk factors for hearing loss in NICU infants. *Acta Paediatr* 2007;96:1155-1158.
25. Borg E. Perinatal asphyxia, hypoxia, ischemia and hearing loss. An overview. *Scand Audiol* 1997;26:77-91.

26. Shapiro SM. Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatr Neurol* 2003;29:410-421.
27. Niebyl JR. Antibiotics and other anti-infective agents in pregnancy and lactation. *Am J Perinatol* 2003;20:405-414.
28. Schrijver I, Gardner P. Hereditary sensorineural hearing loss: advances in molecular genetics and mutation analysis. *Expert Rev Mol Diagn* 2006;6:375-386.
29. Tranebaerg L. Genetics of congenital hearing impairment: a clinical approach. *Int J Audiol* 2008;47:535-545.
30. Eisen MD, Ryugo DK. Hearing molecules: contributions from genetic deafness. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:566-580.
31. Steel KP, Kros CJ. A genetic approach to understanding auditory function. *Nat Genet* 2001;27:143-149.
32. Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet* 2006;69:371-392.
33. Nickel R, Forge A. Gap junctions and connexins in the inner ear: their roles in homeostasis and deafness. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;16:452-457.
34. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Takasaka T, Adams JC. Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;32:163-166.
35. Kaye CI, Accurso F, La Franchi S et al. Newborn screening fact sheets. *Pediatrics* 2006;118:e934-963.
36. Wrightson AS. Universal newborn hearing screening. *Am Fam Physician* 2007;75:1349-1352.
37. Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med* 2006;354:2151-2164.
38. Universal screening for hearing loss in newborns: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Pediatrics* 2008;122:143-148.
39. Olusanya BO, Luxon LM, Wirz SL. Benefits and challenges of newborn hearing screening for developing countries. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2004;68:287-305.
40. Maulik PK, Darmstadt GL. Childhood disability in low- and middle-income countries: overview of screening, prevention, services, legislation, and epidemiology. *Pediatrics* 2007;120 Suppl 1:S1-55.
41. Olusanya BO, Somefun AO, Swanepoel de W. The need for standardization of methods for worldwide infant hearing screening: a systematic review. *Laryngoscope* 2008;118:1830-1836.
42. Noorbakhsh S, Farhadi M, Tabatabaei A, Mohamadi S, Jomeh E. Infection in childhood sensory hearing loss. *Saudi Med J* 2008;29:1470-1474.
43. Ramakrishnan M, Ulland AJ, Steinhardt LC, Moisi JC, Were F, Levine OS. Sequelae due to bacterial meningitis among African children: a systematic literature review. *BMC Med* 2009;7:47.
44. McKenna MJ. Measles, mumps, and sensorineural hearing loss. *Ann N Y Acad Sci* 1997;830:291-298.
45. Juhn SK, Jung MK, Hoffman MD et al. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of otitis media and sequelae. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2008;1:117-138.
46. Tsuprun V, Cureoglu S, Schachern PA et al. Role of pneumococcal proteins in sensorineural hearing loss due to otitis media. *Otol Neurotol* 2008;29:1056-1060.
47. Carleton B, Poole R, Smith M et al. Adverse drug reaction active surveillance: developing a national network in Canada's children's hospitals. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2009;18:713-721.
48. Arslan E, Orzan E, Santarelli R. Global problem of drug-induced hearing loss. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999;884:1-14.
49. Darmstadt GL, Miller-Bell M, Batra M, Law P, Law K. Extended-interval dosing of gentamicin for treatment of neonatal sepsis in developed and developing countries. *J Health Popul Nutr* 2008;26:163-182.
50. Smith AW. The World Health Organisation and the prevention of deafness and hearing impairment caused by noise. *Noise Health* 1998;1:6-12.
51. Van Eyken E, Van Camp G, Van Laer L. The complexity of age-related hearing impairment: contributing environmental and genetic factors. *Audiol Neurootol* 2007;12:345-358.

52. Liu XZ, Yan D. Ageing and hearing loss. *J Pathol* 2007;211:188-197.
53. Yueh B, Shapiro N, MacLean CH, Shekelle PG. Screening and management of adult hearing loss in primary care: scientific review. *JAMA* 2003;289:1976-1985.
54. Mathers C, Smith A, Concha M. Global Burden of Hearing Loss in the Year 2000. WHO 2000:30.
55. Olusanya BO, Ruben RJ, Parving A. Reducing the burden of communication disorders in the developing world: an opportunity for the millennium development project. *JAMA* 2006;296:441-444.
56. Hudspeth AJ. How hearing happens. *Neuron*. 1997;19:947-950.
57. Corina D, Singleton J. Developmental social cognitive neuroscience: insights from deafness. *Child Dev* 2009;80:952-967.
58. van Hooren SA, Anteunis LJ, Valentijn SA et al. Does cognitive function in older adults with hearing impairment improve by hearing aid use? *Int J Audiol* 2005;44:265-271.
59. van Boxtel MP, van Beijsterveldt CE, Houx PJ, Anteunis LJ, Metsemakers JF, Jolles J. Mild hearing impairment can reduce verbal memory performance in a healthy adult population. *J Clin Exp Neuropsychol* 2000;22:147-154.
60. Kramer SE. Hearing impairment, work, and vocational enablement. *Int J Audiol* 2008;47 Suppl 2:S124-130.
61. Stark P, Hickson L. Outcomes of hearing aid fitting for older people with hearing impairment and their significant others. *Int J Audiol* 2004;43:390-398.
62. Mulrow CD, Aguilar C, Endicott JE et al. Quality-of-life changes and hearing impairment. A randomized trial. *Ann Intern Med* 1990;113:188-194.
63. Carabellese C, Appollonio I, Rozzini R et al. Sensory impairment and quality of life in a community elderly population. *J Am Geriatr Soc* 1993;41:401-407.
64. Abutan BB, Hoes AW, Van Dalsen CL, Verschuure J, Prins A. Prevalence of hearing impairment and hearing complaints in older adults: a study in general practice. *Fam Pract* 1993;10:391-395.
65. Weinstein BE, Ventry IM. Hearing impairment and social isolation in the elderly. *J Speech Hear Res* 1982;25:593-599.
66. Gilhorne Herbst KR, Meredith R, Stephens SD. Implications of hearing impairment for elderly people in London and in Wales. *Acta Otolaryngol Suppl* 1990;476:209-214.
67. Joore MA, Potjewijd J, Timmerman AA, Anteunis LJ. Response shift in the measurement of quality of life in hearing impaired adults after hearing aid fitting. *Qual Life Res* 2002;11:299-307.
68. Joore M, Brunenberg D, Zank H et al. Development of a questionnaire to measure hearing-related health state preferences framed in an overall health perspective. *Int J Technol Assess Health Care* 2002;18:528-539.
69. WHO. Rapport du secrétariat de l'OMS sur la mise en oeuvre de la stratégies mondiale de lutte contre les maladies non transmissibles.: WHO, 2008.
70. Shulman A. The cochleovestibular system/ototoxicity/clinical issues. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999;884:433-436.
71. Rybak LP, Ramkumar V. Ototoxicity. *Kidney Int.* 2007;72:931-935.
72. Rybak LP, Whitworth CA. Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discov.Today.* 2005;10:1313-1321.
73. Drusano GL, Ambrose PG, Bhavnani SM, Bertino JS, Nafziger AN, Louie A. Back to the future: using aminoglycosides again and how to dose them optimally. *Clin Infect Dis* 2007;45:753-760.
74. Raju TN. The Nobel chronicles. 1952: Selman Abraham Waksman (1888-1973). *Lancet* 1999;353:1536.
75. Mitnick CD, Shin SS, Seung KJ et al. Comprehensive treatment of extensively drug-resistant tuberculosis. *N.Engl.J.Med.* 2008;359:563-574.
76. Hainrichson M, Nudelman I, Baasov T. Designer aminoglycosides: the race to develop improved antibiotics and compounds for the treatment of human genetic diseases. *Org Biomol Chem* 2008;6:227-239.
77. Hermann T. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1841-1852.
78. Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;70:140-150.

79. Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev* 2005;105:477-498.
80. Levison ME, Chabner, B.A., Thompson E. *The Merck Manual*. Whitehouse Station, N.J.: Merck Research Laboratories, 2009.
81. WHO. *Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing*, 2009.
82. WHO. *Tuberculosis facts*, 2009.
83. Goubau P, Van Gompel A, Costy Fet al. *Repères en Microbiologie*. Louvain: Garant, 2000:391.
84. WHO. *XDR-TB(extensively drug-resistant TB) fact sheet*, 2007.
85. Muggia F. Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: implications for the treatment of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009;112:275-281.
86. Piccart MJ, Lamb H, Vermorken JB. Current and future potential roles of the platinum drugs in the treatment of ovarian cancer. *Ann Oncol* 2001;12:1195-1203.
87. Saldivar JS, Wu X, Follen M, Gershenson D. Nucleotide excision repair pathway review I: implications in ovarian cancer and platinum sensitivity. *Gynecol Oncol* 2007;107:S56-71.
88. WHO. *Fact sheet n°297: WHO*, 2009.
89. Forge A, Brown AM. Ultrastructural and electrophysiological studies of acute ototoxic effects of furosemide. *Br.J.Audiol.* 1982;16:109-116.
90. Hu N, Abbas PJ, Miller CA et al. Auditory response to intracochlear electric stimuli following furosemide treatment. *Hear.Res.* 2003;185:77-89.
91. Laurell G, Engstrom B. The combined effect of cisplatin and furosemide on hearing function in guinea pigs. *Hear.Res.* 1989;38:19-26.
92. Larsen WJ. *Human Embryology*. New York, 1997.
93. Corti A. *Recherches sur l'organe de Corti de l'ouïe des mammifères*. . In: *Zool Zw*, ed., 1851:1-106.
94. Munoz DJ, Thorne PR, Housley GD, Billett TE. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) concentrations in the endolymph and perilymph of the guinea-pig cochlea. *Hear.Res.* 1995;90:119-125.
95. Sterkers O, Saumon G, Tran Ba HP, Amiel C. Evidence for a perilymphatic origin of the endolymph: application to the pathophysiology of Meniere's disease. *Am.J.Otolaryngol.* 1982;3:367-375.
96. Couloigner V, Sterkers O, Ferrary E. What's new in ion transports in the cochlea? *Pflugers Arch* 2006;453:11-22.
97. Ricci AJ, Kachar B, Gale J, van Netten SM. Mechano-electrical transduction: new insights into old ideas. *J.Membr.Biol.* 2006;209:71-88.
98. Johnson SL, Forge A, Knipper M, Munkner S, Marcotti W. Tonotopic variation in the calcium dependence of neurotransmitter release and vesicle pool replenishment at mammalian auditory ribbon synapses. *J.Neurosci.* 2008;28:7670-7678.
99. Jacob LC, Aguiar FP, Tomiasi AA, Tschoeke SN, Bitencourt RF. Auditory monitoring in ototoxicity. *Rev.Bras.Otorrinolaringol.(Engl.Ed)* 2006;72:836-844.
100. Ruel J, Wang J, Rebillard Get al. Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear Res* 2007;227:19-27.
101. Guénard H. *Physiologie Humaine*. Editions Pradel. 2001:606.
102. Wu WJ, Sha SH, Schacht J. Recent advances in understanding aminoglycoside ototoxicity and its prevention. *Audiol.Neurootol.* 2002;7:171-174.
103. Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D, Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear.Res.* 2007;226:157-167.
104. Sha SH, Taylor R, Forge A, Schacht J. Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. *Hear.Res.* 2001;155:1-8.
105. Staecker H, Van De Water TR. Factors controlling hair-cell regeneration/repair in the inner ear. *Curr.Opin.Neurobiol.* 1998;8:480-487.
106. Roberson DW, Alosi JA, Mercola M, Cotanche DA. REST mRNA expression in normal and regenerating avian auditory epithelium. *Hear.Res.* 2002;172:62-72.
107. Poirrier A, Van den Ackerveken P, Kim Tet al. Ototoxic drugs: difference in sensitivity between mice and guinea pigs. *Toxicol Lett* 2009.
108. Wu WJ, Sha SH, McLaren JD, Kawamoto K, Raphael Y, Schacht J. Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA, C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat. *Hear.Res.* 2001;158:165-178.

109. Stebbins WC, Moody DB, Hawkins JE, Jr., Johnsson LG, Norat MA. The species-specific nature of the ototoxicity of dihydrostreptomycin in the patas monkey. *Neurotoxicology*. 1987;8:33-44.
110. Rizzi MD, Hirose K. Aminoglycoside ototoxicity. *Curr.Opin.Otolaryngol.Head Neck Surg*. 2007;15:352-357.
111. Contopoulos-Ioannidis DG, Giotis ND, Baliatsa DV, Ioannidis JP. Extended-interval aminoglycoside administration for children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2004;114:e111-118.
112. Imamura S, Adams JC. Distribution of gentamicin in the guinea pig inner ear after local or systemic application. *J.Assoc.Res.Otolaryngol*. 2003;4:176-195.
113. Richardson GP, Russell IJ. Cochlear cultures as a model system for studying aminoglycoside induced ototoxicity. *Hear.Res*. 1991;53:293-311.
114. Tran Ba Huy P, Deffrennes D. Aminoglycoside binding sites in the inner ears of guinea pigs. *Antimicrob.Agents Chemother*. 1988;32:467-472.
115. Hashino E, Shero M. Endocytosis of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells. *Brain Res*. 1995;704:135-140.
116. Richardson GP, Forge A, Kros CJ, Fleming J, Brown SD, Steel KP. Myosin VIIA is required for aminoglycoside accumulation in cochlear hair cells. *J.Neurosci*. 1997;17:9506-9519.
117. Richardson GP, Forge A, Kros CJ et al. A missense mutation in myosin VIIA prevents aminoglycoside accumulation in early postnatal cochlear hair cells. *Ann N Y Acad Sci* 1999;884:110-124.
118. Marcotti W, van Netten SM, Kros CJ. The aminoglycoside antibiotic dihydrostreptomycin rapidly enters mouse outer hair cells through the mechano-electrical transducer channels. *J.Physiol*. 2005;567:505-521.
119. Hirose K, Westrum LE, Cunningham DE, Rubel EW. Electron microscopy of degenerative changes in the chick basilar papilla after gentamicin exposure. *J Comp Neurol* 2004;470:164-180.
120. Hashino E, Shero M, Salvi RJ. Lysosomal targeting and accumulation of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells. *Brain Res* 1997;777:75-85.
121. Schacht J. Antioxidant therapy attenuates aminoglycoside-induced hearing loss. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 1999;884:125-130.
122. Lesniak W, Pecoraro VL, Schacht J. Ternary complexes of gentamicin with iron and lipid catalyze formation of reactive oxygen species. *Chem.Res.Toxicol*. 2005;18:357-364.
123. Priuska EM, Schacht J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem.Pharmacol*. 1995;50:1749-1752.
124. Sha SH, Schacht J. Formation of reactive oxygen species following bioactivation of gentamicin. *Free Radic.Biol.Med*. 1999;26:341-347.
125. Hong SH, Park SK, Cho Y et al. Gentamicin induced nitric oxide-related oxidative damages on vestibular afferents in the guinea pig. *Hear Res* 2006;211:46-53.
126. Jiang H, Sha SH, Schacht J. Rac/Rho pathway regulates actin depolymerization induced by aminoglycoside antibiotics. *J.Neurosci.Res*. 2006;83:1544-1551.
127. Hirose K, Hockenbery DM, Rubel EW. Reactive oxygen species in chick hair cells after gentamicin exposure in vitro. *Hear.Res*. 1997;104:1-14.
128. Choung YH, Taura A, Pak K, Choi SJ, Masuda M, Ryan AF. Generation of highly-reactive oxygen species is closely related to hair cell damage in rat organ of Corti treated with gentamicin. *Neuroscience* 2009;161:214-226.
129. Ylikoski J, Xing-Qun L, Virkkala J, Pirvola U. Blockade of c-Jun N-terminal kinase pathway attenuates gentamicin-induced cochlear and vestibular hair cell death. *Hear.Res*. 2002;163:71-81.
130. Wang J, Van De Water TR, Bonny C, de RF, Puel JL, Zine A. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against both aminoglycoside and acoustic trauma-induced auditory hair cell death and hearing loss. *J.Neurosci*. 2003;23:8596-8607.
131. Forge A, Schacht J. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol.Neurotol*. 2000;5:3-22.
132. Lesniak W, Harris WR, Kravitz JY, Schacht J, Pecoraro VL. Solution chemistry of copper(II)-gentamicin complexes: relevance to metal-related aminoglycoside toxicity. *Inorg.Chem*. 2003;42:1420-1429.

133. Jiang H, Sha SH, Schacht J. Kanamycin alters cytoplasmic and nuclear phosphoinositide signaling in the organ of Corti in vivo. *J.Neurochem.* 2006;99:269-276.
134. Basile AS, Huang JM, Xie C, Webster D, Berlin C, Skolnick P. N-methyl-D-aspartate antagonists limit aminoglycoside antibiotic-induced hearing loss. *Nat Med* 1996;2:1338-1343.
135. Sha SH, Schacht J. Are aminoglycoside antibiotics excitotoxic? *Neuroreport* 1998;9:3893-3895.
136. Jiang H, Sha SH, Schacht J. NF-kappaB pathway protects cochlear hair cells from aminoglycoside-induced ototoxicity. *J.Neurosci.Res.* 2005;79:644-651.
137. Spoendlin H. Factors inducing retrograde degeneration of the cochlear nerve. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1984;112:76-82.
138. Webster M, Webster DB. Spiral ganglion neuron loss following organ of Corti loss: a quantitative study. *Brain Res.* 1981;212:17-30.
139. Miller JM, Chi DH, O'Keeffe LJ, Kruszka P, Raphael Y, Altschuler RA. Neurotrophins can enhance spiral ganglion cell survival after inner hair cell loss. *Int.J.Dev.Neurosci.* 1997;15:631-643.
140. Dugan LL, Creedon DJ, Johnson EM, Jr., Holtzman DM. Rapid suppression of free radical formation by nerve growth factor involves the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997;94:4086-4091.
141. Schulz JB, Bremen D, Reed JC et al. Cooperative interception of neuronal apoptosis by BCL-2 and BAG-1 expression: prevention of caspase activation and reduced production of reactive oxygen species. *J Neurochem* 1997;69:2075-2086.
142. Huang T, Cheng AG, Stupak Het al. Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. *Int.J.Dev.Neurosci.* 2000;18:259-270.
143. Linthicum FH, Jr., Fayad JN. Spiral ganglion cell loss is unrelated to segmental cochlear sensory system degeneration in humans. *Otol Neurotol* 2009;30:418-422.
144. Teufert KB, Linthicum FH, Jr., Connell SS. The effect of organ of corti loss on ganglion cell survival in humans. *Otol Neurotol* 2006;27:1146-1151.
145. Hinojosa R, Nelson EG, Lerner SA, Redleaf MI, Schramm DR. Aminoglycoside ototoxicity: a human temporal bone study. *Laryngoscope* 2001;111:1797-1805.
146. Sone M, Schachern PA, Paparella MM. Loss of spiral ganglion cells as primary manifestation of aminoglycoside ototoxicity. *Hear.Res.* 1998;115:217-223.
147. Hinojosa R, Lerner SA. Cochlear neural degeneration without hair cell loss in two patients with aminoglycoside ototoxicity. *J Infect Dis* 1987;156:449-455.
148. Mulheran M, Degg C. Comparison of distortion product OAE generation between a patient group requiring frequent gentamicin therapy and control subjects. *Br J Audiol* 1997;31:5-9.
149. Stavroulaki P, Vossinakis IC, Dinopoulou D, Doudounakis S, Adamopoulos G, Apostolopoulos N. Otoacoustic emissions for monitoring aminoglycoside-induced ototoxicity in children with cystic fibrosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:150-155.
150. Song BB, Anderson DJ, Schacht J. Protection from gentamicin ototoxicity by iron chelators in guinea pig in vivo. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1997;282:369-377.
151. Brummett RE, Fox KE. Aminoglycoside-induced hearing loss in humans. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1989;33:797-800.
152. Guthrie OW. Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology.* 2008;.
153. Ekborn A, Lindberg A, Laurell G, Wallin I, Eksborg S, Ehrsson H. Ototoxicity, nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in the guinea pig. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;51:36-42.
154. Ekborn A, Laurell G, Johnstrom P, Wallin I, Eksborg S, Ehrsson H. D-Methionine and cisplatin ototoxicity in the guinea pig: D-methionine influences cisplatin pharmacokinetics. *Hear Res* 2002;165:53-61.
155. Videhult P, Laurell G, Wallin I, Ehrsson H. Kinetics of Cisplatin and its monohydrated complex with sulfur-containing compounds designed for local otoprotective administration. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:1638-1645.
156. van Ruijven MW, de Groot JC, Smoorenburg GF. Time sequence of degeneration pattern in the guinea pig cochlea during cisplatin administration. A quantitative histological study. *Hear.Res.* 2004;197:44-54.

157. Rybak LP, Husain K, Morris C, Whitworth C, Somani S. Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. *Am J Otol* 2000;21:513-520.
158. Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J.Biol.Chem.* 2004;279:46065-46072.
159. Mukherjea D, Whitworth CA, Nandish S, Dunaway GA, Rybak LP, Ramkumar V. Expression of the kidney injury molecule 1 in the rat cochlea and induction by cisplatin. *Neuroscience* 2006;139:733-740.
160. Humes HD. Insights into ototoxicity. Analogies to nephrotoxicity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999;884:15-18.
161. Hellberg V, Wallin I, Eriksson S et al. Cisplatin and oxaliplatin toxicity: importance of cochlear kinetics as a determinant for ototoxicity. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:37-47.
162. Li G, Liu W, Frenz D. Cisplatin ototoxicity to the rat inner ear: a role for HMG1 and iNOS. *Neurotoxicology* 2006;27:22-30.
163. Mukherjea D, Jajoo S, Whitworth C et al. Short interfering RNA against transient receptor potential vanilloid 1 attenuates cisplatin-induced hearing loss in the rat. *J Neurosci* 2008;28:13056-13065.
164. Kohn S, Fradis M, Pratt H et al. Cisplatin ototoxicity in guinea pigs with special reference to toxic effects in the stria vascularis. *Laryngoscope.* 1988;98:865-871.
165. Lee JE, Nakagawa T, Kita T et al. Mechanisms of apoptosis induced by cisplatin in marginal cells in mouse stria vascularis. *ORL J.Otorhinolaryngol.Relat Spec.* 2004;66:111-118.
166. Meech RP, Campbell KC, Hughes LP, Rybak LP. A semiquantitative analysis of the effects of cisplatin on the rat stria vascularis. *Hear Res* 1998;124:44-59.
167. Alam SA, Ikeda K, Oshima T et al. Cisplatin-induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlea. *Hear Res* 2000;141:28-38.
168. Watanabe K, Inai S, Jinnouchi K, Baba S, Yagi T. Expression of caspase-activated deoxyribonuclease (CAD) and caspase 3 (CPP32) in the cochlea of cisplatin (CDDP)-treated guinea pigs. *Auris Nasus Larynx* 2003;30:219-225.
169. Iwasaki S, Mizuta K, Gao J, Wu R, Hoshino T. Focal microcirculation disorder induced by photochemical reaction in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 1997;108:55-64.
170. Hinojosa R, Riggs LC, Strauss M, Matz GJ. Temporal bone histopathology of cisplatin ototoxicity. *Am J Otol* 1995;16:731-740.
171. Rademaker-Lakhai JM, Crul M, Zuur L et al. Relationship between cisplatin administration and the development of ototoxicity. *J Clin Oncol* 2006;24:918-924.
172. Waters GS, Ahmad M, Katsarkas A, Stanimir G, McKay J. Ototoxicity due to cis-diamminedichloroplatinum in the treatment of ovarian cancer: influence of dosage and schedule of administration. *Ear Hear* 1991;12:91-102.
173. Malgrange B, Rigo JM, Coucke P et al. Identification of factors that maintain mammalian outer hair cells in adult organ of Corti explants. *Hear.Res.* 2002;170:48-58.
174. Malgrange B, Rogister B, Lefebvre P et al. Expression of growth factors and their receptors in the postnatal rat cochlea. *Neurochem.Res.* 1998;23:1133-1138.
175. Kuang R, Hever G, Zajic G et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor. Potential for otoprotection. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999;884:270-91.:270-291.
176. Suzuki M, Yagi M, Brown JN, Miller AL, Miller JM, Raphael Y. Effect of transgenic GDNF expression on gentamicin-induced cochlear and vestibular toxicity. *Gene Ther.* 2000;7:1046-1054.
177. Yagi M, Magal E, Sheng Z, Ang KA, Raphael Y. Hair cell protection from aminoglycoside ototoxicity by adenovirus-mediated overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Hum Gene Ther* 1999;10:813-823.
178. Shoji F, Yamasoba T, Magal E, Dolan DF, Altschuler RA, Miller JM. Glial cell line-derived neurotrophic factor has a dose dependent influence on noise-induced hearing loss in the guinea pig cochlea. *Hear.Res.* 2000;142:41-55.
179. Keithley EM, Ma CL, Ryan AF, Louis JC, Magal E. GDNF protects the cochlea against noise damage. *Neuroreport* 1998;9:2183-2187.
180. Yamasoba T, Schacht J, Shoji F, Miller JM. Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo. *Brain Res.* 1999;815:317-325.

181. Hakuba N, Watabe K, Hyodo J et al. Adenovirus-mediated overexpression of a gene prevents hearing loss and progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. *Gene Ther* 2003;10:426-433.
182. Ylikoski J, Pirvola U, Virkkala J et al. Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived growth factor from degeneration after noise trauma. *Hear.Res.* 1998;124:17-26.
183. Green SH, Altschuler RA, Miller JM. Cell Death and Cochlear Protection. In: Schacht J, Popper AN, Fay RR, eds. *Auditory Trauma, Protection and Repair*: Springer US, 2008:275-319.
184. Iwata T, Hevner RF. Fibroblast growth factor signaling in development of the cerebral cortex. *Dev Growth Differ* 2009;51:299-323.
185. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001;2:REVIEWS3005.
186. Lee KH, Cotanche DA. Potential role of bFGF and retinoic acid in the regeneration of chicken cochlear hair cells. *Hear Res* 1996;94:1-13.
187. Sliwinska-Kowalska M, Rzdzińska A, Rajkowska E, Malczyk M. Expression of bFGF and NGF and their receptors in chick's auditory organ following overexposure to noise. *Hear Res* 2005;210:93-103.
188. Umemoto M, Sakagami M, Fukazawa K et al. Hair cell regeneration in the chick inner ear following acoustic trauma: ultrastructural and immunohistochemical studies. *Cell Tissue Res* 1995;281:435-443.
189. Zhai SQ, Wang DJ, Wang JL, Han DY, Yang WY. Basic fibroblast growth factor protects auditory neurons and hair cells from glutamate neurotoxicity and noise exposure. *Acta Otolaryngol* 2004;124:124-129.
190. Zhai SQ, Cheng JC, Wang JL, Yang WY, Gu R, Jiang SC. Protective effect of basic fibroblast growth factor on auditory hair cells after noise exposure. *Acta Otolaryngol* 2002;122:370-373.
191. Yamasoba T, Altschuler RA, Raphael Y, Miller AL, Shoji F, Miller JM. Absence of hair cell protection by exogenous FGF-1 and FGF-2 delivered to guinea pig cochlea in vivo. *Noise Health* 2001;3:65-78.
192. Carnicero E, Zelaryan LC, Ruttiger L et al. Differential roles of fibroblast growth factor-2 during development and maintenance of auditory sensory epithelia. *J Neurosci Res* 2004;77:787-797.
193. Pirvola U, Cao Y, Oellig C, Suoqiang Z, Pettersson RF, Ylikoski J. The site of action of neuronal acidic fibroblast growth factor is the organ of Corti of the rat cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9269-9273.
194. Pickles JO, Harter C, Rebillard G. Fibroblast growth factor receptor expression in outer hair cells of rat cochlea. *Neuroreport* 1998;9:4093-4095.
195. Zine A, de Ribaupierre F. Replacement of mammalian auditory hair cells. *Neuroreport* 1998;9:263-268.
196. Staecker H, Dazert S, Malgrange B, Lefebvre PP, Ryan AF, Van De Water TR. Transforming growth factor alpha treatment alters intracellular calcium levels in hair cells and protects them from ototoxic damage in vitro. *Int.J.Dev.Neurosci.* 1997;15:553-562.
197. Daudet N, Ripoll C, Lenoir M. Transforming growth factor-alpha-induced cellular changes in organotypic cultures of juvenile, amikacin-treated rat organ of Corti. *J Comp Neurol* 2002;442:6-22.
198. Kopke RD, Jackson RL, Li G et al. Growth factor treatment enhances vestibular hair cell renewal and results in improved vestibular function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;98:5886-5891.
199. Caye-Thomasen P, Wagner N, Lidgaard FB, Asal K, Thomsen J. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in the guinea pig inner ear. *Hear.Res.* 2005;203:21-27.
200. Monge Naldi A, Gassmann M, Bodmer D. Erythropoietin but not VEGF has a protective effect on auditory hair cells in the inner ear. *Cell Mol Life Sci* 2009.
201. Andreeva N, Nyamaa A, Haupt H, Gross J, Mazurek B. Recombinant human erythropoietin prevents ischemia-induced apoptosis and necrosis in explant cultures of the rat organ of Corti. *Neurosci Lett* 2006;396:86-90.
202. Monge A, Nagy I, Bonabi S, Schmid S, Gassmann M, Bodmer D. The effect of erythropoietin on gentamicin-induced auditory hair cell loss. *Laryngoscope* 2006;116:312-316.

203. Shoji F, Miller AL, Mitchell A, Yamasoba T, Altschuler RA, Miller JM. Differential protective effects of neurotrophins in the attenuation of noise-induced hair cell loss. *Hear.Res.* 2000;146:134-142.
204. Malgrange B, Lefebvre P, Van De Water TR, Staecker H, Moonen G. Effects of neurotrophins on early auditory neurones in cell culture. *Neuroreport.* 1996;7:913-917.
205. Pettingill LN, Minter RL, Shepherd RK. Schwann cells genetically modified to express neurotrophins promote spiral ganglion neuron survival in vitro. *Neuroscience.* 2008;152:821-828.
206. Staecker H, Galinovic-Schwartz V, Liu Wet al. The role of the neurotrophins in maturation and maintenance of postnatal auditory innervation. *Am.J.Otol.* 1996;17:486-492.
207. Staecker H, Kopke R, Malgrange B, Lefebvre P, Van De Water TR. NT-3 and/or BDNF therapy prevents loss of auditory neurons following loss of hair cells. *Neuroreport.* 1996;7:889-894.
208. Fritzscht B, Tessarollo L, Coppola E, Reichardt LF. Neurotrophins in the ear: their roles in sensory neuron survival and fiber guidance. *Prog.Brain Res.* 2004;146:265-78.:265-278.
209. Kopke R, Staecker H, Lefebvre Pet al. Effect of neurotrophic factors on the inner ear: clinical implications. *Acta Otolaryngol.* 1996;116:248-252.
210. Sugawara M, Murtie JC, Stankovic KM, Liberman MC, Corfas G. Dynamic patterns of neurotrophin 3 expression in the postnatal mouse inner ear. *J.Comp Neurol.* 2007;501:30-37.
211. Ernfors P, Duan ML, ElShamy WM, Canlon B. Protection of auditory neurons from aminoglycoside toxicity by neurotrophin-3. *Nat Med* 1996;2:463-467.
212. Shinohara T, Bredberg G, Ulfendahl Met al. Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002;99:1657-1660.
213. Zheng JL, Stewart RR, Gao WQ. Neurotrophin-4/5 enhances survival of cultured spiral ganglion neurons and protects them from cisplatin neurotoxicity. *J.Neurosci.* 1995;15:5079-5087.
214. Silos-Santiago I, Fagan AM, Garber M, Fritzscht B, Barbacid M. Severe sensory deficits but normal CNS development in newborn mice lacking TrkB and TrkC tyrosine protein kinase receptors. *Eur J Neurosci* 1997;9:2045-2056.
215. Schimmang T, Alvarez-Bolado G, Minichiello Let al. Survival of inner ear sensory neurons in trk mutant mice. *Mech Dev* 1997;64:77-85.
216. Agerman K, Canlon B, Duan M, Ernfors P. Neurotrophins, NMDA receptors, and nitric oxide in development and protection of the auditory system. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999;884:131-142.
217. Clough RL, Sud R, vis-Silberman Net al. Brn-3c (POU4F3) regulates BDNF and NT-3 promoter activity. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2004;324:372-381.
218. Van De Water TR, Staecker H, Halterman MW, Federoff HJ. Gene therapy in the inner ear. Mechanisms and clinical implications. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999;884:345-60.:345-360.
219. Tan J, Shepherd RK. Aminoglycoside-induced degeneration of adult spiral ganglion neurons involves differential modulation of tyrosine kinase B and p75 neurotrophin receptor signaling. *Am.J.Pathol.* 2006;169:528-543.
220. Sariola H, Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 2003;116:3855-3862.
221. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:383-394.
222. Liu Y, Okada T, Shimazaki Ket al. Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. *Mol Ther* 2008;16:474-480.
223. Yagi M, Kanzaki S, Kawamoto Ket al. Spiral ganglion neurons are protected from degeneration by GDNF gene therapy. *J.Assoc.Res.Otolaryngol.* 2000;1:315-325.
224. Lautermann J, McLaren J, Schacht J. Glutathione protection against gentamicin ototoxicity depends on nutritional status. *Hear.Res.* 1995;86:15-24.
225. Lautermann J, Song B, McLaren J, Schacht J. Diet is a risk factor in cisplatin ototoxicity. *Hear.Res.* 1995;88:47-53.

226. Fetoni AR, Sergi B, Ferraresi A, Paludetti G, Troiani D. alpha-Tocopherol protective effects on gentamicin ototoxicity: an experimental study. *Int.J.Audiol.* 2004;43:166-171.
227. Fetoni AR, Sergi B, Ferraresi A, Paludetti G, Troiani D. Protective effects of alpha-tocopherol and tiopronin against cisplatin-induced ototoxicity. *Acta Otolaryngol.* 2004;124:421-426.
228. Sergi B, Fetoni AR, Ferraresi A et al. The role of antioxidants in protection from ototoxic drugs. *Acta Otolaryngol.Suppl* 2004:42-45.
229. Fetoni AR, Sergi B, Scarano E, Paludetti G, Ferraresi A, Troiani D. Protective effects of alpha-tocopherol against gentamicin-induced Oto-vestibulo toxicity: an experimental study. *Acta Otolaryngol.* 2003;123:192-197.
230. Kalkanis JG, Whitworth C, Rybak LP. Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope* 2004;114:538-542.
231. Teranishi M, Nakashima T, Wakabayashi T. Effects of alpha-tocopherol on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Hear.Res.* 2001;151:61-70.
232. Sha SH, Schacht J. Antioxidants attenuate gentamicin-induced free radical formation in vitro and ototoxicity in vivo: D-methionine is a potential protectant. *Hear.Res.* 2000;142:34-40.
233. Campbell KC, Meech RP, Klemens JJ et al. Prevention of noise- and drug-induced hearing loss with D-methionine. *Hear Res* 2007;226:92-103.
234. Bock GR, Yates GK, Miller JJ, Moorjani P. Effects of N-acetylcysteine on kanamycin ototoxicity in the guinea pig. *Hear Res* 1983;9:255-262.
235. Dickey DT, Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and in vivo levels. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:1052-1058.
236. Duan M, Qiu J, Laurell G, Olofsson A, Counter SA, Borg E. Dose and time-dependent protection of the antioxidant N-L-acetylcysteine against impulse noise trauma. *Hear.Res.* 2004;192:1-9.
237. Feghali JG, Liu W, Van De Water TR. L-n-acetyl-cysteine protection against cisplatin-induced auditory neuronal and hair cell toxicity. *Laryngoscope.* 2001;111:1147-1155.
238. Feldman L, Efrati S, Eviatar E et al. Gentamicin-induced ototoxicity in hemodialysis patients is ameliorated by N-acetylcysteine. *Kidney Int* 2007;72:359-363.
239. Tepel M. N-Acetylcysteine in the prevention of ototoxicity. *Kidney Int* 2007;72:231-232.
240. Chen Y, Huang WG, Zha D et al. Aspirin attenuates gentamicin ototoxicity: From the laboratory to the clinic. *Hear.Res.* 2006.
241. Hyppolito MA, de Oliveira JA, Rossato M. Cisplatin ototoxicity and otoprotection with sodium salicylate. *Eur.Arch.Otorhinolaryngol.* 2006;263:798-803.
242. Li G, Sha SH, Zotova E, Arezzo J, Van de WT, Schacht J. Salicylate protects hearing and kidney function from cisplatin toxicity without compromising its oncolytic action. *Lab Invest* 2002;82:585-596.
243. Minami SB, Sha SH, Schacht J. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. *Hear.Res.* 2004;198:137-143.
244. Sha SH, Schacht J. Salicylate attenuates gentamicin-induced ototoxicity. *Lab Invest* 1999;79:807-813.
245. Conlon BJ, Aran JM, Erre JP, Smith DW. Attenuation of aminoglycoside-induced cochlear damage with the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Hear.Res.* 1999;128:40-44.
246. Long M, Smouha EE, Qiu D, Li F, Johnson F, Luft B. Flavanoid of *Drynaria fortunei* protects against gentamicin ototoxicity. *Phytother Res* 2004;18:609-614.
247. Schmitt NC, Rubel EW, Nathanson NM. Cisplatin-induced hair cell death requires STAT1 and is attenuated by epigallocatechin gallate. *J Neurosci* 2009;29:3843-3851.
248. Xie D, Liu G, Zhu G, Wu W, Ge S. (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects cultured spiral ganglion cells from H₂O₂-induced oxidizing damage. *Acta Otolaryngol* 2004;124:464-470.
249. Kawamoto K, Sha SH, Minoda R et al. Antioxidant gene therapy can protect hearing and hair cells from ototoxicity. *Mol.Ther.* 2004;9:173-181.

250. Takumida M, Popa R, Anniko M. Free radicals in the guinea pig inner ear following gentamicin exposure. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1999;61:63-70.
251. Jung HW, Chang SO, Kim CS, Rhee CS, Lim DH. Effects of Ginkgo biloba extract on the cochlear damage induced by local gentamicin installation in guinea pigs. *J Korean Med Sci* 1998;13:525-528.
252. Wang AM, Sha SH, Lesniak W, Schacht J. Tanshinone (Salviae miltiorrhizae extract) preparations attenuate aminoglycoside-induced free radical formation in vitro and ototoxicity in vivo. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2003;47:1836-1841.
253. Mostafa BE, Tawfik S, Hefnawi NG, Hassan MA, Ismail FA. The role of deferoxamine in the prevention of gentamicin ototoxicity: a histological and audiological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 2007;127:234-239.
254. Song BB, Schacht J. Variable efficacy of radical scavengers and iron chelators to attenuate gentamicin ototoxicity in guinea pig in vivo. *Hear.Res.* 1996;94:87-93.
255. Conlon BJ, Perry BP, Smith DW. Attenuation of neomycin ototoxicity by iron chelation. *Laryngoscope* 1998;108:284-287.
256. Song BB, Sha SH, Schacht J. Iron chelators protect from aminoglycoside-induced cochleo- and vestibulo-toxicity. *Free Radic.Biol.Med.* 1998;25:189-195.
257. Sinswat P, Wu WJ, Sha SH, Schacht J. Protection from ototoxicity of intraperitoneal gentamicin in guinea pig. *Kidney Int.* 2000;58:2525-2532.
258. Severinsen SA, Kirkegaard M, Nyengaard JR. 2,3-Dihydroxybenzoic acid attenuates kanamycin-induced volume reduction in mouse utricular type I hair cells. *Hear Res* 2006;212:99-108.
259. Pierson MG, Moller AR. Prophylaxis of kanamycin-induced ototoxicity by a radioprotectant. *Hear Res* 1981;4:79-87.
260. Garetz SL, Altschuler RA, Schacht J. Attenuation of gentamicin ototoxicity by glutathione in the guinea pig in vivo. *Hear.Res.* 1994;77:81-87.
261. Hochman J, Blakley BW, Wellman M, Blakley L. Prevention of aminoglycoside-induced sensorineural hearing loss. *J.Otolaryngol.* 2006;35:153-156.
262. Asplund MS, Lidian A, Linder B, Takumida M, Anniko M. Protective effect of edaravone against tobramycin-induced ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 2009;129:8-13.
263. Sha SH, Qiu JH, Schacht J. Aspirin to prevent gentamicin-induced hearing loss. *N.Engl.J.Med.* 2006;354:1856-1857.
264. Conlon BJ, Smith DW. Supplemental iron exacerbates aminoglycoside ototoxicity in vivo. *Hear.Res.* 1998;115:1-5.
265. Kays SE, Crowell WA, Johnson MA. Iron supplementation increases gentamicin nephrotoxicity in rats. *J.Nutr.* 1991;121:1869-1875.
266. Mukherjea D, Jajoo S, Kaur T, Sheehan KE, Ramkumar V, Rybak LP. Transtympanic Administration of Short Interfering (si)RNA for the NOX3 Isoform of NADPH Oxidase Protects Against Cisplatin-Induced Hearing Loss in the Rat. *Antioxid Redox Signal* 2010.
267. Whitworth CA, Ramkumar V, Jones B, Tsukasaki N, Rybak LP. Protection against cisplatin ototoxicity by adenosine agonists. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1801-1807.
268. Lynch ED, Gu R, Pierce C, Kil J. Reduction of acute cisplatin ototoxicity and nephrotoxicity in rats by oral administration of allopurinol and ebselen. *Hear.Res.* 2005;201:81-89.
269. Kelly TC, Whitworth CA, Husain K, Rybak LP. Aminoguanidine reduces cisplatin ototoxicity. *Hear Res* 2003;186:10-16.
270. Iraz M, Kalcioğlu MT, Kizilay A, Karatas E. Aminoguanidine prevents ototoxicity induced by cisplatin in rats. *Ann Clin Lab Sci* 2005;35:329-335.
271. Watanabe KI, Hess A, Bloch W, Michel O. Nitric oxide synthase inhibitor suppresses the ototoxic side effect of cisplatin in guinea pigs. *Anticancer Drugs* 2000;11:401-406.
272. Teranishi MA, Nakashima T. Effects of trolox, locally applied on round windows, on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003;67:133-139.
273. Kizilay A, Kalcioğlu MT, Ozerol E et al. Caffeic acid phenethyl ester ameliorated ototoxicity induced by cisplatin in rats. *J Chemother* 2004;16:381-387.
274. Huang X, Whitworth CA, Rybak LP. Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects against cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Otol Neurotol* 2007;28:828-833.

275. Choe WT, Chinosornvatana N, Chang KW. Prevention of cisplatin ototoxicity using transtympanic N-acetylcysteine and lactate. *Otol Neurotol* 2004;25:910-915.
276. Church MW, Blakley BW, Burgio DL, Gupta AK. WR-2721 (Amifostine) ameliorates cisplatin-induced hearing loss but causes neurotoxicity in hamsters: dose-dependent effects. *J Assoc Res Otolaryngol* 2004;5:227-237.
277. Rybak LP, Ravi R, Somani SM. Mechanism of protection by diethyldithiocarbamate against cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Fundam Appl Toxicol* 1995;26:293-300.
278. Rybak LP, Whitworth C, Somani S. Application of antioxidants and other agents to prevent cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope*. 1999;109:1740-1744.
279. Church MW, Kaltenbach JA, Blakley BW, Burgio DL. The comparative effects of sodium thiosulfate, diethyldithiocarbamate, fosfomycin and WR-2721 on ameliorating cisplatin-induced ototoxicity. *Hear Res* 1995;86:195-203.
280. Kaltenbach JA, Church MW, Blakley BW, McCaslin DL, Burgio DL. Comparison of five agents in protecting the cochlea against the ototoxic effects of cisplatin in the hamster. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;117:493-500.
281. Kalcioğlu MT, Kizilay A, Gulec Met al. The protective effect of erdoesteine against ototoxicity induced by cisplatin in rats. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005;262:856-863.
282. Campbell KC, Larsen DL, Meech RP, Rybak LP, Hughes LF. Glutathione ester but not glutathione protects against cisplatin-induced ototoxicity in a rat model. *J Am Acad Audiol* 2003;14:124-133.
283. Husain K, Whitworth C, Somani SM, Rybak LP. Partial protection by lipoic acid against carboplatin-induced ototoxicity in rats. *Biomed Environ Sci* 2005;18:198-206.
284. Rybak LP, Husain K, Whitworth C, Somani SM. Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system. *Toxicol Sci* 1999;47:195-202.
285. Korver KD, Rybak LP, Whitworth C, Campbell KM. Round window application of D-methionine provides complete cisplatin otoprotection. *Otolaryngol. Head Neck Surg*. 2002;126:683-689.
286. Wimmer C, Mees K, Stumpf P, Welsch U, Reichel O, Suckfull M. Round window application of D-methionine, sodium thiosulfate, brain-derived neurotrophic factor, and fibroblast growth factor-2 in cisplatin-induced ototoxicity. *Otol Neurotol* 2004;25:33-40.
287. Campbell KC, Rybak LP, Meech RP, Hughes L. D-methionine provides excellent protection from cisplatin ototoxicity in the rat. *Hear Res* 1996;102:90-98.
288. Campbell KC, Meech RP, Rybak LP, Hughes LF. The effect of D-methionine on cochlear oxidative state with and without cisplatin administration: mechanisms of otoprotection. *J Am Acad Audiol* 2003;14:144-156.
289. Rybak LP, Husain K, Evenson L, Morris C, Whitworth C, Somani SM. Protection by 4-methylthiobenzoic acid against cisplatin-induced ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacol Toxicol* 1997;81:173-179.
290. Fetoni AR, Quaranta N, Marchese R, Cadoni G, Paludetti G, Sergi B. The protective role of tiopronin in cisplatin ototoxicity in Wistar rats. *Int J Audiol* 2004;43:465-470.
291. Otto WC, Brown RD, Gage-White Let al. Effects of cisplatin and thiosulfate upon auditory brainstem responses of guinea pigs. *Hear Res* 1988;35:79-85.
292. Wang J, Lloyd Faulconbridge RV, Fetoni A, Guitton MJ, Pujol R, Puel JL. Local application of sodium thiosulfate prevents cisplatin-induced hearing loss in the guinea pig. *Neuropharmacology* 2003;45:380-393.
293. Muldoon LL, Pagel MA, Kroll RA et al. Delayed administration of sodium thiosulfate in animal models reduces platinum ototoxicity without reduction of antitumor activity. *Clin Cancer Res* 2000;6:309-315.
294. Saito T, Zhang ZJ, Manabe Y, Ohtsubo T, Saito H. The effect of sodium thiosulfate on ototoxicity and pharmacokinetics after cisplatin treatment in guinea pigs. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1997;254:281-286.
295. Doolittle ND, Muldoon LL, Brummett RE et al. Delayed sodium thiosulfate as an otoprotectant against carboplatin-induced hearing loss in patients with malignant brain tumors. *Clin Cancer Res* 2001;7:493-500.

296. Ekborn A, Laurell G, Ehrsson H, Miller J. Intracochlear administration of thiourea protects against cisplatin-induced outer hair cell loss in the guinea pig. *Hear Res* 2003;181:109-115.
297. Schweitzer VG. Cisplatin-induced ototoxicity: the effect of pigmentation and inhibitory agents. *Laryngoscope*. 1993;103:1-52.
298. Daldal A, Odabasi O, Serbetcioglu B. The protective effect of intratympanic dexamethasone on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;137:747-752.
299. Hill GW, Morest DK, Parham K. Cisplatin-induced ototoxicity: effect of intratympanic dexamethasone injections. *Otol Neurotol* 2008;29:1005-1011.
300. Kim HJ, Lee JH, Kim SJet al. Roles of NADPH oxidases in Cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. *J Neurosci* 2010;30:3933-3946.
301. So H, Kim H, Lee JHet al. Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NF-kappaB. *J Assoc Res Otolaryngol* 2007;8:338-355.
302. Seidman MD, Shivapuja BG, Quirk WS. The protective effects of allopurinol and superoxide dismutase on noise-induced cochlear damage. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;109:1052-1056.
303. Cassandro E, Sequino L, Mondola P, Attanasio G, Barbara M, Filippo R. Effect of superoxide dismutase and allopurinol on impulse noise-exposed guinea pigs--electrophysiological and biochemical study. *Acta Otolaryngol* 2003;123:802-807.
304. Hu BH, Zheng XY, McFadden SL, Kopke RD, Henderson D. R-phenylisopropyladenosine attenuates noise-induced hearing loss in the chinchilla. *Hear Res* 1997;113:198-206.
305. Henderson D, McFadden SL, Liu CC, Hight N, Zheng XY. The role of antioxidants in protection from impulse noise. *Ann N Y Acad Sci* 1999;884:368-380.
306. Wong AC, Guo CX, Gupta R, Housley GD, Thorne PR, Vlajkovic SM. Post exposure administration of A(1) adenosine receptor agonists attenuates noise-induced hearing loss. *Hear Res* 2010.
307. Franze A, Sequino L, Saulino C, Attanasio G, Marciano E. Effect over time of allopurinol on noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Int J Audiol* 2003;42:227-234.
308. Yamashita D, Jiang HY, Le Prell CG, Schacht J, Miller JM. Post-exposure treatment attenuates noise-induced hearing loss. *Neuroscience* 2005;134:633-642.
309. Ohinata Y, Miller JM, Schacht J. Protection from noise-induced lipid peroxidation and hair cell loss in the cochlea. *Brain Res*. 2003;966:265-273.
310. Kopke RD, Weisskopf PA, Boone JLet al. Reduction of noise-induced hearing loss using L-NAC and salicylate in the chinchilla. *Hear Res* 2000;149:138-146.
311. Ohinata Y, Yamasoba T, Schacht J, Miller JM. Glutathione limits noise-induced hearing loss. *Hear.Res.* 2000;146:28-34.
312. Yamasoba T, Nuttall AL, Harris C, Raphael Y, Miller JM. Role of glutathione in protection against noise-induced hearing loss. *Brain Res* 1998;784:82-90.
313. Hirose Y, Sugahara K, Mikuriya T, Hashimoto M, Shimogori H, Yamashita H. Effect of water-soluble coenzyme Q10 on noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 2008;128:1071-1076.
314. Pourbakht A, Yamasoba T. Ebselen attenuates cochlear damage caused by acoustic trauma. *Hear Res* 2003;181:100-108.
315. Yamasoba T, Pourbakht A, Sakamoto T, Suzuki M. Ebselen prevents noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift. *Neurosci Lett* 2005;380:234-238.
316. Adelman C, Freeman S, Paz Z, Sohmer H. Salicylic Acid Injection before Noise Exposure Reduces Permanent Threshold Shift. *Audiol.Neurotol.* 2008;13:266-272.
317. Minami SB, Yamashita D, Ogawa K, Schacht J, Miller JM. Creatine and tempol attenuate noise-induced hearing loss. *Brain Res*. 2007;1148:83-89.
318. Wang J, Pignol B, Chabrier PEet al. A novel dual inhibitor of calpains and lipid peroxidation (BN82270) rescues the cochlea from sound trauma. *Neuropharmacology*. 2007;52:1426-1437.
319. Casabona G. Intracellular signal modulation: a pivotal role for protein kinase C. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 1997;21:407-425.
320. Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J.Biol.Chem.* 1995;270:28495-28498.

321. Poole AW, Pula G, Hers I, Crosby D, Jones ML. PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *Trends Pharmacol.Sci.* 2004;25:528-535.
322. Lallemand F, Hadjab S, Hans G, Moonen G, Lefebvre PP, Malgrange B. Activation of protein kinase C β 1 constitutes a new neurotrophic pathway for deafferented spiral ganglion neurons. *J.Cell Sci.* 2005;118:4511-4525.
323. Gonelli A, Mischianti C, Guerrini R, Voltan R, Salvadori S, Zauli G. Perspectives of protein kinase C (PKC) inhibitors as anti-cancer agents. *Mini Rev Med Chem* 2009;9:498-509.
324. Singh R, Sharma M, Joshi P, Rawat DS. Clinical status of anti-cancer agents derived from marine sources. *Anticancer Agents Med Chem* 2008;8:603-617.
325. Kortmansky J, Schwartz GK. Bryostatins: a novel PKC inhibitor in clinical development. *Cancer Invest* 2003;21:924-936.
326. Etcheberrigaray R, Tan M, Dewachter J et al. Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004;101:11141-11146.
327. Nelson TJ, Cui C, Luo Y, Alkon DL. Reduction of beta-amyloid levels by novel protein kinase C(epsilon) activators. *J Biol Chem* 2009;284:34514-34521.
328. Sun MK, Hongpaisan J, Alkon DL. Postischemic PKC activation rescues retrograde and anterograde long-term memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:14676-14680.
329. Sun MK, Hongpaisan J, Nelson TJ, Alkon DL. Poststroke neuronal rescue and synaptogenesis mediated in vivo by protein kinase C in adult brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13620-13625.
330. Rosenegger D, Parvez K, Lukowiak K. Enhancing memory formation by altering protein phosphorylation balance. *Neurobiol Learn Mem* 2008;90:544-552.
331. Sun MK, Alkon DL. Protein kinase C activators as synaptogenic and memory therapeutics. *Arch Pharm (Weinheim)* 2009;342:689-698.
332. Bebchuk JM, Arfken CL, Dolan-Manji S, Murphy J, Hasanat K, Manji HK. A preliminary investigation of a protein kinase C inhibitor in the treatment of acute mania. *Arch Gen Psychiatry* 2000;57:95-97.
333. Datta SR, Dudek H, Tao X et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997;91:231-241.
334. Dudek H, Datta SR, Franke TF et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science.* 1997;275:661-665.
335. Zhong J, Yao W, Lee W. Cesium chloride protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by low potassium. *Int.J.Dev.Neurosci.* 2007;25:359-365.
336. Birkenkamp KU, Coffey PJ. FOXO transcription factors as regulators of immune homeostasis: molecules to die for? *J.Immunol.* 2003;171:1623-1629.
337. Brunet A, Bonni A, Zigmond M et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 1999;96:857-868.
338. Yamaguchi H, Wang HG. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene.* 2001;20:7779-7786.
339. Cavanaugh JE, Ham J, Hetman M, Poser S, Yan C, Xia Z. Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurotrophins, neuronal activity, and cAMP in neurons. *J.Neurosci.* 2001;21:434-443.
340. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* 2000;261:44-51.
341. Schmandke A, Strittmatter SM. ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases. *Neuroscientist* 2007;13:454-469.
342. Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:690-701.
343. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509-514.
344. Kollmar R. Who does the hair cell's 'do? Rho GTPases and hair-bundle morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:394-398.
345. Zhang M, Kalinec GM, Urrutia R, Billadeau DD, Kalinec F. ROCK-dependent and ROCK-independent control of cochlear outer hair cell electromotility. *J Biol Chem* 2003;278:35644-35650.
346. Kalinec F, Zhang M, Urrutia R, Kalinec G. Rho GTPases mediate the regulation of cochlear outer hair cell motility by acetylcholine. *J Biol Chem* 2000;275:28000-28005.

347. Lynch ED, Lee MK, Morrow JE, Welch PL, Leon PE, King MC. Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene *diaphanous*. *Science* 1997;278:1315-1318.
348. Weil D, Levy G, Sahly et al. Human myosin VIIA responsible for the Usher 1B syndrome: a predicted membrane-associated motor protein expressed in developing sensory epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3232-3237.
349. Weil D, Blanchard S, Kaplan J et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 1995;374:60-61.
350. Gibson F, Walsh J, Mburu P et al. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene *shaker-1*. *Nature* 1995;374:62-64.
351. Sugahara K, Rubel EW, Cunningham LL. JNK signaling in neomycin-induced vestibular hair cell death. *Hear Res* 2006;221:128-135.
352. Shirai H, Autieri M, Eguchi S. Small GTP-binding proteins and mitogen-activated protein kinases as promising therapeutic targets of vascular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007;16:111-115.
353. Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 2005;33:891-895.
354. Lopez-Illasaca M. Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol* 1998;56:269-277.
355. Bodmer D, Brors D, Pak K, Gloddek B, Ryan A. Rescue of auditory hair cells from aminoglycoside toxicity by *Clostridium difficile* toxin B, an inhibitor of the small GTPases Rho/Rac/Cdc42. *Hear Res* 2002;172:81-86.
356. Bito H, Furuyashiki T, Ishihara H et al. A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron* 2000;26:431-441.
357. Feltri ML, Suter U, Relvas JB. The function of RhoGTPases in axon ensheathment and myelination. *Glia* 2008;56:1508-1517.
358. Chiba Y, Kuroda S, Shichinohe H et al. Synergistic effects of bone marrow stromal cells and a Rho kinase (ROCK) inhibitor, Fasudil on axon regeneration in rat spinal cord injury. *Neuropathology* 2009.
359. Furuya T, Hashimoto M, Koda M et al. Treatment of rat spinal cord injury with a Rho-kinase inhibitor and bone marrow stromal cell transplantation. *Brain Res* 2009;1295:192-202.
360. Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD, McKerracher L. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci* 2002;22:6570-6577.
361. McKerracher L, Higuchi H. Targeting Rho to stimulate repair after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2006;23:309-317.
362. Sagawa H, Terasaki H, Nakamura M et al. A novel ROCK inhibitor, Y-39983, promotes regeneration of crushed axons of retinal ganglion cells into the optic nerve of adult cats. *Exp Neurol* 2007;205:230-240.
363. Lingor P, Teusch N, Schwarz K et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan in vitro and axonal regeneration in the adult optic nerve in vivo. *J Neurochem* 2007;103:181-189.
364. Ellezam B, Dubreuil C, Winton M et al. Inactivation of intracellular Rho to stimulate axon growth and regeneration. *Prog Brain Res* 2002;137:371-380.
365. Fontainhas AM, Townes-Anderson E. RhoA and its role in synaptic structural plasticity of isolated salamander photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:4177-4187.
366. Ding J, Yu JZ, Li QY, Wang X, Lu CZ, Xiao BG. Rho kinase inhibitor Fasudil induces neuroprotection and neurogenesis partially through astrocyte-derived G-CSF. *Brain Behav Immun* 2009;23:1083-1088.
367. Shin HK, Salomone S, Ayata C. Targeting cerebrovascular Rho-kinase in stroke. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12:1547-1564.
368. Ding J, Li QY, Yu JZ et al. Fasudil, a Rho kinase inhibitor, drives mobilization of adult neural stem cells after hypoxia/reoxygenation injury in mice. *Mol Cell Neurosci* 2009.
369. Satoh S, Toshima Y, Hitomi A, Ikegaki I, Seto M, Asano T. Wide therapeutic time window for Rho-kinase inhibition therapy in ischemic brain damage in a rat cerebral thrombosis model. *Brain Res* 2008;1193:102-108.

370. Yagita Y, Kitagawa K, Sasaki Tet al. Rho-kinase activation in endothelial cells contributes to expansion of infarction after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2007;85:2460-2469.
371. Chrissobolis S, Sobey CG. Recent evidence for an involvement of rho-kinase in cerebral vascular disease. *Stroke* 2006;37:2174-2180.
372. Li Q, Huang XJ, He Wet al. Neuroprotective potential of fasudil mesylate in brain ischemia-reperfusion injury of rats. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29:169-180.
373. Huang L, He Z, Guo L, Wang H. Improvement of cognitive deficit and neuronal damage in rats with chronic cerebral ischemia via relative long-term inhibition of rho-kinase. *Cell Mol Neurobiol* 2008;28:757-768.
374. Gisselsson L, Toresson H, Ruscher K, Wieloch T. Rho kinase inhibition protects CA1 cells in organotypic hippocampal slices during in vitro ischemia. *Brain Res* 2010;1316:92-100.
375. Kubo T, Yamashita T. Rho-ROCK inhibitors for the treatment of CNS injury. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2007;2:173-179.
376. Tang BL. Alzheimer's disease: channeling APP to non-amyloidogenic processing. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:375-378.
377. Leuchtenberger S, Kummer MP, Kukar Tet al. Inhibitors of Rho-kinase modulate amyloid-beta (Abeta) secretion but lack selectivity for Abeta42. *J Neurochem* 2006;96:355-365.
378. Chen TJ, Hung HS, Wang DC, Chen SS. The protective effect of ROCK inhibitor on aluminum-induced neurotoxicity in rat cortical neurons. *Toxicol Sci* 2010.
379. Wang PL, Niidome T, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H. Rac1 inhibition negatively regulates transcriptional activity of the amyloid precursor protein gene. *J Neurosci Res* 2009;87:2105-2114.
380. Bauer PO, Wong HK, Oyama Fet al. Inhibition of Rho kinases enhances the degradation of mutant huntingtin. *J Biol Chem* 2009;284:13153-13164.
381. Bauer PO, Nukina N. Enhanced degradation of mutant huntingtin by rho kinase inhibition is mediated through activation of proteasome and macroautophagy. *Autophagy* 2009;5:747-748.
382. Li M, Huang Y, Ma AA, Lin E, Diamond MI. Y-27632 improves rotarod performance and reduces huntingtin levels in R6/2 mice. *Neurobiol Dis* 2009;36:413-420.
383. Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, Mori K, Negishi M. RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 2001;276:18977-18983.
384. Julien S, Schnichels S, Teng Het al. Purkinje cell survival in organotypic cultures: implication of Rho and its downstream effector ROCK. *J Neurosci Res* 2008;86:531-536.
385. Tura A, Schuettauf F, Monnier PP, Bartz-Schmidt KU, Henke-Fahle S. Efficacy of Rho-kinase inhibition in promoting cell survival and reducing reactive gliosis in the rodent retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:452-461.
386. Bermel C, Tonges L, Planchamp Vet al. Combined inhibition of Cdk5 and ROCK additively increase cell survival, but not the regenerative response in regenerating retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci* 2009;42:427-437.
387. Lingor P, Tonges L, Pieper Net al. ROCK inhibition and CNTF interact on intrinsic signalling pathways and differentially regulate survival and regeneration in retinal ganglion cells. *Brain* 2008;131:250-263.
388. Takehara T, Teramura T, Onodera Yet al. Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 promotes survival of cynomolgus monkey embryonic stem cells. *Mol Hum Reprod* 2008;14:627-634.
389. Koyanagi M, Takahashi J, Arakawa Yet al. Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors. *J Neurosci Res* 2008;86:270-280.
390. Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci* 2003;23:1416-1423.
391. Sekiya T, Kojima K, Matsumoto M, Ito J. "Replacement of diseased auditory neurons by cell transplantation". *Front Biosci* 2008;13:2165-2176.
392. Budzyn K, Sobey CG. Vascular rho kinases and their potential therapeutic applications. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2007;10:590-596.

393. Olson MF. Applications for ROCK kinase inhibition. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:242-248.
394. Billings KR, Kenna MA. Causes of pediatric sensorineural hearing loss: yesterday and today. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 1999;125:517-521.
395. Morzaria S, Westerberg BD, Kozak FK. Systematic review of the etiology of bilateral sensorineural hearing loss in children. *Int.J.Pediatr.Otorhinolaryngol.* 2004;68:1193-1198.
396. Schacht J. Biochemistry and pharmacology of aminoglycoside-induced hearing loss. *Acta Physiol Pharmacol.Ther.Latinoam.* 1999;49:251-256.
397. Ikeda K, Oshima T, Hidaka H, Takasaka T. Molecular and clinical implications of loop diuretic ototoxicity. *Hear Res* 1997;107:1-8.
398. Jahnke K. The blood-perilymph barrier. *Arch Otorhinolaryngol* 1980;228:29-34.
399. Aran JM, Erre JP, Lima da CD, Debarh I, Dulon D. Acute and chronic effects of aminoglycosides on cochlear hair cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999;884:60-8.:60-68.
400. Boot R, Walvoort HC. Otitis media in guinea pigs: pathology and bacteriology. *Lab Anim* 1986;20:242-248.
401. Brown SD, Hardisty-Hughes RE, Mburu P. Quiet as a mouse: dissecting the molecular and genetic basis of hearing. *Nat.Rev.Genet.* 2008;9:277-290.
402. Bai YH, Ren CC, Gong XR, Meng LP. A maternal hereditary deafness pedigree of the A1555G mitochondrial mutation, causing aminoglycoside ototoxicity predisposition. *J Laryngol Otol* 2008;122:1037-1041.
403. Gurtler N, Schmuziger N, Kim Y, Mhatre AN, Jungi M, Lalwani AK. Audiologic testing and molecular analysis of 12S rRNA in patients receiving aminoglycosides. *Laryngoscope* 2005;115:640-644.
404. Fischel-Ghodsian N. Genetic factors in aminoglycoside toxicity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999;884:99-109.
405. Fischel-Ghodsian N. Genetic factors in aminoglycoside toxicity. *Pharmacogenomics.* 2005;6:27-36.
406. Prestayko AW, Cadiz M, Crooke ST. Incompatibility of aluminum-containing iv administration equipment with cis-dichlorodiammineplatinum(II) administration. *Cancer Treat Rep* 1979;63:2118-2119.
407. Praetorius M, Baker K, Brough DE, Plinkert P, Staecker H. Pharmacodynamics of adenovector distribution within the inner ear tissues of the mouse. *Hear Res* 2007;227:53-58.
408. Liu Y, Okada T, Sheykholeslami Ket al. Specific and efficient transduction of Cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther* 2005;12:725-733.
409. Jiang H, Fine JP. Survival analysis. *Methods Mol Biol* 2007;404:303-318.
410. Fleming TR, Lin DY. Survival analysis in clinical trials: past developments and future directions. *Biometrics* 2000;56:971-983.
411. Li G, Frenz DA, Brahmsblatt Set al. Round window membrane delivery of L-methionine provides protection from cisplatin ototoxicity without compromising chemotherapeutic efficacy. *Neurotoxicology* 2001;22:163-176.
412. Kamimura T, Whitworth CA, Rybak LP. Effect of 4-methylthiobenzoic acid on cisplatin-induced ototoxicity in the rat. *Hear Res* 1999;131:117-127.
413. Zhou X, Jen PH, Seburn KL, Frankel WN, Zheng QY. Auditory brainstem responses in 10 inbred strains of mice. *Brain Res.* 2006;.
414. Huang CM. A comparative study of the brain stem auditory response in mammals. *Brain Res* 1980;184:215-219.
415. Perera PY, Lichy JH, Mastropaolo J, Rosse RB, Deutsch SI. Expression of NR1, NR2A and NR2B NMDA receptor subunits is not altered in the genetically-inbred Balb/c mouse strain with heightened behavioral sensitivity to MK-801, a noncompetitive NMDA receptor antagonist. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008;18:814-819.
416. Hamre K, Tharp R, Poon K, Xiong X, Smeyne RJ. Differential strain susceptibility following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration acts in an autosomal dominant fashion: quantitative analysis in seven strains of *Mus musculus*. *Brain Res* 1999;828:91-103.

417. Peng YG, Clayton EC, Means LW, Ramsdell JS. Repeated independent exposures to domoic acid do not enhance symptomatic toxicity in outbred or seizure-sensitive inbred mice. *Fundam Appl Toxicol* 1997;40:63-67.
418. Schauwecker PE, Steward O. Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: implications for gene targeting approaches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4103-4108.
419. Kitahara T, Li-Korotky HS, Balaban CD. Regulation of mitochondrial uncoupling proteins in mouse inner ear ganglion cells in response to systemic kanamycin challenge. *Neuroscience* 2005;135:639-653.
420. Kitahara T, Li HS, Balaban CD. Changes in transient receptor potential cation channel superfamily V (TRPV) mRNA expression in the mouse inner ear ganglia after kanamycin challenge. *Hear.Res.* 2005;201:132-144.
421. Unal OF, Ghoreishi SM, Atas A, Akyurek N, Akyol G, Gursel B. Prevention of gentamicin induced ototoxicity by trimetazidine in animal model. *Int.J.Pediatr.Otorhinolaryngol.* 2005;69:193-199.
422. Jiang H, Sha SH, Forge A, Schacht J. Caspase-independent pathways of hair cell death induced by kanamycin in vivo. *Cell Death.Differ.* 2006;13:20-30.
423. Liu YH, Ke XM, Qin Y, Gu ZP, Xiao SF. Adeno-associated virus-mediated Bcl-xL prevents aminoglycoside-induced hearing loss in mice. *Chin Med.J.(Engl.)* 2007;120:1236-1240.
424. Taylor RR, Nevill G, Forge A. Rapid Hair Cell Loss: A Mouse Model for Cochlear Lesions. *J.Assoc.Res.Otolaryngol.* 2007.
425. Oesterle EC, Campbell S, Taylor RR, Forge A, Hume CR. Sox2 and Jagged1 Expression in Normal and Drug-Damaged Adult Mouse Inner Ear. *J.Assoc.Res.Otolaryngol.* 2007;.
426. Staecker H, Praetorius M, Baker K, Brough DE. Vestibular hair cell regeneration and restoration of balance function induced by math1 gene transfer. *Otol.Neurotol.* 2007;28:223-231.
427. Gooi A, Hochman J, Wellman M, Blakley L, Blakley BW. Ototoxic effects of single-dose versus 19-day daily-dose gentamicin. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;37:664-667.
428. Blakley BW, Hochman J, Wellman M, Gooi A, Hussain AE. Differences in Ototoxicity across Species. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;37:700-703.
429. Taleb M, Brandon CS, Lee FS, Harris KC, Dillmann WH, Cunningham LL. Hsp70 inhibits aminoglycoside-induced hearing loss and cochlear hair cell death. *Cell Stress Chaperones* 2009.
430. Hartman BH, Basak O, Nelson BR, Taylor V, Bermingham-McDonogh O, Reh TA. Hes5 Expression in the Postnatal and Adult Mouse Inner Ear and the Drug-Damaged Cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* 2009.
431. Bowers WJ, Chen X, Guo H, Frisina DR, Federoff HJ, Frisina RD. Neurotrophin-3 transduction attenuates cisplatin spiral ganglion neuron ototoxicity in the cochlea. *Mol.Ther.* 2002;6:12-18.
432. So H, Kim H, Kim Yet al. Evidence that Cisplatin-induced Auditory Damage is Attenuated by Downregulation of Pro-inflammatory Cytokines Via Nrf2/HO-1. *J.Assoc.Res.Otolaryngol.* 2008.
433. Yang B, Bankir L. Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F881-896.
434. Walton K, Dorne JL, Renwick AG. Species-specific uncertainty factors for compounds eliminated principally by renal excretion in humans. *Food Chem Toxicol* 2004;42:261-274.
435. Meza G, Aguilar-Maldonado B. Streptomycin action to the mammalian inner ear vestibular organs: comparison between pigmented guinea pigs and rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2007;146:203-206.
436. Lataye R, Campo P, Pouyatos B, Cossec B, Blachere V, Morel G. Solvent ototoxicity in the rat and guinea pig. *Neurotoxicol Teratol* 2003;25:39-50.
437. King FG, Dedrick RL, Farris FF. Physiological pharmacokinetic modeling of cis-dichlorodiammineplatinum(II) (DDP) in several species. *J Pharmacokinet Biopharm* 1986;14:131-155.

438. Tran Ba Huy P, Bernard P, Schacht J. Kinetics of gentamicin uptake and release in the rat. Comparison of inner ear tissues and fluids with other organs. *J.Clin.Invest.* 1986;77:1492-1500.
439. Farris FF, Dedrick RL, King FG. Cisplatin pharmacokinetics: applications of a physiological model. *Toxicol Lett* 1988;43:117-137.
440. van Ruijven MW, de Groot JC, Klis SF, Smoorenburg GF. The cochlear targets of cisplatin: an electrophysiological and morphological time-sequence study. *Hear Res* 2005;205:241-248.
441. Dai CF, Steyger PS. A systemic gentamicin pathway across the stria vascularis. *Hear Res* 2008;235:114-124.
442. Wang Q, Steyger PS. Trafficking of Systemic Fluorescent Gentamicin into the Cochlea and Hair Cells. *J Assoc Res Otolaryngol* 2009.
443. Laurell G, Ekborn A, Viberg A, Canlon B. Effects of a single high dose of cisplatin on the melanocytes of the stria vascularis in the guinea pig. *Audiol Neurootol* 2007;12:170-178.
444. Swan EE, Mescher MJ, Sewell WF, Tao SL, Borenstein JT. Inner ear drug delivery for auditory applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1583-1599.
445. Nakano Y, Kim SH, Kim HMet al. A claudin-9-based ion permeability barrier is essential for hearing. *PLoS Genet* 2009;5:e1000610.
446. Belguith H, Tlili A, Dhouib Het al. Mutation in gap and tight junctions in patients with non-syndromic hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;385:1-5.
447. Elkouby-Naor L, Abassi Z, Lagziel A, Gow A, Ben-Yosef T. Double gene deletion reveals lack of cooperation between claudin 11 and claudin 14 tight junction proteins. *Cell Tissue Res* 2008;333:427-438.
448. Kitajiri S, Miyamoto T, Mineharu Aet al. Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential. *J Cell Sci* 2004;117:5087-5096.
449. Gow A, Davies C, Southwood CMet al. Deafness in Claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function. *J Neurosci* 2004;24:7051-7062.
450. Ben-Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TLet al. Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet* 2003;12:2049-2061.
451. Florian P, Amasheh S, Lessidrensky Met al. Claudins in the tight junctions of stria vascularis marginal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:5-10.
452. Kitajiri SI, Furuse M, Morita Ket al. Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear. *Hear Res* 2004;187:25-34.
453. Dai CF, Mangiardi D, Cotanche DA, Steyger PS. Uptake of fluorescent gentamicin by vertebrate sensory cells in vivo. *Hear Res* 2006;213:64-78.
454. Anniko M. Principles in cochlear toxicity. *Arch.Toxicol.Suppl.* 1985;8:221-39.:221-239.
455. Leonova EV, Raphael Y. Organization of cell junctions and cytoskeleton in the reticular lamina in normal and ototoxically damaged organ of Corti. *Hear Res* 1997;113:14-28.
456. Kim TS, Nakagawa T, Endo Tet al. Alteration of E-cadherin and beta-catenin in mouse vestibular epithelia during induction of apoptosis. *Neurosci.Lett.* 2002;329:173-176.
457. Ciruna B, Rossant J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell* 2001;1:37-49.
458. Low W, Dazert S, Baird A, Ryan AF. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) protects rat cochlear hair cells in organotypical culture from aminoglycoside injury. *J.Cell Physiol.* 1996;167:443-450.
459. Lautermann J, Crann SA, McLaren J, Schacht J. Glutathione-dependent antioxidant systems in the mammalian inner ear: effects of aging, ototoxic drugs and noise. *Hear.Res.* 1997;114:75-82.
460. Misra M, Rodriguez RE, North SL, Kasprzak KS. Nickel-induced renal lipid peroxidation in different strains of mice: concurrence with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicol Lett* 1991;58:121-133.

461. Klemens JJ, Meech RP, Hughes LF, Somani S, Campbell KC. Antioxidant enzyme levels inversely covary with hearing loss after amikacin treatment. *J Am Acad Audiol* 2003;14:134-143.
462. Nelson TJ, Alkon DL. Neuroprotective versus tumorigenic protein kinase C activators. *Trends Biochem Sci* 2009;34:136-145.
463. Lee HW, Smith L, Pettit GR, Smith JB. Bryostatin 1 and phorbol ester down-modulate protein kinase C-alpha and -epsilon via the ubiquitin/proteasome pathway in human fibroblasts. *Mol Pharmacol* 1997;51:439-447.
464. Lorenzo PS, Bogi K, Hughes KMet al. Differential roles of the tandem C1 domains of protein kinase C delta in the biphasic down-regulation induced by bryostatin 1. *Cancer Res* 1999;59:6137-6144.
465. Van De Water TR, Lallemand F, Eshraghi AAet al. Caspases, the enemy within, and their role in oxidative stress-induced apoptosis of inner ear sensory cells. *Otol.Neurotol.* 2004;25:627-632.
466. Matsui JI, Gale JE, Warchol ME. Critical signaling events during the aminoglycoside-induced death of sensory hair cells in vitro. *J.Neurobiol.* 2004;61:250-266.
467. Liu W, Staecker H, Stupak H, Malgrange B, Lefebvre P, Van De Water TR. Caspase inhibitors prevent cisplatin-induced apoptosis of auditory sensory cells. *Neuroreport.* 1998;9:2609-2614.
468. Wang J, Ladrech S, Pujol R, Brabet P, Van De Water TR, Puel JL. Caspase inhibitors, but not c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor treatment, prevent cisplatin-induced hearing loss. *Cancer Res.* 2004;64:9217-9224.
469. Imamura S, Adams JC. Changes in cytochemistry of sensory and nonsensory cells in gentamicin-treated cochleas. *J.Assoc.Res.Otolaryngol.* 2003;4:196-218.
470. Wagner N, Caye-Thomasen P, Laurell G, Bagger-Sjoberg D, Thomsen J. Cochlear hair cell loss in single-dose versus continuous round window administration of gentamicin. *Acta Otolaryngol.* 2005;125:340-345.
471. Okuda T, Sugahara K, Shimogori H, Yamashita H. Inner ear changes with intracochlear gentamicin administration in Guinea pigs. *Laryngoscope.* 2004;114:694-697.
472. Bae WY, Kim LS, Hur DY, Jeong SW, Kim JR. Secondary apoptosis of spiral ganglion cells induced by aminoglycoside: Fas-Fas ligand signaling pathway. *Laryngoscope* 2008;118:1659-1668.
473. Wagner N, Caye-Thomasen P, Laurell G, Bagger-Sjoberg D, Thomsen J. Cochlear hair cell loss in single-dose versus continuous round window administration of gentamicin. *Acta Otolaryngol* 2005;125:340-345.
474. Suzuki M, Ushio M, Yamasoba T. Time course of apoptotic cell death in guinea pig cochlea following intratympanic gentamicin application. *Acta Otolaryngol* 2008;128:724-731.
475. Versnel H, Agterberg MJ, de Groot JC, Smoorenburg GF, Klis SF. Time course of cochlear electrophysiology and morphology after combined administration of kanamycin and furosemide. *Hear.Res.* 2007;.
476. McFadden SL, Ding D, Jiang H, Salvi RJ. Time course of efferent fiber and spiral ganglion cell degeneration following complete hair cell loss in the chinchilla. *Brain Res* 2004;997:40-51.
477. Dodson HC, Mohuiddin A. Response of spiral ganglion neurones to cochlear hair cell destruction in the guinea pig. *J Neurocytol* 2000;29:525-537.
478. Wang J, Dib M, Lenoir Met al. Riluzole rescues cochlear sensory cells from acoustic trauma in the guinea-pig. *Neuroscience* 2002;111:635-648.
479. Delprat B, Boulanger A, Wang Jet al. Downregulation of otospiralin, a novel inner ear protein, causes hair cell degeneration and deafness. *J.Neurosci.* 2002;22:1718-1725.
480. Ruel J, Wang J, Pujol R, Hameg A, Dib M, Puel JL. Neuroprotective effect of riluzole in acute noise-induced hearing loss. *Neuroreport* 2005;16:1087-1090.
481. Eshraghi AA, Wang J, Adil Eet al. Blocking c-Jun-N-terminal kinase signaling can prevent hearing loss induced by both electrode insertion trauma and neomycin ototoxicity. *Hear.Res.* 2007;226:168-177.
482. Gillespie LN, Clark GM, Bartlett PF, Marzella PL. BDNF-induced survival of auditory neurons in vivo: Cessation of treatment leads to accelerated loss of survival effects. *J.Neurosci.Res.* 2003;71:785-790.

483. Richardson RT, O'Leary S, Wise A, Hardman J, Clark G. A single dose of neurotrophin-3 to the cochlea surrounds spiral ganglion neurons and provides trophic support. *Hear.Res.* 2005;204:37-47.
484. McGuinness SL, Shepherd RK. Exogenous BDNF rescues rat spiral ganglion neurons in vivo. *Otol.Neurotol.* 2005;26:1064-1072.
485. Burry RW. PKC activators (phorbol ester or bryostatin) stimulate outgrowth of NGF-dependent neurites in a subline of PC12 cells. *J Neurosci Res* 1998;53:214-222.
486. Singh KR, Taylor LK, Campbell XZ, Fields AP, Neet KE. A bryostatin-sensitive protein kinase C required for nerve growth factor activity. *Biochemistry* 1994;33:542-551.
487. Campbell XZ, Neet KE. Hierarchical analysis of the nerve growth factor-dependent and nerve growth factor-independent differentiation signaling pathways in PC12 cells with protein kinase inhibitors. *J Neurosci Res* 1995;42:207-219.
488. Hegarty JL, Kay AR, Green SH. Trophic support of cultured spiral ganglion neurons by depolarization exceeds and is additive with that by neurotrophins or cAMP and requires elevation of $[Ca^{2+}]_i$ within a set range. *J.Neurosci.* 1997;17:1959-1970.
489. Cheng AG, Huang T, Stracher A et al. Calpain inhibitors protect auditory sensory cells from hypoxia and neurotrophin-withdrawal induced apoptosis. *Brain Res.* 1999;850:234-243.
490. Dodson HC. Loss and survival of spiral ganglion neurons in the guinea pig after intracochlear perfusion with aminoglycosides. *J.Neurocytol.* 1997;26:541-556.
491. Puel JL, Pujol R, Tribillac F, Ladrech S, Eybalin M. Excitatory amino acid antagonists protect cochlear auditory neurons from excitotoxicity. *J.Comp Neurol.* 1994;341:241-256.
492. Roehm PC, Hansen MR. Strategies to preserve or regenerate spiral ganglion neurons. *Curr.Opin.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 2005;13:294-300.
493. Leake PA, Hradek GT, Rebscher SJ, Snyder RL. Chronic intracochlear electrical stimulation induces selective survival of spiral ganglion neurons in neonatally deafened cats. *Hear Res* 1991;54:251-271.
494. Leake PA, Hradek GT, Snyder RL. Chronic electrical stimulation by a cochlear implant promotes survival of spiral ganglion neurons after neonatal deafness. *J.Comp Neurol.* 1999;412:543-562.
495. Jones D, Metzger HJ, Schatz A, Waksman SA. Control of Gram-Negative Bacteria in Experimental Animals by Streptomycin. *Science* 1944;100:103-105.
496. Finegold SM, Winfield ME, Aronsohn RB, Hewitt WL, Guze LB. Clinical experience with kanamycin. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1958;76:319-347.
497. Fleischman RW, Stadnicki SW, Ethier MF, Schaeppi U. Ototoxicity of cis-dichlorodiammine platinum (II) in the guinea pig. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 1975;33:320-332.
498. Wersall J, Hawkins JE, Jr. The vestibular sensory epithelia in the cat labyrinth and their reactions in chronic streptomycin intoxication. *Acta Otolaryngol.* 1962;54:1-23.:1-23.
499. Farkashidy J, Black RG, Briant TD. The effect of kanamycin on the internal ear: an electrophysiological and electron microscopic study. *Laryngoscope.* 1963;73:713-27.:713-727.
500. Desrochers CS, Schacht J. Neomycin concentrations in inner ear tissues and other organs of the guinea pig after chronic drug administration. *Acta Otolaryngol.* 1982;93:233-236.
501. Ding D, McFadden SL, Browne RW, Salvi RJ. Late dosing with ethacrynic acid can reduce gentamicin concentration in perilymph and protect cochlear hair cells. *Hear.Res.* 2003;185:90-96.
502. Dulon D, Aran JM, Zajic G, Schacht J. Comparative uptake of gentamicin, netilmicin, and amikacin in the guinea pig cochlea and vestibule. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1986;30:96-100.
503. Federspil P, Schatzle W, Tiesler E. Pharmacokinetics and ototoxicity of gentamicin, tobramycin, and amikacin. *J.Infect.Dis.* 1976;134 Suppl:S200-5.:S200-S205.
504. Nilsson TM, Tjalve H. Whole-body autoradiography of $[^3H]$ dihydrostreptomycin in guinea pigs and rats: the labelling of the inner ear in relation to other tissues. *Acta Otolaryngol.* 1986;101:247-256.

505. Plontke SK, Mynatt R, Gill RM, Borgmann S, Salt AN. Concentration gradient along the scala tympani after local application of gentamicin to the round window membrane. *Laryngoscope* 2007;117:1191-1198.
506. Tran Ba Huy P, Meulemans A, Wassef M, Manuel C, Sterkers O, Amiel C. Gentamicin persistence in rat endolymph and perilymph after a two-day constant infusion. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1983;23:344-346.
507. Miettinen S, Laurell G, Andersson A, Johansson R, Laurikainen E. Blood flow-independent accumulation of cisplatin in the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol* 1997;117:55-60.
508. Clerici WJ, Hensley K, DiMartino DL, Butterfield DA. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res* 1996;98:116-124.
509. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* 2002;265:49-72.
510. Sha SH, Schacht J. Stimulation of free radical formation by aminoglycoside antibiotics. *Hear.Res.* 1999;128:112-118.
511. Shi X, Ren T, Nuttall AL. The electrochemical and fluorescence detection of nitric oxide in the cochlea and its increase following loud sound. *Hear Res* 2002;164:49-58.
512. Van Campen LE, Murphy WJ, Franks JR, Mathias PI, Toraason MA. Oxidative DNA damage is associated with intense noise exposure in the rat. *Hear Res* 2002;164:29-38.
513. Sha SH, Zajic G, Epstein CJ, Schacht J. Overexpression of copper/zinc-superoxide dismutase protects from kanamycin-induced hearing loss. *Audiol.Neurootol.* 2001;6:117-123.
514. Roth SM, Williams SM, Jiang L, Menon KS, Jeka JJ. Susceptibility genes for gentamicin-induced vestibular dysfunction. *J Vestib Res* 2008;18:59-68.
515. Bindu LH, Reddy PP. Genetics of aminoglycoside-induced and prelingual non-syndromic mitochondrial hearing impairment: a review. *Int J Audiol* 2008;47:702-707.
516. Ross CJ, Katzov-Eckert H, Dube MP et al. Genetic variants in TPMT and COMT are associated with hearing loss in children receiving cisplatin chemotherapy. *Nat Genet* 2009;41:1345-1349.
517. Huang RS, Duan S, Shukla S et al. Identification of genetic variants contributing to cisplatin-induced cytotoxicity by use of a genomewide approach. *Am J Hum Genet* 2007;81:427-437.
518. Riedemann L, Lanvers C, Deuster Det et al. Megalin genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Pharmacogenomics J* 2008;8:23-28.
519. Miller CR, McLeod HL. Pharmacogenomics of cancer chemotherapy-induced toxicity. *J Support Oncol* 2007;5:9-14.
520. Efferth T, Volm M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* 2005;107:155-176.
521. Ansari M, Krajcinovic M. Pharmacogenomics in cancer treatment defining genetic bases for inter-individual differences in responses to chemotherapy. *Curr Opin Pediatr* 2007;19:15-22.
522. Marsh S, McLeod HL. Cancer pharmacogenetics. *Br J Cancer* 2004;90:8-11.
523. Zaiou M, Benachour H, Marteau JB, Visvikis-Siest S, Siest G. Genomics and the prospects of existing and emerging therapeutics for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 2009;15:3193-3206.
524. Pereira NL, Weinshilboum RM. Cardiovascular pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Nat Rev Cardiol* 2009;6:632-638.
525. Rowan K. Should cetuximab replace cisplatin in head and neck cancer? *J Natl Cancer Inst* 2010;102:74-76, 78.
526. Gebbia V, Giuliani F, Valori VM, Agueli R, Colucci G, Maiello E. Cetuximab in squamous cell head and neck carcinomas. *Ann Oncol* 2007;18 Suppl 6:vi5-7.
527. Haddad RI, Shin DM. Recent Advances in Head and Neck Cancer. *N.Engl.J.Med.* 2008;359:1143-1154.
528. Gao WQ. Therapeutic potential of neurotrophins for treatment of hearing loss. *Mol Neurobiol* 1998;17:17-31.

529. Wise AK, Richardson R, Hardman J, Clark G, O'Leary S. Resprouting and survival of guinea pig cochlear neurons in response to the administration of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *J.Comp Neurol.* 2005;487:147-165.
530. Okuda T, Sugahara K, Takemoto T, Shimogori H, Yamashita H. Inhibition of caspases alleviates gentamicin-induced cochlear damage in guinea pigs. *Auris Nasus Larynx.* 2005;32:33-37.
531. Mizutari K, Matsunaga T, Kamiya K, Fujinami Y, Fujii M, Ogawa K. Caspase inhibitor facilitates recovery of hearing by protecting the cochlear lateral wall from acute cochlear mitochondrial dysfunction. *J Neurosci Res* 2008;86:215-222.
532. Hoffmann KK, Silverstein H. Inner ear perfusion: indications and applications. *Curr.Opin.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 2003;11:334-339.
533. Jackson LE, Silverstein H. Chemical perfusion of the inner ear. *Otolaryngol.Clin.North Am.* 2002;35:639-653.
534. Silverstein H. Use of a new device, the MicroWick, to deliver medication to the inner ear. *Ear Nose Throat J* 1999;78:595-598, 600.
535. Lefebvre PP, Staecker H. Steroid perfusion of the inner ear for sudden sensorineural hearing loss after failure of conventional therapy: a pilot study. *Acta Otolaryngol.* 2002;122:698-702.
536. Vanwijck F, Staecker H, Lefebvre PP. Topical steroid therapy using the Silverstein Microwick in sudden sensorineural hearing loss after failure of conventional treatment. *Acta Otolaryngol* 2007;127:1012-1017.
537. Herr BD, Marzo SJ. Intratympanic steroid perfusion for refractory sudden sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132:527-531.
538. Haynes DS, O'Malley M, Cohen S, Watford K, Labadie RF. Intratympanic dexamethasone for sudden sensorineural hearing loss after failure of systemic therapy. *Laryngoscope.* 2007;117:3-15.
539. Battaglia A, Burchette R, Cueva R. Combination therapy (intratympanic dexamethasone + high-dose prednisone taper) for the treatment of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Otol Neurotol* 2008;29:453-460.
540. Plontke SK, Lowenheim H, Mertens Jet al. Randomized, double blind, placebo controlled trial on the safety and efficacy of continuous intratympanic dexamethasone delivered via a round window catheter for severe to profound sudden idiopathic sensorineural hearing loss after failure of systemic therapy. *Laryngoscope* 2009;119:359-369.
541. Vanwijk F, Staecker H, Keithley E, Lefebvre PP. Local perfusion of the tumor necrosis factor alpha blocker infliximab to the inner ear improves autoimmune neurosensory hearing loss. *Audiol.Neurotol.* 2006;11:357-365.
542. Cohen-Kerem R, Kisilevsky V, Einarson TR, Kozer E, Koren G, Rutka JA. Intratympanic gentamicin for Meniere's disease: a meta-analysis. *Laryngoscope* 2004;114:2085-2091.
543. Silverstein H, Wazen J, Van Ess MJ, Daugherty J, Alameda YA. Intratympanic gentamicin treatment of patients with Meniere's disease with normal hearing. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010;142:570-575.
544. Nakashima T, Teranishi M, Yoshida T. In reference to Randomized, double blind, placebo controlled trial on the safety and efficacy of continuous intratympanic dexamethasone delivered via a round window catheter for severe to profound sudden idiopathic sensorineural hearing loss after failure of systemic therapy (*Laryngoscope* 119:359-369, 2009). *Laryngoscope* 2009;119:2480; author reply 2481-2482.
545. Richardson RT, Noushi F, O'Leary S. Inner ear therapy for neural preservation. *Audiol Neurotol* 2006;11:343-356.
546. Barriat S, Poirrier A, Malgrange B, Lefebvre P. Hearing Preservation in Cochlear Implantation and Drug Treatment. *Adv Otorhinolaryngol* 2010;67:6-13.
547. Gillespie LN, Shepherd RK. Clinical application of neurotrophic factors: the potential for primary auditory neuron protection. *Eur.J.Neurosci.* 2005;22:2123-2133.
548. Pettingill LN, Richardson RT, Wise AK, O'Leary SJ, Shepherd RK. Neurotrophic factors and neural prostheses: potential clinical applications based upon findings in the auditory system. *IEEE Trans Biomed Eng* 2007;54:1138-1148.

549. Blamey P. Are spiral ganglion cell numbers important for speech perception with a cochlear implant? *Am J Otol* 1997;18:S11-12.
550. Khan AM, Handzel O, Burgess BJ, Damian D, Eddington DK, Nadol JB, Jr. Is word recognition correlated with the number of surviving spiral ganglion cells and electrode insertion depth in human subjects with cochlear implants? *Laryngoscope* 2005;115:672-677.
551. Scarpidis U, Madhani D, Shoemaker C et al. Arrest of apoptosis in auditory neurons: implications for sensorineural preservation in cochlear implantation. *Otol.Neurotol.* 2003;24:409-417.