

CHRISTINE MARQUILLY

**EFFETS MOLÉCULAIRES ET COGNITIFS DE LA
SURVENUE D'ACOUPHÈNES INDUITS PAR LE
SALICYLATE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Pharmacie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE PHARMACIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2011

*À mon père,
Pour son soutien infailible tout au long de mes études.*

Avant-Propos

C'est avec une grande fierté que je conclus mes études de Maîtrise en Pharmacie. La confiance et l'autonomie que j'ai acquises durant ces années me permettront de continuer mon cheminement en recherche et de relever de nouveaux défis. Bien entendu, la réussite de mon projet de recherche n'aurait pu être possible sans la contribution et l'aide de plusieurs personnes que je tiens sincèrement à remercier.

Je remercie,

Le Dr Matthieu Guitton, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet si intéressant. Votre confiance, votre disponibilité et vos encouragements m'ont permis de réaliser un projet qui fut très enrichissant pour moi, tant au point de vue professionnel que personnel. Durant ces deux années, j'ai appris à vous connaître et je peux affirmer que vous êtes un très bon directeur de recherche qui a à cœur la réussite de ses étudiants. Pour terminer, je suis très fière d'avoir fait partie, et de faire encore partie, de votre équipe et d'avoir contribué à l'avancement de vos recherches.

Le Dr Frédéric Calon, pour m'avoir co-dirigée, ainsi que tous les membres de son laboratoire qui ont aidé à la réalisation de ce projet. Je tiens particulièrement à remercier le Dr Vincent Emond qui m'a initiée aux techniques d'hybridation *in situ* et d'autoradiographie.

Le Dr Martin Beaulieu, pour ses conseils, ainsi que tous les membres de son laboratoire qui ont collaboré à ce projet. Je remercie particulièrement Thomas Del'Guidice, Camille Latapy et Nathalie Bouchard qui ont eu la patience de m'initier à la technique d'immunobuvardage de type Western et m'ont prodigué de précieux conseils.

Les membres du laboratoire du Dr Guillon ainsi que mes amis, qui, chacun à leur manière, m'ont apporté soutien et encouragements. Je remercie François Chartier, Milomir Stefanovic et Marie-Josée Wallman pour leur aide lors des expériences moléculaires. Je tiens également à remercier Catherine Lortie, Meryem Lebbadi et Alain Dury pour leur compagnie de tous les jours et pour les conseils apportés à la rédaction de ce mémoire. Je crois qu'il est important de vivre dans un milieu de travail avec une bonne ambiance et de se sentir apprécié par les gens qui nous entourent. Vous y avez tous grandement contribué !

Le Dr Éric Biron et le Dr Martin Parent. Je leur suis très reconnaissante d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire de Maîtrise.

Résumé

Les acouphènes, perception d'un son en l'absence de stimulation sonore extérieure, affectent fortement la qualité de vie des personnes qui en souffrent. Hélas, aucun traitement n'existe à l'heure actuelle pour traiter les acouphènes. Des études ont montré que la présence d'acouphènes pourrait entraîner une plasticité au niveau des structures nerveuses centrales et des comportements de type anxieux. Nous nous sommes donc intéressés aux altérations moléculaires pouvant caractériser une augmentation de la plasticité synaptique et aux liens existants entre acouphènes et anxiété. En utilisant le modèle d'acouphènes induits par le salicylate chez la souris, nos résultats suggèrent une tendance à la baisse de l'activité dans les structures nerveuses et de la transcription au niveau des structures auditives centrales. Cette baisse est caractérisée par une diminution de l'expression de molécules de signalisation intracellulaire (MAPK-ERK et PI(3)K-AKT) et des niveaux d'expression de l'ARNm des NMDAR, tous marqueurs de plasticité synaptique. Nos résultats démontrent que la survenue d'acouphènes induits par le salicylate chez la souris provoque des comportements de type anxieux qui pourraient être régulés par le système sérotoninergique. Nos résultats semblent confirmer l'origine périphérique plutôt que centrale des acouphènes, tout en montrant que ces altérations périphériques s'accompagnent d'effets centraux et sont prometteurs pour le développement de stratégies thérapeutiques visant à soigner les acouphènes.

Table des matières

Avant-Propos	ii
Résumé.....	iv
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des tableaux.....	x
Liste des abréviations.....	xi
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1. Étiologie des acouphènes	3
1.1. Épidémiologie des acouphènes.....	3
1.2. Les causes principales des acouphènes.....	4
1.3. Hypothèse centrale et hypothèse périphérique	6
1.3.1. Hypothèse de l'origine centrale	7
1.3.2. Hypothèse de l'origine périphérique.....	10
1.3.3. Vers une intégration des deux hypothèses.....	12
2. Les tentatives de traitement pharmacologique des acouphènes	12
2.1. Anesthésiques locaux et antiarythmiques.....	13
2.2. Anticonvulsivants	13
2.3. Antispasmodiques.....	14
2.4. Antidépresseurs.....	15
2.5. Corticostéroïdes et aminosides	15
2.6. Prostaglandines : PGE1 (ou vasodilatateurs).....	16
2.7. Inhibiteurs de la HMG-CoA réductase	16
2.8. Médecines alternatives et complémentaires (produits naturels)	17
2.8.1. Vitamines, minéraux et antioxydants.....	17
2.8.2. <i>Ginkgo biloba</i> et autres composés végétaux.....	17
2.8.3. Toxine botulique	18
2.9. Approches non pharmacologiques.....	18

3. Les modèles expérimentaux d'acouphènes	19
3.1. Les modèles d'acouphènes	20
3.1.1. Le salicylate	20
3.1.2. La quinine	20
3.1.3. Le cisplatine	21
3.1.4. Le méfénamate.....	22
3.1.4. Le traumatisme sonore.....	23
3.2. Le modèle des acouphènes induits par le salicylate	23
3.2.1. Propriétés du salicylate	23
3.2.2. Avantages du modèle.....	25
3.2.3. Inconvénients du modèle	26
3.2.4. Aspects centraux du salicylate.....	27
3.3. L'apport des modèles animaux d'acouphènes	28
3.3.1. Les méthodes de mesure des acouphènes chez l'animal	28
3.3.2. Les contributions des différents modèles animaux d'acouphènes.....	31
4. Les corrélats liés aux acouphènes induits par le salicylate	34
4.1. La plasticité synaptique liée aux acouphènes induits par le salicylate	34
4.1.1. Voies de signalisation cellulaire.....	35
4.1.2. Récepteurs glutamatergiques	37
4.2. L'anxiété liée aux acouphènes induits par le salicylate	38
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	39
CHAPITRE II LA PLASTICITÉ RELIÉE AUX ACOUPHÈNES INDUITS PAR LE SALICYLATE	41
1. Matériels et méthodes	42
1.1. Animaux.....	42
1.2. Traitements pharmacologiques	42
1.3. Choix des structures anatomiques étudiées	43
1.4. Prélèvement des tissus et préparation des tranches de cerveaux	43
1.5. Hybridation <i>in situ</i> de la sous-unité NR1 des NMDAR	45
1.6. Immunobuvardage de type Western	46
1.7. Analyse statistique	48

2. Résultats	50
2.1. Modulation de la voie MAPK-ERK	50
2.2. Modulation de la voie PI(3)K.....	52
2.3. Niveaux d'expression de l'ARNm des NMDAR	59
3. Discussion	62
3.1. Modulation de l'expression et de l'activation protéique	62
3.2. Modulation des niveaux d'expression de l'ARNm des NMDAR	65
CHAPITRE III L'ANXIÉTÉ RELIÉE AUX ACOUPHÈNES INDUITS PAR LE SALICYLATE	66
1. Matériels et méthodes	67
1.1. Animaux.....	67
1.2. Traitements pharmacologiques	67
1.3. Mesure de l'anxiété par le test de la boîte à deux compartiments	68
1.4. Analyse statistique	69
2. Résultats	71
3. Discussion	79
DISCUSSION GÉNÉRALE	84
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	89
RÉFÉRENCES	92

Liste des figures

Figure 1. Anatomie de l'oreille humaine.	5
Figure 2. Acouphènes et localisation de la perte auditive.	6
Figure 3. Représentation schématique des voies auditives centrales primaires et non primaires chez l'homme.	9
Figure 4. Intégration de l'information auditive dans un contexte multisensoriel.	10
Figure 5. Réaction de Kolbe-Schmitt.	25
Figure 6. A) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de ERK/actine après un traitement au salicylate et B) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de ERK/actine après deux traitements au salicylate.	55
Figure 7. A) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de pERK/ERK après un traitement au salicylate et B) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de pERK/ERK après deux traitements au salicylate.	56
Figure 8. A) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de AKT/actine après un traitement au salicylate et B) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de AKT/actine après deux traitements au salicylate.	57
Figure 9. A) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de pAKT/AKT après un traitement au salicylate et B) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de pAKT/AKT après deux traitements au salicylate.	58
Figure 10. A) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de l'ARNm des NMDAR après un traitement au salicylate et B) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de l'ARNm des NMDAR après deux traitements au salicylate.	61
Figure 11. Effet d'une injection i.p. unique d'un agent anxiogénique, le mCPP, sur une réponse comportementale d'anxiété.	74
Figure 12. Effet de l'injection i.p. de salicylate, à différentes concentrations pendant 4 jours, sur une réponse comportementale d'anxiété.	75
Figure 13. Effet de l'injection i.p. de salicylate 300 mg/kg/jour, pendant 2 jours et 4 jours, sur une réponse comportementale d'anxiété.	76
Figure 14. Effet de la co-injection i.p. de salicylate 300 mg/kg/jour et de mCPP 0,5 mg/kg, au même site ou sur deux sites différents, sur une réponse comportementale d'anxiété.	77

Figure 15. Effet de la co-injection i.p. de salicylate 300 mg/kg, pendant 2 jours, et de mCPP 0,5 mg/kg, et de la co-injection de salicylate 300 mg/kg, pendant 4 jours, et de mCPP 0,5 mg/kg, sur une réponse comportementale d'anxiété. 78

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des anticorps primaires utilisés en immunobuvardage de type Western.	49
Tableau 2. Groupes expérimentaux de comportement.	70

Liste des abréviations

5-HT (1A, 2A, 2B, 2C, 1D, 3) : 5-hydroxytryptamine (1A, 2A, 2B, 2C, 1D, 3)

A : amygdale

ADN : acide désoxyribonucléique

AKT/PKB : protéine kinase B

Arc/Arg3.1 : *activity regulated cytoskeleton-associated/activity-regulated gene 3.1*

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNt : acide ribonucléique de transfert

BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*, facteur neurotrophique dérivé du cerveau

CCE : cellules ciliées externes

CCI: cellules ciliées internes

CI : colliculus inférieur

CS : colliculus supérieur

ERK (1, 2) : *extracellular signal-regulated kinase*, kinase régulée par un signal extracellulaire (1,2)

Fr : cortex frontal

GABA (A, B) : *gamma-aminobutyric acid*, acide gamma-aminobutyrique (A, B)

GTP : guanosine triphosphate

HMG-CoA : *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA*

H-Ras : *Harvey rat sarcoma*

I.p. : intrapéritonéale

LTD : *long term depression*, dépression à long terme

LTP : *long term potentiation*, potentialisation à long terme

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*, kinase activée par le mitogène

mCPP : méta-chlorophénylpipérazine

NF1 : *neurofibromatosis-related protein 1*

NF- κ B : *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NMDA : N-methyl D-aspartate

NMDAR : *N-methyl D-aspartate receptor*, récepteur N-methyl D-aspartate

NR1 : *N-methyl D-aspartate receptor 1*, récepteur N-methyl D-aspartate 1

NR2 (A, B, C, D) : *N-methyl D-aspartate receptor*, récepteur N-methyl D-aspartate 2 (A, B, C, D)

pAKT : *phosphorylated protein kinase B*, protéine kinase B phosphorylée

PBS : *phosphate buffered saline*, tampon phosphate salin

pERK : *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*, kinase régulée par un signal extracellulaire phosphorylée

PGE1 : prostaglandine E1

PI(3)K : *phosphatidylinositol-3 kinase*, kinase phosphatidylinositol-3

PIP3 : phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate

PKB/AKT : protéine kinase B

PKC ζ : protéine kinase C zéta

PKD1 : protéine kinase D1

PSD-95 : *postsynaptic density-95*

Ras : *rat sarcoma*, sarcome de rats

SDS : *sodium dodecyl sulfate*, tampon de sodium dodécylsulfate

SFR : *spontaneous firing rate*, taux de décharge spontanée

SSC : *standard saline citrate*, tampon de citrate de sodium standard

SynGAP : *synaptic Ras-guanosine triphosphatase activating protein*

Thr : thréonine

Tris-base : trishydroxyméthylaminométhane

Tyr : tyrosine

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Le tintement des oreilles est un symptôme dont les causes sont difficiles à expliquer. (Du Vernay, 1683, p192)

Trois siècles se sont écoulés depuis cette remarque du médecin français Du Verney (Du Verney, 1683) et l'origine exacte des acouphènes demeure pourtant toujours aussi mystérieuse de nos jours. Les acouphènes sont définis comme la perception d'un son en l'absence de toute stimulation acoustique provenant de l'environnement. Ils peuvent entre autres se traduire par des sensations de bourdonnements, de sifflements, de tintements ou de grondements dans l'oreille qui peuvent être stables ou fluctuants en amplitude, constants, intermittents ou occasionnels. Le terme « acouphènes » regroupe deux phénomènes très différents, soit les acouphènes « objectifs » et les acouphènes « subjectifs ». Les acouphènes dits objectifs sont des sons qui peuvent être mesurés et perçus par un observateur externe. Ils peuvent être de source articulaire (dysfonction mécanique de la mandibule), musculaire (spasme facial ou tympanique) ou encore circulatoire. Dans ces cas, la résolution du problème par chirurgie s'avère souvent une réussite. Les acouphènes dits subjectifs représentent la vaste majorité des cas recensés. Ils correspondent à la définition établie des acouphènes, soit un son audible uniquement par la personne qui en est affectée. L'étiologie des acouphènes subjectifs est plus complexe et en grande partie inconnue. Aucun traitement efficace n'est disponible à l'heure actuelle (Eggermont and Roberts, 2004; Guitton, 2006; Eggermont, 2007). Seuls les acouphènes subjectifs seront abordés dans cette étude.

Avant de présenter les objectifs de ce mémoire, nous allons faire un rapide survol de l'état des connaissances sur les acouphènes. Dans un premier temps, les causes principales d'acouphènes seront présentées. Ensuite, une revue des différentes tentatives de traitement pharmacologique des acouphènes sera faite. Enfin, les principaux modèles animaux d'acouphènes seront décrits afin de cerner leurs avantages, leurs inconvénients et ce que ces différents modèles ont apporté à notre compréhension des acouphènes.

1. Étiologie des acouphènes

1.1. Épidémiologie des acouphènes

Sous-estimés pendant des décennies, les acouphènes affectent un nombre chaque jour plus important de personnes et représentent désormais un problème majeur en termes de santé publique (Chung et al., 1984; Coles, 1984; Dieroff and Meissner, 1987; Schneider et al., 1994; Nicolas-Puel et al., 2002; Ahmad and Seidman, 2004; Eggermont and Roberts, 2004; Nicolas-Puel et al., 2006; Eggermont, 2007; Muluk and Oguzturk, 2008). En effet, dans les pays occidentaux, ils touchent une proportion importante de la population, soit environ 10% de la population adulte (Chung et al., 1984; Dieroff and Meissner, 1987; Nicolas-Puel et al., 2002; Eggermont and Roberts, 2004). Parmi ceux-ci, environ une personne sur 10 souffre à un degré suffisant pour que les acouphènes interfèrent avec les activités et occupations quotidiennes (Nicolas-Puel et al., 2003). L'intensité avec laquelle sont perçus les acouphènes peut varier énormément d'une personne à l'autre. Si pour certaines personnes les acouphènes ne sont qu'un désagrément, pour plusieurs d'entre elles, ils représentent un véritable handicap, surtout lorsqu'ils sont permanents (Nicolas-Puel et al., 2002). Ils peuvent donc fortement altérer la qualité de vie de ces derniers et ainsi représenter une cause majeure de souffrance psychologique et d'isolement social (Halford and Anderson, 1991; Nicolas-Puel et al., 2002; Job et al., 2004; Nondahl et al., 2007; Muluk and Oguzturk, 2008). Un accroissement des symptômes liés aux acouphènes (anxiété, perception du stress, irritabilité) ainsi qu'une détérioration des relations sociales, professionnelles ou familiales, sont fréquemment observés chez les personnes souffrant d'acouphènes et leurs proches (Nicolas-Puel et al., 2002). Au Canada, plus de 360 000 personnes souffriraient d'une forme gênante d'acouphène et près de la moitié d'entre elles verraient leur qualité de vie sérieusement diminuée (Tinnitus Canadian Association, <http://www.kadis.com/ta/tinnitus.htm>). Hélas, aucun traitement efficace n'est actuellement disponible pour soigner les acouphènes (Eggermont and Roberts, 2004; Guitton, 2006; Eggermont, 2007; Golberg and Guitton, 2009). Cette situation est principalement la conséquence du manque actuel de connaissances sur les mécanismes physiopathologiques à

la base des acouphènes (Pujol and Puel, 1999; Puel et al., 2002; Eggermont and Roberts, 2004; Guitton, 2006; Eggermont, 2007).

1.2. Les causes principales des acouphènes

Les causes des acouphènes peuvent être multiples : effets secondaires de certains traitements pharmacologiques, problèmes vasculaires, neurologiques ou infectieux, atteintes de l'os temporal, maladie de Ménière, etc. (Coles, 1983; Chung et al., 1984; Nicolas-Puel et al., 2002; Nondahl et al., 2007). Cependant, la surexposition au bruit et le vieillissement sont les deux facteurs qui se démarquent nettement comme étant les principaux pourvoyeurs d'acouphènes chez l'homme (Chung et al., 1984; Dieroff and Meissner, 1987; Nicolas-Puel et al., 2002, 2006; Nondahl et al., 2007; Muluk and Oguzturk, 2008). Malheureusement, les sociétés occidentales doivent aujourd'hui faire face à une augmentation drastique des niveaux de pollution sonore (bruits liés à l'environnement urbain, aux activités professionnelles, récréatives – chasse, boîtes de nuit, iPod – ou militaires) couplée à un vieillissement très important de leurs populations.

Les acouphènes sont fréquemment associés à un certain niveau de surdité dû à l'âge (presbyacousie) ou qui survient en cooccurrence avec la maladie de Ménière (atteinte cochléo-vestibulaire caractérisée par l'apparition concomitante d'acouphènes, de surdité et de vertiges). Dans la plupart des cas, les acouphènes semblent associés à une perte auditive située dans l'oreille interne au niveau de la cochlée (acouphènes « endocochléaires ») (Figure 1). La cochlée est l'organe neurosensoriel de l'oreille contenant l'organe de Corti qui regroupe les cellules sensorielles (CCI et CCE) et les fibres nerveuses qui leur sont connectées. Les acouphènes liés à des pathologies de l'oreille moyenne et à un dérèglement au niveau du nerf auditif (acouphènes « rétrocochléaires »), qui relie la cochlée aux voies auditives centrales, sont moins fréquents. Finalement, une partie des acouphènes observés en clinique sont d'origine inconnue (Coles, 1983; Chung et al., 1984; Nicolas-Puel et al., 2002) (Figure 2). Au fil des années, de nombreux cliniciens ont également rapporté un corrélat entre l'apparition d'acouphènes et de hauts niveaux d'anxiété (Shea et al., 1981; Shneider et al., 1994; Guitton, 2006; Belli et al., 2008). L'anxiété, trouble émotionnel

complexe (Bourin et al., 1998; Akirav et al., 2006), ne semble pas parvenir à générer des acouphènes à elle seule (Guitton et al., 2005). Toutefois, elle est connue pour potentialiser fortement la perception de stimuli négatifs, c'est-à-dire que l'anxiété crée des conditions qui facilitent la perception subjective de stimuli préexistants (Nicolas-Puel et al., 2002; Guitton et al., 2005; Guitton, 2006). Des acouphènes « latents », non perçus en raison d'un filtrage du cerveau, pourraient donc être démasqués suite à des niveaux élevés de stress.

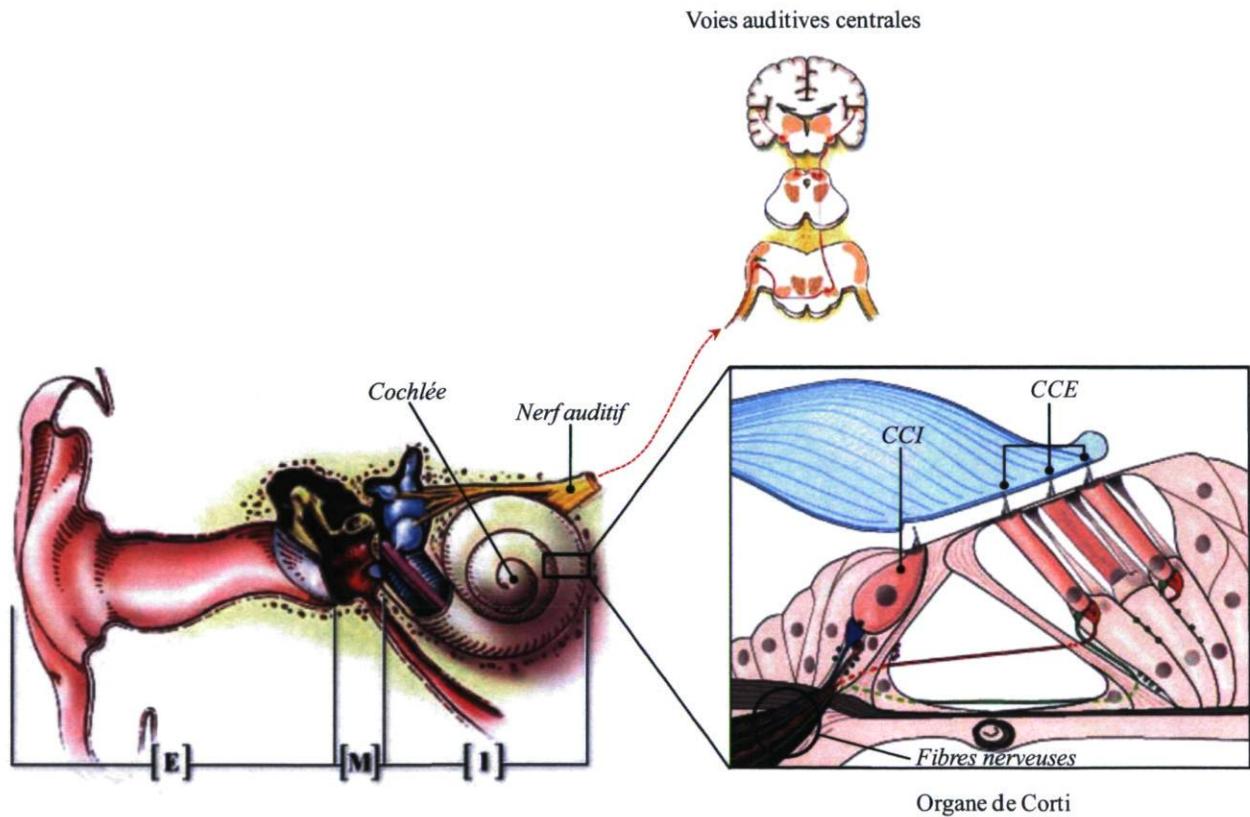


Figure 1. Anatomie de l'oreille humaine.

L'oreille humaine est composée de trois parties : l'oreille externe (E), l'oreille moyenne (M) et l'oreille interne (I). La cochlée, organe neurosensoriel de l'oreille, se situe dans l'oreille interne et contient l'organe de Corti. L'agrandissement de l'organe de Corti permet de distinguer les cellules sensorielles de l'oreille, les cellules ciliées internes (CCI) et externes (CCE), ainsi que les fibres nerveuses qui leur sont connectées. Le nerf auditif, composé des fibres nerveuses connectées aux cellules ciliées, relie la cochlée aux voies auditives centrales. Schémas tirés et adaptés de *Promenade autour de la Cochlée* (<http://www.cochlee.org/>).

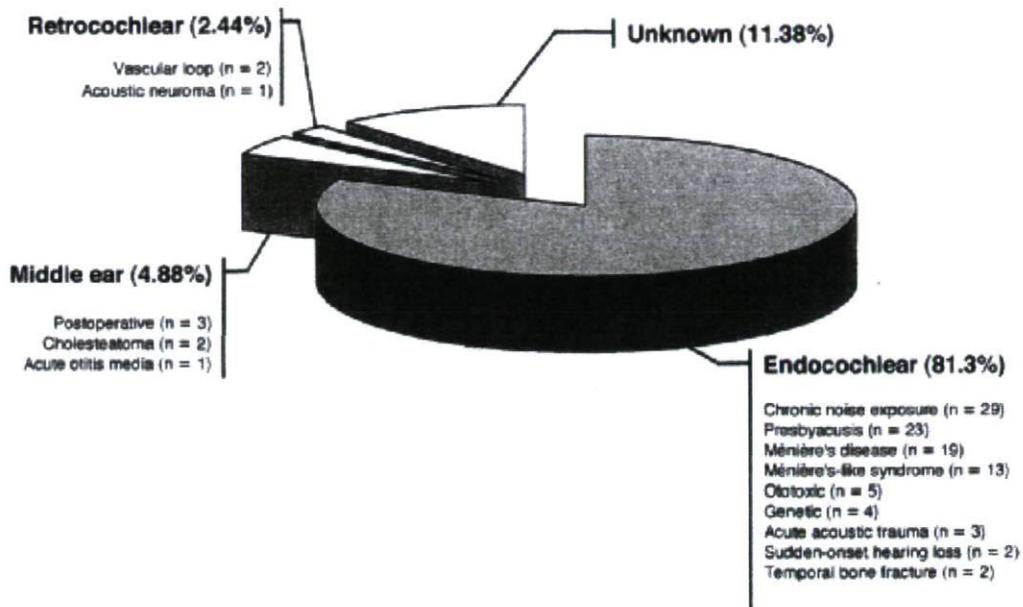


Figure 2. Acouphènes et localisation de la perte auditive.

Chaque portion du secteur représente les acouphènes associés à une perte auditive endocochléaire (81,3%), une pathologie de l'oreille moyenne (4,88%), une perte auditive rétrocochléaire (2,44%) ou une étiologie inconnue (11,38%). Notez la large incidence des acouphènes associés à la perte auditive endocochléaire. Le nombre de patients est représenté par *n* (total de 123 patients). Figure tirée de (Nicolas-Puel et al., 2002).

Les causes à l'origine des acouphènes semblent donc reliées autant au système auditif périphérique qu'au système auditif central. Cette constatation est d'ailleurs au cœur d'un débat concernant le site de génération des acouphènes.

1.3. Hypothèse centrale et hypothèse périphérique

Un des débats classiques dans le domaine des acouphènes concerne le site de génération des acouphènes. Afin de simplifier la problématique, deux hypothèses principales ont émergé de ce débat : l'hypothèse de l'origine centrale des acouphènes et

celle de l'origine périphérique. Le terme « central » fait ici référence aux structures nerveuses cérébrales, qu'elles soient corticales ou sous-corticales, et plus spécifiquement aux voies auditives centrales dans le cas des acouphènes, alors que le terme « périphérique » réfère à l'organe neurosensoriel et aux fibres nerveuses qui y émergent, plus précisément la cochlée et le nerf auditif pour le système auditif (Figure 1).

1.3.1. Hypothèse de l'origine centrale

L'hypothèse de l'origine centrale suggère que l'acouphène proviendrait d'un dysfonctionnement du système nerveux central, par exemple dans le système auditif ou dans le système limbique. Les acouphènes seraient donc assimilables à une maladie neurologique, voire psychiatrique.

Un des éléments les plus forts en faveur de l'origine centrale des acouphènes est l'existence de liens étroits avec l'anxiété. En effet, les cliniciens relatent souvent l'apparition d'acouphènes chez un patient suite à une période d'anxiété (Nicolas-Puel et al., 2002). Il a été démontré chez l'animal que l'anxiété seule n'induit pas d'acouphènes, mais peut accroître la perception d'acouphènes déjà présents (Guitton et al., 2005). Cet effet de l'anxiété sur la perception des acouphènes peut être extrapolé à des situations où des acouphènes encore non perçus, filtrés par le cerveau, pourraient être démasqués suite à des hauts niveaux d'anxiété (Nicolas-Puel et al., 2002; Guitton et al., 2005; Guitton, 2006). L'anxiété viendrait ainsi diminuer le niveau de tolérance aux acouphènes. Une base moléculaire manque toutefois à cette hypothèse.

L'hypothèse centrale est également supportée par des observations expérimentales. Ainsi, dans certains cas, la perception des acouphènes persiste, même lorsque les signaux provenant de l'oreille sont éliminés par le sectionnement du nerf auditif (Dandy, 1941; Silverstein, 1976; House and Brackman, 1981). Cela suggère que le maintien à long terme des acouphènes ferait probablement intervenir les voies auditives centrales (Figure 3). D'autre part, des agents pharmacologiques induisant des acouphènes peuvent avoir des effets directs sur le système auditif central. Les aspects centraux liés au salicylate, agent

anti-inflammatoire non stéroïdien induisant des acouphènes, seront discutés à la sous-section 3.2.4. Finalement, des études d'imagerie cérébrale chez l'homme ont confirmé l'implication des structures centrales dans la perception des acouphènes et signalent des changements d'activation accompagnant les acouphènes non seulement dans le colliculus inférieur (Melcher et al., 2000) et le cortex auditif (Giraud et al., 1999; Lockwood et al., 2001), mais également dans les structures limbiques associées aux émotions (Mirz et al., 2000). En effet, en plus d'être traitée par la voie auditive primaire, l'information auditive chemine via les voies auditives non primaires (Figure 3) qui participent à l'attribution des niveaux de priorité entre les différents types d'information associée au signal auditif reçu, de concert avec les centres de l'éveil et les systèmes de motivation (Figure 4).

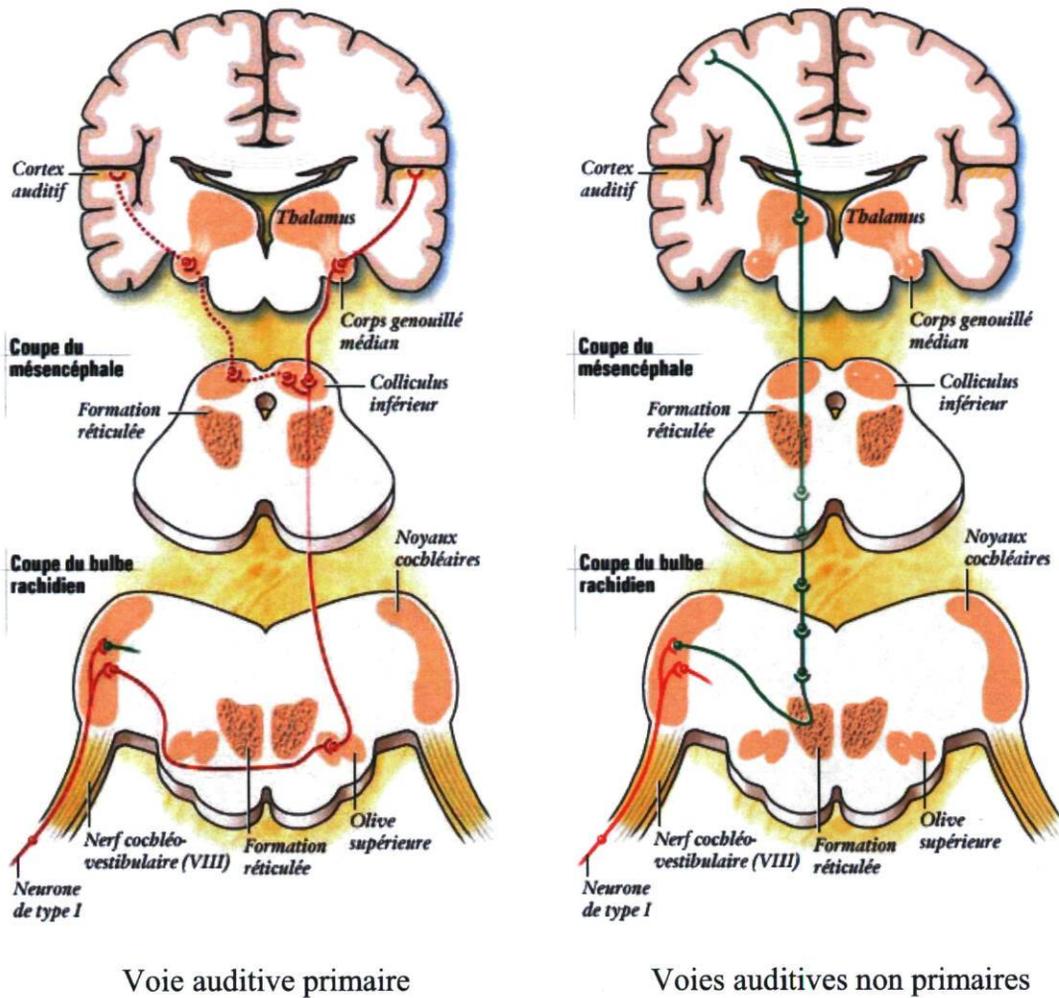


Figure 3. Représentation schématique des voies auditives centrales primaires et non primaires chez l'homme.

Les principaux relais effectués dans les différents étages du système nerveux central par les neurones de la voie auditive primaire et des voies auditives non primaires sont montrés sur cette représentation schématique des voies auditives. Schéma tiré de *Promenade autour de la Cochlée* (<http://www.cochlee.org/>).

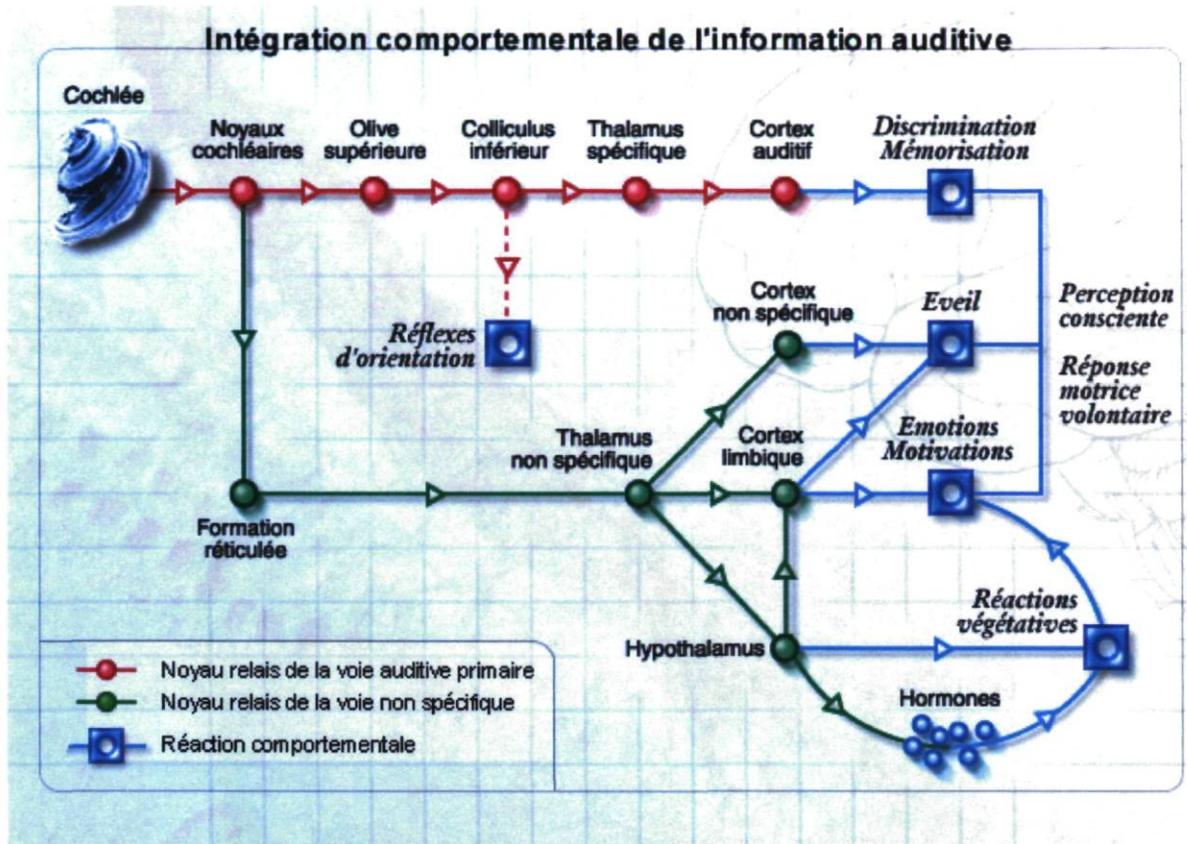


Figure 4 : Intégration de l'information auditive dans un contexte multisensoriel.

La voie auditive primaire (en rouge) assure un traitement complet des informations auditives alors que les voies auditives non primaires (en vert), qui se situent en parallèle, permettent la convergence des informations en provenance des autres modalités sensorielles. Schéma tiré de *Promenade autour de la Cochlée* (<http://www.cochlee.org/>).

1.3.2. Hypothèse de l'origine périphérique

L'hypothèse de l'origine périphérique stipule quant à elle que l'acouphène proviendrait d'un dysfonctionnement du système auditif périphérique. Il prendrait son origine dans la cochlée ou le nerf auditif. Les informations aberrantes seraient par la suite propagées le long des voies auditives. Les acouphènes relèveraient alors de l'oto-rhino-laryngologie.

Plusieurs arguments sont en faveur d'un site de génération des acouphènes au niveau du système auditif périphérique. Les études cliniques représentent un premier élément en faveur de cette hypothèse. Dans la majorité des cas recensés, les acouphènes apparaissent conjointement à d'autres symptômes auditifs tels qu'une perte auditive et des problèmes vestibulaires, ce qui est fortement en faveur de l'hypothèse d'une dysfonction des structures de l'oreille interne (Guitton, 2006). Une étude sur les aspects étiologiques des acouphènes dans une large cohorte de patients résume d'ailleurs clairement cette situation observée en clinique, c'est-à-dire que la plupart des acouphènes reflètent directement un problème cochléaire (Nicolas-Puel et al., 2002). Ainsi, dans la plupart des cas recensés en clinique, les acouphènes proviennent d'un problème situé dans le système auditif périphérique, soit dans la cochlée elle-même ou le nerf auditif, plutôt que d'un dysfonctionnement des structures centrales.

Le deuxième argument provient des études utilisant le salicylate. En effet, les tests de comportement couplés aux enregistrements électrophysiologiques ont apporté plusieurs résultats en faveur d'une origine périphérique des acouphènes. Ces études ont montré que les acouphènes induits par le salicylate sont associés à l'abolition des produits de distorsion acoustique (McFadden and Plattsmier, 1984; Long and Tubis, 1988; Guitton et al., 2003), ce qui confirme que la perte auditive associée aux acouphènes est attribuable à une action sur les CCE (Zheng et al., 2000; Olivier et al., 2001; Zhang et al., 2001). De plus, les acouphènes induits par le salicylate ont été associés à une élévation de l'activité spontanée du nerf auditif (Evans et al., 1981; Evans and Borerwe, 1982; Stypulkowski, 1990) et à un changement du spectre moyen de l'activité cochléoneurale (Schreiner and Snyder, 1987; Martin et al., 1993; Chen and Jastreboff, 1995; Cazals et al., 1998). Finalement, certains acouphènes peuvent être totalement bloqués par l'application d'un antagoniste des NMDAR dans les fluides cochléaires (Guitton et al., 2003; Guitton and Puel, 2004). Cette découverte a également été appuyée par des études électrophysiologiques sur des cultures de neurones auditifs primaires qui ont montré que le salicylate peut agir spécifiquement, de manière dose-dépendante, sur les NMDAR localisés sur ces neurones (Peng et al., 2003). Bien que l'implication des NMDAR cochléaires ne puisse être généralisée pour le moment,

les résultats présentés confirment que, dans une certaine mesure, l'origine des acouphènes est liée à un dysfonctionnement au niveau du système auditif périphérique.

1.3.3. Vers une intégration des deux hypothèses

De nos jours, un consensus semble émerger en faveur d'une origine périphérique des acouphènes (Puel, 1995; Cazals et al., 1998; Oestreicher et al., 1999; Kaltenbach et al., 2002; Oestreicher, 2002; Guitton et al., 2003; Guitton and Puel, 2004). Cependant, il n'est pas exclu que des structures cérébrales soient impliquées dans la physiopathologie des acouphènes. En effet, les structures auditives centrales sont évidemment nécessaires à la perception des acouphènes et pourraient être impliquées dans le maintien à long terme des acouphènes (Eggermont and Roberts, 2004). De plus, le blocage des acouphènes par des antagonistes des NMDAR appliqués dans la cochlée n'est efficace que dans les premiers jours après le traumatisme (Guitton and Dudai, 2007). Il semble donc que la perception des acouphènes générée par une activité anormale dans le système auditif périphérique pourrait être amplifiée via des processus attentionnels et émotionnels centraux (Jastreboff, 1999).

Les deux hypothèses présentées ont conduit au développement de plusieurs stratégies de prise en charge pharmacologique des acouphènes. Hélas, aucun de ces moyens ne s'est, jusqu'à maintenant, montré réellement efficace. Nous allons cependant décrire ces différentes stratégies dans les prochains paragraphes, afin de bien comprendre les enjeux inhérents au développement de nouvelles solutions pharmacologiques pour lutter contre les acouphènes.

2. Les tentatives de traitement pharmacologique des acouphènes

À cause du manque de connaissance sur la physiopathologie exacte des acouphènes et les mécanismes biologiques les sous-tendant, les stratégies de prises en charge pharmacologique des patients acouphéniques ont hélas essentiellement été guidées par l'empirisme. Bien qu'aucune approche ne se soit montrée réellement efficace à ce jour pour traiter les acouphènes, plusieurs molécules pharmacologiques ont fait l'objet d'essais

cliniques (Dobie, 1999; Goldberg and Guitton, 2009) dont certaines présentent tout de même des voies pharmacologiques prometteuses pour soulager les personnes souffrant d'acouphènes (Dobie, 1999; Goldberg and Guitton, 2009).

2.1. Anesthésiques locaux et antiarythmiques

Dans la catégorie des anesthésiques locaux et antiarythmiques, la lidocaïne, la ropivacaïne, la procaïne, la flécaïnide et le mexilétine ont été utilisés lors d'essais de traitement. Aucun d'entre eux ne s'est révélé un traitement valable pour l'acouphène (Dobie, 1999; Lockwood et al., 2002). Dans le cas de la lidocaïne, des améliorations à court terme ont été observées par perfusion IV mais les effets secondaires, tels que l'arythmie cardiaque et l'excitation du système nerveux central, étaient assez considérables pour que son usage soit limité alors que pour la flécaïne et le mexilétine, ils étaient si importants que près de la moitié des participants ont abandonné ces études (Lockwood et al., 2002).

2.2. Anticonvulsivants

Plusieurs médicaments anticonvulsivants ont été étudiés pour leur efficacité éventuelle contre les acouphènes, bien qu'il y ait un manque flagrant d'études cliniques contrôlées. Les benzodiazépines sont des agonistes des récepteurs GABA_A et le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur présent en périphérie et au niveau central de la voie auditive. Ils sont donc susceptibles de réduire l'hyperactivité neuronale liée à l'acouphène (Goldstein and Shulman, 2003). La plupart des benzodiazépines utilisées comme le clonazépam, le diazépam, le flurazépam, l'oxazépam et le bromazépam (Dobie, 1999) ont entraîné des effets symptomatologiques. Toutefois, l'alprazolam est la molécule dont les effets sont les plus clairs (Johnson et al., 1993) et aucune tolérance pharmacologique n'a été observée (Vernon and Meikle, 2003). Par contre, même si les benzodiazépines s'avéraient efficaces dans le soulagement des acouphènes, les désavantages de leur utilisation comprennent des effets secondaires importants dont la sédation (Darlington and Smith, 2007).

La gabapentine est un autre anticonvulsivant qui a été étudié en rapport avec les acouphènes (Goldstein and Shulman, 2003). Elle s'est avérée efficace dans le cas d'acouphènes induits par traumatisme sonore chez certains patients dans une étude clinique contrôlée (Bauer and Brozoski, 2006) et dans une étude animale chez le rat (Bauer and Brozoski, 2001). La gabapentine pourrait donc avoir une certaine efficacité pour traiter les acouphènes induits par un traumatisme sonore, mais le nombre d'études contrôlées n'est pas suffisant pour le prouver (Bauer and Brozoski, 2007; Dinces, 2008).

Certains anticonvulsivants sont des inhibiteurs des canaux sodiques dépendants du voltage et, en partant de l'hypothèse que les acouphènes seraient causés par une hyperactivité neuronale, représentent une cible intéressante pour le traitement des acouphènes. La carbamazépine est celle qui a fait l'objet du plus grand nombre de recherches. Toutefois, peu d'études sont concluantes quant à l'efficacité de la carbamazépine chez l'humain. Les résultats d'une étude chez l'animal suggèrent que cette molécule protégerait contre l'apparition de symptômes d'acouphènes induits par l'acide salicylique (Zheng et al., 2008).

2.3. Antispasmodiques

Une étude récente a révélé que les acouphènes induits par le salicylate chez le rat sont associés à une régulation négative des récepteurs GABA_B dans les noyaux cochléaires dorsaux et ventraux (Darlington and Smith, 2007). Le baclofène, un agoniste des récepteurs GABA_B, a été utilisé pour traiter les acouphènes, mais avec peu de succès et des effets secondaires considérables (Simpson and Davies, 1999). Chez le rat, une administration de L-baclofène semble montrer une efficacité pour réduire les signes d'hyperactivité dans le colliculus inférieur alors que le D-baclofène n'a aucun effet (Szczepaniak and Moller, 1995). Les essais cliniques chez l'homme se sont avérés peu concluants jusqu'à maintenant (Westerberg et al., 1996).

2.4. Antidépresseurs

La comorbidité des acouphènes et de la dépression est rapportée dans la littérature (Shea et al., 1981; Langguth et al., 2007; Robinson et al., 2007; Belli et al., 2008). Les antidépresseurs pourraient donc s'avérer des outils intéressants pour traiter les acouphènes, en même temps que la dépression. Bien que l'acouphène fasse partie des effets secondaires possibles de certains antidépresseurs, des études ont rapporté une amélioration de l'état de certains patients dépressifs souffrant d'acouphène lors de la prise d'antidépresseurs (Folmer and Shi, 2004). Par contre, le traitement de l'acouphène par les antidépresseurs semble inefficace chez les patients non dépressifs (Shea et al., 1981; Robinson et al., 2005). Les récepteurs sérotoninergiques font partie des candidats suspectés d'être impliqués dans la modulation des processus sensoriels du cortex auditif primaire. Selon une hypothèse, l'inhibition de la recapture de la sérotonine inhiberait la transmission des signaux acouphéniques (Shea et al., 1981). Parmi les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine les plus étudiées, mentionnons la fluoxétine et la paroxétine. Le traitement de la dépression et de l'anxiété pourrait également avoir un effet indirect sur la perception des acouphènes (Robinson et al., 2007). Les antidépresseurs tricycliques ont également été étudiés auprès de multiples populations, dépressives et sans symptôme de dépression, mais les quelques études contrôlées et randomisées n'ont pas trouvé de diminution significative des acouphènes par rapport au groupe placebo (Dobie, 1999). D'autres études sont donc nécessaires pour pouvoir recommander les antidépresseurs comme traitement pour les acouphènes (Baldo et al., 2006; Robinson et al., 2007).

2.5. Corticostéroïdes et aminosides

La vaste majorité des médicaments administrés par voie orale ou parentérale ne pouvant atteindre la cochlée, certains agents pharmacologiques comme les stéroïdes et les aminosides ont été appliqués localement par voie intratympanique (Dodson and Sismanis, 2004). Des récepteurs stéroïdiens seraient présents dans les os temporaux et une augmentation du flot sanguin causée par les corticostéroïdes permettrait une diminution des symptômes d'acouphène dans les cas de maladie de Ménière (Dodson and Sismanis, 2004).

La dexaméthasone et la méthylprednisolone ont donné des résultats partagés, mais ils seraient plus efficaces dans les cas de maladie de Ménière avec surdité aux basses fréquences de type fluctuant (Dodson and Sismanis, 2004). Dans les cas avancés de maladie de Ménière, l'utilisation de molécules ototoxiques telles que les antibiotiques aminoglycosides, en particulier la gentamicine, peuvent s'avérer utiles en détruisant les cellules sensorielles de la cochlée (Dodson and Sismanis, 2004). Cependant, ce traitement ne garantit pas une disparition des acouphènes, qui peuvent au contraire être exacerbés.

2.6. Prostaglandines : PGE1 (ou vasodilatateurs)

Les vasodilatateurs ont fait partie de la liste de candidats potentiels pour soulager les symptômes d'acouphène dans les cas de maladie de Ménière, mais des études récentes n'ont pu confirmer leur efficacité (Simpson and Davies, 1999). Administré par voie orale, le misoprostol, un analogue synthétique de la prostaglandine E1 stimulant la vasodilatation, peut se révéler utile dans les cas d'acouphènes associés au syndrome de Ménière (Dinces, 2008). Les études cliniques effectuées avec cette molécule ont cependant indiqué des bénéfices limités (Simpson and Davies, 1999; Yilmaz et al., 2004).

2.7. Inhibiteurs de la HMG-CoA réductase

Les inhibiteurs de l'enzyme HMG-CoA réductase sont suspectés d'avoir une action bénéfique sur le système auditif par l'intermédiaire d'une réduction de la présence de lipoprotéines de basse densité dans les vaisseaux sanguins. Une présence excessive de cholestérol pourrait nuire à la microcirculation cochléaire, augmenter la rigidité des membranes et diminuer la motilité des cellules ciliées (Olzowy et al., 2007). L'atorvastatine a été utilisée lors d'un essai clinique contrôlé et randomisé avec placebo sur la presbycusie et les symptômes d'acouphènes associés ont été mesurés (Olzowy et al., 2007). Le niveau de déficience auditive n'a pas subi de changement suite à la prise d'atorvastatine par voie orale et une tendance non statistiquement significative vers une diminution de l'acouphène a été observée (Olzowy et al., 2007).

2.8. Médecines alternatives et complémentaires (produits naturels)

La médecine alternative et complémentaire regroupe des systèmes de soins de santé et de soins médicaux, de pratiques et de produits ne faisant pas partie de la médecine dite « conventionnelle » tels que des vitamines, des minéraux, des antioxydants et des herbes (Goldberg and Guitton, 2009). Ces produits ont été employés dans le passé, et le sont encore aujourd'hui, pour tenter de soulager les patients atteints d'acouphènes. Toutefois, ils n'ont aucun effet concluant pour traiter les acouphènes. De plus, la prudence est de mise dans l'usage de ces produits, qui malgré les croyances populaires, peuvent être toxiques lorsque mal employés.

2.8.1. Vitamines, minéraux et antioxydants

Les vitamines A, B1, B3, B6, B9, B12, C, E ainsi que le magnésium, le calcium, le potassium, le manganèse, le sélénium et le zinc sont des traitements empiriques de l'acouphène parfois utilisés. Les bénéfices de leur emploi chez des personnes souffrant d'acouphènes s'alimentant convenablement sont négligeables et leur efficacité n'a pas été démontrée lors d'essais contrôlés et randomisés (Enrico et al., 2007). L'usage d'antioxydants, tel que la coenzyme Q₁₀, est plus rationnel car il s'appuie sur l'implication des effets oxydatifs dans les lésions ototoxiques causées par les agents antibactériens et les agents chimiothérapeutiques de type platine, comme le cisplatine (Enrico et al., 2007). Encore une fois, il n'y a aucun résultat concluant concernant l'efficacité des antioxydants dans le traitement de l'acouphène (Khan et al., 2007).

2.8.2. *Ginkgo biloba* et autres composés végétaux

Le *Ginkgo biloba* contient deux types de principes actifs particuliers, les glycosides flavonoïdes et des lactones terpènes, qui sont responsables de nombreux effets biologiques tels que l'interaction avec plusieurs neurotransmetteurs et l'amélioration de la microcirculation (via l'inhibition de la fonction d'activation plaquettaire). Cette plante a également été proposée comme traitement pour plusieurs pathologies du système nerveux

dont les acouphènes. L'efficacité reste une fois de plus à confirmer au moyen d'essais cliniques rigoureux (Lockwood et al., 2002; Enrico et al., 2007).

2.8.3. Toxine botulique

L'application de toxique botulique par injection locale autour de l'oreille a été suggérée dans une étude récente pour traiter les acouphènes d'origine somatique (Lainez and Piera, 2007), mais les résultats sont ambigus. En effet, les auteurs révèlent une amélioration en ce qui concerne les acouphènes sans mentionner ce qui se produit au niveau de l'audition. Dans le cas des acouphènes, c'est plutôt son rôle d'inhibiteur du glutamate qui serait intéressant. Cependant, la prudence est de mise pour l'utilisation de cette molécule puisqu'elle peut entraîner des effets secondaires comme des difficultés de déglutition, des troubles de la parole et respiratoires, une faiblesse généralisée, une parésie des muscles respiratoires, voire même une atteinte des nerfs crâniens.

2.9. Approches non pharmacologiques

Il existe une panoplie de traitements dits « comportementaux » qui visent à apprendre aux patients à tolérer ou à mieux maîtriser leurs acouphènes. Ces approches tentent de limiter les effets indésirables sans toutefois soigner les acouphènes. De plus, leur évaluation est ardue puisqu'il faut s'assurer que les acouphènes traités et les outils de mesure utilisés sont comparables d'une étude à l'autre.

Le masquage et les thérapies de réentraînement (*retraining*) sont les deux pratiques les plus répandues. Le masquage implique le port d'une orthèse auditive produisant un bruit masquant la fréquence de l'acouphène. Cette approche peut permettre d'annuler les acouphènes une fois l'orthèse enlevée, mais les effets ne persistent pas à long terme et il peut même se produire une aggravation des symptômes dans certains cas (Dinces, 2008). Les thérapies de réentraînement tentent plutôt d'habituer le patient à faire fi d'un signal acouphénique. À ce jour, l'efficacité de cette technique n'a pas été prouvée à long terme (Golberg and Guittou, 2009). Le biorétrocontrôle et la réduction de stress, la thérapie

cognitive comportementale, les stimulations électriques, l'acupuncture, la stimulation répétitive transcrânienne, l'usage d'ultrasons, l'hypnose et la psychothérapie sont autant de techniques dites « alternatives » dont l'efficacité n'a encore une fois pu être établie lors d'essais cliniques contrôlés et randomisés (Dobie, 1999; Vernon and Meikle, 2003). Il est également important de garder en tête que l'acouphène est un symptôme chronique qui nécessite une solution permanente. Il faut donc être prudent face à certains traitements qui se révèlent efficaces sur quelques semaines, mais qui ne le sont plus après plusieurs mois.

Malgré les avancées dans la compréhension des bases neurophysiologiques des acouphènes, le progrès dans le développement de traitements pharmacologiques demeure faible (Eggermont and Roberts, 2004; Baguley, 2006). Comparativement à d'autres désordres neurologiques, peu d'essais cliniques contrôlés et randomisés ont été effectués, et ce même pour des agents pharmacologiques couramment utilisés pour traiter les acouphènes (par exemple la carbamazépine et la gabapentine). Des études sur de nouveaux agents pharmacologiques potentiels tels que la mémantine émergent, mais encore une fois de façon très lente (Simpson and Davies, 1999; Smith and Darlington, 2005).

Il ressort clairement que l'absence de traitement efficace vient du manque de connaissances solides sur les mécanismes biologiques exacts sous-tendant le développement et le maintien des acouphènes à long terme. Les modèles animaux constituent une des premières avancées majeures dans la compréhension de ces mécanismes. Ainsi, nous allons tenter au cours des prochains paragraphes de faire un survol le plus exhaustif possible des différents modèles animaux d'acouphènes qui ont été développés au cours des dernières décennies.

3. Les modèles expérimentaux d'acouphènes

Un des premiers défis de la recherche sur les acouphènes a été celui d'induire des acouphènes chez l'animal. Les modèles animaux se sont révélés un outil précieux afin de comprendre les mécanismes biologiques à la base des acouphènes. Une fois les acouphènes induits, un autre défi était de les mesurer. La solution résidait cette fois dans les méthodes

de comportement (Jastreboff et al., 1988a, 1988b; Guitton et al., 2003; Guitton, 2004), dont certaines seront présentées un peu plus loin dans cette partie. Tout d'abord, faisons un survol des différents modèles utilisés pour induire les acouphènes.

3.1. Les modèles d'acouphènes

3.1.1. Le salicylate

La plupart des connaissances sur les acouphènes proviennent de recherches basées sur un modèle unique et largement utilisé, celui des acouphènes induits par le salicylate (Jastreboff et al., 1988a, 1988b; Jastreboff and Sasaki, 1994; Chen and Jastreboff, 1995; Wallhäusser-Franke et al., 1996; Wallhäusser-Franke, 1997; Cazals et al., 1998; Bauer et al., 1999; Cazals, 2000; Guitton et al., 2003; Peng et al., 2003; Wallhäusser-Franke et al., 2003; Guitton and Puel, 2004; Malkhe and Wallhäusser-Franke, 2004; Guitton et al., 2005; Wallhäusser-Franke et al., 2006; Guitton and Dudai, 2007; Liu et al., 2007; Puel and Guitton, 2007; Yang et al., 2007; Ruel et al., 2008). Le salicylate est présenté en détails plus loin dans ce chapitre, à la section 3.2. Tout d'abord, voici une présentation des autres modèles utilisés pour induire des acouphènes chez l'animal, la plupart étant considérés comme anecdotiques en raison de leurs effets secondaires importants.

3.1.2. La quinine

Un premier modèle pharmacologique d'induction des acouphènes est celui utilisant la quinine, un alcaloïde naturel ayant des propriétés antipyrétique, antipaludique et analgésique (Canadian Pharmacists Association, 2007). La quinine a d'abord été utilisée pour la prévention du paludisme avant d'être supplantée par des dérivés. Elle peut induire des acouphènes chez l'homme comme chez l'animal (Jastreboff et al., 1991). Il a été suggéré que la quinine induirait des acouphènes via un blocage des canaux potassiques activés par le calcium et un élargissement des potentiels d'action des fibres du nerf auditif (Puel et al., 1990; Lin et al., 1998). La quinine réduit également la fonction entrée-sortie du potentiel d'action cochléaire composite (somme de l'activité unitaire des fibres du nerf

auditif) et les potentiels microphoniques et sommatifs cochléaires (potentiels électriques reflétant l'activité de certaines cellules ciliées), mais n'affecte pas le potentiel endocochléaire (Puel et al., 1990).

Bien que la quinine ait apporté plusieurs éléments pertinents pour la compréhension des mécanismes à la base des acouphènes (section 3.3), il n'en demeure pas moins qu'elle possède des effets indésirables importants. Outre son action non spécifique sur les canaux potassiques, la quinine possède une toxicité élevée bien connue sur les systèmes hématologique, rénal, neurologique, cardiaque et endocrinien (Rouveix, 1999; Canadian Pharmacists Association, 2007). L'effet le plus connu de la quinine est le cinchonisme qui comprend non seulement les acouphènes, mais également d'autres effets secondaires comme des vertiges, céphalées, nausées, troubles de la vision et baisse aiguë de l'acuité auditive (Canadian Pharmacists Association, 2007). Injectée en intramusculaire, une dilution est nécessaire sinon la solution provoque une nécrose tissulaire (Nosten and White, 1999). Plusieurs autres effets secondaires tels que des troubles gastro-intestinaux ou neurologiques centraux peuvent également survenir suite à une administration de quinine (Canadian Pharmacists Association, 2007).

3.1.3. Le cisplatine

Le cisplatine, agent antinéoplasique contenant du platine, peut également être utilisé pour induire des acouphènes (Koegel, 1985; Kaltenbach et al., 2002; Rachel et al., 2002; Wang et al., 2003; Kaltenbach, 2006). En situation thérapeutique, le cisplatine est utilisé dans le traitement de différents cancers tels que les sarcomes, carcinomes, lymphomes et tumeurs des cellules germinales. Le mécanisme d'action exact du cisplatine n'est pas connu mais il est, d'un point de vue biochimique, similaire aux composés alkylants, c'est-à-dire qu'il se fixe sélectivement sur les bases puriques de l'ADN (A ou G) et induit une variation de la conformation locale du double brin d'ADN, ce qui inhibe la réplication et la transcription de l'ADN, et induit ainsi la mort cellulaire (Canadian Pharmacists Association, 2007).

Ce modèle d'acouphènes présente cependant des effets secondaires négatifs importants pouvant conduire à un état moribond. En plus d'être cytotoxique et néphrotoxique, le cisplatine est ototoxique puisqu'il entraîne la dégénération de l'organe de Corti avec une perte partielle ou totale des CCE, une perte sporadique des CCI et endommage la strie vasculaire (Estrem et al., 1981; McAlpine and Johnstone, 1990; Tsukasaki et al., 2000; Kaltenbach et al., 2002). Les neurones auditifs primaires semblent également directement affectés (Zheng and Gao, 1996). L'exposition au cisplatine induit des hauts niveaux de stress oxydatif : il y a apparition de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) dans la cochlée et des dommages dus aux radicaux libres s'ensuivent (Clerici et al., 1996). Le cisplatine endommage ainsi fortement la cochlée et induit finalement une perte d'audition sensorineurale bilatérale irréversible (Wang et al., 2003). Finalement, d'un point de vue pratique, le cisplatine est un composé salin qui se dissout mal, ce qui rend son utilisation difficile.

3.1.4. Le méfénamate

Le méfénamate est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) qui bloque la cyclooxygénase de façon non sélective (Saeed and Warren, 1973; Guitton et al., 2003) et empêche ainsi la synthèse de prostaglandines (Puel et al., 1990). En effet, la cyclooxygénase est une enzyme qui convertit l'acide arachidonique en prostaglandines et en thromboxanes (Jung et al., 1992). En bloquant la cyclooxygénase, le méfénamate crée une accumulation d'acide arachidonique dans les membranes biologiques de la cochlée. Cet amoncellement d'acide arachidonique augmenterait la probabilité d'ouverture des NMDAR (Guitton et al., 2003; Guitton and Puel, 2004). L'inhibition de la voie des cyclooxygénases et l'activation de récepteurs NMDAR cochléaires serait un des mécanismes via lequel le méfénamate induirait des acouphènes.

En clinique, le méfénamate est utilisé pour traiter les douleurs menstruelles (dysménorrhée, ménorragie), l'arthrite rhumatoïde et les migraines (Peatfield et al., 1983). En recherche, il a été utilisé dans quelques études pour induire des acouphènes chez le rat (Guitton et al., 2003; Puel, 2007; Ruel et al., 2008). Cependant, l'acide méfénamique

possède une forte toxicité, surtout au niveau des reins. Il peut également entraîner plusieurs effets secondaires tels que la diarrhée, un vomissement accompagné de sang, l'hématurie (sang dans l'urine) et une vision brouillée (Trinus et al., 1977).

3.1.4. Le traumatisme sonore

Finalement, les acouphènes peuvent également être induits par traumatisme sonore (Heffner and Harrington, 2002; Heffner and Koay, 2005; Guitton and Dudai, 2007). C'est le modèle le plus réaliste puisque le traumatisme sonore est la principale cause des acouphènes recensés en clinique humaine (Coles, 1983; Chung et al., 1984; Dieroff and Meissner, 1987; Nicolas-Puel et al., 2006; Nondahl et al., 2007; Muluk and Oguzturk, 2008). Ainsi, les avancées fournies à l'aide de ce modèle sont beaucoup plus pertinentes pour leurs applications éventuelles en réalité clinique. Cette méthode d'induction demeure toutefois difficile d'accès. En effet, seulement une partie des animaux (environ 50%) développent des acouphènes (Heffner and Harrington, 2002; Guitton and Dudai, 2007) et l'équipement nécessaire, comme une chambre sourde, rend son utilisation difficile. De plus, environ la moitié des acouphènes induits par traumatisme sonore sont irréversibles (Guitton and Dudai, 2007).

3.2. Le modèle des acouphènes induits par le salicylate

3.2.1. Propriétés du salicylate

Le salicylate de sodium, composé actif de l'aspirine (acide acétylsalicylique), est un composé végétal extrait de l'écorce de saule blanc (*Salix alba*). Le salicylate est un agent anti-inflammatoire non stéroïdien bien connu (Vane, 1971; Vane and Botting, 2003). Il y a maintenant plus d'un siècle, en 1877, à un stade précoce de son utilisation clinique, le docteur Germain Sée a décrit pour la première fois que des doses massives d'aspirine provoquaient des pertes auditives et des acouphènes réversibles chez l'homme (Sée, 1877). Ces effets ont par la suite été attribués au salicylate (Myers and Bernstein, 1965). Comme il a été décrit précédemment pour le méfénamate (section 3.1.4), le salicylate inhibe

également l'activité de la cyclooxygénase (Vane, 1971; Mitchell et al., 1993; Vane and Botting, 1998) et crée une accumulation d'acide arachidonique dans les membranes lipidiques de la cochlée, ce qui augmenterait la probabilité d'ouverture des NMDAR cochléaires (Guitton and Puel, 2004). C'est entre autres via ce mécanisme que le salicylate induirait des acouphènes (Guitton et al., 2003; Peng et al., 2003; Guitton and Puel, 2004; Ruel et al., 2008).

Les premiers remèdes dérivés du saule et autres plantes riches en salicylate font partie de la pharmacopée au moins depuis l'époque de la civilisation ancienne sumérienne, en Mésopotamie (Diarmuid, 2005). Une tablette de pierre datant de la Troisième dynastie d'Ur, 3000 ans avant J.-C., arbore des textes médicaux listant le saule parmi les plantes utilisées comme remède, mais sans autres indications (Diarmuid, 2005). La première référence spécifique à l'utilisation du saule pour ses propriétés analgésique, antipyrétique et anti-inflammatoire provient d'un texte médical égyptien, le papyrus Ebers, datant de 1534 avant J.-C., probablement une copie du texte datant de la tablette d'Ur (Diarmuid, 2005). Les préparations à partir de l'écorce de saule sont devenues un standard du *materia medica* de la médecine moderne au 5^e siècle. C'est durant cette époque que le médecin grec Hippocrate écrivit à propos d'une poudre amère extraite du saule blanc qui pouvait soulager les douleurs et réduire la fièvre (Feldmann, 1991). Plus tard, au 19^e siècle, certains peuples américains indigènes, dont les Cherokees, faisaient des infusions de saule blanc pour traiter la fièvre (Paul and Mary, 1975). Le révérent Edward Stone avait également noté en 1763 que l'écorce de saule était efficace pour réduire la fièvre (Stone, 1763). L'extrait actif de l'écorce, appelé salicine d'après le nom latin du saule blanc (*Salix alba*), a été isolé et nommé par le chimiste allemand Johann Andreas Buchner en 1828. Une plus grande quantité fut par la suite isolée dans sa forme cristalline en 1829 par un pharmacien français, Henri Leroux. En 1838, le chimiste italien, Raffaele Piria, trouva une méthode pour obtenir une forme acide du saule blanc plus efficace, qu'il nomma acide salicylique et réussit par la suite à convertir la substance en un sucre et un second composé, qui oxydé devient l'acide salicylique (Diarmuid, 2005).

De nos jours, l'acide salicylique est biosynthétisé à partir d'un acide aminé, la phénylalanine. Le salicylate de sodium est commercialement préparé à partir de phénolate de sodium combiné au dioxyde de carbone sous haute pression (100 atm) et haute température (390 K), une méthode connue comme la réaction de Kolbe-Schmitt. L'acidification du produit avec de l'acide sulfurique donne l'acide salicylique (Figure 5). Finalement, l'acide salicylique peut également être préparé via l'hydrolyse de l'aspirine (acide acétylsalicylique) ou du salicylate de méthyle avec une base ou un acide fort.

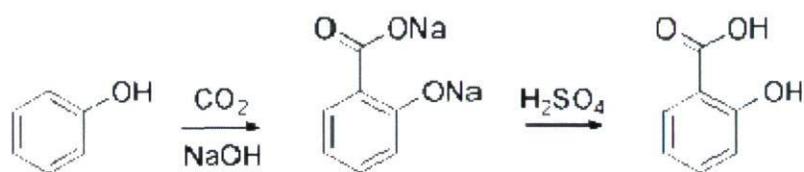


Figure 5. Réaction de Kolbe-Schmitt.

Le salicylate de sodium est commercialement préparé à partir de phénolate de sodium combiné au dioxyde de carbone sous haute pression (100 atm) et haute température (390 K), et le produit est traité avec de l'acide sulfurique. Le produit final est un hydroxy-acide aromatique connu sous le nom d'acide salicylique.

3.2.2. Avantages du modèle

Les acouphènes induits par le salicylate sont caractérisés, tant chez l'homme (McCabe and Dey, 1965; Myers and Bernstein, 1965) que chez l'animal (Jastreboff et al., 1988a; Cazals et al., 1998; Cazals, 2000; Guitton et al., 2003; Guitton et al., 2005), par leur réversibilité et leur facilité d'utilisation. Ainsi, dans les études électrophysiologiques par exemple, la facilité d'application du salicylate (par injection) permet l'étude d'un même neurone avant, pendant et après l'injection (Eggermont, 2008). De plus, les acouphènes sont induits dans 100% des cas si la dose administrée de salicylate est suffisante (Cazals et

al., 1998; Guitton et al., 2003; Guitton and Dudai, 2007; Puel and Guitton, 2007). En raison de cette forte reproductibilité, le salicylate représente un outil expérimental idéal pour induire les acouphènes de manière calibrée (Jastreboff et al., 1988a; Cazals et al., 1998; Bauer et al., 1999; Guitton et al., 2003; Puel and Guitton, 2007). Il représente d'ailleurs depuis plusieurs décennies le moyen privilégié d'induire des acouphènes dans le contexte de la recherche biomédicale.

3.2.3. Inconvénients du modèle

Cependant, bien que les acouphènes induits par le salicylate représentent un excellent modèle de recherche fondamentale, l'exposition chronique au bruit reste la principale cause des acouphènes recensés en clinique humaine (Nicolas-Puel et al., 2002). Le modèle ne reflète donc pas la réalité clinique. De plus, les acouphènes induits par le salicylate sont réversibles alors que les acouphènes induits par le bruit sont souvent chroniques. L'étude des différents aspects des acouphènes à long terme n'est donc pas possible avec ce modèle. Finalement, un troisième inconvénient a été mis en évidence récemment : il semblerait que les acouphènes induits par le salicylate et ceux induits par le bruit diffèrent par rapport à leurs caractéristiques perceptives (Guitton and Dudai, 2007).

De plus, tout comme les autres molécules utilisées pour induire des acouphènes et décrites précédemment (section 3.1), le salicylate peut également entraîner des effets secondaires indésirables. Tout d'abord, à forte concentration, le salicylate peut être néphrotoxique et hépatotoxique. De plus, un traitement au salicylate peut, chez l'homme comme chez l'animal, s'accompagner d'anémie, d'hémorragies gastro-intestinales, de malformations fœtales (tératogénicité) et parfois, de réactions allergiques (Lucente, 1971; Rainsford, 1984). Malgré ces effets indésirables possibles, les avantages du salicylate surpassent les inconvénients et font de cette molécule l'un des modèles les plus faciles à utiliser pour induire des acouphènes chez l'animal.

3.2.4. Aspects centraux du salicylate

Des agents pharmacologiques induisant des acouphènes peuvent avoir des répercussions directes sur le système auditif central. Dans le cas de l'administration de salicylate, les effets sont variables d'une structure auditive à l'autre selon les corrélats étudiés.

Les résultats basés sur les taux de décharge spontanée (SFR) obtenus jusqu'à présent indiquent des changements dans le système auditif central suite à des acouphènes dû à un dysfonctionnement des récepteurs cochléaires. Une diminution des signaux sortants en provenance de la cochlée réduit l'inhibition dans les structures auditives centrales (Szczepaniak and Moller, 1995; Abbott et al., 1999; Milbrandt et al., 2000), entraînant une hyperexcitabilité du système auditif central (Salvi et al., 1990; Salvi et al., 2000). Cette réduction de l'inhibition a été indirectement montrée, suite à un traitement au salicylate, par une élévation des SFR des neurones du noyau central et du noyau externe du colliculus inférieur (Jastreboff and Sasaki, 1986; Chen and Jastreboff, 1995) et de ceux du cortex auditif secondaire (Eggermont and Kenmochi, 1998). Ces résultats sont en accord avec des études électrophysiologiques montrant que le salicylate bloque les canaux calciques de type L (Liu et al., 2005) et les canaux potassiques rectifiants sortants dans le colliculus inférieur (Liu and Li, 2004). Le salicylate augmente également l'activité sérotoninergique chez le rat jusqu'à six heures après l'injection dans le colliculus inférieur et dans le cortex auditif primaire (Liu et al., 2003). D'autre part, aucun changement des SFR n'a été observé dans le cortex auditif primaire suite à l'administration d'une faible dose de salicylate (Ochi and Eggermont, 1996) alors qu'à forte dose, le salicylate entraîne une diminution des SFR (Eggermont, 1992; Eggermont and Kenmochi, 1998). La diminution significative de l'activité électrique spontanée dans le cortex auditif primaire suggère fortement un effet central du salicylate (Kenmochi and Eggermont, 1997). Toutefois, il n'est pas clair si ces élévations des SFR sont directement reliées à la perception des acouphènes.

Deux autres corrélats des acouphènes ont été étudiés à l'aide du modèle animal d'acouphènes induits par le salicylate : les décharges en bouffée et la synchronie neuronale. Suite à une administration de salicylate, les décharges en bouffée tendent à augmenter dans le noyau externe du colliculus inférieur (Chen and Jastreboff, 1995) alors que dans les neurones corticaux, la quantité de bouffée observée ne change pas (Ochi and Eggermont, 1996). Quant à la synchronie neuronale, elle est également plus élevée dans le cortex auditif primaire suite à un traitement au salicylate (Ochi and Eggermont, 1997; Norena and Eggermont, 2003). Les études animales suggèrent également que le métabolisme diminue dans le colliculus inférieur après une administration de salicylate, mais qu'il augmente dans le corps genouillé médian, le cortex auditif, le cortex auditif et l'amygdale (Wallhäusser-Franke et al., 1996; Wallhäusser-Franke, 1997; Wallhäusser-Franke et al., 2003; Zhang et al., 2003).

3.3. L'apport des modèles animaux d'acouphènes

3.3.1. Les méthodes de mesure des acouphènes chez l'animal

Le développement de modèles d'acouphènes chez l'animal a été une des avancées majeures dans la compréhension de la neurobiologie des acouphènes. En effet, si un patient peut dire qu'il perçoit ou non des acouphènes, il en va tout autrement pour un animal ! Il a fallu attendre la seconde moitié des années 80 pour qu'un scientifique parvienne à surpasser les difficultés rencontrées pour établir un modèle d'acouphènes chez l'animal. Ce sont Jastreboff et ses collaborateurs qui développèrent le premier test comportemental de conditionnement suppressif permettant de mettre en évidence des acouphènes chez l'animal (Jastreboff and Sasaki, 1986; Jastreboff et al., 1988a, 1988b; Brennan and Jastreboff, 1991; Jastreboff and Brennan, 1994; Jastreboff and Sasaki, 1994). Le protocole combinait l'utilisation du salicylate et un paradigme de conditionnement suppressif basé sur la privation d'eau (Jastreboff et al., 1988a, 1988b; Jastreboff and Sasaki, 1994). Bauer et collaborateurs ont utilisé une variante de ce protocole de conditionnement et administré le salicylate aux rats via l'eau qui leur était fournie (Bauer et al., 1999). Une variante avec le traumatisme sonore a également été utilisée (Heffner and Harrington, 2002; Heffner and

Koay, 2005). Brièvement, ces protocoles impliquaient le conditionnement des animaux à effectuer une action en présence d'un son. Ainsi, il était moins probable, par rapport aux animaux contrôles, que les animaux traités au salicylate effectuent cette action quand le bruit s'arrêtait puisqu'ils expérimentaient des acouphènes (perception sonore en l'absence de stimulation externe).

Étant donné que ces tests étaient stressants pour l'animal (perte de poids due à la privation d'eau et de nourriture), assez complexes d'utilisation et que la durée de conditionnement était très longue, un autre modèle comportemental a été développé, celui de l'évitement actif avec renforcement négatif (Guitton et al., 2003; Guitton, 2005). Dans ce protocole, l'animal est conditionné à exécuter une tâche motrice, c'est-à-dire à grimper sur une barre en réponse à un son extérieur. Ainsi, le résultat attendu demeure le même, c'est-à-dire que les animaux présentant des acouphènes induits par le salicylate exécutent la tâche en l'absence de son extérieur. Deux paramètres sont ensuite évalués : le nombre de réponses correctes (l'animal grimpe lorsque le son est émis) qui permet d'évaluer la sensibilité auditive et le nombre de faux positifs (l'animal grimpe en l'absence de son extérieur) qui permet de détecter la présence d'acouphènes. Contrairement aux protocoles précédents, ce paradigme d'évitement actif ne cause pas de changements dans l'état physiologique des animaux. Ce modèle présente donc des avantages importants, notamment lorsque des procédures chirurgicales subséquentes sont nécessaires. Finalement, un dernier test comportemental a été développé pour tester les acouphènes chez le rat, basé sur la navigation reliée à un son dans un labyrinthe immergé en forme de « T » avec renforcement positif (Guitton and Dudai, 2007). Ce test est basé sur l'association de la position d'une plateforme, dans l'un ou l'autre des bras du labyrinthe, par rapport à la présentation ou non d'un son. Ce test n'entraîne presque aucun stress chez l'animal, le conditionnement étant plus rapide et l'apprentissage à plus long terme. En parallèle, un autre modèle de mesure comportementale a été développé récemment par l'équipe de Knipper, à l'aide de la boîte de Skinner (automatisation de la présentation du stimulus et de renforcements) pour évaluer les acouphènes (Rüttiger et al., 2003; Tan et al., 2007; Singer et al., 2008). Encore une fois, ce test combine plusieurs paramètres (privation d'eau,

récompense/punition, tâche motrice), ce qui le rend complexe, autant pour l'expérimentateur que pour l'animal.

Les expériences de comportement ont également été couplées avec des enregistrements électrophysiologiques. Les méthodes utilisées pour mesurer les acouphènes de façon électrophysiologique consistent en des enregistrements de l'activité spontanée à l'aide d'électrodes posées sur la structure ou la cellule à l'étude, suite à une anesthésie (Puel et al., 1989). Plusieurs études ont ainsi mesuré l'activité spontanée des neurones auditifs (fibres unitaires), à l'aide de micro-électrodes de verre placées directement sur les cellules, au niveau du nerf auditif (Evans et al., 1981; Evans and Borerwe, 1982; Stypulkowski, 1990), du noyau cochléaire dorsal (Kaltenbach et al., 1998; Kaltenbach et al., 2000; Brozowski et al., 2002; Chang et al., 2002; Kaltenbach et al., 2002), du noyau externe (Jastreboff and Sasaki 1986; Chen and Jastreboff, 1995; Manabe et al., 1997) et central (Ma et al., 2005) du colliculus inférieur, du cortex auditif secondaire (Occhi and Eggermont, 1996; Eggermont and Kenmochi, 1998) et du cortex auditif primaire (Norena and Eggermont, 2003; Seki and Eggermont, 2003). Un ensemble de mesures des SFR du nerf auditif (potentiels globaux) peut être obtenu à partir d'enregistrements du spectre moyen d'activité, qui représente une mesure globale de l'activité spontanée du nerf auditif, en plaçant une macro-électrode sur le nerf auditif ou sur la fenêtre ronde de la cochlée (Schreiner and Snyder, 1987; Dolan et al., 1990; Martin et al., 1993; Cazals and Huang, 1996; Cazals et al., 1998).

Finalement, le bruit de fond cochléaire pourrait être une autre mesure possible des acouphènes chez l'animal. L'évaluation des effets du bruit contralatéral est une façon d'examiner l'activité efférente du complexe olivocochléaire médian (Cazals et al., 1998). L'oreille interne agit parfois comme un générateur de son produisant des sons appelés oto-émissions acoustiques (Tyler, 2000), qui sont le reflet des mécanismes actifs et des propriétés électromotiles des CCE (Promenade autour de la Cochlée, <http://www.cochlee.org/>). Ces oto-émissions peuvent être enregistrées à l'aide d'un microphone miniature placé dans le canal auditif. En plaçant une sonde dans le conduit auditif externe, on peut enregistrer une réponse acoustique après une émission spontanée.

Cependant, ce n'est que dans de très rares cas que ces oscillations ont pu être objectivées sous forme d'oto-émissions spontanées correspondant à la fréquence de l'acouphène.

3.3.2. Les contributions des différents modèles animaux d'acouphènes

Bien que chacun possède ses avantages et ses inconvénients, les différents modèles animaux d'acouphènes ont permis d'élargir les connaissances sur les acouphènes. Comme il a été mentionné auparavant, il est connu depuis longtemps que les humains peuvent percevoir des acouphènes (Sée, 1877). Les modèles d'acouphènes induits par le salicylate, la quinine, le cisplatine, le méfénamate et le traumatisme sonore ont permis de montrer que les animaux perçoivent également les acouphènes (Jastreboff et al., 1988a, 1988b; Jastreboff and Sasaki, 1994; Heffner and Harrington, 2002; Guitton et al., 2003; Guitton and Dudai, 2007). De plus, des atteintes cochléaires, tant modérées (par traumatisme sonore, par exemple) (Heffner and Harrington, 2002; Heffner and Koay, 2005; Guitton and Dudai, 2007) que massives (par le cisplatine, par exemple) (Kaltenbach et al., 2002; Rachel et al., 2002; Wang et al., 2003) peuvent provoquer des acouphènes. Bien que cela soit matière à polémique, des études utilisant le modèle d'acouphènes induits par le salicylate ont montré que les acouphènes pourraient partager des similitudes avec la perception des membres fantômes (Jastreboff et al., 1988a, 1988b) et la perception de la douleur et de la douleur chronique (Mahlke and Wallhäusser-Franke, 2004). Les modèles d'acouphènes induits par le salicylate (Guitton et al., 2003) et par un traumatisme sonore (Guitton and Dudai, 2007) ont permis de démontrer que les acouphènes pourraient aussi partager des mécanismes moléculaires communs avec la mémoire, en particulier dans le cas du profil d'activation des NMDAR.

En périphérie, des études réalisées chez le cochon d'Inde ont permis de relier les acouphènes induits par la quinine à une augmentation de la proportion des fibres du nerf cochléaire à haute activité spontanée, combinée à une diminution de la période réfractaire absolue (Mulheran, 1999). Des traitements au salicylate à des doses connues pour induire des acouphènes entraînent également une augmentation de l'activité spontanée des neurones auditifs primaires (Evans and Borerwe, 1982; Puel et al., 1989; Stypulkowski,

1990; Cazals et al., 1998). Comme mentionné aux sections 3.1 et 3.2, l'utilisation des modèles d'acouphènes induits par le salicylate et le méfénamate, combinée à des approches comportementales, ont également permis de démontrer que le salicylate potentialise les NMDAR du glutamate cochléaires via une inhibition de la cyclooxygénase et une augmentation de la concentration d'acide arachidonique (Guitton et al., 2003; Peng et al., 2003; Guitton and Puel, 2004; Ruel et al., 2008). Les acouphènes induits par le salicylate (Guitton et al., 2003; Guitton et al., 2005; Guitton and Dudai, 2007) et par un traumatisme sonore (Guitton and Dudai, 2007) semblent donc générés suite à l'activation de NMDAR cochléaires. Par la suite, il a été montré que la perception d'acouphènes induits par le salicylate peut être abolie par l'application intracochléaire d'antagonistes des NMDAR (Guitton et al., 2003; Guitton et al., 2005; Guitton and Dudai, 2007), illustrant un rôle-clé de la transmission synaptique dans la génération des acouphènes. De plus, des résultats récents ont démontré que cette sensibilité des acouphènes aux antagonistes des NMDAR existait également dans le cas des acouphènes provoqués par le bruit, renforçant davantage la validité de ce modèle expérimental (Guitton and Dudai, 2007). Dans le cas d'un traumatisme sonore, le blocage des acouphènes par des antagonistes NMDA ne peut se faire que dans les premiers jours après le traumatisme. Si l'action pharmacologique a lieu après cette période critique, le blocage des acouphènes déjà installés ne peut plus se faire (Guitton and Dudai, 2007).

Au niveau central, des traitements au salicylate à des doses connues pour induire des acouphènes induisent, tout comme en périphérie, une augmentation de l'activité spontanée des neurones auditifs, qui se propage jusque dans les neurones auditifs corticaux (Jastreboff and Sasaki, 1986; Chen and Jastreboff, 1995; Ochi and Eggermont, 1996; Manabe et al., 1997). Les différents modèles d'acouphènes ont permis de démontrer, non sans créer de polémique, que la perception d'acouphènes pourrait entraîner une plasticité au niveau des structures nerveuses centrales. Des études utilisant le cisplatine pour induire les acouphènes ont notamment permis de montrer une augmentation de l'activité spontanée (hyperactivité) des neurones du noyau cochléaire dorsal chez le hamster (Kaltenbach et al., 2002; Rachel et al., 2002). Cependant, comme le cisplatine possède une forte toxicité, la quasi-totalité des cellules ciliées de la cochlée étaient détruites. Comme mentionné plus tôt,

l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle chez des patients acouphéniques a permis de montrer des changements d'activation dans certaines zones limbiques (Mirz et al., 2000). Cependant, les sujets de l'étude avaient également des hallucinations auditives et ont été ultérieurement diagnostiqués comme schizophrènes. Finalement, Wallhäusser-Franke et ses collaborateurs ont montré qu'un traitement au salicylate induisant des acouphènes engendre de la plasticité dans différentes structures auditives (Wallhäusser-Franke et al., 1996; Wallhäusser-Franke, 1997; Mahlke and Wallhäusser-Franke, 2004; Wallhäusser-Franke et al., 2006). Toujours au niveau central, le modèle d'acouphènes induits par le salicylate a permis de montrer que l'anxiété peut potentialiser la perception d'acouphènes déjà présents (Guitton et al., 2005; Guitton, 2006) et que cette potentialisation pourrait faire intervenir des récepteurs sérotoninergiques (Guitton et al., 2005; Guitton, 2006). Cependant, ces récepteurs ne semblent pas directement impliqués ni dans la génération des acouphènes induits par le salicylate (Guitton et al., 2005) ni dans la génération des acouphènes induits par un traumatisme sonore (Guitton and Dudai, 2007).

Au niveau du cortex auditif, des altérations électrophysiologiques similaires ont été observées entre des traitements à la quinine et au salicylate induisant des acouphènes (Ochi and Eggermont, 1996; Kenmochi and Eggermont, 1997; Ochi and Eggermont, 1997; Eggermont and Kenmochi, 1998). Ainsi, les deux drogues diminuent les potentiels de champ locaux et les fréquences de modulation (Kenmochi and Eggermont, 1997) ainsi que les SFR des neurones (Eggermont and Kenmochi, 1998) et leur synchronie de manière dose-dépendante (Ochi and Eggermont, 1996; Ochi and Eggermont, 1997) dans le cortex auditif primaire alors qu'elles augmentent les SFR dans le cortex auditif secondaire (Eggermont and Kenmochi, 1998). Un traumatisme sonore provoquant des acouphènes induit une élévation des SFR dans le noyau cochléaire dorsal (Kaltenbach et al., 1998) et dans le cortex auditif primaire (Eggermont and Komiya, 2000; Noreña and Eggermont, 2003; Seki and Eggermont, 2003). De plus, une autre étude portant sur les effets d'un traumatisme sonore induisant des acouphènes a montré une augmentation de l'activité spontanée des cellules fusiformes dans le noyau cochléaire dorsal (Brozoski et al., 2002). Ces résultats suggèrent une augmentation des SFR dans les structures auditives corticales et sous-corticales suite à un traumatisme sonore et une exposition à des agents ototoxiques.

Les similitudes des effets entraînés par la quinine et le salicylate ainsi que cette élévation commune des SFR portent à croire que ces altérations sont reliées aux acouphènes (Cazals, 2000), sans toutefois qu'une relation directe avec la perception des acouphènes ait été mise en lumière à ce jour. De plus, il est à noter que ces similitudes ne sont pas dues au même mécanisme d'action. En effet, les altérations électrophysiologiques créées par le salicylate sont le reflet d'un effet périphérique au niveau des mécanismes actifs cochléaires alors que la quinine agit au niveau central sur les canaux potassiques et sodiques.

4. Les corrélats liés aux acouphènes induits par le salicylate

4.1. La plasticité synaptique liée aux acouphènes induits par le salicylate

La plasticité est une propriété du système nerveux qui permet à des parties spécifiques de ce système de changer de fonction ou d'organisation (Moller, 2007). Les changements d'efficacité synaptique (Wall, 1977) et les changements au niveau de la synthèse protéique dans les cellules nerveuses (Sie and Rubel, 1992) font partie des modifications induites par la plasticité. De tels changements peuvent altérer l'excitabilité et entraîner un changement de parcours de l'information ou une réorganisation du cortex cérébral (Kaas, 1991; Kral et al., 2000). Ces modifications peuvent avoir des effets bénéfiques tels qu'une réorganisation du système nerveux après des blessures ou une adaptation du système nerveux suite à des changements de l'information envoyée comme dans le cas d'implants cochléaires (Kral and Tillein, 2006; Kral et al., 2006). Cependant, cette habileté des systèmes nerveux sensoriels à se réorganiser ou à changer de fonction peut également causer des symptômes et signes de maladie. Ainsi, l'expression de la plasticité synaptique joue un rôle important dans la création des signes et symptômes de plusieurs désordres (Moller, 2006b), incluant les acouphènes (Moller, 2006a).

La réorganisation à court terme impliquerait des changements d'efficacité synaptique entraînant la potentialisation de synapses régulées par les NMDAR (Jain et al., 1998) et des changements dans la synthèse protéique (Sie and Rubel, 1992) alors que la réorganisation à long terme est probablement régulée par la pousse de dendrites et d'axones

ou leur élimination (Moller, 2007). Alors qu'il existe des signes de réorganisation du cortex cérébral chez des individus souffrant d'acouphènes, les populations de neurones affectés ne sont pas connues (Moller, 2007). De plus, comme il a été présenté au Chapitre I (section 3.3.2), plusieurs études chez l'animal ont démontré que la présence d'acouphènes pourrait entraîner une plasticité au niveau des structures nerveuses centrales (Ochi and Eggermont, 1996; Wallhäusser-Franke et al., 1996; Kenmochi and Eggermont, 1997; Ochi and Eggermont, 1997; Wallhäusser-Franke, 1997; Eggermont and Kenmochi, 1998; Kaltenbach et al., 1998; Eggermont and Komiya, 2000; Mirz et al., 2000; Brozoski et al., 2002; Kaltenbach et al., 2002; Rachel et al., 2002; Noreña and Eggermont, 2003; Seki and Eggermont, 2003; Mahlke and Wallhäusser-Franke, 2004; Wallhäusser-Franke et al., 2006). Parmi les marqueurs impliqués dans des phénomènes de plasticité, nous nous sommes intéressés aux molécules de signalisation intracellulaire MAPK-ERK et PI(3)K-AKT ainsi qu'aux NMDAR.

4.1.1. Voies de signalisation cellulaire

Les voies de signalisation cellulaire MAPK-ERK et PI(3)K-AKT sont toutes deux des effecteurs de la GTPase Ras et sont impliquées, notamment, dans des phénomènes de plasticité synaptique. Les MAPK contrôlent les signaux extracellulaires d'une grande variété de facteurs comme les cytokines et les neurotrophines afin de réguler la synthèse de protéines impliquées dans le réarrangement synaptique (Reichardt, 2006; Hollis et al., 2009; Van't Veer et al., 2009). La cascade des MAPK mène à l'activation de la protéine ERK qui est entre autres impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémoire, dans certains processus neurodégénératifs et dans les changements de plasticité qui surviennent dans le cortex visuel, l'hippocampe et l'amygdale (Di Cristo et al., 2001; Hebert and Dash, 2002; Bozon et al., 2003; Kelly et al., 2003; Thomas and Huganir, 2004; Narasimhan et al., 2009; Tian et al., 2009). Dans les tissus nerveux, la transduction du signal via la voie MAPK-ERK peut être initiée par une variété de stimuli dont les neurotrophines, les cytokines, l'excitation neuronale, les protéines G couplées à des récepteurs synaptiques, les protéines kinases, les stress cellulaires et les dommages neuronaux (Grewal et al., 1999; Pearson et al., 2001; Sweatt, 2001). L'activité de cette voie mène ultimement à la

phosphorylation, au niveau du cytosol, de ERK1 et ERK2 qui, à leur tour, phosphorylent des effecteurs ou substrats moléculaires. Les effecteurs extranucléaires incluent les protéines kinases ainsi que les protéines membranaires et cytosquelettiques (Suneja and Potashner, 2003). Après leur entrée dans le noyau, pERK1 et pERK2 peuvent phosphoryler des facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes (Xia et al., 1996; Fields et al., 1997; Pearson et al., 2001) et contribuent ainsi aux changements de plasticité synaptique (Impey et al., 1999; Mazzucchelli and Brambilla, 2000; Sweatt, 2001). Des études sur l'effet d'acouphènes induits par traumatisme sonore ont montré des répercussions sur l'expression de protéines MAPK, dans la cochlée (Meltser et al., 2010) et au niveau du système auditif central, dans le colliculus inférieur (Meltser and Canlon, 2010).

La voie PI(3)K (phosphatidylinositol 3-kinase) est une autre voie signalétique jouant un rôle clé dans les événements moléculaires sous-tendant la plasticité synaptique. En effet, dans les neurones, la voie PI(3)K, qui mène à l'activation de la PKB (ou AKT), est connue comme étant un modulateur de plasticité synaptique (Sweatt, 2001; Opazo et al., 2003). La voie PI(3)K est activée par des facteurs de croissance et possède comme substrats les phosphoinositides. Son activation entraîne la formation de PIP3, ce qui a pour effet de recruter PKD1 à la membrane plasmique. PKD1 est alors en mesure de phosphoryler AKT, ce qui contribue à son activation. AKT est une sérine/thréonine kinase qui, une fois phosphorylée, permet l'activation des gènes de prolifération et de survie cellulaire (Franke, 2008). La phosphorylation d'AKT peut également activer des processus mitogéniques incluant la transcription de gènes de survie et ainsi contribuer à des changements de plasticité (Kelly and Lynch, 2000; Lin et al., 2001; Raymond et al., 2002; Sanna et al., 2002). La voie PI(3)K est également activée par le stress cellulaire (Cantley, 2002; Franke et al., 2003). Ainsi, AKT serait activée dans l'organe de Corti suite à un traitement ototoxique entraînant la mort de cellules ciliées (Chung et al., 2006). Les résultats de cette étude semblent donc indiquer que la voie PI(3)K favoriserait la survie des cellules ciliées via ces cibles situées en aval, PKB/AKT et PKC.

4.1.2. Récepteurs glutamatergiques

Les NMDAR sont des récepteurs ionotropiques activés par le glutamate. Ils sont formés de sous-unités NR1 et NR2 (NR2A, NR2B, NR2C ou NR2D). NR1 est une sous-unité essentielle à la formation d'un récepteur fonctionnel et la combinaison de cette sous-unité avec les différentes sous-unités NR2 permet l'obtention de récepteurs dont les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques diffèrent (Nakanishi, 1992; Ziff, 1999). Outre le site de liaison aux agonistes, les NMDAR contiennent également un site de liaison à la glycine. L'activation de ce site est nécessaire au fonctionnement du récepteur. À l'intérieur du canal, un site cationique voltage dépendant fixant l'ion magnésium bloque l'influx ionique (Davis and Linn, 2003). En réponse au glutamate et à une forte dépolarisation membranaire, le blocage du canal du récepteur par le magnésium est levé et permet une entrée de calcium intracellulaire (Ozawa et al., 1998, Shen et al., 2006). Ce mécanisme entraîne l'activation subséquente de messagers secondaires et joue un rôle fondamental dans l'expression de divers mécanismes de plasticité synaptique (LTP et LTD) (Collingridge, 1987; Larson and Lynch, 1988; Chen and Diamond, 2002; Micu et al., 2006).

Les NMDAR sont donc au cœur de phénomènes de plasticité (Monyer et al., 1994; Nicoll and Malenka, 1995; Rosenblum et al., 1996; d'Aldin et al., 1997; Rosenblum et al., 1997). Ils sont non seulement impliqués au niveau cortical dans la LTP, mais également dans des phénomènes de plasticité liée au comportement chez les mammifères (Monyer et al., 1994; Nicoll and Malenka, 1995; Rosenblum et al., 1996; d'Aldin et al., 1997; Rosenblum et al., 1997). De plus, comme il a été présenté à la section 3.2.2, des études ont montré la présence de phénomènes de neuroplasticité liés aux acouphènes, incluant un rôle des NMDAR cochléaires (Oestreicher et al., 1999; Guitton et al., 2003; Guitton et al., 2005).

4.2. L'anxiété liée aux acouphènes induits par le salicylate

L'existence de relations étroites entre acouphènes et anxiété chez l'homme est connue depuis fort longtemps, sans toutefois que la nature de ces liens soit complètement comprise (Nicolas-Puel et al., 2002; Guitton, 2006). Déjà Hippocrate (460-377 av. JC), l'un des pères de la médecine occidentale, avait remarqué que des troubles anxieux étaient souvent associés aux acouphènes (Feldmann, 1991). Comme mentionné au Chapitre I, de nombreux cliniciens ont rapporté au fil des années une corrélation entre l'apparition d'acouphènes et des niveaux élevés d'anxiété (Shea et al., 1981; Schneider et al., 1994). Plus récemment, plusieurs études ont rapporté un lien entre ces deux phénomènes (Nicolas-Puel et al., 2002; Guitton et al., 2005; Guitton, 2006; Belli et al., 2008). Ainsi, l'anxiété est connue pour potentialiser fortement la perception de stimuli négatifs, c'est-à-dire que l'anxiété crée des conditions qui facilitent la perception subjective de stimuli préexistants. Des acouphènes « latents », non perçus en raison d'un filtrage du cerveau, pourraient donc être démasqués suite à des niveaux élevés de stress (Guitton et al., 2005; Guitton, 2006). D'un autre côté, les acouphènes peuvent représenter à eux seuls un important état anxieux car on peut facilement imaginer qu'entendre un bruit constant dans la tête, sans aucune façon de l'arrêter, est une expérience très stressante.

Ces constatations apportent un questionnement sur les liens qui existent entre acouphènes et anxiété. Y-a-t-il un lien de cause à effet et, si oui, dans quel sens s'oriente cette relation ? L'utilisation de modèles animaux a permis d'apporter des éléments de réponse à ces questions. Chez l'animal, l'anxiété seule ne suffit pas à générer des acouphènes (Guitton et al., 2005). En revanche, l'anxiété peut potentialiser la perception d'acouphènes déjà existants. Cependant, ces résultats expérimentaux mesuraient uniquement des réponses comportementales d'acouphènes. Comme il a été suggéré que la présence d'acouphènes pourrait provoquer une augmentation de l'anxiété (Nicolas-Puel et al., 2002; Guitton, 2006), nous nous sommes intéressés aux niveaux d'anxiété concomitants à la survenue d'acouphènes afin de mieux comprendre les altérations comportementales reliées aux acouphènes induits par le salicylate.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Même si l'origine périphérique de la plupart des acouphènes semble désormais clairement établie, il est évident qu'il existe également une contribution centrale. La survenue d'acouphènes semble en effet s'accompagner d'un certain niveau de plasticité au niveau des structures auditives centrales. Ainsi, **notre hypothèse centrale est que la perception des acouphènes entraîne une plasticité dans les voies auditives, c'est-à-dire au niveau du système nerveux central**. Les corrélaires de notre hypothèse sont que cette plasticité liée aux acouphènes a des répercussions au niveau moléculaire et au niveau comportemental.

Le but de ce travail sera donc double. Tout d'abord, tenter de mettre en évidence quelques-unes des altérations moléculaires pouvant caractériser une augmentation éventuelle de la plasticité synaptique des structures centrales liée aux acouphènes (Chapitre II). Ensuite, étudier de manière plus approfondie les liens existants entre acouphènes et anxiété (Chapitre III). Ainsi, deux objectifs spécifiques autour desquels s'articule ce projet de recherche ont été établis :

- 1) Déterminer quels **marqueurs de plasticité synaptique centrale** sont associés aux acouphènes induits par le salicylate.
- 2) Évaluer les **altérations comportementales d'anxiété** provoquées par la présence d'acouphènes induits par un traitement au salicylate.

CHAPITRE II

LA PLASTICITÉ RELIÉE AUX
ACOUPHÈNES INDUITS PAR LE
SALICYLATE

1. Matériels et méthodes

1.1. Animaux

Nos expériences ont été réalisées sur des souris Balb/C adultes (mâles âgés de 70 ± 4 jours). Les animaux provenaient des Laboratoires Charles River (Saint-Constant, Québec, Canada). Un total de 60 animaux a été utilisé au cours des expériences présentées dans cette première partie. Lors des expériences, les animaux ont été hébergés soit à l'animalerie du Centre de Recherche du CHUL (Centre Hospitalier de l'Université Laval), soit à l'animalerie du Centre de recherche Université Laval Robert-Giffard (CRULRG) dans un environnement contrôlé en température ($22 \pm 3^\circ\text{C}$), en humidité relative ($50 + 10\%$) et en cycle de lumière (12 heures, 7h à 19h). Les animaux ont eu accès en tout temps à de la nourriture et de l'eau tempérée. Tous les protocoles de cette étude ont été approuvés par le Comité de Protection des Animaux du CHUL (CPAC, autorisations 07-051-1 et 07-051-2) et par le Comité de Protection des Animaux de l'Université Laval (CPAUL, autorisations 2009039-1 et 2009039-2). L'hébergement des animaux ainsi que l'ensemble des expérimentations réalisées respectaient les normes du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA).

1.2. Traitements pharmacologiques

Trois groupes de 20 animaux ont été utilisés. Dans chacun des 3 groupes, les cerveaux de 10 animaux ont été utilisés pour l'hybridation *in situ* et les cerveaux des 10 autres animaux pour l'immunobuvardage de type Western. Dans le groupe contrôle, les animaux ont reçu des injections de sérum physiologique pendant 4 jours (une injection quotidienne unique de 10 ml/kg de sérum physiologique en i.p.). Les animaux des deux autres groupes ont reçu des traitements au salicylate de sodium (Sigma Aldrich, St-Louis, Missouri, États-Unis). Le traitement au salicylate consistait en une injection intrapéritonéale quotidienne de salicylate de sodium dissout dans du sérum physiologique (300 mg/kg/jour) durant 4 jours consécutifs. Ce traitement particulier au salicylate est connu pour induire de manière fiable et systématique des acouphènes chez les rongeurs

(Jastreboff et al., 1988a; Cazals et al., 1998; Cazals, 2000; Guitton et al., 2003; Guitton et al., 2005). Le premier groupe traité au salicylate a reçu un seul traitement (300 mg/kg/jour pendant 4 jours, i.p.), alors que le second groupe a reçu ce traitement deux fois, séparé par une semaine de repos. Ainsi, les animaux du second groupe expérimental recevaient un premier traitement (300 mg/kg/jour pendant 4 jours, i.p.), ne recevaient aucune injection pendant une semaine, puis recevaient un second traitement (300 mg/kg/jour pendant 4 jours, i.p.). Les injections ont toutes été réalisées approximativement à la même heure, soit vers 12h.

1.3. Choix des structures anatomiques étudiées

La taille des structures analysées devaient être suffisamment importantes pour pouvoir récolter assez de matériel biologique pour mener à bien des quantifications de protéines. De plus, les structures des voies auditives choisies devaient avoir un « équivalent » dans une autre modalité sensorielle en termes de niveau de complexité neuronale afin de vérifier la spécificité du salicylate pour le système auditif. Deux structures des voies auditives correspondaient au profil recherché : le colliculus inférieur et le cortex auditif (Figure 3, Chapitre I). Les contrôles équivalents de ces structures sont le colliculus supérieur et le cortex visuel. Des échantillons du cortex frontal, structure d'intégration par excellence, et l'amygdale, structure appartenant au système limbique, ont également été prélevés. Finalement, le cervelet a été utilisé en tant que structure de contrôle global lors des analyses. En immunobuvardage de type Western, toutes ces structures ont été prélevées alors qu'en hybridation *in situ*, nous avons évalué les niveaux de l'ARNm de la sous-unité NR1 des NMDAR uniquement dans le cortex auditif, le cortex visuel et l'amygdale.

1.4. Prélèvement des tissus et préparation des tranches de cerveaux

Deux heures après la dernière injection, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale et les hémisphères cérébraux ont été prélevés rapidement et plongés immédiatement dans l'azote liquide pour éviter la dégradation des protéines. Les

échantillons ont ensuite été conservés à -80°C , jusqu'au moment d'être coupés à l'aide d'un cryostat. Le moment du sacrifice (deux heures après la dernière injection de salicylate) a été déterminé en fonction des résultats d'études démontrant que les acouphènes atteignent une intensité maximale deux heures après la dernière injection (Cazals, 2000; Guitton et al., 2003).

Les cerveaux attribués à l'hybridation *in situ* ont été montés sur une platine de cryostat (Leica CM1900, Leica Microsystems Inc., Richmond Hill, Ontario, Canada), réglé à -22°C , à l'aide de Tissue-Tek (Miles Inc., Elkhart, États-Unis) et coupés en sections coronales de $12\ \mu\text{m}$. Pour chacun des trois groupes expérimentaux, des sections (deux par structure par cerveau) de cortex préfrontal (Bregma 3,20 à 2,58 mm, $n=20$), d'amygdale (Bregma -0,82 à -1,82 mm, $n=20$), de cortex auditif et visuel (Bregma -2,46 à -3,40 mm, $n=20$), de colliculus supérieur (Bregma -4,16 à -4,84 mm, $n=20$), de colliculus inférieur (Bregma -5,20 à -5,68 mm, $n=20$) et de cervelet (Bregma -6,48 à -7,20 mm, $n=20$) ont été prélevées en se référant à l'atlas de cerveau de souris de Franklin et Paxinos (Franklin and Paxinos, 2008). Les mesures de Bregma pour les colliculi inférieur et supérieur ainsi que pour le cervelet sont présentées à titre indicatif, puisque ces structures ont été prélevées à partir du cerveau entier plutôt que sur des tranches, ces structures étant facilement accessibles à partir de sa surface externe. Les sections ont ensuite été montées sur lames (Colorfrost Plus, Fisher, Nepean, Ontario, Canada) et placées dans un dessiccateur dans une chambre à 4°C pendant une nuit avant d'être replacées à -80°C jusqu'aux marquages.

Les cerveaux attribués aux immunobuvardages ont été coupés dans l'enceinte du cryostat, toujours réglé à -22°C , à l'aide de lames et d'une matrice (Zivic-Miller Laboratories Inc., Allison Park, Pennsylvanie, États-Unis) conçue pour couper précisément et à des endroits stratégiques les cerveaux de souris en tranches coronales de 1,0 mm. Les différentes structures choisies ont ensuite été prélevées sur ces tranches à l'aide d'un scalpel, en se référant à l'atlas de cerveau de souris de Franklin et Paxinos (Franklin and Paxinos, 2008) et en conservant les mêmes échelles de Bregma que celles mentionnées ci-dessus. Les échantillons de chaque structure ont été placés individuellement dans des eppendorfs et entreposés à -80°C jusqu'aux extractions protéiques.

1.5. Hybridation *in situ* de la sous-unité NR1 des NMDAR

L'évaluation des marqueurs de plasticité glutamatergiques a été faite par hybridation *in situ*, essentiellement selon le protocole décrit dans l'article de Wisden et Morris (Wisden and Morris, 1994). L'hybridation *in situ* a été effectuée à l'aide d'une combinaison de séquences d'oligonucléotides codant pour les acides aminés 153-109 (5' AGCGCGGGCGAAGGAGCAGGAGAAAAGCAGGGCGAATGTCAGCAG 3') et 1133-1089 (5' TTCCGGTCCCCATCCTCATTGAATTCCACACGGCCAGTCACTCCA 3') de la sous-unité NR1 des NMDAR de souris. Ces séquences ont été élaborées à partir de séquences d'ARNm complet du NMDAR de souris trouvées sur GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, numéro d'accèsion NM_009169). Les séquences choisies ont été analysées à l'aide du logiciel Oligo 4.01 (National Bioscience Inc., Minnesota, États-Unis) et sélectionnées selon des critères préétablis (Erdtmann-Vourliotis et al., 1999) de température de fusion, pourcentage des bases azotées G et C, nombre de nucléotides, etc. Après avoir choisi les sondes, les séquences ont été envoyées sur Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) afin de confirmer leur spécificité avec l'ARNm cible.

Les oligonucléotides synthétisés ont été marqués au S³⁵ (1250 Ci/mmmole; Perkin Erlmer, Woodbridge, Ontario, Canada) à leur extrémité 3' par la déoxynucléotidyl terminal transférase (New England Biolabs, Pickering, Ontario, Canada). La réaction s'est produite à 37°C pendant 1 heure et les nucléotides non incorporés ont été séparés de la sonde par passage du mélange au travers d'une colonne de résine faisant partie de l'ensemble de purification QIAquick Nucleotide Removal (Qiagen, Québec, Canada). La radioactivité des fractions récoltées à la sortie de la colonne a été dosée sur un compteur à scintillation. Les sondes purifiées ont été conservées à -20°C jusqu'au lendemain pour la suite de l'expérience.

Après avoir été séchées au dessiccateur (4°C), les sections ont été fixées pendant 5 minutes dans une solution de paraformaldéhyde 4% préparée dans du PBS 0,1 M (pH 7,4), puis rincées 2 fois pendant 5 minutes avec du PBS 0,1 M, à température ambiante. Les

sections ont ensuite été incubées dans une solution de triéthanolamine 0,1 M (pH 8,0), fraîchement préparée, pendant 5 minutes, à laquelle de l'acide acétique anhydre (0,25%, v/v) a été ajouté pour une incubation de 10 minutes supplémentaires. Les lames ont été plongées dans deux bains de tampon SSC 2X (SSC 1X = 0,15 M NaCl, 0,015 M citrate de sodium, pH 7,0) et déshydratées à l'aide d'une série de bains de concentrations croissantes d'éthanol (70, 85 et 100%, 1 minute chaque), séchées à l'air ambiant et placées environ 3 heures dans un dessiccateur à température ambiante.

Les deux sondes d'oligonucléotides ont été diluées (5000 cpm/ μ l) dans un tampon d'hybridation (formamide 50%, sulfate de dextran 10%, solution de Denhardt 1X, dithiothréitol 10 mM, ARNt 250 μ g/ml, ADN de sperme de saumon 500 μ g/ml, tampon SSC 4X). Les sondes ont été chauffées à 60°C puis déposées sur chacune des lames qui ont ensuite été recouvertes d'une lamelle. L'hybridation a été effectuée à 40°C pendant la nuit dans une chambre humide. Deux lames contrôles ont subi l'hybridation en présence d'un excès de sonde non marquées afin de vérifier la spécificité du marquage. Les lamelles ont été retirées à l'aide d'un lavage dans du tampon SSC 2X. Les sections ont par la suite été lavées successivement dans du tampon SSC 2X (30 minutes à température ambiante), SSC 1X (120 minutes à température ambiante), SSC 0,5X (30 minutes à 37°C), SSC 0,5X (30 minutes à température ambiante) et SSC 0,5X (30 minutes à 50°C). Finalement, les lames ont été déshydratées à l'aide d'une série de bains d'éthanol de concentration croissante (70, 85 et 100%, 1 minute chaque), séchées à l'air ambiant et exposées dans l'obscurité avec un film Kodak Biomax MR-2 pendant 8 jours à température ambiante. Les films ont été analysés en utilisant le logiciel Stereo Investigator 7. Les valeurs présentées pour chaque structure représentent la moyenne des valeurs mesurées pour les 10 animaux du groupe correspondant.

1.6. Immunobuvardage de type Western

L'évaluation des marqueurs de plasticité synaptique a été faite par immunobuvardage de type Western, selon le protocole du laboratoire du Dr Martin Beaulieu (Centre de recherche Université Laval Robert-Giffard). Les échantillons de tissu

cérébral ont été dissociés mécaniquement dans un tampon SDS 1%, chauffé préalablement à 95°C pendant 5 minutes. Ensuite, 5 µl de chaque échantillon ont été prélevés pour effectuer le dosage des protéines selon la méthode de Lowry. Cette portion de chaque échantillon a été diluée dans 45 µl d'eau distillée, 250 µl de réactif A' et 2 ml de réactif B. Les tubes ont été immédiatement agités au vortex et incubés à température ambiante pendant 15 minutes. Enfin, l'absorbance de chacun des échantillons a été mesurée à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre SmartSpec Plus (Hercules, Californie, États-Unis). Par la suite, la balance de chaque échantillon a été diluée dans un tampon composé de laemmli 1X et de β-mercaptoéthanol. Les échantillons ont été chauffés à 95°C pendant 5 minutes avant d'être congelés à -80°C jusqu'à l'immunobuvardage.

Les protéines recherchées ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide tris-glycine 10% (Novex Tris-glycine Midi Gel, Invitrogen, Carlsbad, Californie, État-Unis). Tout d'abord, environ 25 µg de protéines ont été chauffés à 95°C dans un tampon laemmli 1X pendant 5 minutes afin de les dénaturer. Ces protéines ont été déposées sur le gel puis elles ont migré pendant environ 3 heures à 80 volts dans 1 litre de tampon d'électrophorèse composé de Tris-base 25 mM, de glycine 192 mM et de SDS 0,1%. Ensuite, les protéines du gel ont été transférées à l'aide d'un appareil «Semi-dry blotter» (Invitrogen, Carlsbad, Californie, État-Unis) sur une membrane de nitrocellulose imbibée de tampon de transfert contenant du Tris-base 25 mM, de la glycine 192 mM et 10 % de méthanol. Ce transfert a été réalisé pendant 1 heure à 20 volts. La présence de protéines sur la membrane a été vérifiée à l'aide d'une solution de rouge ponceau puis la membrane a été rincée 3 fois pendant 5 minutes dans l'eau distillée. Le blocage des sites d'interactions non spécifiques a été réalisé dans une solution PBS 1X contenant du lait sans matière grasse 5% pendant 1 heure à la température ambiante. La membrane a été brièvement rincée dans l'eau distillée avant d'être incubée dans l'anticorps primaire, dilué dans du PBS-tween 0,01% selon la dilution recommandée. L'incubation s'est déroulée pendant toute la nuit à 4°C. Le lendemain, la membrane a été rincée 3 fois dans du PBS-tween 0,1% pendant une dizaine de minutes.

La membrane a ensuite été incubée dans l'anticorps secondaire approprié, combiné à un agent fluorescent (*IRDye 680 Goat anti-Mouse IgG* ou *IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG*, 1:10000, Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska, États-Unis), dilué selon les recommandations dans du PBS-tween 0,01% pendant 2 heures à température ambiante. Trois autres sessions de 10 minutes de lavage au PBS-tween 0,1% ont été effectuées et les protéines marquées ont été révélées à l'aide du système d'imagerie Odyssey (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska, États-Unis). La quantification des densités optiques des bandes a été faite à l'aide du logiciel fourni avec l'appareil (Odyssey, version 3.0.16). Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : anti-ERK1/2 (p44/42) et anti-ERK phosphorylé (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, États-Unis) anti-AKT/PKB (Invitrogen, Carlsbad, Californie, État-Unis), anti-AKT phosphorylé 1/2/3 (Thr308) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californie, États-Unis) et anti-actine (Millipore, Billerica, Massachusetts, États-Unis). Les dilutions et l'origine de chacun des anticorps primaires sont présentées dans le Tableau 1.

1.7. Analyse statistique

Les données de l'hybridation *in situ* et des immunobuvardages ont été traitées avec un test de student (*two-tailed t-test*) ou une analyse non-paramétrique (test U de Mann-Whitney) dans les cas où le test de normalité échouait. Tous les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm erreur standard.

Tableau 1. Liste des anticorps primaires utilisés en immunobuvardage de type Western.

Anticorps	Type/espèce	Protéine reconnue	Dilution	Poids moléculaire (kDa)	Source
MAB1501 Clone C4	Monoclonal/souris	Actine	1/10000	42	Millipore
44-609G	Polyclonal/lapin	AKT/PKB	1/2000	70	Invitrogen
sc-16646-R	Polyclonal/lapin	Phospho-AKT 1/2/3 (Thr 308)	1/500	70	Santa Cruz
9102	Polyclonal /lapin	p44/42 MAPK	1/6000	44/42	Cell Signaling
9106 Clone E10	Monoclonal/souris	Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	1/500	44/42	Cell Signaling

2. Résultats

2.1. Modulation de la voie MAPK-ERK

Dans le but de répondre à la première partie de notre hypothèse, soit que la survenue d'acouphènes induits par le salicylate provoque une plasticité au niveau central, le degré d'activation et d'expression de la voie MAPK-ERK a été testé. L'évaluation de l'activité de la voie MAPK-ERK a été réalisée en mesurant l'expression et l'activation (phosphorylation) de ERK par immunobuvardage, après un traitement au salicylate ainsi qu'après deux traitements au salicylate. L'anticorps utilisé pour évaluer la phosphorylation est spécifique aux résidus phospho-tyrosine et phospho-thréonine du site d'activation, un domaine bien conservé des protéines ERK. Les densités optiques obtenues pour ERK1 et ERK2, ainsi que pour pERK1 et pERK2, ont été additionnées pour obtenir les densités optiques totales de ERK et de pERK. Cependant, ERK2 et pERK2 étaient les isoformes prédominants. Tous les groupes contiennent 10 échantillons ($n=10$).

Les niveaux d'expression de ERK dans le cortex frontal (Fr) et l'amygdale (A) restent inchangés par le traitement au salicylate. Aucune différence significative n'est observée sur les niveaux de ERK, que ce soit après un traitement (Fr : $0,68 \pm 0,11$, $p=0,21$, A : $0,83 \pm 0,12$, $p=0,38$; Figure 6A) ou deux traitements (Fr : $0,68 \pm 0,14$, $p=0,79$, A : $0,68 \pm 0,058$, $p=0,34$; Figure 6B) au salicylate par rapport au groupe contrôle correspondant à chaque structure (Fr : $1 \pm 0,14$, A : $1 \pm 0,18$). L'administration d'un traitement au salicylate (Fr : $1,06 \pm 0,22$, $p=0,85$, A : $1,36 \pm 0,19$, $p=0,11$; Figure 7A) et de deux traitements (Fr : $0,99 \pm 0,14$, $p=0,62$, A : $1,24 \pm 0,19$, $p=0,23$; Figure 7B) ne cause pas non plus de changement significatif des niveaux de phosphorylation de ERK par rapport aux groupe contrôles correspondants (Fr : $1 \pm 0,16$, A : $1 \pm 0,15$).

Pour le cortex auditif, aucun changement significatif n'est observé pour les niveaux de ERK après un traitement au salicylate ($0,69 \pm 0,1$, $p=0,19$; Figure 6A). Par contre, deux traitements au salicylate entraînent une diminution significative de l'expression de ERK ($0,68 \pm 0,038$, * $p<0,05$; Figure 6B) dans le cortex auditif par rapport au groupe contrôle

($1 \pm 0,11$). En ce qui concerne les niveaux de pERK, aucune différence significative n'est observée dans le cortex auditif après un traitement ($1,13 \pm 0,075$, $p=0,98$; Figure 7A) ou deux traitements ($1,05 \pm 0,086$, $p=0,57$; Figure 7B) au salicylate par rapport au groupe contrôle ($1 \pm 0,079$).

Le traitement au salicylate laisse inchangés les niveaux de ERK dans le cortex visuel chez les souris traitées une première fois ($0,85 \pm 0,051$, $p=0,094$; Figure 6A) au salicylate ainsi que celles traitées deux fois ($1,1 \pm 0,14$, $p=0,97$, groupe contrôle : $1 \pm 0,065$; Figure 6B). La figure 7B montre que dans le cortex visuel les rapports pERK/ERK baissent significativement après deux traitements au salicylate ($0,64 \pm 0,06$, *** $p<0,001$) comparativement aux contrôles ($1 \pm 0,059$) alors qu'il n'y a pas de différence significative observée après un seul traitement ($0,77 \pm 0,075$, $p=0,081$; Figure 7A).

Dans le colliculus inférieur (CI), le traitement au salicylate n'entraîne pas de changement significatif pour les ratios pERK/ERK après un traitement ($0,8 \pm 0,061$, $p=0,067$; Figure 7A) ou deux traitements ($0,93 \pm 0,067$, $p=0,68$; Figure 7B) au salicylate, en comparaison avec les animaux contrôles ($1 \pm 0,074$). En ce qui concerne l'expression de ERK, aucune différence significative n'est observée après un traitement au salicylate ($0,95 \pm 0,049$, $p=0,13$; Figure 6A) alors qu'elle diminue significativement après deux traitements au salicylate ($0,76 \pm 0,025$, *** $p<0,001$, groupe contrôle : $1 \pm 0,055$; Figure 6B). Cependant, une tendance à la diminution de l'expression de ERK est tout de même observée après un traitement au salicylate par rapport au groupe contrôle.

L'état de phosphorylation de ERK demeure le même dans le colliculus supérieur (CS), que ce soit après un ($1,07 \pm 0,074$; Figure 6A) ou deux traitements au salicylate ($1,11 \pm 0,087$, $p=0,31$, groupe contrôle : $1 \pm 0,11$; Figure 6B). Cependant, l'administration de salicylate produit une diminution significative de l'expression de ERK (un traitement : $0,67 \pm 0,1$, * $p<0,05$; Figure 6A, deux traitements : $0,59 \pm 0,1$, ** $p<0,01$; Figure 6B) dans le CS par rapport au groupe contrôle ($1 \pm 0,094$).

Finalement, le traitement au salicylate n'affecte pas significativement les ratios pERK/ERK dans le cervelet (un traitement : $0,88 \pm 0,068$, $p=0,081$; Figure 7A, deux traitements : $1,14 \pm 0,068$, $p=0,13$; Figure 7B, groupe contrôle : $1 \pm 0,071$). Toutefois, les niveaux de ERK augmentent après un traitement au salicylate ($1,24 \pm 0,077$, * $p<0,05$; Figure 6A) et diminuent après deux traitements au salicylate ($0,76 \pm 0,046$, ** $p<0,01$, groupe contrôle : $1 \pm 0,045$; Figure 6B).

2.2. Modulation de la voie PI(3)K

Dans le but d'apporter d'autres éléments de réponse à la première partie de notre hypothèse, soit que la survenue d'acouphènes induits par le salicylate provoque une plasticité au niveau central, le degré d'activation et d'expression de la voie PI(3)K-AKT a été testé. L'activité de la PI(3)K est évaluée en fonction de la phosphorylation d'AKT sur la thréonine 308. Plus la voie est active, plus AKT est phosphorylé. La quantité d'AKT totale est mesurée pour assurer que les quantités de protéines ne varient pas d'un puits à l'autre. La phosphorylation d'AKT sur la thréonine 308 ainsi que l'expression d'AKT ont été mesurées après un traitement au salicylate, ainsi qu'après deux traitements au salicylate. Encore une fois, tous les groupes contiennent 10 échantillons ($n=10$).

Dans le cortex frontal (Fr) et l'amygdale (A), les niveaux d'AKT demeurent semblables suite à un traitement au salicylate. Aucune différence significative n'est observée sur les niveaux d'AKT, que ce soit après un traitement (Fr : $0,63 \pm 0,17$, $p=0,28$, A : $0,81 \pm 0,077$, $p=0,66$; Figure 8A) ou deux traitements (Fr : $0,94 \pm 0,27$, $p=0,57$, A : $0,7 \pm 0,066$, $p=0,62$; Figure 8B) au salicylate par rapport au groupe contrôle correspondant à chaque structure (Fr : $1 \pm 0,26$, A : $1 \pm 0,23$). Dans ces deux structures, l'administration d'un traitement au salicylate (Fr : $0,95 \pm 0,061$, $p=0,85$, A : $1,73 \pm 0,36$, $p=0,12$; Figure 9A) et de deux traitements (Fr : $0,71 \pm 0,13$, $p=0,14$, A : $1,29 \pm 0,33$, $p=0,62$; Figure 9B) ne cause pas non plus de changement significatif des niveaux de phosphorylation d'AKT par rapport aux groupes contrôles correspondants (Fr : $1 \pm 0,12$, A : $1 \pm 0,22$).

Les niveaux d'AKT diminuent significativement dans le cortex auditif après un traitement ($0,74 \pm 0,045$, $** p < 0,01$; Figure 8A) et deux traitements au salicylate ($0,74 \pm 0,076$, $** p < 0,01$, groupe contrôle : $1 \pm 0,075$; Figure 8B) alors que les taux de phosphorylation indiquent plutôt une tendance à augmenter. En effet, dans le cas d'un seul traitement au salicylate ($1,62 \pm 0,13$, $** p < 0,01$; Figure 9A), il y a une augmentation significative de pAKT alors qu'une tendance à l'augmentation est observée pour l'état de phosphorylation d'AKT après deux traitements au salicylate ($1,39 \pm 0,088$, $p = 0,18$, groupe contrôle : $1 \pm 0,11$; Figure 9B).

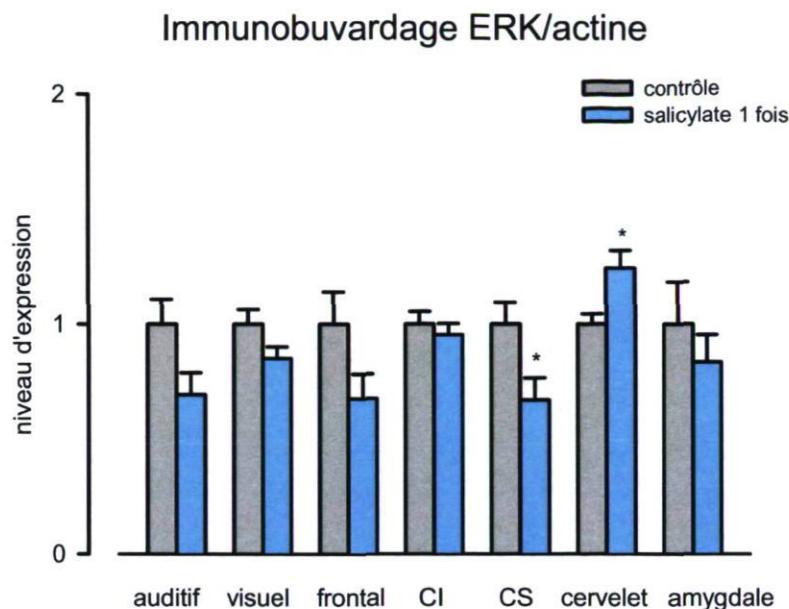
Pour le cortex visuel, aucun changement significatif n'est observé pour les niveaux d'AKT après un traitement ($0,75 \pm 0,093$, $p = 0,12$; Figure 8A) ou deux traitements ($1,051 \pm 0,2$, groupe contrôle : $1 \pm 0,14$; Figure 8B) au salicylate. En ce qui concerne les niveaux de pAKT, aucune différence significative n'est observée dans le cortex visuel après un traitement ($1,014 \pm 0,11$, $p = 0,1$; Figure 9A) ou deux traitements ($0,88 \pm 0,18$, $p = 0,25$; Figure 9B) au salicylate par rapport au groupe contrôle correspondant ($1 \pm 0,12$).

La figure 8A montre que dans les colliculi inférieur (CI) ($0,80 \pm 0,048$, $* p < 0,05$, groupe contrôle : $1 \pm 0,066$) et supérieur (CS) ($0,57 \pm 0,12$, $** p < 0,01$, groupe contrôle : $1 \pm 0,12$), l'expression d'AKT baisse significativement après un traitement au salicylate. La figure 8B montre également une baisse significative dans ces deux structures après deux traitements (CI : $0,66 \pm 0,05$, $*** p < 0,001$, groupe contrôle : $1 \pm 0,066$, CS : $0,53 \pm 0,078$, $** p < 0,01$, groupe contrôle : $1 \pm 0,1186$). L'administration de salicylate ne change pas significativement les niveaux de phosphorylation d'AKT chez les souris traitées une seule fois, dans le CI ($2,18 \pm 0,43$, $p = 0,054$, groupe contrôle : $1 \pm 0,14$; Figure 9A) comme dans le CS ($1,6 \pm 0,34$, $p = 0,14$, groupe contrôle : $1 \pm 0,26$; Figure 9A). Deux traitements au salicylate n'affectent pas non plus de façon significative les ratios pAKT/AKT dans le CI ($0,97 \pm 0,1$, $p = 0,85$, groupe contrôle : $1 \pm 0,14$; Figure 9B) et le CS ($1,36 \pm 0,25$, $p = 0,24$, groupe contrôle : $1 \pm 0,26$; Figure 9B).

Aucun effet significatif n'est observé dans le cervelet pour les niveaux de phosphorylation d'AKT, après une série d'injections ($1,04 \pm 0,2$, $p=0,68$; Figure 9A) ou deux séries d'injections ($1,18 \pm 0,14$, $p=0,47$; Figure 9B) de salicylate comparativement au groupe contrôle ($1 \pm 0,16$). Un seul traitement au salicylate ne modifie pas significativement l'expression d'AKT dans le cervelet ($1,21 \pm 0,16$, $p=0,12$; Figure 8A) comparativement aux contrôles ($1 \pm 0,081$) alors qu'il y a une baisse significative après deux traitements ($0,73 \pm 0,097$, * $p<0,05$; Figure 8B).

En résumé, l'expression des protéines ERK et AKT a tendance à diminuer dans le cortex auditif, le colliculus inférieur et le colliculus supérieur suite à un ou deux traitements au salicylate. Dans le cortex visuel, il y a une diminution significative de pERK après deux traitements au salicylate alors qu'aucun changement significatif n'est observé pour l'activation d'AKT. Dans le cervelet, l'expression de ERK et d'AKT a tendance à augmenter après un traitement au salicylate et diminue significativement dans le cas de deux traitements, par rapport aux groupes contrôles. Finalement, il n'y a aucun changement significatif de l'expression ou de l'activation des protéines étudiées dans le cortex frontal et l'amygdale, que ce soit après un traitement ou deux traitements au salicylate.

A.



B.

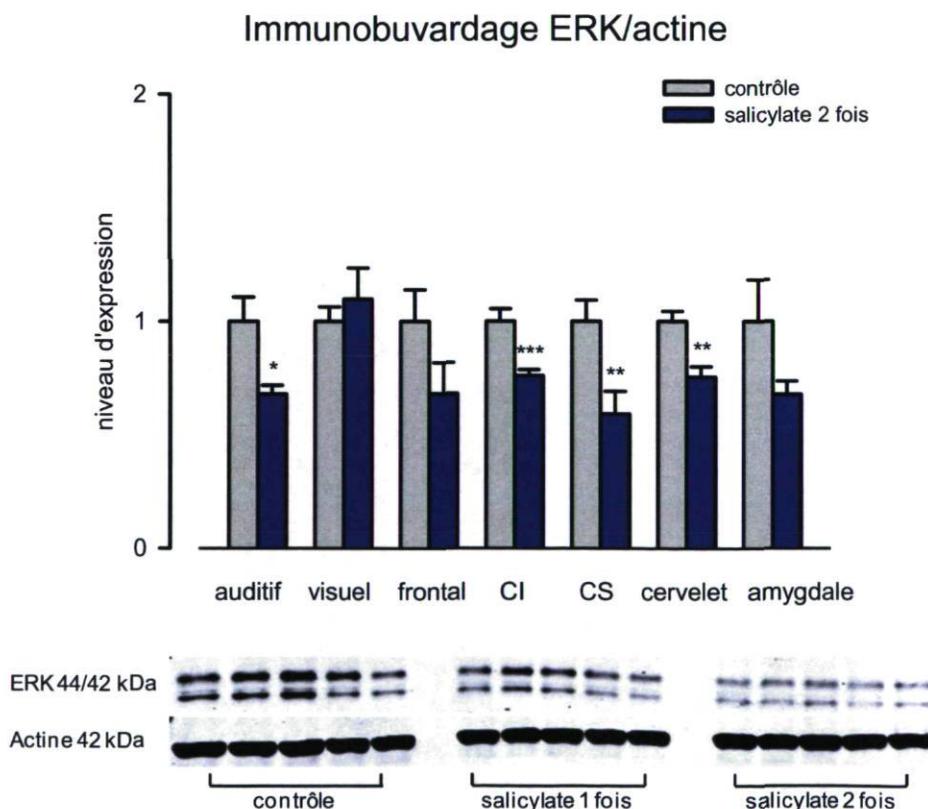
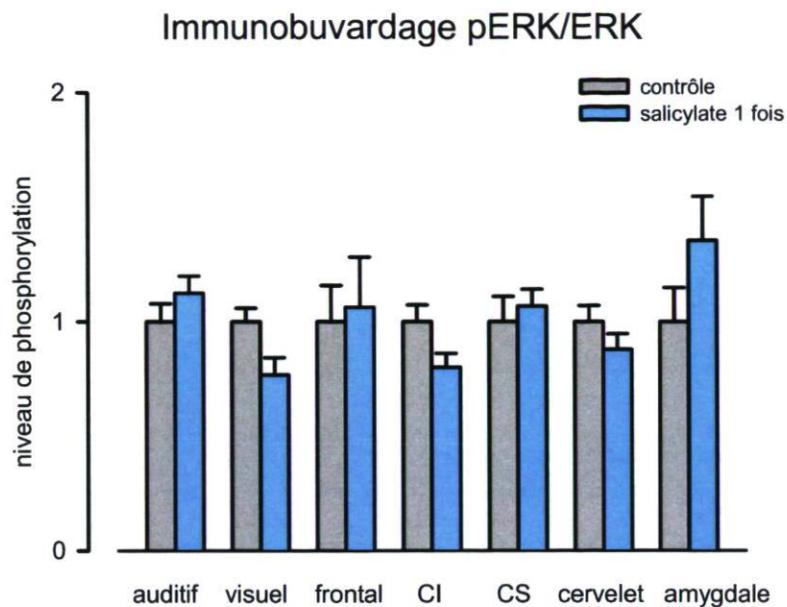


Figure 6. A) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de ERK/actine après un traitement au salicylate et B) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de ERK/actine après deux traitements au salicylate.

Les niveaux d'expression de la protéine ERK ont été étudiés par immunobuvardage de type Western pour sept structures anatomiques : le cortex auditif, le cortex visuel, le cortex frontal, le colliculus inférieur (CI), le colliculus supérieur (CS), le cervelet et l'amygdale. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ vs contrôle. Les valeurs représentent la moyenne du rapport d'unité arbitraire \pm erreur standard de 10 souris Balb/C mâles adultes par groupe.

A.



B.

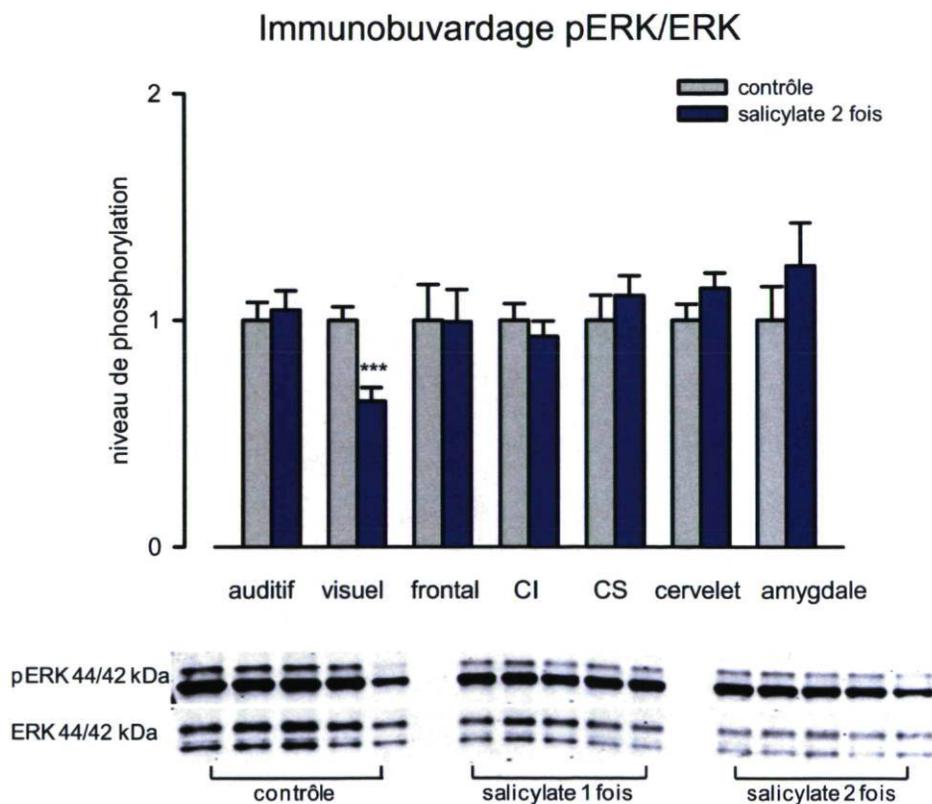
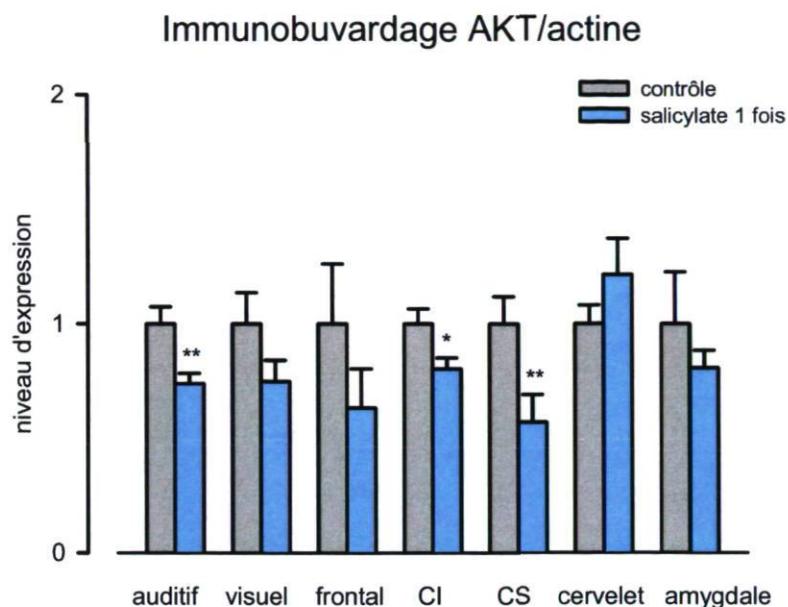


Figure 7. A) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de pERK/ERK après un traitement au salicylate et B) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de pERK/ERK après deux traitements au salicylate.

Les niveaux de phosphorylation de la protéine ERK ont été étudiés par immunobuvardage de type Western pour sept structures anatomiques : le cortex auditif, le cortex visuel, le cortex frontal, le colliculus inférieur (CI), le colliculus supérieur (CS), le cervelet et l'amygdale. *** $p < 0,001$ vs contrôle. Les valeurs représentent la moyenne du rapport d'unité arbitraire \pm erreur standard de 10 souris Balb/C mâles adultes par groupe.

A.



B.

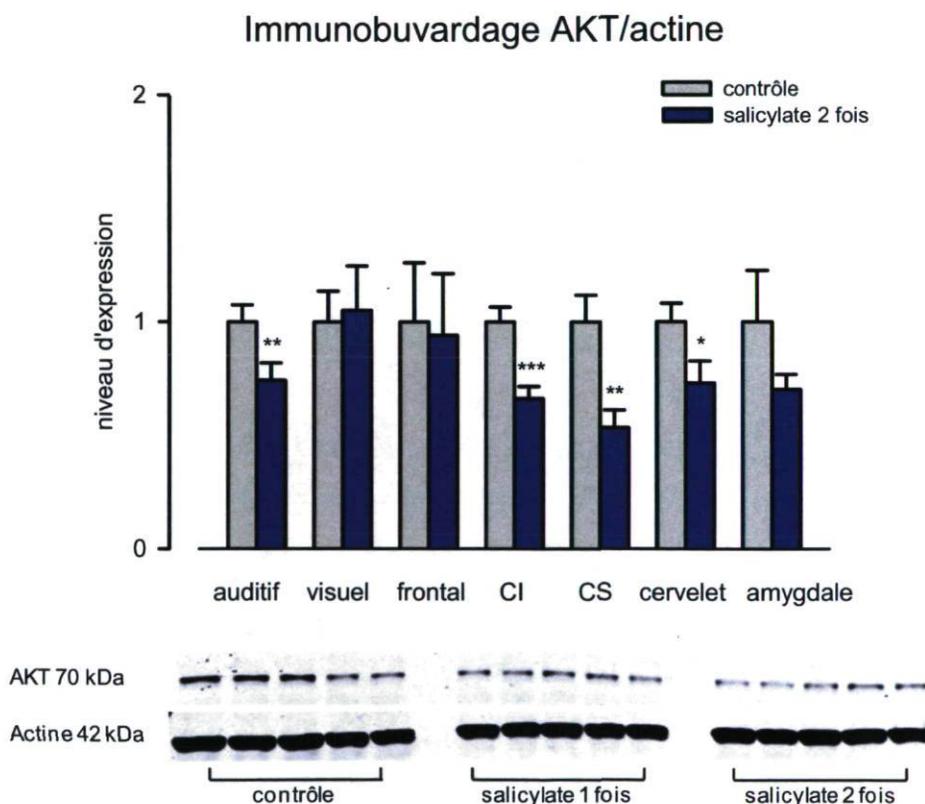
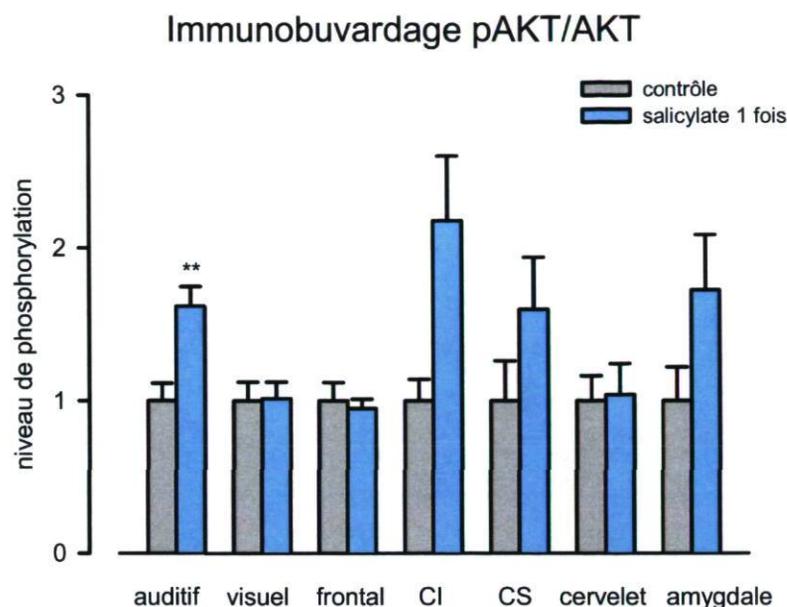


Figure 8. A) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de AKT/actine après un traitement au salicylate et B) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de AKT/actine après deux traitements au salicylate.

Les niveaux d'expression de la protéine AKT ont été étudiés par immunobuvardage de type Western pour sept structures anatomiques : le cortex auditif, le cortex visuel, le cortex frontal, le colliculus inférieur (CI), le colliculus supérieur (CS), le cervelet et l'amygdale. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ vs contrôle. Les valeurs représentent la moyenne du rapport d'unité arbitraire \pm erreur standard de 10 souris Balb/C mâles adultes par groupe.

A.



B.

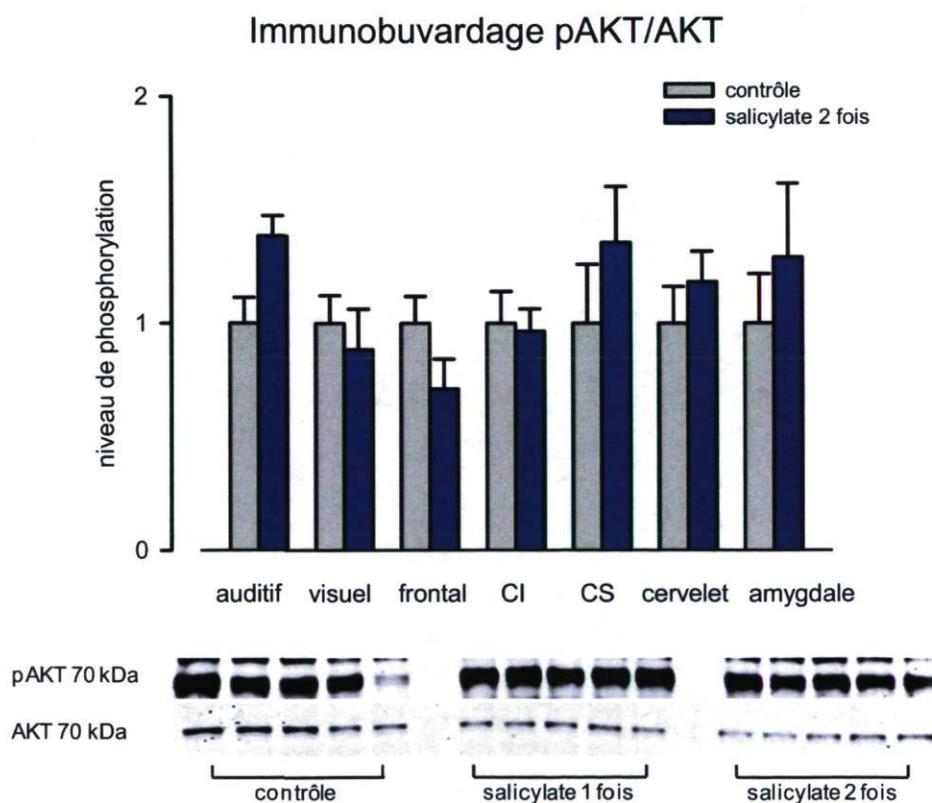


Figure 9. A) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de pAKT/AKT après un traitement au salicylate et B) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de pAKT/AKT après deux traitements au salicylate.

Les niveaux de phosphorylation de la protéine AKT ont été étudiés par immunobuvardage de type Western pour sept structures anatomiques : le cortex auditif, le cortex visuel, le cortex frontal, le colliculus inférieur (CI), le colliculus supérieur (CS), le cervelet et l'amygdale. ** $p < 0,01$ vs contrôle. Les valeurs représentent la moyenne du rapport d'unité arbitraire \pm erreur standard de 10 souris Balb/C mâles adultes par groupe.

2.3. Niveaux d'expression de l'ARNm des NMDAR

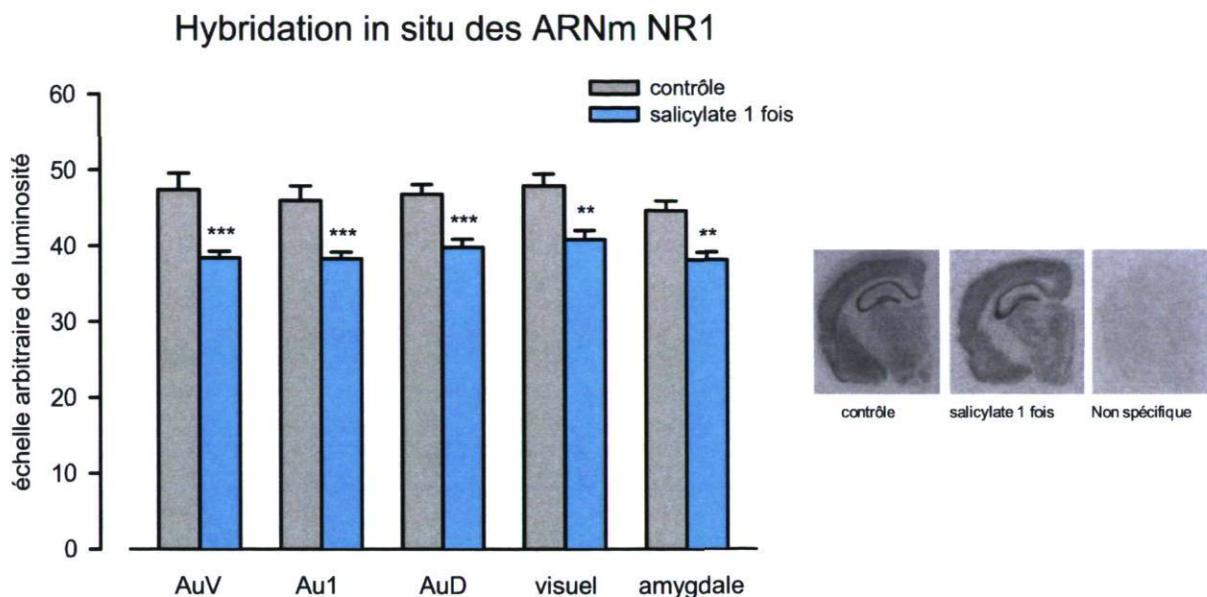
Toujours dans l'optique d'apporter des éléments de réponse à la première partie de notre hypothèse, soit que la survenue d'acouphènes induits par le salicylate provoque une plasticité au niveau central, les niveaux d'expression de l'ARNm de la sous-unité NR1 des NMDAR ont été évalués. La sous-unité NR1 a été sélectionnée dans cette étude puisque c'est la seule sous-unité à être toujours présente dans la composition des NMDAR alors que la présence des sous-unités NR2 (NR2A, NR2B, NR2C ou NR2D) est variable d'un récepteur à l'autre. Les trois groupes (contrôles, salicylate 1 fois, salicylate 2 fois) contiennent 10 échantillons ($n=10$).

En ce qui concerne les niveaux de l'ARNm de la sous-unité NR1, nous avons observé en hybridation *in situ* une diminution significative après un traitement au salicylate de 300 mg/kg/jour pendant 4 jours (salicylate 1 fois) dans toutes les structures évaluées, soit le cortex auditif, le cortex visuel et l'amygdale (Figure 10A). Cette diminution est donc observée non seulement dans les structures auditives, mais également dans les autres structures, dites non auditives, qui ont été testées. En effet, pour le cortex auditif primaire ($38,29 \pm 0,85$, *** $p < 0,001$), secondaire ventral ($38,36 \pm 0,89$, *** $p < 0,001$) et secondaire dorsal ($39,78 \pm 1,08$, *** $p < 0,001$), la moyenne du signal est significativement moins élevée que celle du groupe contrôle correspondant à chaque structure ($45,92 \pm 1,92$, $47,38 \pm 2,14$, $46,75 \pm 1,31$, respectivement). De même, les résultats pour le cortex visuel ($40,78 \pm 1,20$, ** $p < 0,01$) et l'amygdale ($38,10 \pm 1,02$, ** $p < 0,01$) sont significativement moins élevés par rapport à ceux des animaux contrôles correspondants ($47,83 \pm 1,59$, $44,58 \pm 1,29$, respectivement).

Tout comme en immunobuvardage, nous avons voulu voir ce qui se passait avec un deuxième traitement identique au salicylate après une semaine de repos (salicylate 2 fois). Nous avons alors observé des niveaux de l'ARNm de la sous-unité NR1 comparables à ceux observés chez les animaux contrôles (Figure 10B). En effet, pour le cortex auditif primaire ($48,63 \pm 1,19$, $p=0,28$), secondaire ventral ($48,39 \pm 1,37$, $p=0,60$) et secondaire dorsal ($49,48 \pm 1,03$, $p=0,15$) et l'amygdale ($45,75 \pm 0,77$, $p=0,45$), la moyenne du signal

n'est significativement pas différente de celle obtenue pour le groupe contrôle correspondant ($45,92 \pm 1,92$, $47,38 \pm 2,14$, $46,75 \pm 1,31$, $44,58 \pm 1,29$, respectivement). Seul le cortex visuel ($51,27 \pm 0,62$, * $p < 0,05$) présente une moyenne du signal légèrement plus élevée par rapport au groupe contrôle ($47,83 \pm 1,59$).

A.



B.

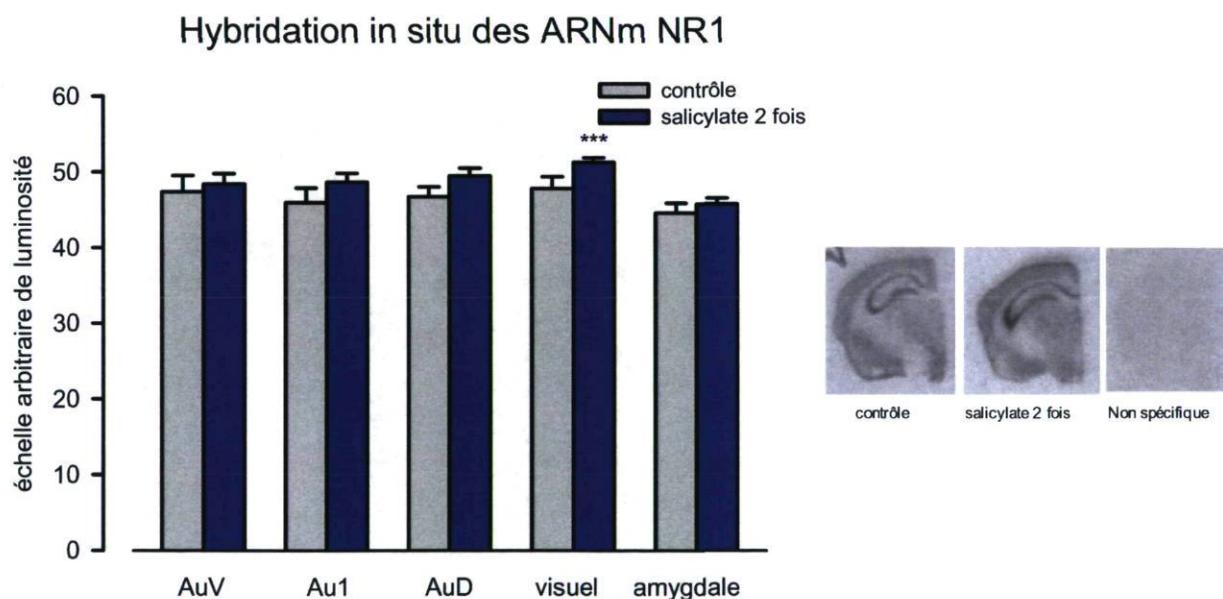


Figure 10. A) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de l'ARNm des NMDAR après un traitement au salicylate et B) Effet des acouphènes induits par le salicylate sur les niveaux de l'ARNm des NMDAR après deux traitements au salicylate.

Les niveaux d'expression de l'ARNm de la sous-unité NR1 des NMDAR, évalués par une échelle arbitraire de luminosité, ont été étudiés par hybridation *in situ* pour trois structures anatomiques : le cortex auditif primaire (Au1)/secondaire ventral (AuV)/secondaire dorsal (AuD), le cortex visuel et l'amygdale. ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ vs contrôle. Les valeurs représentent la moyenne \pm erreur standard de 10 souris Balb/C mâles adultes par groupe.

3. Discussion

3.1. Modulation de l'expression et de l'activation protéique

Les résultats obtenus au cours de cette étude révèlent des changements de l'expression de ERK et d'AKT pour certaines structures auditives suite à un traitement au salicylate induisant des acouphènes. Dans le cortex auditif et le colliculus inférieur, une diminution significative de ERK a été observée après deux traitements au salicylate alors qu'aucune différence significative n'a été observée après un traitement. Il semble donc que la voie MAPK-ERK ne soit affectée qu'avec un traitement chronique induisant des acouphènes. Dans le cas d'AKT, une diminution significative de l'expression a été observée dans le cortex auditif et le colliculus inférieur, après un et deux traitements au salicylate. Les résultats obtenus pour le cortex auditif sont en accord avec des études indiquant une diminution de l'activité dans le cortex auditif primaire suite à un traumatisme sonore induisant des acouphènes (Brozoski et al., 2007) et une diminution de l'expression de la protéine cytosquelettique Arc/Arg3.1 dans le cortex auditif suite à un traitement au salicylate induisant des acouphènes (Panford-Walsh et al., 2008). Une diminution de l'expression de Arc/Arg3.1, ainsi que de BDNF et c-fos, a également été démontrée dans le cortex auditif primaire après un traumatisme sonore induisant des acouphènes (Tan et al., 2007). Le produit de transcription Arc est par ailleurs connu comme étant un gène précoce entièrement dépendant de l'activation de la cascade des MAPK (Waltereit et al., 2001). Ainsi, un lien concordant peut être établi entre la diminution de l'expression de ERK et celle de Arc/Arg3.1 après un traitement au salicylate induisant des acouphènes. De plus, comme les voies MAPK-ERK et PI(3)K-AKT sont toutes deux des effecteurs de la GTPase Ras, il n'est pas surprenant que les changements observés aillent dans le même sens. Ces diminutions d'expression protéique suggèrent une réduction de l'efficacité synaptique et de l'état d'excitabilité générale dans le cortex auditif et dans le colliculus inférieur en réponse aux acouphènes induits par le salicylate et par un traumatisme sonore.

Une diminution significative de l'expression de ERK et d'AKT est également observée dans le colliculus supérieur, que ce soit après un ou deux traitements au salicylate.

Il semble donc que des altérations du système auditif peuvent provoquer des modifications de la plasticité synaptique dans des structures non auditives. Des résultats dans la littérature ont d'ailleurs suggéré des répercussions dans des structures cérébrales non auditives suite à un traitement au salicylate (Wallhausser-Franke et al., 2003) et à un traumatisme sonore (Kraus et al., 2010), tous deux induisant des acouphènes. De plus, il y aurait des connections entre le cortex auditif et le colliculus supérieur (Mezzalana et al., 2007). Ainsi, il est possible que les mêmes répercussions soient observées dans le cortex auditif et le colliculus supérieur, comme c'est le cas ici avec l'observation de diminutions d'expression des protéines ERK et AKT.

De façon surprenante, une augmentation de l'expression de ERK et une tendance à augmenter pour AKT dans le cervelet ont été observées après un traitement au salicylate alors qu'il y avait une diminution significative de l'expression des deux protéines après deux traitements au salicylate. Cependant, des connections auditives vers le cervelet ont déjà été documentées chez l'animal (Gacek, 1973; Aitkin and Boyd, 1975; Huang et al., 1982; Azizi et al., 1985; Morest et al., 1998) et une étude de cas a rapporté des anomalies cérébrales en conjonction avec la présence d'acouphènes (Shulman and Strashun, 1999). Les résultats d'imagerie par résonance magnétique d'une étude chez le rat ont également indiqué une modification de l'activité cérébelleuse suite à un traitement induisant des acouphènes (Brozoski et al., 2007).

Finalement, aucune différence de l'activation de ERK n'a été observée sauf après deux traitements au salicylate dans le cortex visuel. Comme mentionné plus tôt, ERK serait impliqué dans des changements de plasticité qui surviennent dans le cortex visuel (Di Cristo et al., 2001). Le changement d'activation de ERK pourrait donc être dû à son implication au niveau du cortex visuel plutôt qu'aux acouphènes en tant que tel. Pour l'activation d'AKT, aucune différence n'a été observée excepté dans le cortex auditif. En effet, il y a une augmentation de l'activation d'AKT après un traitement au salicylate alors qu'une diminution de l'expression d'AKT a été observée. Il semble donc y avoir un effet de compensation de la diminution d'expression d'AKT par une augmentation de sa phosphorylation après un traitement au salicylate.

Suite à une administration de salicylate, des études ont démontré une augmentation de l'activité spontanée des fibres auditives (Evans et al., 1981; Evans and Borerwe, 1982) et des neurones du colliculus inférieur (Jastreboff and Sasaki, 1986) ainsi qu'une élévation de l'activité métabolique dans les noyaux auditifs (Kauer et al., 1982; Wallhausser-Franke et al., 2003). Ces études suggèrent ainsi une augmentation de l'activité neuronale dans les voies auditives qui pourrait représenter un corrélât des acouphènes. Les divergences entre les résultats de ces études et les nôtres peuvent être expliquées de deux façons. Premièrement, des facteurs méthodologiques pourraient être la cause de ces divergences : les doses de salicylate administrées, la durée du traitement et la méthode d'injection. En effet, une dose de 300 mg/kg de salicylate pendant 4 jours a été administrée en i.p. dans cette étude alors que les autres études mentionnées utilisaient des traitements différents de salicylate, variant entre 350 mg/kg (Wallhausser-Franke et al., 2003), 400 mg/kg (Evans et al., 1981) et 450 mg/kg (Jastreboff and Sasaki, 1986) en une seule injection et parfois directement injectée sur les cellules de la structure étudiée plutôt que sur l'animal (Jastreboff and Sasaki, 1986). Deuxièmement, les diminutions d'expression de ERK et d'AKT peuvent être expliquées par une diminution de l'état d'activité des structures nerveuses dans le cortex auditif et le colliculus inférieur. En effet, des doses suffisantes de salicylate provoquent non seulement des acouphènes, mais également des pertes auditives. Les acouphènes induits par le salicylate affectent uniquement les fréquences pour lesquelles la densité de neurones auditifs primaires est la plus élevée alors que les pertes auditives induites par le salicylate touchent toutes les fréquences. Lorsque l'on fait les prélèvements pour effectuer les immunobuvardages de type Western, on prend la totalité de chaque structure. Par conséquent, les neurones prélevés sont non seulement ceux régulant les acouphènes mais également les pertes auditives. L'hyperexcitabilité associée aux acouphènes (Cazals, 2000; Kaltenbach and Afman, 2000; Eggermont and Roberts, 2004) est donc doublement annulée par la baisse d'audition affectant toutes les fréquences.

D'autre part, des différences de l'activation entre ERK et AKT ont été observées dans le cortex auditif. L'augmentation de la phosphorylation d'AKT, mais pas de ERK, après un traitement au salicylate, reflète un certain niveau de plasticité provoquée par les acouphènes induits par le salicylate. Cette plasticité serait fonctionnelle, puisqu'elle semble

liée uniquement à la phosphorylation d'AKT, plutôt que structurale et donc liée à la phosphorylation de ERK, à l'activation de la cascade des MAPK et, par conséquent, à l'infrastructure du cytosquelette. Ce résultat n'était pas imprévisible puisque le salicylate induit des acouphènes réversibles et ainsi, une plasticité fonctionnelle aurait le temps de s'installer, ce qui n'est pas le cas d'une plasticité structurale.

3.2. Modulation des niveaux d'expression de l'ARNm des NMDAR

Les résultats obtenus en hybridation *in situ* indiquent des niveaux réduits de l'ARNm des NMDAR après un traitement au salicylate. Les effets sont observés dans des zones tant auditives que non auditives, mais seulement pour un premier traitement au salicylate. Un second traitement identique au salicylate renverse les effets observés après un premier traitement, suggérant que les altérations centrales observées ne sont pas nécessairement directement liées à la perception des acouphènes induits par le salicylate. Il ne semble pas s'agir d'un effet non spécifique du salicylate puisque d'autres études ont également rapporté des effets dans certaines structures non auditives suite à un traumatisme sonore induisant des acouphènes (Kraus et al., 2010).

Ainsi, nos résultats suggèrent qu'un traitement au salicylate induisant des acouphènes provoque des altérations des niveaux d'expression de l'ARNm de protéines impliquées dans la plasticité synaptique. Étant donné qu'un second traitement de salicylate ne semble pas avoir d'effet au niveau central mais qu'il y a quand même présence d'acouphènes, nos résultats semblent confirmer l'origine périphérique des acouphènes, tout en montrant que ces altérations périphériques s'accompagnent d'effets centraux, ainsi qu'un effet d'adaptation à long terme.

CHAPITRE III

L'ANXIÉTÉ RELIÉE AUX
ACOUPHÈNES INDUITS PAR LE
SALICYLATE

1. Matériels et méthodes

1.1. Animaux

Nos expériences ont été réalisées sur des souris Balb/C mâles adultes, âgées de 70 ± 4 jours. Les animaux provenaient des Laboratoires Charles River (Saint-Constant, Québec, Canada). Un total de 159 animaux a été utilisé au cours des expériences présentées dans cette seconde partie. Lors des expériences, les animaux ont été gardés soit à l'animalerie du Centre de Recherche du CHUL (Centre Hospitalier de l'Université Laval), soit à l'animalerie du Centre de recherche Université Laval Robert-Giffard (CRULRG) dans un environnement contrôlé en température ($22 \pm 3^\circ\text{C}$), en humidité relative ($50 + 10\%$) et en cycle de lumière (12 heures, 7h à 19h). Les animaux ont eu accès en tout temps à de la nourriture et de l'eau. Tous les protocoles de cette étude ont été approuvés par le Comité de Protection des Animaux du CHUL (CPAC, autorisations 07-051-1 et 07-051-2) et par le Comité de Protection des Animaux de l'Université Laval (CPAUL, autorisations 2009039-1 et 2009039-2). Le maintien des animaux dans les animaleries ainsi que l'ensemble des expérimentations réalisées respectaient les normes du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA).

1.2. Traitements pharmacologiques

Treize groupes ont été utilisés pour évaluer l'anxiété liée aux acouphènes. La liste des différents groupes est présentée dans le Tableau 2. Les animaux du groupe contrôle ($n=12$) n'ont reçu aucune injection. Un second groupe contrôle a été constitué ($n=12$), dans lequel les animaux ont reçu des injections de sérum physiologique pendant 4 jours (une injection quotidienne unique de 10 ml/kg de sérum physiologique en i.p.). Les animaux de cinq autres groupes ont reçu des traitements au salicylate de sodium (Sigma Aldrich, St-Louis, Missouri, États-Unis), à différentes concentrations : 50 mg/kg/jour ($n=11$), 150 mg/kg/jour ($n=10$), 200 mg/kg/jour ($n=10$), 250 mg/kg/jour ($n=10$) et 300 mg/kg/jour ($n=13$). Ces traitements au salicylate consistaient en une injection intrapéritonéale quotidienne de salicylate de sodium dissout dans du sérum physiologique durant 4 jours

consécutifs. Les animaux d'un groupe supplémentaire ($n=10$) ont reçu des injections de 300 mg/kg/jour de salicylate, mais seulement sur 2 jours au lieu de 4. Deux autres groupes ont reçu une injection unique de méta-chlorophénylpipérazine (mCPP). Le premier groupe ($n=10$) a reçu une concentration de 0,1 mg/kg de mCPP et l'autre groupe ($n=11$), une concentration de 0,5 mg/kg. Finalement, les derniers groupes ont été traités avec une combinaison de salicylate et de mCPP. Un premier groupe ($n=10$) a reçu des injections de salicylate 300 mg/kg/jour pendant 4 jours et une injection de mCPP 0,5 mg/kg au quatrième jour d'injection, en plus de l'injection de salicylate. Le même traitement a été donné à un second groupe ($n=10$), mais les injections ont cette fois été effectuées sur deux sites différents de l'animal. Toutes les injections ont été faites sur le côté droit du ventre de l'animal, excepté pour ce groupe où l'injection de salicylate a été effectuée sur la partie droite de l'animal, comme à l'habitude, alors que l'injection de mCPP a été faite sur le côté gauche du ventre de l'animal. Finalement, un dernier groupe ($n=10$) a également été traité avec une combinaison de salicylate 300 mg/kg/jour et de mCPP 0,5 mg/kg, mais seulement sur 2 jours au lieu de 4. Toutes les injections ont été effectuées par voie intrapéritonéale et ont été réalisées tous les jours approximativement à la même heure, soit vers 12h pour les injections de salicylate et vers 13h15 pour les injections de mCPP. Le moment pour évaluer le comportement d'anxiété (deux heures après la dernière injection de salicylate et 45 minutes après l'injection de mCPP) a été déterminé en fonction des résultats d'études démontrant que les acouphènes atteignent une intensité maximale deux heures après la dernière injection de salicylate (Cazals, 2000; Guitton et al. 2003) et que l'anxiété est à son apogée 45 minutes après l'injection de mCPP (Bourin et al., 1998).

1.3. Mesure de l'anxiété par le test de la boîte à deux compartiments

Le paradigme de la boîte à deux compartiments (ou boîte blanche et noire) a été utilisé afin d'évaluer l'anxiété chez les souris (Crawley and Goodwin, 1980). Ce test est basé sur l'aversion naturelle des souris pour la lumière et sur leur comportement d'exploration spontané dans un nouvel environnement, et possède une bonne sensibilité aux traitements pharmacologiques anxiolytiques (Crawley, 1985). Les expériences ont été réalisées dans une boîte en plastique transparente (32 cm x 17 cm x 18,5 cm) divisée en

deux compartiments. Le premier compartiment (compartiment « noir ») est peint en noir et couvert d'une feuille transparente rouge, assurant à la fois l'obscurité du compartiment et permettant à l'observateur de voir l'animal. Le second compartiment (compartiment « blanc ») est transparent et exposé à la lumière. Une petite ouverture (4 cm x 4 cm) permet à la souris de passer de l'un des compartiments à l'autre. Au départ, la souris est placée dans le compartiment noir et différents paramètres peuvent être mesurés pendant une période de 5 minutes. Le paramètre évalué pour cette étude est la latence de sortie, qui représente le temps que l'animal prend pour entrer dans le compartiment blanc la première fois. Les tests de comportement ont été effectués deux heures après la dernière injection de salicylate et 45 minutes après l'injection de mCPP, lorsqu'il y avait lieu.

1.4. Analyse statistique

Les données de latence de sortie ont été analysées avec un test de student (*two-tailed t-test*) ou une analyse non-paramétrique (test U de Mann-Whitney) dans les cas où le test de normalité échouait. Tous les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm erreur standard.

Tableau 2. Groupes expérimentaux de comportement.

Nom du groupe	Traitement pharmacologique	N
Contrôles	Aucun	12
Sérum physiologique	Injection quotidienne de sérum physiologique pendant 4 jours	12
Salicylate 50 mg/kg	Injection quotidienne de salicylate 50 mg/kg/jour pendant 4 jours	11
Salicylate 150 mg/kg	Injection quotidienne de salicylate 150 mg/kg/jour pendant 4 jours	10
Salicylate 200 mg/kg	Injection quotidienne de salicylate 200 mg/kg/jour pendant 4 jours	10
Salicylate 250 mg/kg	Injection quotidienne de salicylate 250 mg/kg/jour pendant 4 jours	10
Salicylate 300 mg/kg ou salicylate 4 jours	Injection quotidienne de salicylate 300 mg/kg/jour pendant 4 jours	13
mCPP 0,1 mg/kg	Injection unique de mCPP 0,1 mg/kg	10
mCPP 0,5 mg/kg	Injection unique de mCPP 0,5 mg/kg	11
Salicylate + mCPP ou salicylate (4j) + mCPP	Injection quotidienne de salicylate 300 mg/kg/jour pendant 4 jours, plus une injection unique de mCPP 0,5 mg/kg au dernier jour, au même site	10
Salicylate + mCPP 2 sites	Injection quotidienne de salicylate 300 mg/kg/jour pendant 4 jours, plus une injection unique de mCPP 0,5 mg/kg au dernier jour, sur deux sites différents	10
Salicylate 2 jours	Injection quotidienne de salicylate 300 mg/kg/jour pendant 2 jours	10
Salicylate (2j) + mCPP	Injection quotidienne de salicylate 300 mg/kg/jour pendant 2 jours, plus une injection unique de mCPP 0,5 mg/kg au dernier jour	10

2. Résultats

Le deuxième volet de notre hypothèse stipule que la survenue d'acouphènes induits par le salicylate provoque des altérations comportementales d'anxiété. Dans le but de répondre à cet aspect de notre hypothèse centrale, les niveaux d'anxiété ont été testés suite à différents traitements impliquant le salicylate, agent anti-inflammatoire non-stéroïdien induisant des acouphènes à des doses connues, et le mCPP, un agent anxiogénique. Les mesures comportementales d'anxiété ont été évaluées par la latence de sortie des animaux vers le côté éclairé de la boîte à deux compartiments.

La latence de sortie des animaux contrôles non traités était de $5,33 \pm 1$ secondes ($n=12$) (Figure 11). Un traitement de sérum physiologique de 10 mL/kg pendant 4 jours ne produit pas d'augmentation significative de la latence de sortie ($6,92 \pm 1,66$ secondes, $n=12$, $p=0,42$ par rapport au groupe contrôle) (Figure 11).

La validation de la technique de mesure comportementale de l'anxiété à l'aide de la boîte à deux compartiments a été faite grâce à l'utilisation d'un agent anxiogénique, le mCPP. L'injection de mCPP à faible concentration (soit 0,1 mg/kg) ne produit pas de réponse comportementale d'anxiété, c'est-à-dire que les données de latence de sortie du groupe mCPP 0,1 ($6,10 \pm 1,27$ secondes, $n=10$) sont comparables à celles obtenues pour les animaux contrôles ($p=0,64$ par rapport aux animaux contrôles non traités, et $p=0,71$ par rapport aux animaux ayant reçu un traitement au sérum physiologique) (Figure 11). Au contraire, une dose plus élevée de mCPP (0,5 mg/kg), reconnue comme anxiogène, entraîne une augmentation significative de la latence de sortie des animaux traités ($19,82 \pm 6,27$ secondes, $n=11$, * $p<0,05$ par rapport aux animaux contrôles non traités, et * $p<0,05$ par rapport aux animaux ayant reçu un traitement au sérum physiologique) (Figure 11). Nos résultats confirment que la boîte à deux compartiments mesure bel et bien les niveaux d'anxiété des animaux.

Par la suite, nous avons vérifié l'effet de différentes concentrations de salicylate, inférieures à la concentration de 300 mg/kg/jour pendant 4 jours qui est connue pour

produire des acouphènes dans 100% des cas. Aucune augmentation significative de la latence de sortie n'a été observée pour des traitements avec des concentrations de 50 mg/kg/jour ($7,18 \pm 0,86$ secondes, $n=11$, $p=0,18$ par rapport aux animaux contrôles non traités, $p=0,89$ par rapport aux animaux ayant reçu un traitement au sérum physiologique), 150 mg/kg/jour ($9 \pm 1,94$ secondes, $n=10$, $p=0,093$ par rapport aux animaux contrôles non traités, et $p=0,42$ par rapport aux animaux ayant reçu un traitement au sérum physiologique) et 200 mg/kg/jour ($6 \pm 1,26$ secondes, $n=10$, $p=0,68$ par rapport aux animaux contrôles non traités, et $p=0,68$ par rapport aux animaux ayant reçu un traitement au sérum physiologique) (Figure 12). Un traitement à la concentration de 250 mg/kg/jour, plus proche de la concentration décisive de 300 mg/kg/jour, provoquait une augmentation marquée, mais non significative, de la latence de sortie ($11,2 \pm 3,45$ secondes, $n=10$, $p=0,15$ par rapport aux animaux contrôles non traités, et $p=0,34$ par rapport aux animaux ayant reçu un traitement au sérum physiologique) (Figure 12). Le résultat obtenu pour ce groupe donne l'illusion d'une réponse intermédiaire entre les concentrations de 200 mg/kg/jour et de 300 mg/kg/jour. Cependant, il faut noter que les latences de sortie obtenues pour le groupe de 250 mg/kg/jour étaient divisées en deux groupes de valeurs avec un certain écart, soit des latences de sortie courtes comparables à celles obtenues pour les groupes contrôles et des latences de sortie plus élevées comparables à celles obtenues pour le groupe traité avec 300 mg/kg/jour. Le traitement au salicylate à la concentration de 300 mg/kg/4j de salicylate provoquait une augmentation significative de la latence de sortie des animaux ($18,31 \pm 2,37$ secondes, $n=13$, *** $p<0,001$ par rapport aux animaux contrôles non traités, et ** $p<0,01$ par rapport aux animaux ayant reçu un traitement au sérum physiologique) (Figure 12).

Nous avons également vérifié l'effet sur les niveaux d'anxiété d'un traitement au salicylate 300 mg/kg/jour sur 2 jours seulement. Nous avons obtenu, pour le groupe traité pendant 2 jours, une moyenne des latences de sortie intermédiaire ($14,1 \pm 3,27$ secondes, $n=10$) entre celle obtenue pour le groupe traité pendant 4 jours et le groupe contrôle (Figure 13). Cette latence de sortie est significativement différente par rapport aux animaux contrôles non traités (* $p<0,05$), et presque significativement différente par rapport aux animaux ayant reçu un traitement au sérum physiologique ($p=0,06$) (Figure 13).

Par la suite, nous avons exploré davantage les liens entre les acouphènes et l'anxiété en allant voir si un anxiogène pouvait exacerber l'anxiété associée aux acouphènes. Les résultats de la co-injection de salicylate 300 mg/kg/jour et de mCPP 0,5 mg/kg, qu'elle soit effectuée au même site ($5,4 \pm 1,29$ secondes, $n=10$) ou sur deux sites différents ($5,9 \pm 1,24$ secondes, $n=10$), indiquent que les niveaux d'anxiété sont comparables à ceux obtenus pour les animaux contrôles ($p=0,97$ et $p=0,72$, respectivement, par rapport aux animaux contrôles non traités, et $p=0,49$ et $p=0,64$, respectivement, par rapport aux animaux ayant reçu un traitement au sérum physiologique) (Figure 14). Nous avons également comparé les résultats obtenus pour la concentration de 300 mg/kg/4j de salicylate et celle de 0,5 mg/kg de mCPP. Il est intéressant de noter que le salicylate induit une réponse comportementale d'anxiété similaire à celle d'un agent anxiogénique, c'est-à-dire que la moyenne des latences de sortie obtenue pour les animaux traités avec une concentration de 300 mg/kg/4j de salicylate ($18,31 \pm 2,37$ secondes, $n=13$, $p=0,32$) n'est pas significativement différente de celle obtenue pour les animaux traités avec une injection unique de 0,5 mg/kg de mCPP ($19,82 \pm 6,27$ secondes, $n=11$) (Figure 14). Finalement, nous avons testé l'effet d'un traitement au salicylate 300 mg/kg/jour sur 2 jours combiné avec une injection unique de mCPP 0,5 mg/kg. Tout comme pour le groupe traité sur 4 jours, nous avons obtenu une moyenne des latences de sortie pour les animaux traité sur 2 jours ($4,6 \pm 0,98$ secondes, $n=10$) comparable à celle obtenue pour les animaux contrôles ($p=0,61$ par rapport aux animaux contrôles non traités, et $p=0,48$ par rapport aux animaux ayant reçu un traitement au sérum physiologique) (Figure 15).

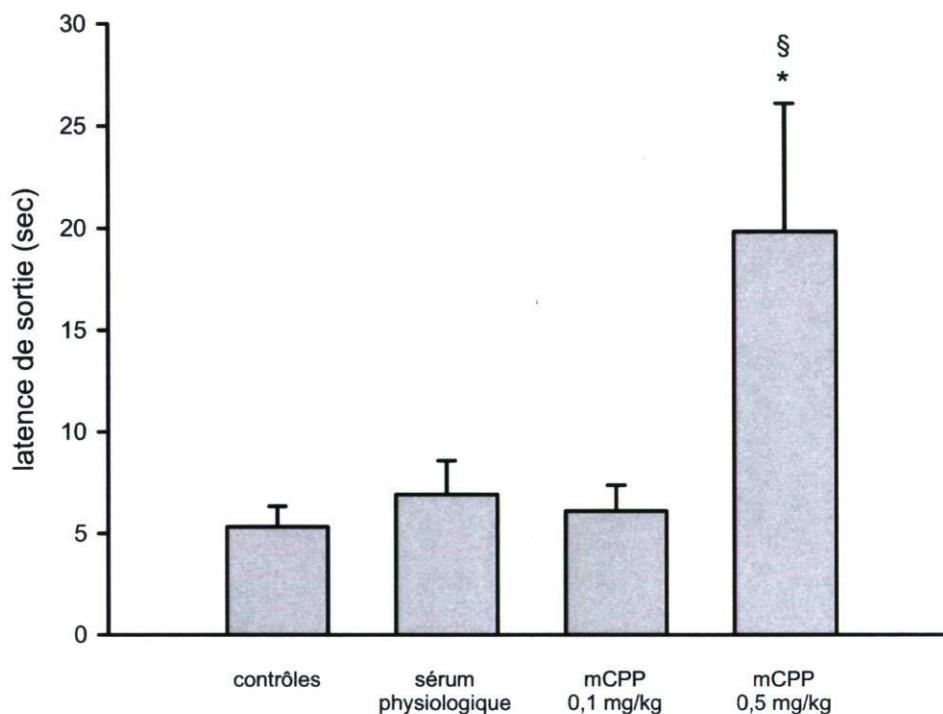


Figure 11. Effet d'une injection i.p. unique d'un agent anxiogénique, le mCPP, sur une réponse comportementale d'anxiété.

Le graphique présente les latences de sortie, reflétant les niveaux d'anxiété des animaux et mesurées à l'aide d'une boîte à deux compartiments, pour quatre groupes ayant reçu des traitements différents : aucune injection (contrôles), une injection unique de sérum physiologique ou une injection unique de méta-chlorophénylpipérazine (mCPP) 0,1 mg/kg ou 0,5 mg/kg. * $p < 0,05$ vs contrôle non traité; § $p < 0,05$ vs contrôle traité au sérum physiologique. Les valeurs représentent la moyenne des latences de sortie (en secondes) \pm erreur standard de 10 souris Balb/C mâles adultes par groupe.

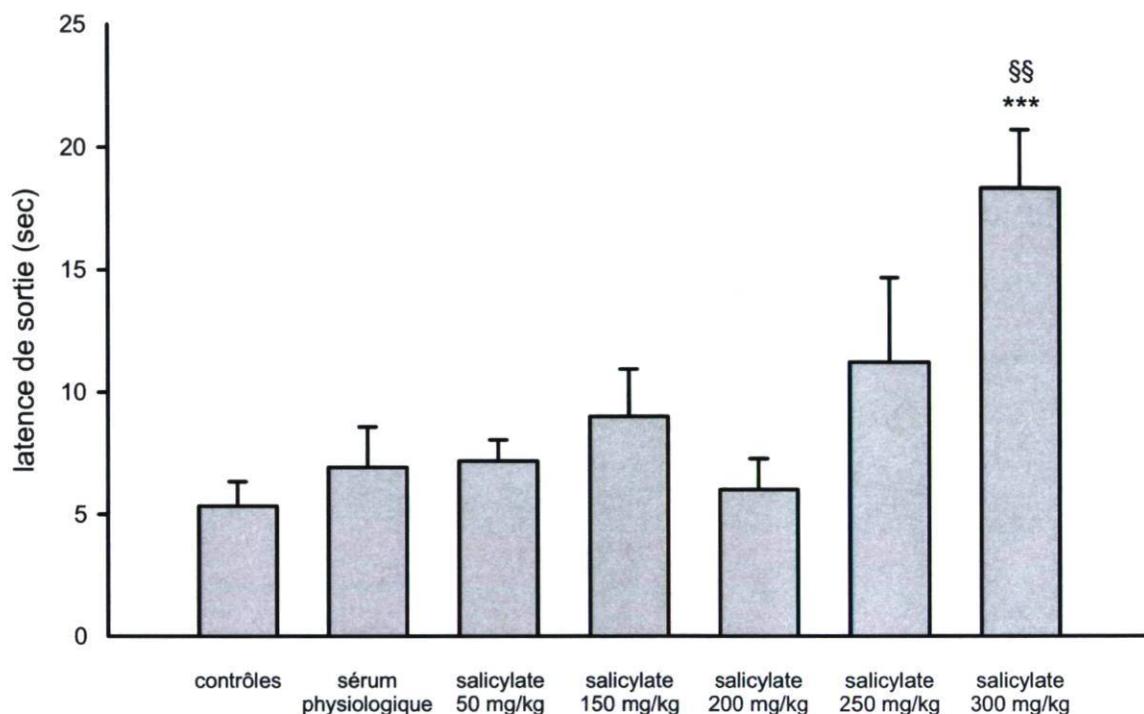


Figure 12. Effet de l'injection i.p. de salicylate, à différentes concentrations pendant 4 jours, sur une réponse comportementale d'anxiété.

Le graphique présente les latences de sortie, reflétant les niveaux d'anxiété des animaux et mesurées à l'aide d'une boîte à deux compartiments, pour sept groupes ayant reçu des traitements différents : aucune injection (contrôles), une injection unique de sérum physiologique ou une injection de salicylate 50, 150, 200, 250 ou 300 mg/kg/jour pendant 4 jours. *** $p < 0,001$ vs contrôle non traité; §§ $p < 0,01$ vs contrôle traité au sérum physiologique. Les valeurs représentent la moyenne des latences de sortie (en secondes) \pm erreur standard de 10 souris Balb/C mâles adultes par groupe.

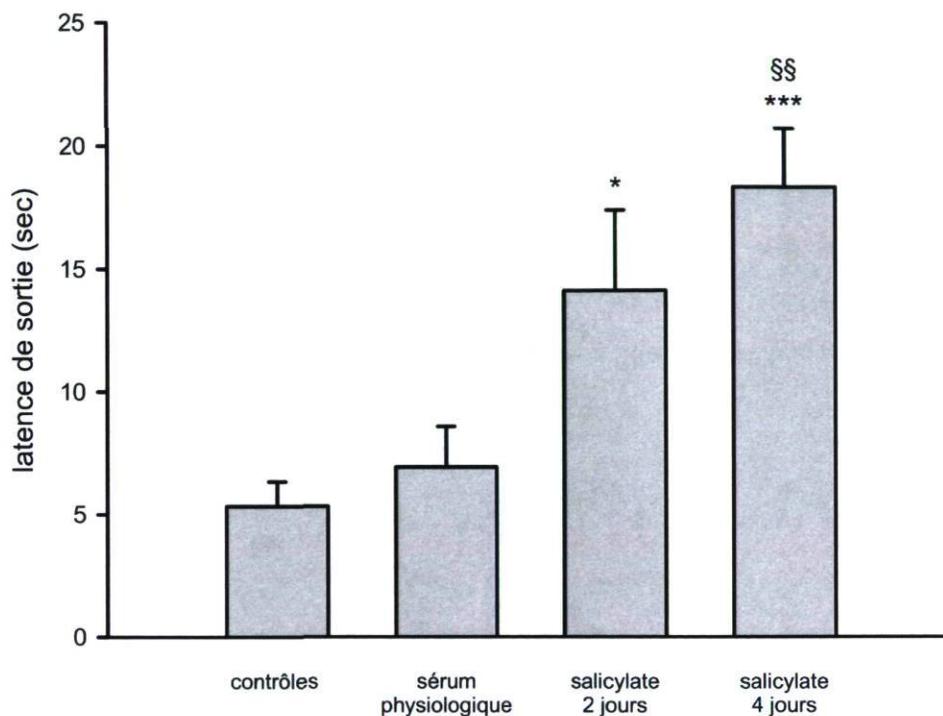


Figure 13. Effet de l'injection i.p. de salicylate 300 mg/kg/jour, pendant 2 jours et 4 jours, sur une réponse comportementale d'anxiété.

Le graphique présente les latences de sortie, reflétant les niveaux d'anxiété des animaux et mesurées à l'aide d'une boîte à deux compartiments, pour quatre groupes ayant reçu des traitements différents : aucune injection (contrôles), une injection unique de sérum physiologique ou une injection de salicylate 300 mg/kg/jour, administrée pendant 2 jours ou 4 jours. * $p < 0,05$ vs contrôle non traité; *** $p < 0,001$ vs contrôle non traité; §§ $p < 0,01$ vs contrôle traité au sérum physiologique. Les valeurs représentent la moyenne des latences de sortie (en secondes) \pm erreur standard de 10 souris Balb/C mâles adultes par groupe.

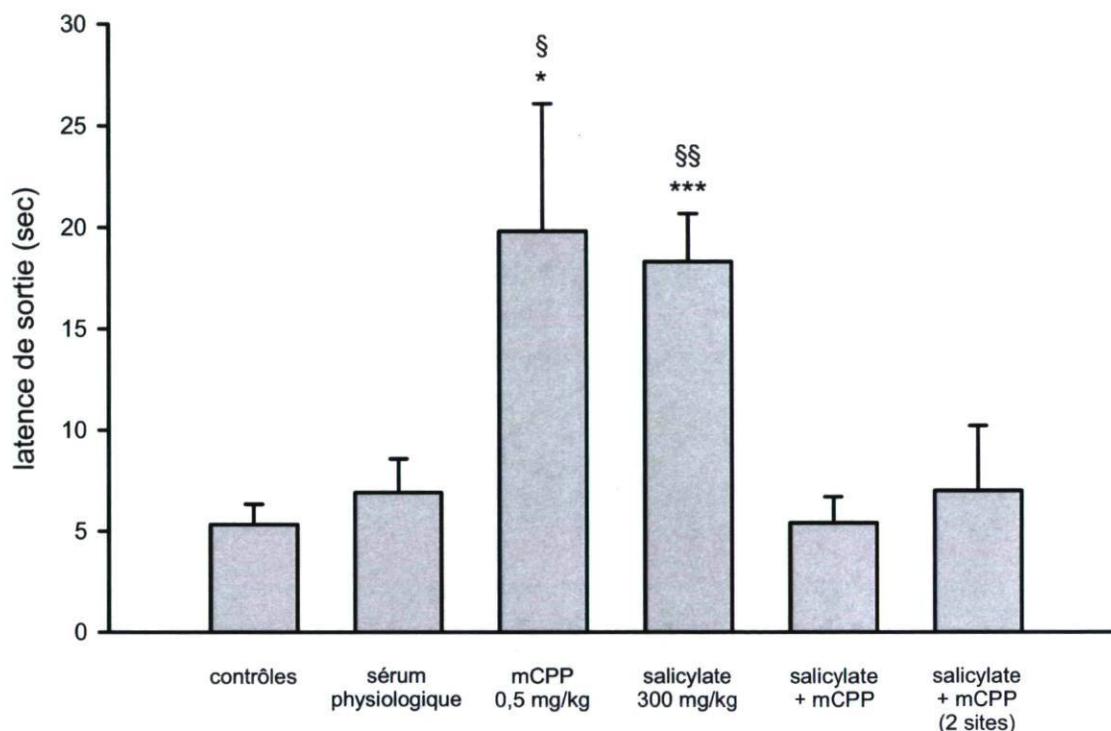


Figure 14. Effet de la co-injection i.p. de salicylate 300 mg/kg/jour et de mCPP 0,5 mg/kg, au même site ou sur deux sites différents, sur une réponse comportementale d'anxiété.

Le graphique présente les latences de sortie, reflétant les niveaux d'anxiété des animaux et mesurées à l'aide d'une boîte à deux compartiments, pour six groupes ayant reçu des traitements différents : aucune injection (contrôles), une injection de sérum physiologique, une injection de méta-chlorophénylpipérazine (mCPP) 0,5 mg/kg, une injection de salicylate 300 mg/kg, une co-injection de salicylate 300 mg/kg/jour pendant 4 jours et d'une dose unique de mCPP 0,5 mg/kg au 4^e jour, sur le côté droit de l'animal (salicylate + mCPP) ou une co-injection de salicylate 300 mg/kg/jour pendant 4 jours, sur le côté droit du corps de l'animal, et d'une dose unique de mCPP 0,5 mg/kg au 4^e jour, sur le côté gauche du corps de l'animal (salicylate + mCPP (2 sites)). * $p < 0,05$ vs contrôle non traité; *** $p < 0,001$ vs contrôle non traité; §§ $p < 0,01$ vs contrôle traité au sérum physiologique. Les valeurs représentent la moyenne des latences de sortie (en secondes) \pm erreur standard de 10 souris Balb/C mâles adultes par groupe.

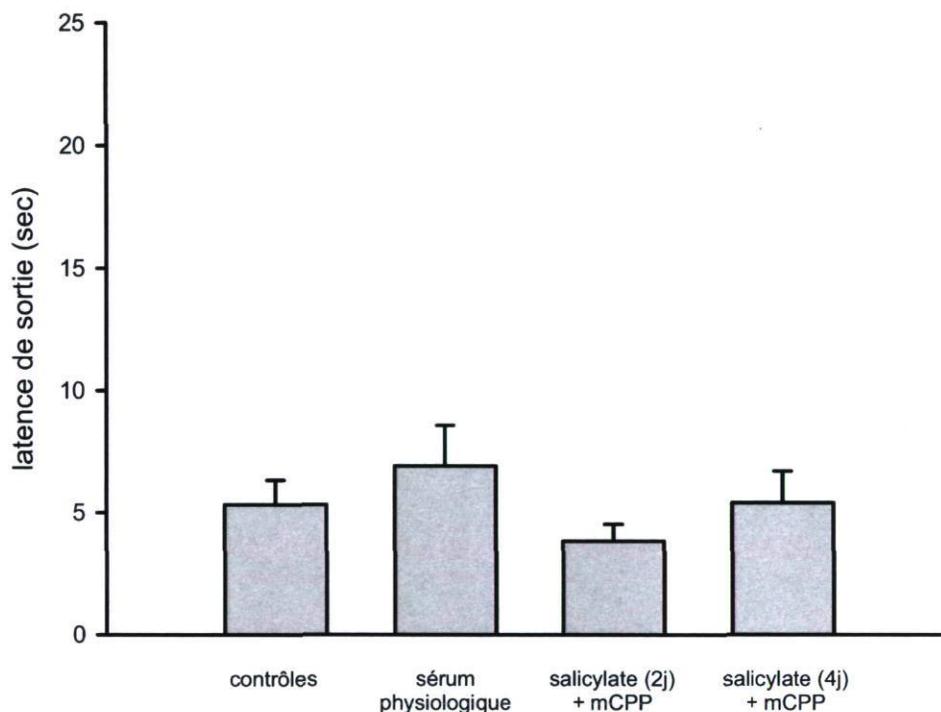


Figure 15. Effet de la co-injection i.p. de salicylate 300 mg/kg, pendant 2 jours, et de mCPP 0,5 mg/kg, et de la co-injection de salicylate 300 mg/kg, pendant 4 jours, et de mCPP 0,5 mg/kg, sur une réponse comportementale d'anxiété.

Le graphique présente les latences de sortie, reflétant les niveaux d'anxiété des animaux et mesurées à l'aide d'une boîte à deux compartiments, pour quatre groupes ayant reçu des traitements différents : aucune injection (contrôles), une injection de sérum physiologique, une co-injection de salicylate 300 mg/kg/jour pendant 2 jours et d'une dose unique de mCPP 0,5 mg/kg au 2^e jour (salicylate (2j) + mCPP) ou une co-injection de salicylate 300 mg/kg/jour pendant 4 jours et d'une dose unique de mCPP 0,5 mg/kg au 4^e jour (salicylate (4j) + mCPP). Les valeurs représentent la moyenne des latences de sortie (en secondes) ± erreur standard de 10 souris Balb/C mâles adultes par groupe.

3. Discussion

La méthodologie que nous avons utilisée pour mesurer l'anxiété chez l'animal est la méthode de la boîte à deux compartiments, adaptée à partir du protocole original de Crawley et collaborateurs (Crawley and Goodwin, 1980). La boîte à deux compartiments représente l'une des méthodes les plus largement utilisées pour mettre en évidence les états émotionnels isomorphiques à l'anxiété chez les rongeurs (Crawley, 2000). En effet, l'injection de mCPP, agent anxiogénique reconnu (Charney et al., 1987; Bilkei-Gorzo, 1998; Bourin et al., 1998; De Vry et al., 2003; Guitton and Dudai, 2004; Guitton et al., 2005; Guitton et al., 2008), provoque une réponse anxieuse chez l'animal à des concentrations élevées, tandis qu'aucune réponse comportementale anxieuse n'est observée pour des concentrations faibles de mCPP. Cette absence de réponse anxieuse pour des concentrations faibles de mCPP, couplée à l'absence de réponse anxieuse pour des injections de sérum physiologique, démontre bien la spécificité de ce test pour les états émotionnels de type anxieux (notamment par rapport à un stress qui pourrait être lié à la contention ou la méthode d'injection). Un traitement au salicylate produisait également une réponse anxieuse.

Cependant, une question importante était de savoir si l'anxiété observée était simplement concomitante aux acouphènes, ou si elle était induite par les acouphènes. Le salicylate, comme tout agent pharmacologique, a des effets propres qui sont dépendants de la dose injectée (effet dit « dose-réponse »). Par contre, il a été démontré que l'induction d'acouphènes par le salicylate suivait une loi de seuil. En d'autres termes, les acouphènes n'apparaissent qu'après une certaine dose de salicylate, indépendamment des autres effets secondaires du salicylate (Jastreboff, 1988a; Jastreboff and Sasaki, 1994; Cazals et al., 1998; Cazals, 2000; Guitton et al., 2003; Guitton and Puel, 2004; Puel and Guitton, 2007). Dans le cas des rongeurs, la dose nécessaire pour induire des acouphènes dans 100% des cas est de 300 mg/kg/jour pendant 4 jours (Jastreboff, 1988a; Jastreboff and Sasaki, 1994; Cazals, 2000; Guitton et al., 2003; Guitton and Puel, 2004; Guitton and Dudai, 2007). Dans nos expériences, l'utilisation de doses plus faibles (allant de 50 à 200 mg/kg/jour pendant 4 jours) ne suffisait pas à provoquer d'augmentation quantifiable des niveaux d'anxiété des

animaux, suggérant très fortement que l'anxiété observée était bel et bien induite par les acouphènes, ou du moins corrélée avec ces derniers, et non pas simplement concomitante.

Le cas des animaux ayant reçu une concentration de 250 mg/kg/jour de salicylate est un peu particulier. En effet, le résultat moyen semblait être intermédiaire entre une absence d'anxiété et une anxiété forte telle que celle observée avec le traitement de 300 mg/kg/jour. Cependant, les animaux se divisaient clairement en deux groupes distincts : un premier groupe ne présentant aucune réponse de type comportementale d'anxiété, et un second groupe présentant une réponse équivalente à celle observée chez les animaux traités avec 300 mg/kg/jour. Ainsi, la concentration de 250 représente très probablement le point de seuil véritable : en-dessous, aucun animal ne ressent d'acouphènes : au-dessus, tous les animaux perçoivent des acouphènes. Ainsi, la mise en évidence indirecte via des mesures d'anxiété de cette concentration possédant un taux de réponse de 50% en plus de la concentration de 300 mg/kg/jour provoquant des acouphènes dans 100% des cas est des plus intéressantes, car elle offre un outil pharmacologique supplémentaire pour développer et calibrer de nouveaux modèles expérimentaux d'acouphènes. En effet, rappelons ici que, dans le cas de rats Wistar, certaines études ont montré que seulement 48% des animaux présentaient des acouphènes après une exposition à un traumatisme sonore de 130 dB SPL pendant 15 minutes (Guitton and Dudai, 2007). Cette variabilité quant à la vulnérabilité aux acouphènes fait d'ailleurs écho à ce qui est observé chez les patients humains (Chung et al., 1984; Dieroff and Meissner, 1987). Ainsi, la découverte des effets sur l'anxiété induite par les acouphènes d'une dose de 250 mg/kg/jour de salicylate nous procure un outil supplémentaire pour étudier la variabilité interindividuelle de vulnérabilité aux acouphènes, élément essentiel si l'on veut un jour développer une approche pharmacogénétique pour traiter les acouphènes.

Les études comportementales antérieures avaient montré que, si la survenue d'acouphènes dépendait d'un seuil limite au niveau de la concentration de salicylate utilisée, les acouphènes apparaissaient progressivement suivant un décours temporel régulier au cours des 4 jours du traitement (Guitton et al., 2003; Guitton et al., 2005). Dans notre cas, des niveaux d'anxiété intermédiaires étaient observés dès le second jour,

suggérant que les niveaux d'anxiété suivaient de manière très proche les niveaux de perception des acouphènes. Ainsi, il semble donc que non seulement l'anxiété peut potentialiser la perception d'acouphènes déjà présents (Guitton et al., 2005; Guitton 2006), mais que les acouphènes induits par le salicylate produisent de l'anxiété chez l'animal.

Du point de vue neurobiologique, l'anxiété est un phénomène complexe qui met en jeu de nombreuses structures anatomiques et plusieurs systèmes de neurotransmetteurs (Bourin et al., 1998; Lader and Udhe, 2006; Holmes and Quirk, 2010; Knoll and Carlezon, 2010; Narayan and Dragunow, 2010; Rotzinger et al., 2010). Nous avons donc cherché à quantifier la contribution de l'un de ces systèmes, le système sérotoninergique, dans l'anxiété induite par les acouphènes. Le choix de ce système particulier a été fait pour plusieurs raisons. Premièrement, le système sérotoninergique est un système impliqué de manière extrêmement forte dans les réactions d'anxiété (Lesch et al., 1996; Ramboz et al., 1998; Manji et al., 2001; Snyder, 2002). Deuxièmement, dans le débat existant entre origine centrale et périphérique des acouphènes (voir l'Introduction de ce Mémoire), le système sérotoninergique jouit d'une place intéressante. En effet, tandis que l'immense majorité des systèmes de neurotransmetteurs sont présents dans la cochlée, l'application cochléaire d'agonistes ou d'antagonistes sérotoninergiques n'a aucun effet physiologique observable, que se soit en conditions normales ou pathologiques (Eybalin, 1993; Puel, 1995; Guitton et al., 2005; Guitton and Dudai, 2007).

De manière surprenante, la co-injection après un traitement de salicylate de 300 mg/kg/jour pendant 4 jours avec l'agent sérotoninergique anxiogénique qu'est le mCPP n'exacerbait pas davantage les niveaux d'anxiété, mais au contraire semblait abolir cette anxiété. Craignant un artefact qui aurait pu être lié à la dégradation du mCPP par le salicylate (les injections, bien que séparées dans le temps, ayant été faites dans le même site d'injection afin de réduire l'inconfort de l'animal), nous avons reproduit ces expériences en utilisant non pas un, mais deux sites d'injection différents. Les résultats obtenus donnent des valeurs semblables à celles obtenues lorsque les agents étaient injectés au même site, c'est-à-dire qu'encore une fois, le mCPP semblait renverser l'anxiété associée aux acouphènes induits par le salicylate. À partir de ce résultat, nous avons pu émettre

l'hypothèse que l'anxiété causée par les acouphènes induits par le salicylate met en jeu le système sérotoninergique. Dans ce cas, ce système serait saturé et le mCPP aurait alors un effet opposé, c'est-à-dire qu'il devient anxiolytique plutôt qu'anxiogénique. Cette action particulière mixte du mCPP dans des situations d'anxiété sérotoninergique a déjà été rapportée dans la littérature (Bourin et al., 1998). En effet, le mCPP peut se comporter tant comme un antagoniste que comme un agoniste, selon la sous-unité des récepteurs 5-HT concernée (Kahn and Wetzler, 1991; Bourin et al., 1998).

Premièrement, il a été suggéré que le mCPP agirait comme un agoniste partiel sur la sous-unité 5-HT_{1A} (Odagaki et al., 2005). Des études portant sur les effets du mCPP sur l'hydrolyse des phosphoinositides induite par les récepteurs sérotoninergiques suggèrent qu'il agit comme agoniste sur la sous-unité 5-HT_{2C}, mais comme antagoniste sur la sous-unité 5-HT_{2A} (Conn and Sanders-Bush, 1987). Plus récemment cependant, il a été montré que le mCPP peut également agir comme agoniste partiel sur la sous-unité 5-HT_{2A} (Grotewiel et al., 1994). In vitro, il a été démontré que le mCPP est un agoniste relativement sélectif des sous-unités 5-HT_{2B} (Clineschmidt et al., 1985; Kennett et al., 1994; Baxter et al., 1995) et 5-HT_{2C} (Smith and Suckow, 1985; Conn and Sanders-Bush, 1987; Kilpatrick et al., 1987; Hamik and Peroutka, 1989; Hoyer, 1989). Des effets agonistes du mCPP sur la sous-unité 5-HT_{1D} peuvent également être inférés à partir d'une étude montrant que le mCPP diminue l'hyperpolarisation des neurones sérotoninergiques chez le cochon d'Inde (Bobker and Williams, 1990). Finalement, le mCPP agit comme un antagoniste compétitif lors de la dépolarisation du nerf vague induite par les récepteurs sérotoninergiques, un effet induit par la sous-unité 5-HT₃, suggérant que le mCPP est un antagoniste de la sous-unité 5-HT₃ (Ireland and Tyers, 1987).

Les études liées au décours temporel d'apparition des acouphènes montraient que la perception des acouphènes n'était pas maximale au deuxième jour et qu'il restait une certaine marge de progression (Guitton et al., 2003; Guitton et al., 2005). Nos résultats montrent que c'est également le cas pour l'anxiété induite par les acouphènes. Nous avons donc testé l'effet de l'injection de mCPP après seulement deux jours de traitements au salicylate. Dans ce cas, le mCPP renverse encore une fois de manière totale les niveaux

d'anxiété induits par le salicylate. Le fait que ce renversement des comportements anxieux puisse être observé après seulement 2 jours de traitement renforce très fortement notre hypothèse proposant pour le système sérotoninergique un rôle de premier plan dans la perception de l'anxiété liée aux acouphènes.

Ainsi, l'anxiété concomitante aux acouphènes induits par le salicylate semble faire intervenir de manière massive le système sérotoninergique. Il reste cependant possible qu'une implication des autres systèmes de neurotransmetteurs jouant un rôle dans l'anxiété (en particulier le système GABAergique et le système cholécystokininergique) puisse également exister dans le cas des acouphènes. Mais les résultats présentés ici suggèrent que le rôle majeur est joué par la sérotonine.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Au cours de cette étude, l'utilisation d'une approche combinée moléculaire et comportementale nous a permis de documenter certains aspects des altérations provoquées par la perception d'acouphènes induits par un traitement au salicylate dans le cerveau des rongeurs. Nos résultats suggèrent un changement de plasticité synaptique ainsi qu'un état émotionnel similaire à l'anxiété associés aux acouphènes induits par le salicylate. Des liens peuvent être établis entre les résultats observés au niveau moléculaire. En effet, la modulation des voies MAPK-ERK et PI(3)K-AKT et celle des niveaux d'expression de l'ARNm des NMDAR associées aux acouphènes induits par le salicylate semblent inter-reliées.

Premièrement, comme mentionné plus tôt, les voies MAPK-ERK et PI(3)K-AKT sont toutes deux des effecteurs de la GTPase Ras. Il n'est donc pas surprenant que les changements moléculaires observés aillent dans le même sens. Par ailleurs, bien que le rôle de Ras dans la signalisation régulée par les NMDAR soit peu connu, plusieurs études ont indiqué que les voies de signalisation de Ras jouent un rôle important dans des formes de plasticité dépendantes des NMDAR, comme la LTP. Ainsi, des mutations affectant H-Ras (Manabe et al., 2000) ou NF1 (Costa et al., 2002) et SynGAP (Komiyama et al., 2002), protéines activant Ras, entraînent des altérations de la LTP dans l'hippocampe chez la souris. De plus, l'inhibition pharmacologique de pERK (Sweatt, 2001; Adams and Sweatt, 2002) et de PI(3)K (Kelly and Lynch, 2000; Lin et al., 2001; Raymond et al., 2002; Sanna et al., 2002) interrompt la LTP. Le mécanisme à la base de l'implication de la protéine PI(3)K dans la LTP est peu connu. Cependant, il a été démontré que l'activation de la MAPK ERK via une stimulation des NMDAR est complètement dépendante de l'activité de la PI(3)K en culture neuronale (Chandler et al., 2001; Perkin et al., 2002), suggérant que les inhibiteurs de la PI(3)K suppriment la LTP puisque l'activité de cette kinase est requise pour l'activation de ERK régulée par les NMDAR. Ainsi, les diminutions d'expression d'AKT observées et associées dans cette étude aux acouphènes induits par le salicylate se répercutent également dans les voies MAPK-ERK puisque ces deux voies sont inter-reliées par les NMDAR et ces diminutions d'expression pourraient également influencer des phénomènes de plasticité synaptique via une réduction de la LTP dépendant des NMDAR, par exemple.

Deuxièmement, toujours d'un point de vue moléculaire, plusieurs voies enzymatiques dont celle des MAPK régulent la transcription et la synthèse protéique (Deisseroth et al., 2003). Ainsi, la réduction observée de la transcription de l'ADN en ARNm du NMDAR pourrait être liée à la diminution de l'activité démontrée dans les voies de signalisation PI(3)K et MAPK. Par ailleurs, des études récentes ont montré que les NMDAR forment des complexes multiprotéiques qui contiennent un certain nombre de protéines impliquées dans la voie de signalisation Ras (Husi et al., 2000). La protéine PI(3)K se lie directement à la sous-unité NR2B des NMDAR (Hisatsune et al., 1999) et le site de liaison est phosphorylé par la tyrosine kinase Fyn (Hisatsune et al., 1999), qui est requise pour l'induction de la LTP (Grant et al., 1992). En contraste avec l'interaction directe de la PI(3)K avec NR2B, la protéine ERK est régulée par la SynGAP qui se lie directement à PSD-95 (Chen et al., 1998; Kim et al., 1998), qui à son tour se lie aux sous-unités NR2 (Kornau et al., 1995). Les protéines PI(3)K et ERK sont donc liées, directement ou indirectement, aux sous-unités des NMDAR. Ainsi, la diminution de l'expression des protéines ERK et AKT pourrait entraîner une diminution des niveaux d'expression des ARNm des NMDAR.

Les résultats obtenus indiquent également une réduction de l'expression des niveaux de l'ARNm des NMDAR seulement après un traitement au salicylate. Un second traitement identique au salicylate renverse les effets observés après un premier traitement. Ceci suggère que les altérations centrales observées ne sont pas nécessairement directement liées à la perception des acouphènes induits par le salicylate.

Finalement, il avait été démontré que l'anxiété pouvait exacerber la perception d'acouphènes déjà existants mais ne pouvait pas créer des acouphènes *per se* (Guitton et al., 2005). Pour notre part, nous avons en plus démontré que la présence d'acouphènes induits par le salicylate provoque une augmentation des réponses comportementales d'anxiété. Cependant, si le salicylate utilisé à la concentration de 300 mg/kg/jour pendant 4 jours provoque des acouphènes dans tous les cas, ceci est très différent de la réalité clinique (Chung et al., 1984; Dieroff and Meissner, 1987; Nicolas-Puel et al., 2002; Nicolas-Puel et al., 2006). En effet, il existe clairement des différences interindividuelles très marquées

quant à la susceptibilité d'un individu à développer des acouphènes (Loeb and Smith, 1967; Cahani et al., 1983; Chung et al., 1984; Dieroff and Meissner, 1987; Nicolas-Puel et al., 2002; Nicolas-Puel et al., 2006; Guitton and Dudai, 2007). Dans cette optique, les résultats obtenus avec la concentration de 250 mg/kg/jour pendant 4 jours de salicylate représentent un point des plus intéressants. En effet, cette concentration semble être la concentration « pivot » à partir de laquelle seulement une partie des animaux développent des acouphènes. Bien évidemment, les preuves sont pour l'instant indirectes (mesure de l'anxiété corrélée à la perception d'acouphènes) et des travaux ultérieurs seront nécessaires pour renforcer cette observation. Si cette hypothèse venait à se confirmer, nous aurions réussi à développer un nouvel outil pharmacologique permettant d'étudier non pas simplement l'absence ou la présence d'acouphènes, mais les différences de susceptibilité interindividuelles aux acouphènes. Ce nouvel outil permettrait clairement à nos connaissances sur les mécanismes physiopathologiques à la base des acouphènes de faire un bond en avant, car le seul moyen à l'heure actuelle pour étudier ces phénomènes de variabilité est le recours à des traumatismes sonores (Heffner and Harrington, 2002; Guitton and Dudai, 2007).

L'exploration de l'apparition d'anxiété associée aux acouphènes selon un décours temporel de 4 jours nous a permis de démontrer que, si la survenue d'anxiété associée aux acouphènes dépend d'un seuil limite au niveau de la concentration de salicylate utilisée, elle apparaît progressivement suivant un décours temporel similaire à celui observé pour l'apparition d'acouphènes induits par le salicylate. Ainsi, le fait que les acouphènes induits par le salicylate, même sur 2 jours, produisent de l'anxiété chez l'animal indique que les niveaux d'anxiété suivent de manière très proche les niveaux de perception des acouphènes.

De manière surprenante, l'injection d'un agent sérotoninergique chez des animaux souffrant d'acouphènes induits par le salicylate et d'anxiété n'exacerbe pas davantage les niveaux d'anxiété, mais semble au contraire abolir l'anxiété liée aux acouphènes. Il semble donc que l'anxiété causée par les acouphènes induits par le salicylate met en jeu le système sérotoninergique. Le mCPP pouvant se comporter comme un agoniste ou un antagoniste selon la sous-unité des récepteurs 5-HT concernée (Kahn and Wetzler, 1991; Bourin et al.,

1998), nos résultats portent à croire que le système sérotoninergique pourrait être saturé par la présence d'anxiété provoquée par les acouphènes induits par le salicylate et que le mCPP aurait alors un effet opposé, c'est-à-dire qu'il deviendrait anxiolytique plutôt qu'anxiogénique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nos résultats (d'une part, tendance à la baisse de l'activité dans les structures nerveuses et de la transcription dans les structures auditives centrales et, d'autre part, survenue de comportement de type anxieux uniquement lorsque les concentrations de salicylate utilisées sont suffisantes pour avoir un effet cochléaire) semblent confirmer l'origine périphérique des acouphènes, tout en montrant que ces altérations périphériques s'accompagnent d'effets centraux beaucoup plus complexes que ceux initialement suggérés (Wallhauser-Franke, 1997; Cazals, 2000; Kaltenbach et al., 2005). En effet, la diminution de l'activité dans les structures nerveuses et la diminution de la transcription allant à l'encontre de l'hyperexcitabilité démontrée et liée aux acouphènes (Salvi et al., 1990; Cazals, 2000; Kaltenbach and Afman, 2000; Salvi et al., 2000; Eggermont and Roberts, 2004), nos résultats pointent vers une origine périphérique des acouphènes plutôt que centrale.

Les travaux réalisés ouvrent la voie à de nombreuses perspectives, tant du point de vue des aspects fondamentaux que de celui des aspects translationnels et appliqués. Les perspectives des travaux présentés peuvent se diviser en perspectives à court terme, à moyen terme et à long terme.

À court terme, il serait intéressant de compléter les expériences moléculaires en allant explorer d'autres voies signalétiques (PKC ζ , PSD-95, NF- κ B, etc.) en immunobuvardage ainsi qu'en regardant l'effet des acouphènes induits par le salicylate sur l'expression des NMDAR en autoradiographie. Des analyses histologiques (marquage de Golgi) permettraient également d'évaluer si des changements des caractéristiques morphologiques des neurones surviennent en présence d'acouphènes.

De même, si nos résultats obtenus sur les liens entre acouphènes et anxiété sont extrêmement prometteurs, nous allons chercher à vérifier que le rôle du système sérotoninergique est bien prépondérant. Pour ce faire, nous utiliserons la même approche que celle que nous avons utilisée avec succès avec le mCPP, mais en nous servant d'antagonistes ou agonistes sérotoninergiques plus sélectifs que ce dernier. Dans cette même optique, il serait également intéressant d'étudier les changements d'expression des

récepteurs 5-HT liés aux acouphènes induits par le salicylate, par autoradiographie. Il sera également pertinent de tester des agents pharmacologiques agissant sur d'autres systèmes de neurotransmetteurs ou de neuromodulateurs impliqués dans les réponses de type anxieux. Les systèmes cibles seront principalement les systèmes noradrénergique et cholécystokininérgique.

À moyen terme, nous allons chercher à dépasser les présents résultats pour aller plus loin dans notre compréhension des bases biologiques des acouphènes; non seulement des acouphènes induits par le salicylate, mais surtout d'une manière plus générale par les acouphènes induits par des causes plus communément observées en clinique humaine. Parmi les causes principales d'acouphènes observés en clinique figurent les traumatismes sonores et la presbyacousie. S'il existe d'ors et déjà des modèles animaux d'acouphènes induits par un traumatisme sonore chez le hamster (Heffner and Harrington, 2002) et chez le rat (Guitton and Dudai, 2007), un tel modèle fait encore défaut chez la souris. De même, il manque encore à l'heure actuelle un modèle murin réellement validé de presbyacousie, même si des tentatives ont été réalisées. Ainsi, développer ces modèles représente un enjeu extrêmement important pour la recherche future sur les acouphènes. Ayant mis en évidence un certain nombre de biomarqueurs tant moléculaires que comportementaux témoignant de la présence d'acouphènes chez la souris, nos travaux ouvrent la voie au développement de tels modèles. Nous allons également approfondir les aspects comportementaux en étudiant dans la lignée des travaux les plus récents, les aspects comportementaux intégrés (Guitton, 2009), en utilisant notamment des outils de bioacoustique (analyse des vocalisations ultrasoniques d'animaux présentant des acouphènes).

Enfin, à long terme, le but ultime de nos travaux reste de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour soigner de manière efficace les patients acouphéniques. En particulier, nos travaux suggèrent la possibilité de combiner une approche pharmacologique spécifique centrée sur les acouphènes (« cause », au niveau périphérique) et une approche pharmacologique ciblant l'anxiété (« symptôme », au niveau central). Clairement, ces approches combinées pourraient réussir là où des approches plus simples ne mettant en jeu qu'une seule stratégie de ciblage moléculaire ont échoué.

RÉFÉRENCES

- Abbott SD, Hughes LF, Bauer CA, Salvi R, Caspary DM (1999) Detection of glutamate decarboxylase isoforms in rat inferior colliculus following acoustic exposure. *Neuroscience* 93:1375-1381
- Adams JP, Sweatt JD (2002) Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:135-163
- Ahmad N, Seidman M (2004) Tinnitus in the older adult: epidemiology, pathophysiology and treatment options. *Drugs Aging* 21:297-305
- Aitkin LM, Boyd J (1975) Responses of single units in cerebellar vermis of the cat to monaural and binaural stimuli. *J Neurophysiol* 38:418-429
- Akirav I, Raizel H, Maroun M (2006) Enhancement of conditioned fear extinction by infusion of the GABA(A) agonist muscimol into the rat prefrontal cortex and amygdala. *Eur J Neurosci* 23:758-764
- Azizi SA, Burne RA, Woodward DJ (1985) The auditory corticopontocerebellar projection in the rat: inputs to the paraflocculus and midvermis. An anatomical and physiological study. *Exp Brain Res* 59:36-49
- Baguley DM (2006) What progress have we made with tinnitus? The Tonndorf Lecture 2005. *Acta Otolaryngol Suppl*:4-8
- Baldo P, Doree C, Lazzarini R, Molin P, McFerran DJ (2006) Antidepressants for patients with tinnitus. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003853
- Bauer CA, Brozoski TJ (2001) Assessing tinnitus and prospective tinnitus therapeutics using a psychophysical animal model. *J Assoc Res Otolaryngol* 2:54-64
- Bauer CA, Brozoski TJ (2006) Effect of gabapentin on the sensation and impact of tinnitus. *Laryngoscope* 116:675-681
- Bauer CA, Brozoski TJ (2007) Gabapentin. *Prog Brain Res* 166:287-301
- Bauer CA, Brozoski TJ, Rojas R, Boley J, Wyder M (1999) Behavioral model of chronic tinnitus in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg* 121:457-462
- Baxter G, Kennett G, Blaney F, Blackburn T (1995) 5-HT₂ receptor subtypes: a family reunited? *Trends Pharmacol Sci* 16:105-110
- Belli S, Belli H, Bahcebasi T, Ozcetin A, Alpay E, Ertem U (2008) Assessment of psychopathological aspects and psychiatric comorbidities in patients affected by tinnitus. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 265:279-285

- Bilkei-Gorzo A, Gyertyan I, Levay G (1998) mCPP-induced anxiety in the light-dark box in rats--a new method for screening anxiolytic activity. *Psychopharmacology (Berl)* 136:291-298
- Bobker DH, Williams JT (1990) Serotonin-mediated inhibitory postsynaptic potential in guinea-pig prepositus hypoglossi and feedback inhibition by serotonin. *J Physiol* 422:447-462
- Bourin M, Baker GB, Bradwejn J (1998) Neurobiology of panic disorder. *J Psychosom Res* 44:163-180
- Bozon B, Kelly A, Josselyn SA, Silva AJ, Davis S, Laroche S (2003) MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:805-814
- Brennan JF, Jastreboff PJ (1991) Generalization of conditioned suppression during salicylate-induced phantom auditory perception in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 51:15-27
- Brozoski TJ, Bauer CA, Caspary DM (2002) Elevated fusiform cell activity in the dorsal cochlear nucleus of chinchillas with psychophysical evidence of tinnitus. *J Neurosci* 22:2383-2390
- Brozoski TJ, Ciobanu L, Bauer CA (2007) Central neural activity in rats with tinnitus evaluated with manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Hear Res* 228:168-179
- Cahani M, Paul G, Shahar A (1983) Tinnitus pitch and acoustic trauma. *Audiology* 22:357-363
- Canadian Pharmacists Association (2007) *Compendium of Pharmaceuticals and Specialties: The Canadian Drug Reference for Health Professionals*. 42^e édition. Canadian Pharmacists Assoc., Ottawa
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway *Science* 296:1655-1657
- Cazals Y (2000) Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate. *Prog Neurobiol* 62:583-631
- Cazals Y, Horner KC, Huang ZW (1998) Alterations in average spectrum of cochleoneural activity by long-term salicylate treatment in the guinea pig: a plausible index of tinnitus. *J Neurophysiol* 80:2113-2120
- Cazals Y, Huang ZW (1996) Average spectrum of cochlear activity: a possible synchronized firing, its olivo-cochlear feedback and alterations under anesthesia. *Hear Res* 101:81-92

- Chandler LJ, Sutton G, Dorairaj NR, Norwood D (2001) N-methyl D-aspartate receptor-mediated bidirectional control of extracellular signal-regulated kinase activity in cortical neuronal cultures. *J Biol Chem* 276:2627-2636
- Chang H, Chen K, Kaltenbach JA, Zhang J, Godfrey DA (2002) Effects of acoustic trauma on dorsal cochlear nucleus neuron activity in slices. *Hear Res* 164:59-68
- Charney DS, Woods SW, Goodman WK, Heninger GR (1987) Serotonin function in anxiety. II. Effects of the serotonin agonist MCPP in panic disorder patients and healthy subjects. *Psychopharmacology (Berl)* 92:14-24
- Chen GD, Jastreboff PJ (1995) Salicylate-induced abnormal activity in the inferior colliculus of rats. *Hear Res* 82:158-178
- Chen HJ, Rojas-Soto M, Oguni A, Kennedy MB (1998) A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* 20:895-904
- Chen S, Diamond JS (2002) Synaptically released glutamate activates extrasynaptic NMDA receptors on cells in the ganglion cell layer of rat retina. *J Neurosci* 22:2165-2173
- Chung DY, Gannon RP, Mason K (1984) Factor affecting the prevalence of tinnitus. *Audiology* 23:441-452
- Chung WH, Pak K, Lin B, Webster N, Ryan AF (2006) A PI3K Pathway Mediates Hair Cell Survival and Opposes Gentamicin Toxicity in Neonatal Rat Organ of Corti. *J Assoc Res Otolaryngol* 7:373-382
- Clerici WJ, Hensley K, DiMartino DL, Butterfield DA (1996) Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res* 98:116-124
- Clineschmidt BV, Reiss DR, Pettibone DJ, Robinson JL (1985) Characterization of 5-hydroxytryptamine receptors in rat stomach fundus. *J Pharmacol Exp Ther* 235:696-708
- Coles R (1983) Epidemiology of tinnitus: (1) Prevalence. In: *Proceedings of the 2nd International Tinnitus Seminar* (Shulman A, ed.). Raven Press, New York, p 7-16
- Coles RRA (1984) Epidemiology of tinnitus: (2) demographic and clinical features. *J Laryngol Otol Suppl* 9:195-202
- Collingridge G (1987) Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* 330:604-605

- Costa RM, Federov NB, Kogan JH, Murphy GG, Stern J, Ohno M, Kucherlapati R, Jacks T, Silva AJ (2002) Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Nature* 415:526-530
- Conn PJ, Sanders-Bush E (1987) Relative efficacies of piperazines at the phosphoinositide hydrolysis-linked serotonergic (5-HT-2 and 5-HT-1c) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 242:552-557
- Crawley J, Goodwin FK (1980) Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13:167-170
- Crawley JN (1985) Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 9:37-44
- Crawley JN (2000) What's Wrong With My Mouse? In: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice. John Wiley & Sons, New York
- d'Aldin CG, Ruel J, Assie R, Pujol R, Puel JL (1997) Implication of NMDA type glutamate receptors in neural regeneration and neoformation of synapses after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea. *Int J Dev Neurosci* 15:619-629
- Dandy WE (1941) The Surgical Treatment of Intracranial Aneurysms of the Internal Carotid Artery. *Ann Surg* 114:336-340
- Darlington CL, Smith PF (2007) Drug treatments for tinnitus. *Prog Brain Res* 166:249-262
- Davis SF, Linn CL (2003) Activation of NMDA receptors linked to modulation of voltage-gated ion channels and functional implications. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C757-768
- Deisseroth K, Mermelstein PG, Xia H, Tsien RW (2003) Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 13:354-365
- De Vry J, Schreiber R, Daschke A, Jentsch KR (2003) Effects of serotonin 5-HT(1/2) receptor agonists in a limited-access operant food intake paradigm in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol* 13:337-345
- Diarmuid J (2005) Aspirin : the remarkable story of a wonder drug. Bloomsbury, New York, p 38-40
- Di Cristo G, Berardi N, Cancedda L, Pizzorusso T, Putignano E, Ratto GM, Maffei L (2001) Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science* 292:2337-2340
- Dieroff HG, Meissner W (1987) Prevalence of tinnitus in noise-induced hearing loss. In: Proceedings of the Third International Tinnitus Seminar. Harsch Verlag, Karlsruhe, p 159-161

- Dinces EA (2008) Treatment of tinnitus, version 17.3 [En ligne] www.uptodate.com, consulté le 11 janvier 2010
- Dobie RA (1999) A review of randomized clinical trials in tinnitus. *Laryngoscope* 109:1202-1211
- Dodson KM, Sismanis A (2004) Intratympanic perfusion for the treatment of tinnitus. *Otolaryngol Clin North Am* 37:991-1000
- Dolan DF, Nuttall AL, Avinash G (1990) Asynchronous neural activity recorded from the round window. *J Acoust Soc Am* 87:2621-2627
- Du Verney JG (1683) *Traité de l'organe de l'ouïe, contenant la structure, les usages et les maladies de toutes les parties de l'oreille*. Estienne Michallet, Paris, 210 p
- Eggermont JJ (2007) Pathophysiology of tinnitus. *Prog Brain Res* 166:19-35
- Eggermont JJ (2008) Role of auditory cortex in noise- and drug-induced tinnitus. *Am J Audiol* 17:S162-169
- Eggermont JJ (1992) Salicylate-induced changes in the spontaneous activity in cat auditory cortex. In: *Tinnitus 91, Proc. IV Int. Tinnitus Seminar* (Aran J and Dauman R, eds.). Kugler Publications, Amsterdam, p 293–298
- Eggermont JJ, Kenmochi M (1998) Salicylate and quinine selectively increase spontaneous firing rates in secondary auditory cortex. *Hear Res* 117:149-160
- Eggermont JJ, Komiya H (2000) Moderate noise trauma in juvenile cats results in profound cortical topographic map changes in adulthood. *Hear Res* 142:89–101
- Eggermont JJ, Roberts LE (2004) The neuroscience of tinnitus. *Trends Neurosci* 27:676-682
- Enrico P, Sirca D, Mereu M (2007) Antioxidants, minerals, vitamins, and herbal remedies in tinnitus therapy. *Prog Brain Res* 166:323-330
- Erdtmann-Vourliotis M, Mayer P, Riechert U, Handel M, Kriebitzsch J, Hollt V (1999) Rational design of oligonucleotide probes to avoid optimization steps in in situ hybridization. *Brain Res Brain Res Protoc* 4:82-91
- Estrem SA, Babin RW, Ryu JH, Moore KC (1981) Cis-diamminedichloroplatinum (II) ototoxicity in the guinea pig. *Otolaryngol Head Neck Surg* 89:638-645
- Evans EF, Borerwe TA (1982) Ototoxic effects of salicylates on the responses of single cochlear nerve fibres and on cochlear potentials. *Br J Audiol* 16:101-108

- Evans EF, Wilson JP, Borerwe TA (1981) Animal models of tinnitus. *Ciba Found Symp* 85:108-138
- Eybalin M (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73:309-373
- Feldmann H (1991) History of tinnitus research. In: *Tinnitus: Diagnosis/Treatment* (Shulman A, Aran JM, Tonndorf J, Feldmann H, Vernon JA, eds.) Lea & Febiger, Philadelphia, p 3-37
- Fields RD, Eshete F, Stevens B, Itoh K (1997) Action potential-dependent regulation of gene expression: temporal specificity in Ca^{2+} , cAMP-responsive element binding proteins, and mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci* 17:7252-7266
- Folmer RL, Shi YB (2004) SSRI use by tinnitus patients: interactions between depression and tinnitus severity. *Ear Nose Throat J* 83:107-108, 110, 112 passim
- Franke TF (2008) PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27:6473-6488
- Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C (2003) PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22:8983-8998
- Franklin K, Paxinos G (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Third edition. Academic Press, San Diego
- Gacek RR (1973) A cerebellocochlear nucleus pathway in the cat. *Exp Neurol* 41:101-112
- Giraud AL, Chery-Croze S, Fischer G, Fischer C, Vighetto A, Gregoire MC, Lavenne F, Collet L (1999) A selective imaging of tinnitus. *Neuroreport* 10:1-5
- Goldberg F, Guitton MJ (2009) Le traitement pharmacologique des acouphènes : mythe ou réalité ? *Québec Pharmacie* 55:25-32
- Goldstein BA, Shulman A (2003) Tinnitus outcome profile and tinnitus control. *Int Tinnitus J* 9:26-31
- Grant SG, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P, Kandel ER (1992) Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in *fyn* mutant mice. *Science* 258:1903-1910
- Grewal SS, York RD, Stork PJ (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9:544-553
- Grotewiel MS, Chu H, Sanders-Bush E (1994) m-chlorophenylpiperazine and m-trifluoromethylphenylpiperazine are partial agonists at cloned 5-HT_{2A} receptors expressed in fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 271:1122-1126

- Guittton MJ (2006) Tinnitus and anxiety: more than meets the ear. *Curr Psychiatry Rev* 2:333-338
- Guittton MJ (2009) Tinnitus-provoking salicylate treatment triggers social impairments in mice. *J Psychosom Res* 67:273-276
- Guittton MJ, Caston J, Ruel J, Johnson RM, Pujol R, Puel JL (2003) Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors. *J Neurosci* 23:3944-3952
- Guittton MJ, Dudai Y (2004) Anxiety-like state associates with taste to produce conditioned taste aversion. *Biol Psychiatry* 56:901-904
- Guittton MJ, Dudai Y (2007) Blockade of cochlear NMDA receptors prevents long-term tinnitus during a brief consolidation window after acoustic trauma. *Neural Plast* 2007:809040
- Guittton MJ, Klin Y, Dudai Y (2008) Taste-dependent sociophobia: when food and company do not mix. *Behav Brain Res* 191:148-152
- Guittton MJ, Puel JL (2004) Cochlear NMDA receptors and tinnitus. *Audiological Medicine* 2:3-7
- Guittton MJ, Pujol R, Puel JL (2005) m-Chlorophenylpiperazine exacerbates perception of salicylate-induced tinnitus in rats. *Eur J Neurosci* 22:2675-2678
- Halford JB, Anderson SD (1991) Anxiety and depression in tinnitus sufferers. *J Psychosom Res* 35:383-390
- Hamik A, Peroutka SJ (1989) 1-(m-chlorophenyl)piperazine (mCPP) interactions with neurotransmitter receptors in the human brain. *Biol Psychiatry* 25:569-575
- Hebert AE, Dash PK (2002) Extracellular signal-regulated kinase activity in the entorhinal cortex is necessary for long-term spatial memory. *Learn Mem* 9:156-166
- Heffner HE, Harrington IA (2002) Tinnitus in hamsters following exposure to intense sound. *Hear Res* 170:83-95
- Heffner HE, Koay G (2005) Tinnitus and hearing loss in hamsters (*Mesocricetus auratus*) exposed to loud sound. *Behav Neurosci* 119:734-742
- Hisatsune C, Umemori H, Mishina M, Yamamoto T (1999) Phosphorylation-dependent interaction of the N-methyl-D-aspartate receptor epsilon 2 subunit with phosphatidylinositol 3-kinase. *Genes Cells* 4:657-666
- Hollis ER, 2nd, Jamshidi P, Low K, Blesch A, Tuszynski MH (2009) Induction of corticospinal regeneration by lentiviral trkB-induced Erk activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7215-7220

- Holmes A, Quirk GJ (2010) Pharmacological facilitation of fear extinction and the search for adjunct treatments for anxiety disorders--the case of yohimbine. *Trends Pharmacol Sci* 31:2-7
- House JW, Brackmann DE (1981) Tinnitus: surgical treatment. *Ciba Found Symp* 85:204-216
- Hoyer D (1989) 5-Hydroxytryptamine receptors and effector coupling mechanisms in peripheral tissues. In: *The peripheral actions of 5-hydroxytryptamine* (Fozard JR, ed.). Oxford University Press, Oxford, p 72-99
- Huang CM, Liu G, Huang R (1982) Projections from the cochlear nucleus to the cerebellum. *Brain Res* 244:1-8
- Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci* 3:661-669
- Ireland SJ, Tyers MB (1987) Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine-induced depolarization of the rat isolated vagus nerve. *Br J Pharmacol* 90:229-238
- Impey S, Obrietan K, Storm DR (1999) Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 23:11-14
- Jain N, Florence SL, Kaas JH (1998) Reorganization of Somatosensory Cortex After Nerve and Spinal Cord Injury. *News Physiol Sci* 13:143-149
- Jastreboff PJ (1999) The neurophysiological model of tinnitus and hyperacusis. In: *Proceedings of the Sixth International Tinnitus Seminar* (Hazell JWP, ed.) The Tinnitus and Hyperacusis Centre, London, p 32-38
- Jastreboff PJ, Brennan JF, Coleman JK, Sasaki CT (1988a) Phantom auditory sensation in rats: an animal model for tinnitus. *Behav Neurosci* 102:811-822
- Jastreboff PJ, Brennan JF (1994) Evaluating the loudness of phantom auditory perception (tinnitus) in rats. *Audiology* 33:202-217
- Jastreboff PJ, Brennan JF, Sasaki CT (1988b) An animal model for tinnitus. *Laryngoscope* 98:280-286
- Jastreboff PJ, Brennan JF, Sasaki CT (1991) Quinine-induced tinnitus in rats. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117:1162-1166
- Jastreboff PJ, Sasaki CT (1986) Salicylate-induced changes in spontaneous activity of single units in the inferior colliculus of the guinea pig. *J Acoust Soc Am* 80:1384-1391

- Jastreboff PJ, Sasaki CT (1994) An animal model of tinnitus: a decade of development. *Am J Otol* 15:19-27
- Job A, Cian C, Esquivie D, Leiffen D, Trousselard M, Charles C, Nottet JB (2004) Moderate variations of mood/emotional states related to alterations in cochlear otoacoustic emissions and tinnitus onset in young normal hearing subjects exposed to gun impulse noise. *Hear Res* 193:31-38
- Johnson RM, Brummett R, Schleuning A (1993) Use of alprazolam for relief of tinnitus. A double-blind study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 119:842-845
- Jung TT, Miller SK, Rozehnal S, Woo HY, Park YM, Baer W (1992) Effect of round window membrane application of salicylate and indomethacin on hearing and levels of arachidonic acid metabolites in perilymph. *Acta Otolaryngol Suppl* 493: 81-7
- Kaas JH (1991) Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. *Annu Rev Neurosci* 14:137-167
- Kahn RS, Wetzler S (1991) m-Chlorophenylpiperazine as a probe of serotonin function. *Biol Psychiatry* 30:1139-1166
- Kaltenbach JA (2006) Summary of evidence pointing to a role of the dorsal cochlear nucleus in the etiology of tinnitus. *Acta Otolaryngol Suppl*:20-26
- Kaltenbach JA, Afman CE (2000) Hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus after intense sound exposure and its resemblance to tone-evoked activity: a physiological model for tinnitus. *Hear Res* 140:165-172
- Kaltenbach JA, Godfrey DA, Neumann JB, McCaslin DL, Afman CE, Zhang J (1998) Changes in spontaneous neural activity in the dorsal cochlear nucleus following exposure to intense sound: relation to threshold shift. *Hear Res* 124:78-84
- Kaltenbach JA, Rachel JD, Mathog TA, Zhang J, Falzarano PR, Lewandowski M (2002) Cisplatin-induced hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus and its relation to outer hair cell loss: relevance to tinnitus. *J Neurophysiol* 88:699-714
- Kaltenbach JA, Zhang J, Afman CE (2000) Plasticity of spontaneous neural activity in the dorsal cochlear nucleus after intense sound exposure. *Hear Res* 147:282-292
- Kaltenbach JA, Zhang J, Finlayson P (2005) Tinnitus as a plastic phenomenon and its possible neural underpinnings in the dorsal cochlear nucleus. *Hear Res* 206:200-226
- Kauer JS, Nemitz JW, Sasaki CT (1982) Tinnitus aurium: fact ... or fancy. *Laryngoscope* 92:1401-1407

- Kelly A, Laroche S, Davis S (2003) Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* 23:5354-5360
- Kelly A, Lynch MA (2000) Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Neuropharmacology* 39:643-651
- Kenmochi M, Eggermont JJ (1997) Salicylate and quinine affect the central nervous system. *Hear Res* 113:110-116
- Kennett GA, Wood MD, Glen A, Grewal S, Forbes I, Gadre A, Blackburn TP (1994) In vivo properties of SB 200646A, a 5-HT_{2C/2B} receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 111:797-802
- Khan M, Gross J, Haupt H, Jainz A, Niklowitz P, Scherer H, Schmidt FP, Klapp BF, Reissshauer A, Mazurek B (2007) A pilot clinical trial of the effects of coenzyme Q10 on chronic tinnitus aurium. *Otolaryngol Head Neck Surg* 136:72-77
- Kilpatrick GJ, Jones BJ, Tyers MB (1987) Identification and distribution of 5-HT₃ receptors in rat brain using radioligand binding. *Nature* 330:746-748
- Kim JH, Liao D, Lau LF, Huganir RL (1998) SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron* 20:683-691
- Knoll AT, Carlezon WA Jr. (2010) Dynorphin, stress, and depression. *Brain Res* 1314:56-73
- Komiyama NH, Watabe AM, Carlisle HJ, Porter K, Charlesworth P, Monti J, Strathdee DJ, O'Carroll CM, Martin SJ, Morris RG, O'Dell TJ, Grant SG (2002) SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor. *J Neurosci* 22:9721-9732
- Koegel L, Jr. (1985) Ototoxicity: a contemporary review of aminoglycosides, loop diuretics, acetylsalicylic acid, quinine, erythromycin, and cisplatin. *Am J Otol* 6:190-199
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740
- Kral A, Hartmann R, Tillein J, Heid S, Klinke R (2000) Congenital auditory deprivation reduces synaptic activity within the auditory cortex in a layer-specific manner. *Cereb Cortex* 10:714-726
- Kral A, Tillein J (2006) Brain plasticity under cochlear implant stimulation. *Adv Otorhinolaryngol* 64:89-108

- Kral A, Tillein J, Heid S, Klinke R, Hartmann R (2006) Cochlear implants: cortical plasticity in congenital deprivation. *Prog Brain Res* 157:283-313
- Kraus KS, Mitra S, Jimenez Z, Hinduja S, Ding D, Jiang H, Gray L, Lobarinas E, Sun W, Salvi RJ (2010) Noise trauma impairs neurogenesis in the rat hippocampus. *Neuroscience* 167:1216-1226
- Lader MH, Uhde TW (2006) *Anxiety, panic and phobias*. Health Press, Abingdon, UK
- Lainez MJ, Piera A (2007) Botulinum toxin for the treatment of somatic tinnitus. *Prog Brain Res* 166:335-338
- Langguth B, Kleinjung T, Fischer B, Hajak G, Eichhammer P, Sand PG (2007) Tinnitus severity, depression, and the big five personality traits. *Prog Brain Res* 166:221-225
- Larson J, Lynch G (1988) Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by burst stimulation patterned after the hippocampal theta-rhythm. *Brain Res* 441:111-118
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL (1996) Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274:1527-1531
- Lin CH, Yeh SH, Lin CH, Lu KT, Leu TH, Chang WC, Gean PW (2001) A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron* 31:841-851
- Lin X, Chen S, Tee D (1998) Effects of quinine on the excitability and voltage-dependent currents of isolated spiral ganglion neurons in culture. *J Neurophysiol* 79:2503-2512
- Liu J, Li X, Wang L, Dong Y, Han H, Liu G (2003) Effects of salicylate on serotonergic activities in rat inferior colliculus and auditory cortex. *Hear Res* 175:45-53
- Liu Y, Li X (2004) Effects of salicylate on voltage-gated sodium channels in rat inferior colliculus neurons. *Hear Res* 193:68-74
- Liu Y, Li X, Ma C, Liu J, Lu H (2005) Salicylate blocks L-type calcium channels in rat inferior colliculus neurons. *Hear Res* 205:271-276
- Liu Y, Zhang H, Li X, Wang Y, Lu H, Qi X, Ma C, Liu J (2007) Inhibition of voltage-gated channel currents in rat auditory cortex neurons by salicylate. *Neuropharmacology* 53:870-880
- Lockwood AH, Salvi RJ, Burkard RF (2002) Tinnitus. *N Engl J Med* 347:904-910

- Lockwood AH, Wack DS, Burkard RF, Coad ML, Reyes SA, Arnold SA, Salvi RJ (2001) The functional anatomy of gaze-evoked tinnitus and sustained lateral gaze. *Neurology* 56:472-480
- Loeb M, Smith RP (1967) Relation of induced tinnitus to physical characteristics of the inducing stimuli. *J Acoust Soc Am* 42:453-455
- Long GR, Tubis A (1988) Modification of spontaneous and evoked otoacoustic emissions and associated psychoacoustic microstructure by aspirin consumption. *J Acoust Soc Am* 84:1343-1353
- Lucente FE (1971) Aspirin and the otolaryngologist. *Arch Otolaryngol* 94:443-446
- Ma WL, Hidaka H, May BJ (2006) Spontaneous activity in the inferior colliculus of CBA/J mice after manipulations that induce tinnitus. *Hear Res* 212:9-21
- Mahlke C, Wallhauser-Franke E (2004) Evidence for tinnitus-related plasticity in the auditory and limbic system, demonstrated by arg3.1 and c-fos immunocytochemistry. *Hear Res* 195:17-34
- Manabe T, Aiba A, Yamada A, Ichise T, Sakagami H, Kondo H, Katsuki M (2000) Regulation of long-term potentiation by H-Ras through NMDA receptor phosphorylation. *J Neurosci* 20:2504-2511
- Manabe Y, Yoshida S, Saito H, Oka H (1997) Effects of lidocaine on salicylate-induced discharge of neurons in the inferior colliculus of the guinea pig. *Hear Res* 103:192-198
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS (2001) The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7:541-547
- Martin WH, Schwegler JW, Scheibelhoffer J, Ronis ML (1993) Salicylate-induced changes in cat auditory nerve activity. *Laryngoscope* 103:600-604
- Mazzucchelli C, Brambilla R (2000) Ras-related and MAPK signalling in neuronal plasticity and memory formation. *Cell Mol Life Sci* 57:604-611
- McAlpine D, Johnstone BM (1990) The ototoxic mechanism of cisplatin. *Hear Res* 47:191-203
- McCabe PA, Dey FL (1965) The effect of aspirin upon auditory sensitivity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 74:312-324
- McFadden D, Plattsmier HS, Pasanen EG (1984) Temporary hearing loss induced by combinations of intense sounds and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Otolaryngol* 5:235-241

- Meltser I, Canlon B (2010) The expression of mitogen-activated protein kinases and brain-derived neurotrophic factor in inferior colliculi after acoustic trauma. *Neurobiol Dis* 40:325-330
- Meltser I, Tahera Y, Canlon B (2010) Differential activation of mitogen-activated protein kinases and brain-derived neurotrophic factor after temporary or permanent damage to a sensory system. *Neuroscience* 165:1439-1446
- Melcher JR, Sigalovsky IS, Guinan JJ, Jr., Levine RA (2000) Lateralized tinnitus studied with functional magnetic resonance imaging: abnormal inferior colliculus activation. *J Neurophysiol* 83:1058-1072
- Mezzalana R, Bilecki MM, Gontijo BP, Slusser JE, Bernarde GE, Maudonnet OA (2007) Can oculomotricity be altered in patients with tinnitus only? A preliminary study. *Int Tinnitus J* 13:152-156
- Micu I, Jiang Q, Coderre E, Ridsdale A, Zhang L, Woulfe J, Yin X, Trapp BD, McRory JE, Rehak R, Zamponi GW, Wang W, Stys PK (2006) NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature* 439:988-992
- Milbrandt JC, Holder TM, Wilson MC, Salvi RJ, Caspary DM (2000) GAD levels and muscimol binding in rat inferior colliculus following acoustic trauma. *Hear Res* 147:251-260
- Mirz F, Gjedde A, Sodkilde-Jrgensen H, Pedersen CB (2000) Functional brain imaging of tinnitus-like perception induced by aversive auditory stimuli. *Neuroreport* 11:633-637
- Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR (1993) Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11693-11697
- Moller AR (2006a) *Hearing: anatomy, physiology, and disorders of the auditory system*, Second edition. Academic Press, Amsterdam
- Moller AR (2006b) *Neural plasticity and disorders of the nervous system*. Cambridge University Press, Cambridge
- Moller AR (2007) The role of neural plasticity in tinnitus. *Prog Brain Res* 166:37-45
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540
- Morest DK, Kim J, Potashner SJ, Bohne BA (1998) Long-term degeneration in the cochlear nerve and cochlear nucleus of the adult chinchilla following acoustic overstimulation. *Microsc Res Tech* 41:205-216

- Mulheran M (1999) The effects of quinine on cochlear nerve fibre activity in the guinea pig. *Hear Res* 134:145-152
- Muluk NB, Oguzturk O (2008) Occupational noise-induced tinnitus: does it affect workers' quality of life? *J Otolaryngol Head Neck Surg* 37:65-71
- Myers EN, Bernstein JM (1965) Salicylate ototoxicity; a clinical and experimental study. *Arch Otolaryngol* 82:483-493
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603
- Narasimhan P, Liu J, Song YS, Massengale JL, Chan PH (2009) VEGF Stimulates the ERK 1/2 signaling pathway and apoptosis in cerebral endothelial cells after ischemic conditions. *Stroke* 40:1467-1473
- Narayan P, Dragunow M (2010) Pharmacology of epigenetics in brain disorders. *Br J Pharmacol* 159:285-303
- Norena AJ, Eggermont JJ (2003) Changes in spontaneous neural activity immediately after an acoustic trauma: implications for neural correlates of tinnitus. *Hear Res* 183:137-153
- Nicolas-Puel C, Akbaraly T, Lloyd R, Berr C, Uziel A, Rebillard G, Puel JL (2006) Characteristics of tinnitus in a population of 555 patients: specificities of tinnitus induced by noise trauma. *Int Tinnitus J* 12:64-70
- Nicolas-Puel C, Faulconbridge RL, Guitton M, Puel JL, Mondain M, Uziel A (2002) Characteristics of tinnitus and etiology of associated hearing loss: a study of 123 patients. *Int Tinnitus J* 8:37-44
- Nicolas-Puel C, Guitton MJ, Mondain M (2003) Épidémiologies et sémiologie des acouphènes. *Les cahiers de l'audition* 16:25-31
- Nicoll RA, Malenka RC (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-118
- Nondahl DM, Cruickshanks KJ, Dalton DS, Klein BE, Klein R, Schubert CR, Tweed TS, Wiley TL (2007) The impact of tinnitus on quality of life in older adults. *J Am Acad Audiol* 18:257-266
- Nosten F, White NJ (1999) Modes d'action et caractéristiques pharmacologiques des antipaludiques. *Méd Mal Infect* 29(suppl 3): 307-315
- Ochi K, Eggermont JJ (1996) Effects of salicylate on neural activity in cat primary auditory cortex. *Hear Res* 95:63-76

- Ochi K, Eggermont JJ (1997) Effects of quinine on neural activity in cat primary auditory cortex. *Hear Res* 105:105-118
- Odagaki Y, Toyoshima R, Yamauchi T (2005) Trazodone and its active metabolite m-chlorophenylpiperazine as partial agonists at 5-HT_{1A} receptors assessed by [³⁵S]GTPgammaS binding. *J Psychopharmacol* 19:235-241
- Oestreicher E (2002) Pharmacological approach of tinnitus. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 56:353-354
- Oestreicher E, Arnold W, Ehrenberger K, Felix D (1999) New approaches for inner ear therapy with glutamate antagonists. *Acta Otolaryngol* 119:174-178
- Olzowy B, Canis M, Hempel JM, Mazurek B, Suckfull M (2007) Effect of atorvastatin on progression of sensorineural hearing loss and tinnitus in the elderly: results of a prospective, randomized, double-blind clinical trial. *Otol Neurotol* 28:455-458
- Olivier B, Leahy C, Mullen T, Paylor R, Groppi VE, Sarnyai Z, Brunner D (2001) The DBA/2J strain and prepulse inhibition of startle: a model system to test antipsychotics? *Psychopharmacology (Berl)* 156:284-290
- Opazo P, Watabe AM, Grant SG, O'Dell TJ (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the induction of long-term potentiation through extracellular signal-related kinase-independent mechanisms. *J Neurosci* 23:3679-3688
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618
- Panford-Walsh R, Singer W, Ruttiger L, Hadjab S, Tan J, Geisler HS, Zimmermann U, Kopschall I, Rohbock K, Vieljans A, Oestreicher E, Knipper M (2008) Midazolam reverses salicylate-induced changes in brain-derived neurotrophic factor and arg3.1 expression: implications for tinnitus perception and auditory plasticity. *Mol Pharmacol* 74:595-604
- Paul BH, Mary UC (1975) Cherokee Plants and Their Uses -- A 400 Year History. In: *A Database of Foods, Drugs, Dyes and Fibers of Native American Peoples, Derived from Plants* (Dan Moerman, ed.). Herald Publishing Co, Sylva
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153-183
- Peatfield RC, Petty RG, Rose FC (1983) Double blind comparison of mefenamic acid and acetaminophen (paracetamol) in migraine. *Cephalalgia* 3:129-134

- Peng BG, Chen S, Lin X (2003) Aspirin selectively augmented N-methyl-D-aspartate types of glutamate responses in cultured spiral ganglion neurons of mice. *Neurosci Lett* 343:21-24
- Perkinton MS, Ip JK, Wood GL, Crossthwaite AJ, Williams RJ (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurones. *J Neurochem* 80:239-254
- Puel JL (1995) Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog Neurobiol* 47:449-476
- Puel JL (2007) Cochlear NMDA receptor blockade prevents salicylate-induced tinnitus. *B-Ent 3 Suppl* 7:19-22
- Puel JL, Bobbin RP, Fallon M (1990) Salicylate, mefenamate, meclofenamate, and quinine on cochlear potentials. *Otolaryngol Head Neck Surg* 102:66-73
- Puel JL, Bobbin RP, Fallon M (1989) Suppression of auditory nerve activity in the guinea pig cochlea by 1-(p-bromobenzoyl)-piperazine-2,3-dicarboxylic acid. *Brain Res* 487:9-15
- Puel JL, Guitton MJ (2007) Salicylate-induced tinnitus: molecular mechanisms and modulation by anxiety. *Prog Brain Res* 166:141-146
- Pujol R, Puel JL (1999) Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings. *Ann N Y Acad Sci* 884:249-254
- Puel JL, Ruel J, Guitton M, Pujol R (2002) The inner hair cell afferent/efferent synapses revisited: a basis for new therapeutic strategies. *Adv Otorhinolaryngol* 59:124-130
- Promenade autour de la Cochlée (2007) [En ligne] <http://www.cochlee.org/>, consulté le 21 août 2010
- Rachel JD, Kaltenbach JA, Janisse J (2002) Increases in spontaneous neural activity in the hamster dorsal cochlear nucleus following cisplatin treatment: a possible basis for cisplatin-induced tinnitus. *Hear Res* 164:206-214
- Rainsford KD (1984) *Aspirin and the Salicylates*. Butterworths, London
- Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R (1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14476-14481
- Raymond CR, Redman SJ, Crouch MF (2002) The phosphoinositide 3-kinase and p70 S6 kinase regulate long-term potentiation in hippocampal neurons. *Neuroscience* 109:531-536

- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545-1564
- Robinson SK, Viirre ES, Bailey KA, Gerke MA, Harris JP, Stein MB (2005) Randomized placebo-controlled trial of a selective serotonin reuptake inhibitor in the treatment of nondepressed tinnitus subjects. *Psychosom Med* 67:981-988
- Robinson SK, Viirre ES, Stein MB (2007) Antidepressant therapy in tinnitus. *Hear Res* 226:221-231
- Rosenblum K, Berman DE, Hazvi S, Lamprecht R, Dudai Y (1997) NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J Neurosci* 17:5129-5135
- Rosenblum K, Dudai Y, Richter-Levin G (1996) Long-term potentiation increases tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in rat dentate gyrus in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10457-10460
- Rotzinger S, Lovejoy DA, Tan LA (2010) Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety. *Peptides* 31:736-756
- Rouveix B (1999) Effets indésirables des natimulariques, cardiotoxicité exclue. *Méd Mal Infect* 29(suppl 3): 326-332
- Ruel J, Chabbert C, Nouvian R, Bendris R, Eybalin M, Leger CL, Bourien J, Mersel M, Puel JL (2008) Salicylate enables cochlear arachidonic-acid-sensitive NMDA receptor responses. *J Neurosci* 28:7313-7323
- Ruttiger L, Ciuffani J, Zenner HP, Knipper M (2003) A behavioral paradigm to judge acute sodium salicylate-induced sound experience in rats: a new approach for an animal model on tinnitus. *Hear Res* 180:39-50
- Saeed SA, Warren BT (1973) On the mode of action and biochemical properties of anti-inflammatory drugs. I. *Biochem Pharmacol* 22:1965-1969
- Sanna PP, Cammalleri M, Berton F, Simpson C, Lutfjens R, Bloom FE, Francesconi W (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J Neurosci* 22:3359-3365
- Salvi RJ, Saunders SS, Gratton MA, Arehole S, Powers N (1990) Enhanced evoked response amplitudes in the inferior colliculus of the chinchilla following acoustic trauma. *Hear Res* 50:245-257
- Salvi RJ, Wang J, Ding D (2000) Auditory plasticity and hyperactivity following cochlear damage. *Hear Res* 147:261-274

- Schreiner CE, Snyder RL (1987) A physiological animal model of peripheral tinnitus. In: Proceeding of the 3rd International Tinnitus Seminar (Feldmann H, ed.). Harsch Verlag, Karlsruhe, p 100–106
- Schneider WR, Hilk A, Franzen U (1994) Social support disability, coping with stress and personality markers in patients with subjective chronic aural tinnitus. *HNO* 42:22-27
- Sée G (1877) Études sur l'acide salicylique et les salicylates; traitement du rhumatisme aigu et chronique et de la goutte, et de diverses affections du système nerveux sensitif par les salicylates. *Bull Acad Natl Med* 26:689-706
- Seki S, Eggermont JJ (2003) Changes in spontaneous firing rate and neural synchrony in cat primary auditory cortex after localized tone-induced hearing loss. *Hear Res* 180:28-38
- Shea JJ, Emmett JR, Orchik DJ, Mays K, Webb W (1981) Medical treatment of tinnitus. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 90:601-609
- Shulman A, Strashun A (1999) Descending auditory system/cerebellum/tinnitus. *Int Tinnitus J* 5:92-106
- Sie KC, Rubel EW (1992) Rapid changes in protein synthesis and cell size in the cochlear nucleus following eighth nerve activity blockade or cochlea ablation. *J Comp Neurol* 320:501-508
- Silverstein H (1976) Transmeatal labyrinthectomy with and without cochleovestibular neurectomy. *Laryngoscope* 86:1777-1791
- Simpson JJ, Davies WE (1999) Recent advances in the pharmacological treatment of tinnitus. *Trends Pharmacol Sci* 20:12-18
- Singer W, Panford-Walsh R, Watermann D, Hendrich O, Zimmermann U, Kopschall I, Rohbock K, Knipper M (2008) Salicylate alters the expression of calcium response transcription factor 1 in the cochlea: implications for brain-derived neurotrophic factor transcriptional regulation. *Mol Pharmacol* 73:1085-1091
- Smith PF, Darlington CL (2005) Drug treatments for subjective tinnitus: serendipitous discovery versus rational drug design. *Curr Opin Investig Drugs* 6:712-716
- Smith TM, Suckow RF (1985) Trazodone and m-chlorophenylpiperazine. Concentration in brain and receptor activity in regions in the brain associated with anxiety. *Neuropharmacology* 24:1067-1071
- Snyder SH (2002) Neurobiology: serotonin sustains serenity. *Nature* 416:377-380

- Stone, E (1763) An Account of the Success of the Bark of the Willow in the Cure of Agues. *Philosophical Transactions* 53: 195–200
- Stypulkowski PH (1990) Mechanisms of salicylate ototoxicity. *Hear Res* 46:113-145
- Suneja SK, Potashner SJ (2003) ERK and SAPK signaling in auditory brainstem neurons after unilateral cochlear ablation. *J Neurosci Res* 73:235-245
- Sweatt JD (2001) Protooncogenes subserve memory formation in the adult CNS. *Neuron* 31:671-674
- Szczepaniak WS, Moller AR (1995) Evidence of decreased GABAergic influence on temporal integration in the inferior colliculus following acute noise exposure: a study of evoked potentials in the rat. *Neurosci Lett* 196:77-80
- Tan J, Ruttiger L, Panford-Walsh R, Singer W, Schulze H, Kilian SB, Hadjab S, Zimmermann U, Kopschall I, Rohbock K, Knipper M (2007) Tinnitus behavior and hearing function correlate with the reciprocal expression patterns of BDNF and Arg3.1/arc in auditory neurons following acoustic trauma. *Neuroscience* 145:715-726
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173-183
- Tian HP, Huang BS, Zhao J, Hu XH, Guo J, Li LX (2009) Non-receptor tyrosine kinase Src is required for ischemia-stimulated neuronal cell proliferation via Raf/ERK/CREB activation in the dentate gyrus. *BMC Neurosci* 10:139
- Tinnitus Canadian Association [En ligne] <http://www.kadis.com/ta/tinnitus.htm>, consulté le 6 janvier 2010
- Touze JE, Heno P., Foucarde L., Deharo JC, Mafart B, Lemaitre X (1999) La toxicité cardiaque des antipaludéens. *Méd Mal Infect* 29(suppl 3): 316-325
- Trinus FP, Mokhort NA, Yagupol'skii LM, Fadeicheva AG, Danilenko VS, Ryabukha TK, Fialkov YA, Kirichek LM (1977) Mefenamic acid - A nonsteroid antiinflammatory agent. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 11: 1706
- Tsukasaki N, Whitworth CA, Rybak LP (2000) Acute changes in cochlear potentials due to cisplatin. *Hear Res* 149:189-198
- Tyler RS (2000) Tinnitus handbook. First edition. Singular, San Diego
- Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231:232-235

- Vane JR, Botting RM (1998) Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 104:2S–8S
- Vane JR, Botting RM (2003) The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res* 110:255-258
- Van't Veer A, Du Y, Fischer TZ, Boetig DR, Wood MR, Dreyfus CF (2009) Brain-derived neurotrophic factor effects on oligodendrocyte progenitors of the basal forebrain are mediated through trkB and the MAP kinase pathway. *J Neurosci Res* 87:69-78
- Vernon JA, Meikle MB (2003) Masking devices and alprazolam treatment for tinnitus. *Otolaryngol Clin North Am* 36:307-320
- Wallhauser-Franke E (1997) Salicylate evokes c-fos expression in the brain stem: implications for tinnitus. *Neuroreport* 8:725-728
- Wallhauser-Franke E, Braun S, Langner G (1996) Salicylate alters 2-DG uptake in the auditory system: a model for tinnitus? *Neuroreport* 7:1585-158
- Wallhauser-Franke E, Cuautle-Heck B, Wenz G, Langner G, Mahlke C (2006) Scopolamine attenuates tinnitus-related plasticity in the auditory cortex. *Neuroreport* 17:1487-1491
- Wallhauser-Franke E, Mahlke C, Oliva R, Braun S, Wenz G, Langner G (2003) Expression of c-fos in auditory and non-auditory brain regions of the gerbil after manipulations that induce tinnitus. *Exp Brain Res* 153:649-654
- Wall PD (1977) The presence of ineffective synapses and the circumstances which unmask them. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 278:361-372
- Waltereit R, Dammermann B, Wulff P, Scafidi J, Staubli U, Kauselmann G, Bundman M, Kuhl D (2001) Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *J Neurosci* 21:5484-5493
- Wang J, Lloyd Faulconbridge RV, Fetoni A, Guitton MJ, Pujol R, Puel JL (2003) Local application of sodium thiosulfate prevents cisplatin-induced hearing loss in the guinea pig. *Neuropharmacology* 45:380-393
- Westerberg BD, Roberson JB, Jr., Stach BA (1996) A double-blind placebo-controlled trial of baclofen in the treatment of tinnitus. *Am J Otol* 17:896-903
- Wisden W, Morris BJ (1994) In situ hybridization with synthetic oligonucleotide probes. In: *In Situ Hybridization Protocols for the Brain* (Wisden W and Morris BJ, eds.). Academic Press, San Diego, p 9-34

- Xia Z, Dudek H, Miranti CK, Greenberg ME (1996) Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci* 16:5425-5436
- Yang G, Lobarinas E, Zhang L, Turner J, Stolzberg D, Salvi R, Sun W (2007) Salicylate induced tinnitus: behavioral measures and neural activity in auditory cortex of awake rats. *Hear Res* 226:244-253
- Yilmaz I, Akkuzu B, Cakmak O, Ozluoglu LN (2004) Misoprostol in the treatment of tinnitus: a double-blind study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 130:604-610
- Zhang X, Heinz MG, Bruce IC, Carney LH (2001) A phenomenological model for the responses of auditory-nerve fibers: I. Nonlinear tuning with compression and suppression. *J Acoust Soc Am* 109:648-670
- Zheng JL, Gao WQ (1996) Differential damage to auditory neurons and hair cells by ototoxins and neuroprotection by specific neurotrophins in rat cochlear organotypic cultures. *Eur J Neurosci* 8:1897-1905
- Zheng JL, Shou J, Guillemot F, Kageyama R, Gao WQ (2000) Hes1 is a negative regulator of inner ear hair cell differentiation. *Development* 127:4551-4560
- Zheng Y, Hooton K, Smith PF, Darlington CL (2008) Carbamazepine reduces the behavioural manifestations of tinnitus following salicylate treatment in rats. *Acta Otolaryngol* 128:48-52
- Ziff EB (1999) Recent excitement in the ionotropic glutamate receptor field. *Ann N Y Acad Sci* 868:465-473