

Université de Montréal

**Évaluation de l'ototoxicité secondaire au bleu de méthylène
chez le cochon d'Inde
Étude animale prospective**

Par

Sarah Belhassen, M.D.

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de M. Sc.

En Sciences Biomédicales

Avril 2015

© Sarah Belhassen, 2015

RÉSUMÉ FRANÇAIS

Introduction

Le bleu de méthylène est un colorant grandement utilisé dans le domaine médical, notamment pour ses propriétés de coloration histologique. Il est également utilisé comme agent photosensibilisant dans la thérapie photodynamique antimicrobienne, qui une fois photoactivé devient efficace pour l'éradication de plusieurs germes multirésistants. L'objectif de cette étude est d'investiguer le potentiel ototoxique du bleu de méthylène.

Méthodes

Vingt cochons d'Inde divisés en deux groupes, ont reçu une solution de bleu de méthylène et de gentamicine dans l'oreille testée. L'oreille controlatérale a reçu une solution saline contrôle. Nous avons procédé à des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral avant et une semaine suivant la série d'injections. À la suite des dissections, des analyses histologiques et immunohistochimiques ont été réalisées.

Résultats

La différence moyenne de perte auditive dans le groupe gentamicine comparativement au groupe normal salin était de 66.25 dB ($p < 0.001$). Toutefois, la différence moyenne de perte auditive dans le groupe ayant reçu du bleu de méthylène comparativement à celui ayant reçu des injections de la solution saline était de 1.50 dB, et n'a pas été démontré comme étant statistiquement significative ($p = 0.688$). De plus, la captation de caspase-3 en immunohistochimie (marqueur d'apoptose) n'a pas été significative dans le groupe recevant le bleu de méthylène.

Conclusion

À la lumière de nos résultats, les injections intratympaniques de bleu de méthylène n'ont pas démontrées de potentiel ototoxique. Nous recommandons des études supplémentaires afin d'en préciser son utilisation sécuritaire dans le domaine otologique.

Mots-Clés

Ototoxicité, Oreille moyenne, Bleu de méthylène, Intratympanique, Immunohistochimie

RÉSUMÉ ANGLAIS - ABSTRACT

Introduction

Methylene blue is widely used in the medical field, especially as a blue dye for staining. It is also used as a photosensitizing agent in antimicrobial photodynamic therapy, which once photoactivated is effective for the eradication of several multiresistant bacteria. The objective of this study is to investigate its ototoxic potential.

Subjects and Methods

Twenty guinea pigs, forming two groups, received respectively intratympanic methylene blue and gentamicin in one ear. The contralateral ears received a control saline solution. We conducted auditory evoked brainstem response (ABR) before and one week after the injection series. Once completed, the cochleas were dissected and analyzed by histology and immunohistochemistry.

Results

The mean difference of hearing loss in the saline group compared to the gentamicin group was 66.25dB ($p < 0.001$). However, the mean difference of hearing loss in the methylene blue group compared to normal saline was 1.50 dB, and it was not shown to be statistically significant ($p = 0.688$). Furthermore, uptake of caspase-3 by immunohistochemistry (apoptotic marker) was negative in the group which received injections of methylene blue.

Conclusion

In light of our results, intratympanic injections of methylene blue did not demonstrate an ototoxic potential. We recommend further studies to precise its usefulness in the otology field.

Keywords: Ototoxicity, Middle ear, Methylene blue, Intratympanic, Immunohistochemistry

Table des matières

RÉSUMÉ FRANÇAIS	iii
RÉSUMÉ ANGLAIS - ABSTRACT	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations et sigles.....	ix
Remerciements	xi
Introduction	1
Objectifs	3
Revue de la littérature.....	4
Chapitre 1 : Anatomie de la cochlée et physiologie de l'audition	4
Chapitre 2 : Otite moyenne chronique suppurée	8
Définition	8
Épidémiologie et facteurs de risque	8
Pathophysiologie	9
Traitements	11
Chapitre 3 : La thérapie photodynamique antimicrobienne	13
Bleu de méthylène.....	15
Efficacité de la thérapie antimicrobienne photodynamique.....	16
Méthodologie.....	18
Modèle animal.....	18
Procédures Générales et Groupes	18
Protocole anesthésique	19
Potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral (PEATC).....	20
Protocole d'euthanasie et dissection des cochlées.....	20
Histologie et analyse immunohistochimique (IHC)	21

Analyse statistique	22
Résultats.....	24
Potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral (PEATC).....	24
Analyses descriptives : PEATC dans le groupe contrôle.....	24
Analyses descriptives : PEATC dans le groupe expérimental	25
Analyse Statistique	26
Histologie et Immunohistochimie	28
Discussion.....	33
Limites et directions futures	38
Conclusion	i
Bibliographie.....	ii

Liste des tableaux

Tableau 1: Seuils moyens des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral dans le groupe contrôle avant et après les injections intratympaniques.....	24
Tableau 2: Seuils moyens des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral dans le groupe expérimental avant et après les injections intratympaniques.....	25

Liste des figures

Figure I : Coupe transverse de la cochlée.....	5
Figure II : Schéma des cellules ciliées internes (gauche) et externes (droite).....	7
Figure III : Mécanisme de photosensibilisation.....	14
Figure IV : Structure chimique du bleu de méthylène.....	15
Figure V : Conception de l'étude.....	19
Figure VI : Résultats des PEATC. Pertes moyennes par fréquence dans le groupe contrôle positif.....	27
Figure VII : Résultats des PEATC. Pertes moyennes par fréquence dans le groupe expérimental.....	27
Figure VIII : Coloration par hématoxyline et éosine dans le groupe expérimental.....	29
Figure IX : Analyses IHC groupe contrôle négatif (Normal Salin).....	30
Figure X : Analyses IHC groupe contrôle positif (Gentamicine).....	31
Figure XI : Analyses IHC groupe expérimental (Bleu de méthylène).....	32

Liste des abréviations et sigles

ADN : acide désoxyribonucléique

BM : bleu de méthylène

CCE : cellules ciliées externes

CCI : cellules ciliées internes

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

g/ml : gramme/millilitre

IgAS : IgA sécrétoires

IHC : immunohistochimie

Injection IT : injection intratympanique

k Ω : kilo Ohms

mcg : microgramme

mg : milligramme

ml : millilitre

NaCl : normal salin 0,9%

nm : nanomètre

OMCS : otite moyenne chronique suppurée

p : valeur de signification statistique

PEATC : potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral

SARM : staphylococcus aureus résistant à la méthicilline

Spp : espèces

TPD : thérapie photodynamique

TPDa : thérapie photodynamique antimicrobienne

*Je dédie ce mémoire à mes êtres chers
Pour leur présence et leur amour inconditionnel*

Merci

Remerciements

Je voudrais prendre un moment afin de remercier l'ensemble de mes professeurs m'ayant soutenu à travers la réalisation de ce projet. Plus particulièrement, je remercie le Dr Issam Saliba, directeur de recherche, pour toute son implication et énergie investie dans l'accomplissement de mes travaux, qui a été pour moi un mentor et un exemple à suivre au travers de mes études.

Je voudrais remercier toute l'équipe du centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, spécialement à Mme Souad Rhalmi, assistante de recherche en études expérimentales, qui a su toujours se montrer disponible et d'un grand soutien en tout temps. Merci aussi à Dre Holly Orlando, vétérinaire, ainsi qu'à Mme Denise Carrier assistante de recherche à l'animalerie, pour votre support et vos conseils judicieux.

Merci à Valérie Ouellet, audiologiste à l'hôpital Sainte-Justine, qui m'a généreusement aidé lors des enregistrements des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral sur les cochons d'Inde. Je remercie également toute l'équipe de pathologie et d'immunohistochimie de l'Université de Montréal qui a accepté de s'impliquer dans un défi nouveau et de croire en ce projet.

Finalement, la précision des résultats de cette étude n'aurait pu être possible sans le travail minutieux du professeur Miguel Chagnon qui m'a aidé avec les analyses statistiques.

Introduction

Le bleu de méthylène est un composé aromatique chimique retrouvé principalement dans les domaines de la biologie et de la chimie. Heinrich Caro a été le premier à le synthétiser en 1876, et depuis il est largement utilisé dans le domaine médical. Par exemple, le bleu de méthylène a une place dans le traitement de la méthémoglobinémie, le choc septique, le syndrome hépato-pulmonaire, ou même comme un agent anti-malarien (1). Il est également décrit comme un antidote pour la toxicité de l'ifosfamide, ou pour la neutralisation de l'héparine chez les patients présentant une allergie à la protamine (1).

Dans le domaine de l'otorhinolaryngologie, le bleu de méthylène est essentiellement utilisé pour ses propriétés de colorant histologique. Il a été démontré comme étant une méthode efficace pour la localisation de glandes parathyroïdes anormales, ou pour la localisation de ganglions sentinelles. De plus, plusieurs études ont démontré qu'il était efficace pour induire une apoptose cellulaire sélective dans les cas de cancer, notamment lorsque utilisé dans le cadre de la thérapie photodynamique (2).

Le bleu de méthylène possède également des propriétés antiseptiques. Combiné à la lumière, il a été démontré comme étant un puissant agent antimicrobien, appelé thérapie photodynamique antimicrobienne (TPDa). Avec l'émergence des souches bactériennes résistantes, le traitement de plusieurs pathologies infectieuses, incluant celui de l'otite moyenne chronique suppurée, se complexifie. Ceci a donc stimulé la recherche de modalités de traitement alternatives.

L'avenue de nouvelles modalités technologiques, telle la thérapie photodynamique antimicrobienne, utilise la photoactivation d'agents dits photosensibilisants, comme le bleu de méthylène. Une fois photoactivé, ces agents obtiennent des propriétés antimicrobiennes puissantes et efficaces, et ce même contre des germes résistants tels le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) (3).

Le bleu de méthylène est un agent colorant bleu, qui colore les urines en vert, et la peau et muqueuses en bleu. Sa toxicité demeure une condition rare, mais à hautes doses, il a

été rapporté comme pouvant avoir des effets néfastes, soit des arythmies cardiaques, une vasoconstriction coronarienne, une diminution du débit cardiaque ou rénal, une augmentation de la pression vasculaire pulmonaire, et une détérioration des échanges gazeux (1).

Plusieurs études ont démontré l'efficacité de la TPDa utilisant le bleu de méthylène comme agent photosensibilisant (4) contre les pathogènes les plus couramment rencontrés dans l'otite moyenne chronique, soit le *Staphylococcus aureus* et le *Pseudomonas aeruginosa* (5–7). Toutefois bien qu'utilisé dans plusieurs domaines, tels que pour le traitement des pathologies orales (8) et cutanées, son application dans le domaine otologique demeure à être définie.

À notre connaissance, aucune étude précédente n'a exploré le potentiel ototoxique du bleu de méthylène. Face à l'utilisation grandissante de ce dernier dans le domaine médical, nous voulons décrire et étudier son utilisation sécuritaire dans le domaine otologique.

Objectifs

L'objectif de cette étude est de déterminer le potentiel ototoxique du bleu de méthylène lorsqu'appliqué directement dans l'oreille moyenne sur un modèle animal.

Afin de pouvoir évaluer son profil de sécurité en neuro-otologie, nous avons utilisé une évaluation par potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral (PEATC) ainsi qu'une évaluation de l'intégrité des cellules cochléaires par histopathologie et immunohistochimie.

Revue de la littérature

Chapitre 1 : Anatomie de la cochlée et physiologie de l'audition

L'oreille interne est contenue dans l'os temporal, et se retrouve dans la structure osseuse nommée labyrinthe osseux. L'os qui entoure la cochlée ainsi que le labyrinthe vestibulaire est le plus dur de tout le corps humain. Le labyrinthe se divise en trois parties : le vestibule, la cochlée ainsi que les canaux semi-circulaires. Le point initial de communication entre l'oreille moyenne et l'oreille interne est la fenêtre ovale, où la platine de l'étrier constitue la séparation au niveau de la fenêtre ovale. À la base de la cochlée se retrouve la membrane de la fenêtre ronde qui communique avec l'oreille moyenne. La cochlée possède une forme de colimaçon, faisant deux tours et demi au total.

Le centre de la cochlée est formé par le modiolus, qui est un os poreux permettant le passage des fibres nerveuses auditives du conduit auditif interne aux synapses des cellules ciliées. La lame osseuse spirale sous-divise les chambres supérieures et inférieures de la cochlée en *scala vestibuli* (rampe vestibulaire) et *scala tympani* (rampe tympanique). Celles-ci communiquent entre elles à l'apex de la cochlée en un point appelé héliotrème. Au tour basal de la cochlée, se retrouve l'aqueduc cochléaire, un canal osseux qui permet la communication entre le liquide périlymphatique proche de la fenêtre ronde, et l'espace sous-arachnoïdien au niveau de la fosse postérieure. **(Figure I)**

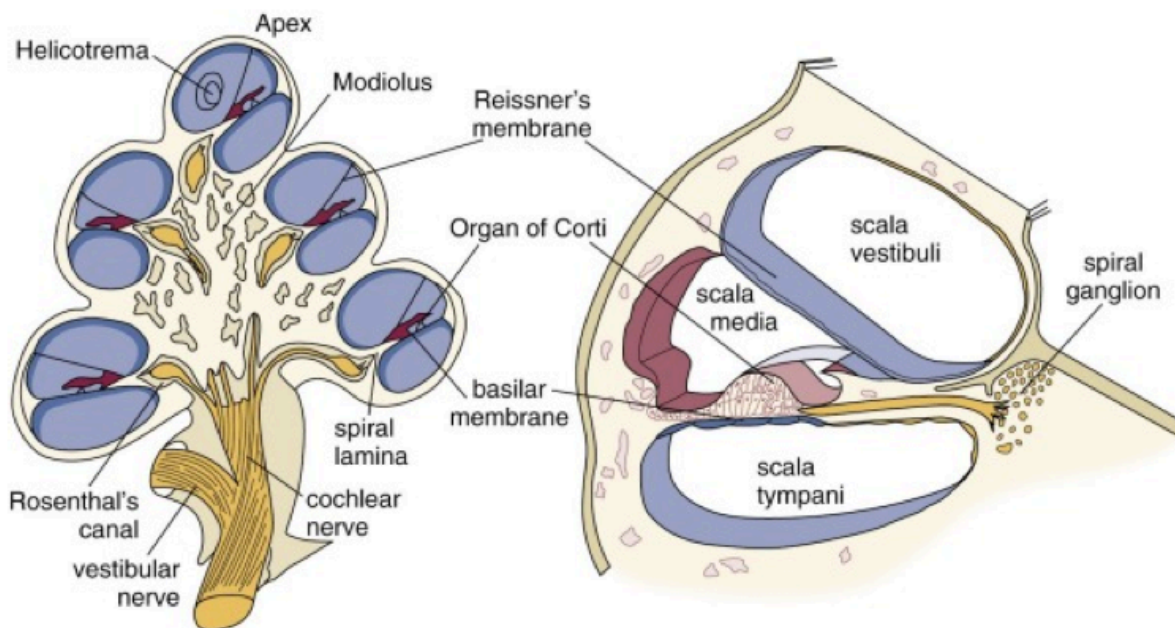


Figure I : Coupe transverse de la cochlée.

Source : Flint : Cummings Otolaryngology : Head & Neck Surgery, 5th ed. CHAPTER 128 – Anatomy of the Auditory System Cochlear Anatomy Osteology

Le labyrinthe membraneux de la cochlée suit la forme de la portion osseuse de la cochlée, et forme une troisième chambre cochléaire, soit la *scala media*. L'organe sensible de l'audition réside dans le labyrinthe membraneux. Celui-ci est délimité supérieurement par la membrane de Reissner et inférieurement par la membrane basilaire. La *stria vascularis*, tissu hautement vascularisé responsable de l'environnement métabolique de la *scala media*, se situe au niveau de la portion latérale de la cochlée. Les structures qui composent l'organe de Corti se situent au niveau de la membrane basilaire. L'organe de Corti, ou organe de l'audition, est composé de cellules ciliées internes (CCI), cellules ciliées externes (CCE) ainsi que de cellules de soutien. La membrane tectoriale couvre les CCI et les CCE.

La présence de deux liquides différents, soient le liquide endolymphatique et périlymphatique, permet de créer un environnement crucial au déplacement des ondes sonores,

à la dépolarisation cellulaire et à l'activité synaptique subséquente. En effet, entre les labyrinthes osseux et membraneux se retrouve le liquide périlymphatique, contenant une concentration élevée en sodium et faible en potassium, ce qui est similaire au liquide céphalo-rachidien ou au sérum sanguin. Il est à noter que la présence de périlymphe dans les espaces intercellulaires au sein de l'organe de Corti a été retrouvée chez les humains ainsi que les cochons d'Inde. (9)

A l'intérieur du labyrinthe membraneux se retrouve le liquide endolymphatique, ou endolymphe, qui possède une concentration élevée en potassium et faible en sodium, tel que typiquement retrouvé en intracellulaire. Il est à noter que ces concentrations sont maintenues par les cellules retrouvées dans la *stria vascularis*.

Les cellules ciliées internes et externes fonctionnent tels des récepteurs cellulaires qui transforment un mouvement mécanique en signal électromécanique afin de stimuler le nerf auditif. La partie apicale de chaque cellule ciliée comporte une région plus épaisse : la plaque cuticulaire. Le stéréocil, ou filament d'actine, se retrouve au niveau de cette plaque cuticulaire, et dévie suite à un mouvement mécanique. Adjacente à cette structure se retrouve le kinocil, au niveau de la région non-cuticulaire.

Il existe environ 3500 cellules ciliées internes organisées en une rangée, et 12 000 cellules ciliées externes organisées en trois rangées. Pour les deux types de cellules ciliées, les stéréocils, les plus longs se retrouvent du côté de la stria, et les plus courts du côté du modiolus. Le stéréocil le plus long est en contact avec la membrane tectoriale, qui résulte en une déflexion du stéréocil suite à un mouvement de la membrane basilaire. Les stéréocils sont connectés entre eux par des liens filamenteux, permettant un mouvement de tous les stéréocils en une seule unité lorsqu'il y a déflexion du plus long stéréocil, et donc une stimulation du nerf auditif. (**Figure II**)

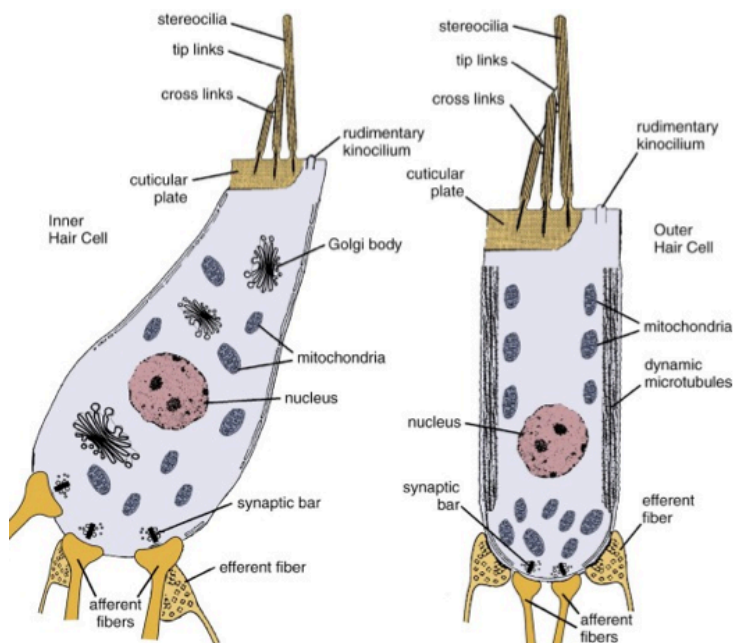


Figure II : Schéma des cellules ciliées internes (gauche) et externes (droite)

Source : Flint : Cummings Otolaryngology : Head & Neck Surgery, 5th ed. CHAPTER 128 – Anatomy of the Auditory System Cochlear Anatomy Osteology

L'innervation afférente des cellules ciliées cochléaires est responsable du transport de l'information auditive ascendante de la cochlée au système auditif central. Les fibres efférentes originent du faisceau olivocochléaire et modulent l'activité des cellules ciliées de la cochlée. Les corps cellulaires des fibres afférentes forment le ganglion spiral (**cf figure I**) qui se situe dans le canal de Rosenthal au sein du modiolus. Les fibres nerveuses sont classifiées en deux types : type I et II. Les fibres de type I sont bipolaires, de diamètres larges, et myélinisées. Celles-ci constituent 95% du nombre total des fibres. Elles communiquent de manière indépendante et directe avec le corps cellulaire des CCI, et chaque CCI est innervé par approximativement 20 fibres de type I. Les fibres de type II constituent 5% des fibres, sont plus petites, peuvent être myélinisées ou non, et font synapse directement sur les CCE. Une seule fibre de type II diverge et forme des branches qui font synapse sur de multiples CCE.

(10)

Chapitre 2 : Otite moyenne chronique suppurée

Définition

Une otite moyenne chronique suppurée est définie comme une inflammation chronique de l'oreille moyenne ainsi que de la mastoïde avec une atteinte de la membrane tympanique (soit une perforation ou un tube de tympanostomie). Il n'existe pas de consensus clair quant à la durée de celle-ci. Selon l'organisation mondiale de la santé (11), il s'agirait d'une otorrhée chronique perdurant plus de deux semaines, alors que d'autres sources mentionnent une otorrhée de plus de six semaines (12). S'il y a présence de cholestéatome, le terme d'otite moyenne chronique suppurée avec cholestéatome est alors utilisé. Il est à noter qu'il existe une distinction entre une otite moyenne chronique suppurée et une otite séreuse, chez laquelle il y a absence de processus infectieux et de perforation tympanique.

Épidémiologie et facteurs de risque

La plupart des otites moyennes chroniques suppurées (OMCS) surviennent dans les cinq premières années de vie. Les OMCS sont plus fréquentes dans les pays en développement ainsi que chez les populations plus à risque, comme chez les enfants avec anomalies cranio-faciales. (12). Selon une étude sur la prévalence de l'otite chronique (13), les taux les plus élevés sont rencontrés chez les Inuits d'Alaska (30-46%) ,les Inuits du Canada (7-31%) ,les Inuits du Groenland (7-12%),les aborigènes d'Australie (12-33%) ainsi que chez les Amérindiens (4-8%). Par opposition, les taux les plus bas sont rencontrés aux États Unis d'Amérique ainsi qu'au Royaume-Unis (13). Une histoire d'otite moyenne récidivante, une histoire parentale d'otite moyenne chronique, la fréquentation d'une grande garderie ou le fait de vivre dans une famille nombreuse, ont tous été identifiés comme des facteurs de risque pour le développement de l'OMCS. Toutefois, aucune association claire n'a pu être mise en évidence entre cette pathologie et le statut allergique, les infections respiratoires récidivantes, l'allaitement maternel, le sexe, l'âge parental ou la fumée secondaire. (12). La prévalence mondiale de l'OMCS est de 65 à 330 millions de personnes, dont 60% (39 à 200 millions) présentent une atteinte auditive significative (14).

Pathophysiologie

L'étiologie de l'otite moyenne chronique est multifactorielle. Parmi les causes reconnues, il existe les facteurs anatomiques et fonctionnels, comme la fonction de la trompe d'Eustache, les causes infectieuses et microbiologiques, ainsi que les causes immunologiques. Nous reverrons dans ce chapitre les principaux facteurs étiologiques de l'otite moyenne chronique.

Fonctions de la trompe d'Eustache

Les principales fonctions de la trompe d'eustache sont la ventilation, la protection et le drainage de l'oreille moyenne. Il existe des facteurs endogènes et exogènes pouvant altérer ces fonctions et ainsi causer une otite moyenne (15). Avec la présence d'une perforation tympanique, spontanée ou secondairement à la mise en place d'un tube trans-tympanique, il y a une augmentation du reflux des sécrétions nasopharyngées via la trompe d'Eustache, et un risque accru de contamination de l'oreille moyenne avec des pathogènes des voies respiratoires supérieures (13). Il est à noter que les enfants sont plus à risque d'un tel reflux; puisque leur trompe d'Eustache possède une orientation plus horizontale, est plus courte et est moins rigide (15,16). D'autres facteurs peuvent également atteindre le drainage de l'oreille moyenne et ainsi contribuer au développement de l'otite moyenne chronique suppurée (17). Il s'agit entre autre des pathologies affectant la fonction ciliaire de la trompe d'Eustache, comme une diminution de la fonction ciliaire retrouvée dans la dyskinésie ciliaire.

Inflammation et Microbiologie

L'otite moyenne chronique est marquée par la présence de changements inflammatoires au sein de l'oreille moyenne et de la mastoïde. Selon une étude de Costa et al (18), ces modifications inflammatoire incluent notamment la présence de tissu de granulation, de changements au niveau de la chaîne ossiculaire ainsi que de sclérose au sein de la cavité tympanique.

Une infection récidivante ou chronique de l'oreille moyenne peut résulter en une perforation de la membrane tympanique. Les oreilles atteintes d'otite chronique sans cholestéatome peuvent être infectées de manière constante ou intermittente. Une perforation tympanique peut être la source d'une infection de l'oreille moyenne, soit via une contamination du conduit auditif externe, ou secondaire à une infection au niveau de la mastoïde. Le nasopharynx peut également être source d'infection via la trompe d'Eustache. Les microorganismes aérobiques les plus fréquemment rencontrés dans l'OMCS sont le *Pseudomonas aeruginosa* (18-67%) ainsi que le *Staphylococcus aureus* (14-33%). Les Grams négatifs sont également rencontrés, tels le *Proteus* spp, le *Klebsiella* spp, l'*Escherichia* spp (4-43%) ainsi que l'*Haemophilus influenzae* (1 -11%) (12,19). Les organismes anaérobiques les plus fréquemment rencontrés sont le *Bacteroides* spp (1 – 91%) ainsi que le *Fusobacterium* spp (4 – 15%)(12). Les mycoses jouent également un rôle dans la microbiologie de l'OMCS, notamment l'*Aspergillus* spp. ainsi que le *Candida* spp., et la colonisation fongique peut même atteindre 50% dans des régions endémiques chaudes et humides (12).

Il est à noter que la prévalence du SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline) est grandissante. Une étude effectuée par Jo Ahn et al. (20), a démontré que le SARM était la bactérie la plus fréquemment identifiée en pré-opératoire chez les patients avec OMCS, variant de 25.9% chez les patients avec cholestéatome, à 33% chez les patients avec otite moyenne chronique sans cholestéatome. De plus, les patients avec SARM cultivé en pré-opératoire présentaient plus de risque d'otorrhée post-opératoire (20).

Le rôle des biofilms dans la pathophysiologie des infections chroniques est de plus en plus étudié. Un biofilm est une population de cellules bactériennes vivant en surface, encapsulée dans une matrice exo-polysaccharidique (21). Difficiles à éradiquer, les biofilms joueraient donc un rôle prépondérant dans les infections chroniques (22). Ceux-ci peuvent se retrouver au niveau de la muqueuse inflammatoire de l'oreille moyenne ou des tubes de tympanostomies, et donc causer des infections persistantes.

Immunologie

Les immunoglobulines IgG et IgA sont importantes dans la défense contre des infections muqueuses, tel que rencontré dans l'OMCS. Les IgG facilitent la phagocytose

directement ou via une activation du complément. Les IgA sécrétoires (IgAS) sont synthétisées localement par des cellules plasmiques au niveau de la muqueuse de l'oreille moyenne, et aideraient à éviter une colonisation bactérienne. Les enfants avec OMCS présenteraient un déficit en IgAS (23). Dans l'OMCS, il existe un important enrobage des immunoglobulines, soit une forte adhésion à la paroi des bactéries. Toutefois, lorsque l'agent causatif est le *P. aeruginosa*, l'enrobage bactérien est absent (23), ce qui expliquerait la difficulté à éradiquer cet organisme.

Traitements

Depuis plus d'un demi-siècle les gouttes antibiotiques, avec ou sans corticostéroïdes, sont utilisées comme traitement efficace de l'OMCS. Par contre dans les pays en voie de développement, les gouttes antiseptiques comme l'acide borique, la poudre d'iode ou l'acétate d'aluminium, demeurent couramment utilisées pour le traitement de l'OCMS. Effectivement, celles-ci présentent un faible coût ainsi qu'une grande disponibilité (12, 24). Une étude Cochrane (24), incluant 1660 patients a étudié l'évolution des patients avec OMCS. Chez les enfants avec OMCS, l'utilisation d'antibiotiques topiques est associée à une amélioration des symptômes lorsque comparé aux antiseptiques topiques. La combinaison d'antibiotique topique et systémique n'est pas plus efficace que le traitement d'antibiotique topique seul. De plus, il semble que les antibiotiques contre les bactéries gram-négatives peuvent réduire l'otorrhée de manière plus efficace que les autres classes d'antibiotiques (24). En effet, la classe des quinolones topiques a été démontrée comme étant plus efficace que les non-quinolones dans le traitement des OMCS (OR 0.26, IC 95% 0.16-0.41). L'utilisation des quinolones topiques est donc favorisée, compte tenue de son efficacité et du fait qu'elle ne comporte pas de risque d'ototoxicité (25).

Toutefois, certains patients avec otite moyenne chronique demeurent réfractaires au traitement médical optimal. Deux options sont alors possibles : l'administration d'antibiothérapie intraveineuse à long terme (6 à 8 semaines) ou une approche chirurgicale, soit une mastoïdectomie avec tympanoplastie (masto-tympanoplastie). L'administration

d'antibiotiques systémiques est à considérer s'il y a présence d'une infection compliquée ou invasive, et chez les patients avec signes d'atteinte systémique (fièvre, leucocytose, protéine C réactive élevée) (25). Les objectifs de la masto-tympanoplastie incluent l'aération de l'oreille moyenne et de la mastoïde, l'exérèse du tissu chroniquement infecté ainsi que la reconstruction de la chaîne ossiculaire si nécessaire. Toutefois, peu de données existent quant à l'efficacité du traitement chirurgical. Nous ne savons pas si la tympanoplastie, avec ou sans mastoïdectomie, améliore les symptômes chez les patients atteints d'OMCS comparativement aux autres traitements ou au fait de ne pas opérer, et cela chez les adultes et les enfants (14).

Chapitre 3 : La thérapie photodynamique antimicrobienne

Face à l'émergence grandissante de la résistance bactérienne aux antibiotiques, la recherche de nouvelles avenues thérapeutiques efficaces et sécuritaires s'impose. C'est donc dans ce cadre que s'inscrit le développement de la thérapie photodynamique antimicrobienne.

La lumière est utilisée dans le traitement des maladies depuis l'antiquité (26). Le concept d'induction de mort cellulaire par l'interaction de lumière avec un agent chimique est reconnu depuis plus de 100 ans. Ceci a été initialement rapporté par Oscar Raab, un étudiant en médecine qui travaillait avec le Professeur Hermann von Tappeiner à Munich. Pendant ses études sur l'effet de l'acridine sur la malaria, il découvrit que la combinaison de rouge d'acridine et de lumière avait un effet létal sur l'Infusoria, une espèce des paramecium (26). Cependant, ce n'est que récemment que son utilisation a grandi dans le domaine médical et chirurgical, telle la photothérapie pour le traitement de l'ictère néonatal, mais également pour la thérapie photodynamique.

La thérapie photodynamique consiste en la capacité d'un colorant, appelé agent photosensibilisateur, d'être activé par une lumière ayant une longueur d'onde spécifique, produisant ainsi des radicaux libres toxiques aux micro-organismes. Après irradiation, le photosensibilisateur subit une transition d'un état de base à faible énergie, à un état d'énergie plus élevé dit « triplet ». Ce dernier peut subir une réaction de type I en réagissant avec des biomolécules afin de produire des radicaux libres, ou subir une réaction de type II en réagissant avec une molécule d'oxygène et produire ainsi une molécule d'oxygène hautement réactive de type « singlet »(27) (**figure III**).

Les oxygènes dits « singlet » produits par les réactions de type II peuvent oxyder plusieurs structures biologiques, telles les protéines, les acides nucléiques et les lipides. Malgré le fait que les dommages à l'ADN ont été démontrés, ce mécanisme ne serait pas la cause principale de mort bactérienne. En fait, il s'agirait plutôt des dommages à la membrane cytoplasmique ainsi que les fuites de contenu cellulaire et l'inactivation des systèmes de

transport membranaire et enzymatique (27). Il est à noter que la diffusion de l'oxygène de type singlet est limitée à un maximum de 30 nm, ce qui signifie que la localisation du photosensibilisateur détermine le site d'action, ce qui diminue les dommages aux sites et aux tissus adjacents (28). Par conséquent, ceci signifie que la TPD est une technologie possédant une certaine précision, et que son effet est relativement confiné au site d'action choisi du laser et de l'agent photosensibilisant, avec un impact minime sur les structures avoisinantes.

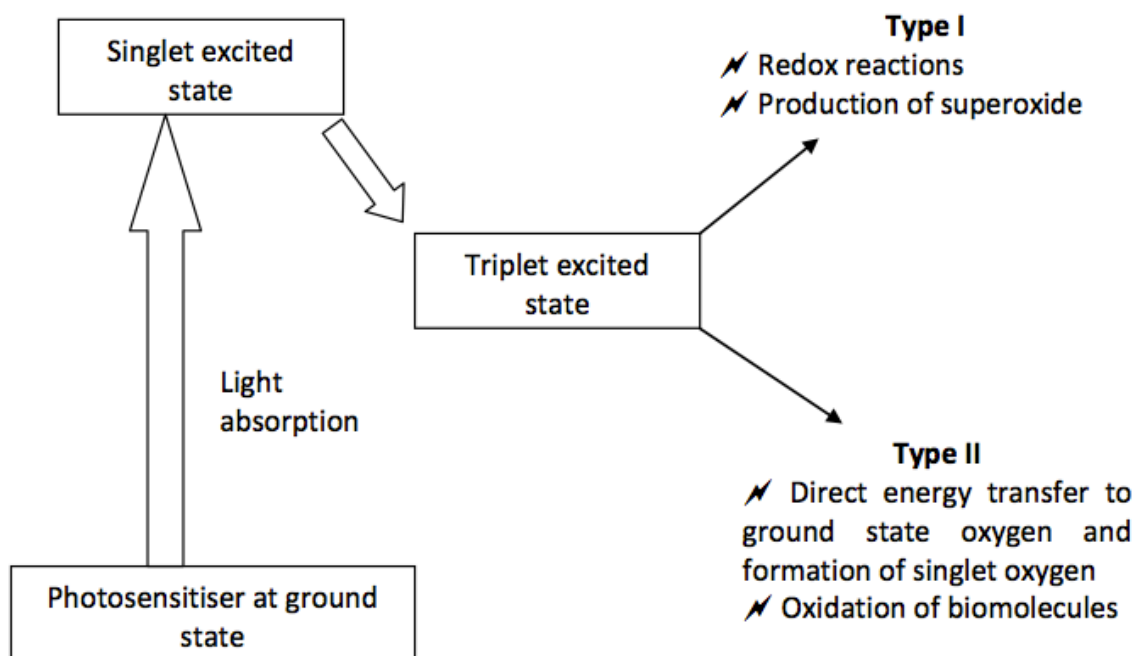


Figure III : Mécanisme de photosensibilisation

Source : Tubby, S. (2011). The effect of light-activated antimicrobial agents on bacterial virulence factors and key modulators of inflammation. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/1318137/>

Bleu de méthylène

Le bleu de méthylène est un colorant de la famille des phénothiazines. Il a été initialement synthétisé en 1876 pendant la période de grande expansion du textile en Europe (29). Les scientifiques Robert Koch et Paul Ehrlich ont par la suite développé le potentiel de colorant de cet agent en microscopie, notamment dans les domaines à l'époque émergent de la microbiologie et de la pathologie. Par la suite, en 1891 Ehrlich a développé l'utilisation du bleu de méthylène dans le traitement de la malaria chez les humains (29). De nos jours, l'utilisation du bleu de méthylène est bien reconnue en médecine, notamment pour ses propriétés de coloration histologiques, ainsi que pour le traitement du choc septique (4).

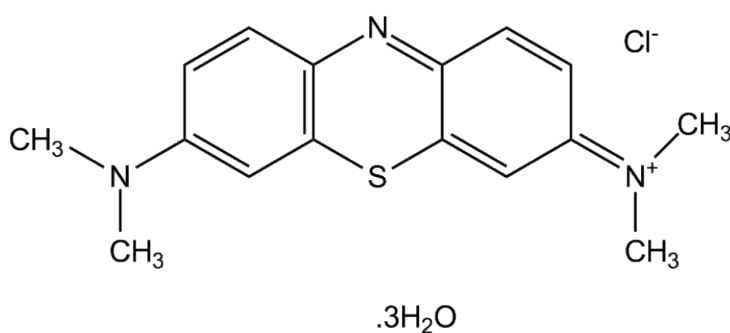


Figure IV : Structure chimique du bleu de méthylène.

Source : Tubby, S. (2011). The effect of light-activated antimicrobial agents on bacterial virulence factors and key modulators of inflammation. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/1318137/>

Les phénothiazines possèdent une structure tricyclique plane, et en pH physiologique, sont généralement cationiques, ce qui leur permet de cibler de manière adéquate la membrane bactérienne chargée négativement (27). Par conséquent, les photosensibilisateurs cationiques sont utiles dans la thérapie photodynamique antimicrobienne puisqu'ils sont efficaces contre les agents gram négatifs et positifs. De plus, puisque les cellules des mammifères absorbent lentement les molécules cationiques, le bleu de méthylène est donc plus spécifique aux cellules bactériennes, et cause ainsi moins de dommages aux cellules saines de l'hôte (30). Le

bleu de méthylène absorbe fortement la lumière ayant une longueur d'onde de 600-700 nm, avec un pic spécifique à 665 nm.

Efficacité de la thérapie antimicrobienne photodynamique.

La famille des phénothiazines, qui inclut le bleu de méthylène, a été démontré efficace contre de multiples bactéries résistantes, telles le *Mycobacterium tuberculosis*, le *Staphylococcus aureus* ainsi que des protozoaires résistants aux antibiotiques comme le *Plasmodium falciparum* (31). Il est à noter que le *Mycobacterium tuberculosis* ainsi que le *Plasmodium falciparum* sont responsables de plus de quatre millions de décès par année. De plus, le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) est le principal agent associé à l'ensemble des infections nosocomiales, et la résistance à la vancomycine est de plus en plus rencontrée (31).

Une étude de *Zolfaghari et al.* (3) a démontré que la thérapie antimicrobienne photodynamique était efficace pour le traitement du SARM sur des plaies in vivo, suivant une irradiation de plaies à $360\text{J}/\text{cm}^2$ d'une lumière laser de 670 nm en présence de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bleu de méthylène. Cette trouvaille était indépendante de l'augmentation de la température au niveau de la plaie. *Hajim et al* ont également étudié l'effet de la thérapie photodynamique antimicrobienne dans le traitement du SARM in vitro (32), et ont démontré une efficacité de 100% après 15 minutes d'exposition au laser. Aucun effet n'a été démontré sur les colonies exposées au laser seul. *Miyabe et al.* (33) ont étudié l'effet de la TPD sur vingt souches de *Staphylococcus*. Les résultats ont démontré que la TPD était efficace dans la réduction du nombre de cellules viables dans tous les isolats cliniques de *Staphylococcus*. L'efficacité de la TPDa contre plusieurs souches de *Streptococcus mutans* a également été largement étudiée (34,35).

Une étude de *Merrill et al* (6) a étudié l'effet de la thérapie photodynamique antimicrobienne sur des biofilms polymicrobiens de *Pseudomonas aeruginosa* et SARM avec bleu de méthylène exposé à une lumière de 670nm. Une réduction du biofilm antimicrobien

supérieure à 99.9% a été notée après un seul traitement. *Hashimoto et al.* (36) ont étudié l'effet de la TPDa contre des souches résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* utilisant d'une part un modèle in vitro, et d'autre part un modèle de souris in vivo. La TPDa a été prouvée efficace pour la réduction du *P. aeruginosa* in vitro. De plus, dans le modèle in vivo, la TPDa a permis de réduire la charge bactérienne des plaies, de retarder la bactériémie, et de garder une charge bactérienne sanguine inférieure à celle des animaux non-traités. La survie des souris a également augmentée après 24 heures.

Une étude de *Peloi et al* (7) a utilisé une autre source lumineuse, soit une lumière de type LED (light-emitting diode), pour la photoactivation du bleu de méthylène dans la TPDa. Son efficacité a été testée contre différentes souches, soit le *Staphylococcus aureus*, l'*Escherichia coli*, le *Candida albicans* et l'*Artemia salina*. La TPDa utilisant une lumière LED a été démontrée comme étant efficace contre les germes cités ci-dessus. L'efficacité de la TPD antimicrobienne ne se limite donc pas seulement aux bactéries, mais affecte également une grande variété de mycoses, tel le *Candida albicans* (37–39). En effet, la diminution de la croissance de *Candida albicans* secondairement à la TPDa serait associée à une augmentation de la perméabilité membranaire (40).

La thérapie photodynamique antimicrobienne a donc été démontrée comme étant efficace contre plusieurs germes et pathogènes.

Méthodologie

Modèle animal

Vingt cochons d'Inde ont été utilisés pour cette étude, avec un poids moyen variant de 250-300g. Cet animal a été choisi puisque l'anatomie de leur oreille moyenne se rapproche de celle de l'humain. De plus, il possède une oreille moyenne et membrane tympanique relativement grandes, ce qui facilite les manipulations. Toutefois, il existe quelques différences anatomiques entre l'anatomie du cochon d'Inde et celle de l'humain. En effet, la chaîne ossiculaire est comprimée, et donc une seule unité incudo-malléolaire remplace le marteau et l'étrier chez le cochon d'Inde (41). De plus, notre laboratoire de recherche possède une grande expérience dans la manipulation de ces animaux.

Cette étude a été préalablement approuvée par le comité d'éthique en recherche du centre de recherche de l'hôpital Sainte Justine de Montréal. Les animaux ont été traités selon les recommandations du Conseil Canadien de Protection des animaux (42).

Procédures Générales et Groupes

Tous les cochons d'Inde ont été assignés de manière aléatoire en deux groupes : un groupe expérimental et un groupe contrôle. Chaque animal a été utilisé comme son propre contrôle. Le groupe expérimental a reçu des injections intratympaniques (IT) de bleu de méthylène (300 mcg/ml) dans une oreille, et du normal salin (NaCl 0,9%) dans l'oreille controlatérale. Dans le groupe contrôle, nous avons procédé à des injections de gentamicine (40mg/ml) dans une oreille, ce qui constituait le groupe contrôle positif, comparativement au groupe contrôle négatif, ayant reçu des injections de NaCl 0,9% dans l'oreille controlatérale. **(Figure V)**

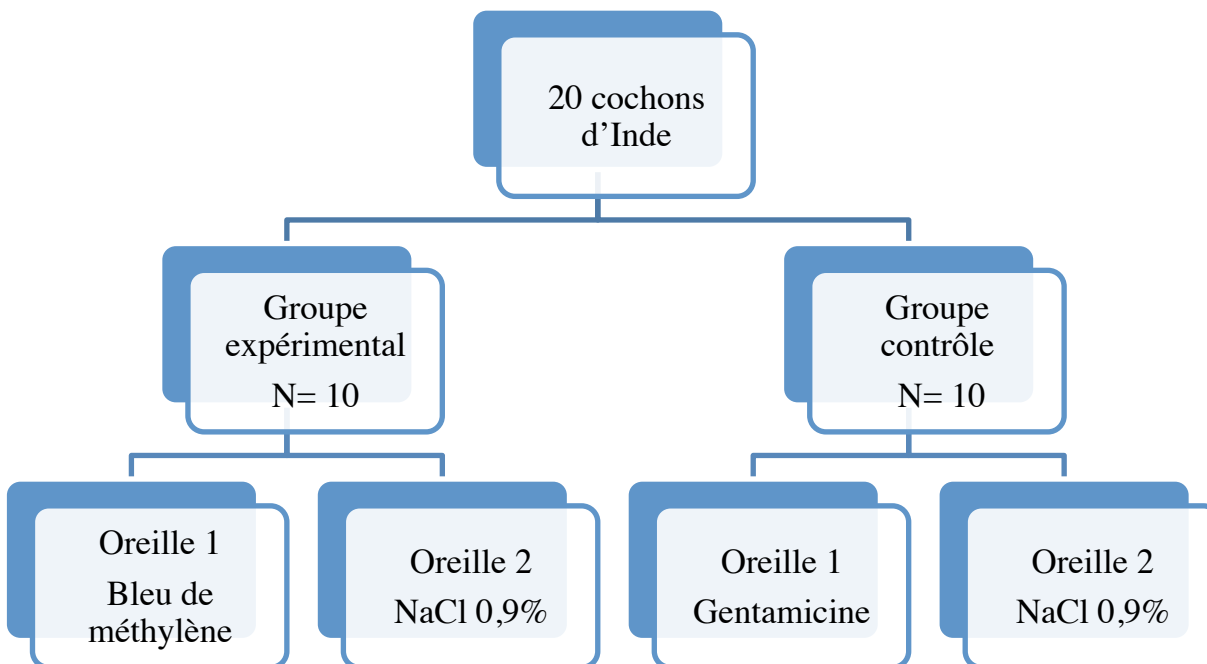


Figure V : Conception de l'étude

Un total de trois injections IT a été échelonné sur sept jours. Une moyenne de 0,1 ml a été injectée dans chaque oreille. Chaque injection IT a été effectuée sous visualisation directe à l'aide d'un microscope, utilisant une aiguille de taille 27 gauges de type Withacre Spinal needle® au niveau du quadrant postéro-inférieur de la membrane tympanique.

Protocole anesthésique

L'induction et le maintien de l'anesthésie générale pour les injections IT ainsi que pour les potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral (PEATC), ont été effectués à l'aide d'isoflurane 2 à 3%.

Potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral (PEATC)

L'enregistrement des PEATC pour chaque oreille a été effectué une semaine avant la première injection IT, puis a été répété une semaine suivant la dernière injection IT. Les conduits auditifs externes ont été examinés initialement et nettoyés de débris de cérumen si présent. Tous les PEATC ont été enregistrés avec le système Nicolet BRAVO (Nicolet Bravo System®, Nicolet Biomedical, Madison, Wisconsin, USA). Un total de quatre électrodes sous-cutanées ont été utilisées pour l'enregistrement de l'activité électrique: une électrode positive au niveau du vertex, une électrode de terre au niveau du cou, ainsi que deux électrodes sur chaque mastoïde. Avant de procéder à l'enregistrement, l'impédance a été vérifiée et acceptée si inférieure à 3 kilo Ohms (kΩ). Des stimuli de type "tone burst" ont été générés à des fréquences de 2000, 4000, 6000 et 8000 Hz. Le seuil électrophysiologique a été défini comme l'intensité minimale capable de produire une onde V visible, et ce au moins à trois reprises consécutives.

Protocole d'euthanasie et dissection des cochlées

Après avoir effectué une anesthésie générale profonde à l'aide d'isoflurane 5%, tous les animaux ont été euthanasiés. Par la suite, l'oreille moyenne a été exposée en réséquant la membrane tympanique et la portion cartilagineuse du conduit auditif externe. Chaque cochlée a par la suite été disséquée au microscope, pour un total de 40 échantillons.

Préparation des tissus

Après dissection, les cochlées ont été placées dans de la formaline tamponnée à 10% pour au moins 48 heures pour fixation. Par la suite les spécimens ont été trempés dans une solution décalcifiante (solution Shandon™ TBD-2™) pour 48 à 72 heures. Ceci a permis de retirer le calcium contenu dans les structures osseuses des cochlées, et de faciliter les dissections. Une fois décalcifiées, les cochlées ont été déshydratées via trois solutions d'alcool à concentration croissante de 70%, 80% et 90%, afin de prévenir les dommages tissulaires. Puis, l'eau a été finalement retirée avec trois bains finaux d'alcool absolu (C₂H₅OH). Trois bains de toluène ont par la suite remplacé l'alcool présent, et tous les spécimens ont été

immergés dans des bains de cire chaude de 44 à 60 degrés pour solidifier les tissus. Par la suite, ils ont été placés dans des moules à paraffine chaude. Une fois les échantillons fixés dans la paraffine solidifiée, les moules ont été retirés. Puis des coupes de quatre microns ont été effectuées au travers les cochlées à l'aide d'un microtome. Les spécimens ont par la suite été placés sur des lames avant d'être colorées.

Histologie et analyse immunohistochimique (IHC)

Une coloration histologique de routine a été initialement effectuée à l'aide de la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, permettant ainsi d'étudier la structure architecturale globale. En effet, l'hématoxyline colore en violet les noyaux cellulaires et l'éosine colore en rose les cytoplasmes.

Nous avons également procédé à des analyses par immunohistochimie. Deux colorations ont été effectuées. La coloration DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) est un agent fluorescent qui se lie fortement aux régions A et T de l'ADN. Celle-ci a été faite initialement afin d'évaluer les structures cellulaires des spécimens (lumière bleue à l'IHC). Par la suite, nous avons procédé à une coloration FITC (isothiocyanate de fluorescéine). Celle-ci apparaît en vert à l'IHC, et est un indicateur de captation de caspase-3. La protéine caspase-3, qui est codée par le gène CASP3, est un membre de la famille des Caspases (*cysteine-aspartic acid protease*). Ces protéines jouent un rôle central dans la phase d'exécution de l'apoptose cellulaire. Par conséquent, une captation positive de caspase-3 à l'IHC, est un marqueur d'apoptose cellulaire, et donc de toxicité aux cellules de l'oreille interne.

Analyse statistique

Le nombre d'animaux nécessaire afin d'obtenir une significativité statistique (10dB) pour l'étude a été déterminé au préalable à l'aide de la méthode de Snedecor (43). Nous avons basé nos calculs sur une formule du livre "*Statistical Methods*" par Snedecor et Cochran. Il s'agit d'une formule utilisée pour calculer le nombre de sujets lorsqu'on compare les moyennes de deux groupes et lorsque les variables sont continues.

Soit la formule ci dessous :

$$n=1 + 2C * (s/d) ^2$$

Chaque variable est alors définie :

- **n**: nombre d'animaux nécessaire
- **C**: valeur basée sur alpha et 1-beta.
Nous avons choisi alpha=0.05 et 1-beta=1- 0.1= 0.9
D'après la table du livre, ceci donne C=10.51.
- **s**: écart type.
Ici, s=19.3 dB d'après nos études antérieures traitant de l'ototoxicité (44)
- **d**: la taille de l'effet que nous voulons détecter. Ici, nous avons choisi d=30 dB car ceci est cliniquement significatif.

Donc en suivant la formule ci-dessus et en remplaçant les valeurs, ceci nous donne :

$$n = 1+ 2*10.51 *(19.3/30) ^2 = 9.7$$

Ces calculs montrent que nous avons besoin de 10 animaux pour chaque groupe. Puisque l'étude est composée d'un groupe expérimental ainsi que d'un groupe contrôle, 20 animaux au total sont nécessaires pour l'étude.

Pour l'interprétation des résultats de PEATC, nous avons procédé à une analyse de variance de type ANOVA. Les effets de fréquences (2000, 4000, 6000 et 8000 Hz), le côté

traité (droit vs gauche) et le produit injecté (bleu de méthylène, gentamicine, NaCl 0,9%) ont été mesurés. Les résultats ont été comparés entre les groupes. Aucune interaction entre les variables n'a été trouvée, et chacun des effets a donc été étudié séparément. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme étant statistiquement significative.

Résultats

Potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral (PEATC)

Analyses descriptives : PEATC dans le groupe contrôle

Le seuil moyen des PEATC a été calculé au niveau des fréquences de 2000, 4000, 6000 et 8000 Hz. Pour le groupe contrôle négatif, qui a reçu des injections IT de NaCl 0,9%, le seuil moyen avant les injections IT était à 23,5 dB. Une fois les injections IT terminées, le seuil moyen était à 25,88 dB.

Chez le groupe contrôle positif, ayant reçu des injections de gentamicine, le seuil auditif moyen initial était mesuré à 20,25dB. À la fin de la série des injections IT, le seuil moyen des PEATC était à 88,88 dB. (**Tableau 1**)

Tableau 1: Seuils moyens des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral dans le groupe contrôle avant et après les injections intratympaniques

Fréquences	Normal Salin 0,9%			Gentamicine		
	Avant	Après	Différence	Avant	Après	Différence
2000 Hz	29.00	37.00	8.00	30.50	105.00	74.50
4000 Hz	31.00	33.50	2.50	27.50	98.00	70.50
6000 Hz	24.50	25.50	1.00	19.00	86.00	67.00
8000 Hz	9.50	7.50	-2.00	4.00	66.50	62.50
Moyenne	23.50	25.88	2.38	20.25	88.88	68.63

Analyses descriptives : PEATC dans le groupe expérimental

Dans le groupe expérimental, les oreilles traitées avec normal salin ont présenté en pré injection IT un seuil moyen à 17,63 dB. Une fois la dernière injection IT achevée, le seuil moyen se situait à 18,88 dB. Pour les oreilles traitées avec le bleu de méthylène, le seuil des PEATC moyen était situé à 21,38 dB et à 24,23 dB avant et après les injections IT respectivement. (**Tableau 2**)

Tableau 2: Seuils moyens des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral dans le groupe expérimental avant et après les injections intratympaniques.

Fréquences	Normal Salin 0,9%			Bleu de Méthylène		
	Avant	Après	Différence	Avant	Après	Différence
2000 Hz	32.50	33.00	0.50	38.00	41.00	3.00
4000 Hz	24.00	26.00	2.00	27.50	30.50	3.00
6000 Hz	14.50	16.50	2.00	17.50	20.00	2.50
8000 Hz	-0.50	0.00	0.50	2.50	5.00	2.50
Moyenne	17.63	18.88	1.25	21.38	24.13	2.75

Analyse Statistique

Nous avons comparé la moyenne des pertes auditives dans chaque groupe. Dans le groupe contrôle positif, la perte moyenne des seuils auditifs pour toutes les fréquences combinées était de 66,25 dB; soit 68,63 dB de perte moyenne dans le groupe ayant reçu de la gentamicine, moins 2,38 dB de différence moyenne dans le groupe traité avec NaCl 0,9%. ($p < 0.001$, CI 95 % [44.6; 87.9]).

Dans le groupe expérimental, la différence moyenne des seuils auditifs du groupe injecté de bleu de méthylène était de 2,75 dB, et celle-ci était de 1,25 dB chez les animaux traités par NaCl 0,9%. Par conséquent, la moyenne des pertes auditives pour toutes les fréquences combinées était de 1,50 dB ($p = 0.688$, CI 95% [-6.8 ; 9.8]). Aucune différence statistiquement significative n'a donc été démontrée entre le groupe ayant reçu du bleu de méthylène comparativement au groupe ayant été injecté de la solution de NaCl 0,9%.

Toutes les pertes moyennes des PEATC selon les fréquences dans les groupes contrôle et expérimental sont représentées dans les **figures VI et VII**.

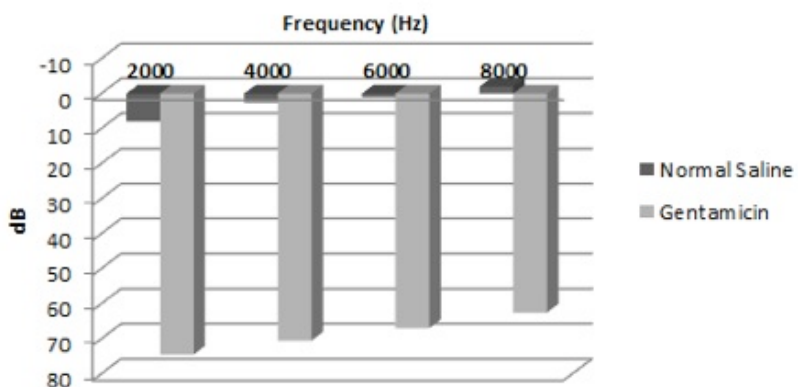


Figure VI : Résultats des PEATC. Pertes moyennes par fréquence dans le groupe contrôle positif.

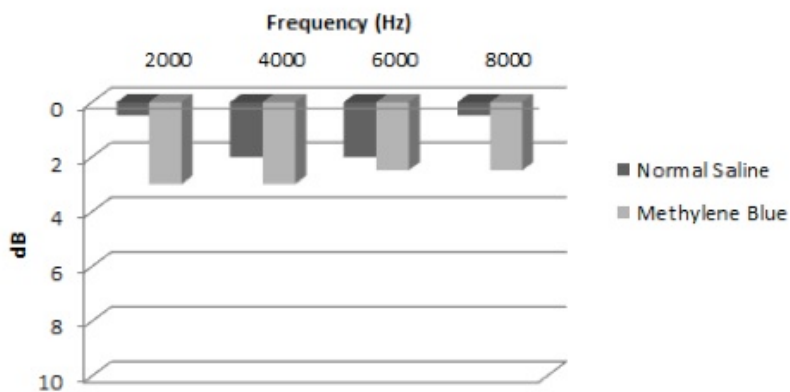


Figure VII : Résultats des PEATC. Pertes moyennes par fréquence dans le groupe expérimental.

Histologie et Immunohistochimie

Une fois les cochlées disséquées et préparées, nous avons procédé à des analyses histologiques. Nous avons tout d'abord effectué une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine afin de préciser les structures cellulaires des cochlées. Par la suite, nous avons procédé à des analyses par immunohistochimie afin de détecter l'apoptose cellulaire, et donc l'ototoxicité.

La coloration histologique par hématoxyline et éosine qui permet d'étudier l'architecture des structures cellulaires, n'a pas mis en évidence d'atteinte cochléaire structurelle dans le groupe expérimental. (**Figure VIII**)

Par la suite, nous avons effectué des analyses par immunohistochimie. Nous avons tout d'abord procédé à une coloration DAPI afin d'évaluer les structures des cochlées. En effet cette coloration, qui se lie fortement aux régions A et T de l'ADN, colore en bleu les noyaux cellulaires. Les groupes ayant été injectés avec la solution de NaCl 0,9 % (groupe contrôle négatif) et avec le bleu de méthylène (groupe expérimental) n'ont pas présenté d'atteinte à la coloration DAPI. Cependant, on note une diminution de captation des noyaux cellulaires chez le groupe ayant été injecté à la gentamicine (groupe contrôle positif). (**Figures IX - XI**).

Nous avons poursuivi avec une coloration FITC. Lorsque celle-ci est combinée à la caspase-3, il y a émission d'une lumière fluorescente verte, et est donc un marqueur apoptotique. Aucune apoptose cellulaire significative n'a été détecté dans le groupe expérimental ayant été exposé au bleu de méthylène, ainsi que dans le groupe contrôle négatif ayant reçu la solution de NaCl 0,9%. Par opposition, le groupe contrôle positif ayant été injecté avec de la gentamicine a démontré une forte captation de caspase-3 à la coloration FITC. (**Figures IX - XI**).

Figure VIII : Coloration par hématoxyline et éosine dans le groupe expérimental

A : Grossissement x 1.5, B : Grossissement x 5, C : Grossissement x 10

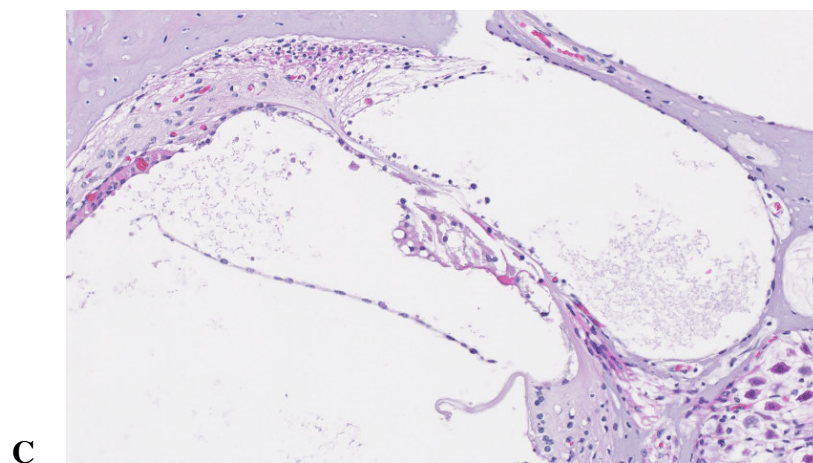
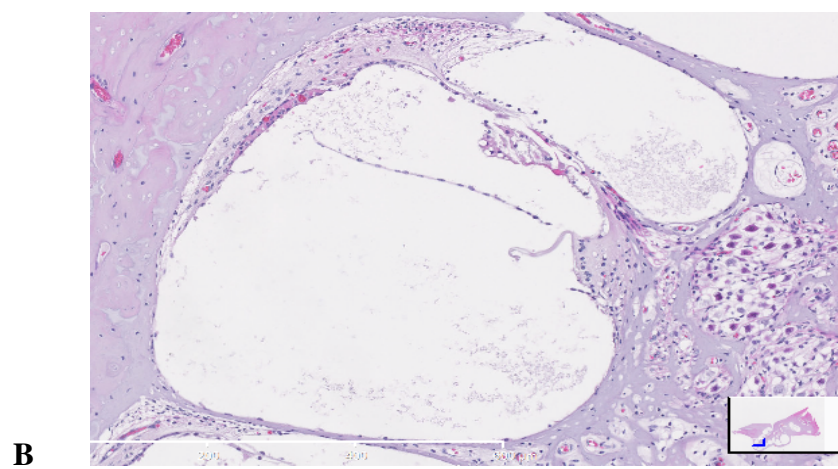
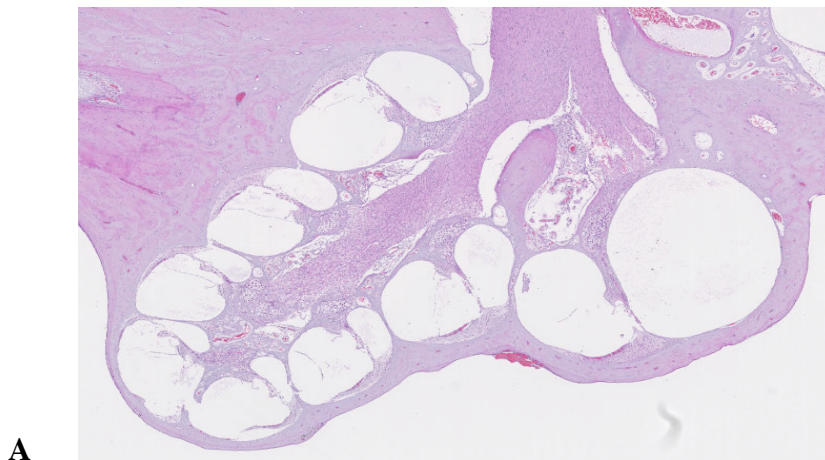


Figure IX : Analyses IHC groupe contrôle négatif (Normal Salin).

A) coloration DAPI, B) Coloration FITC

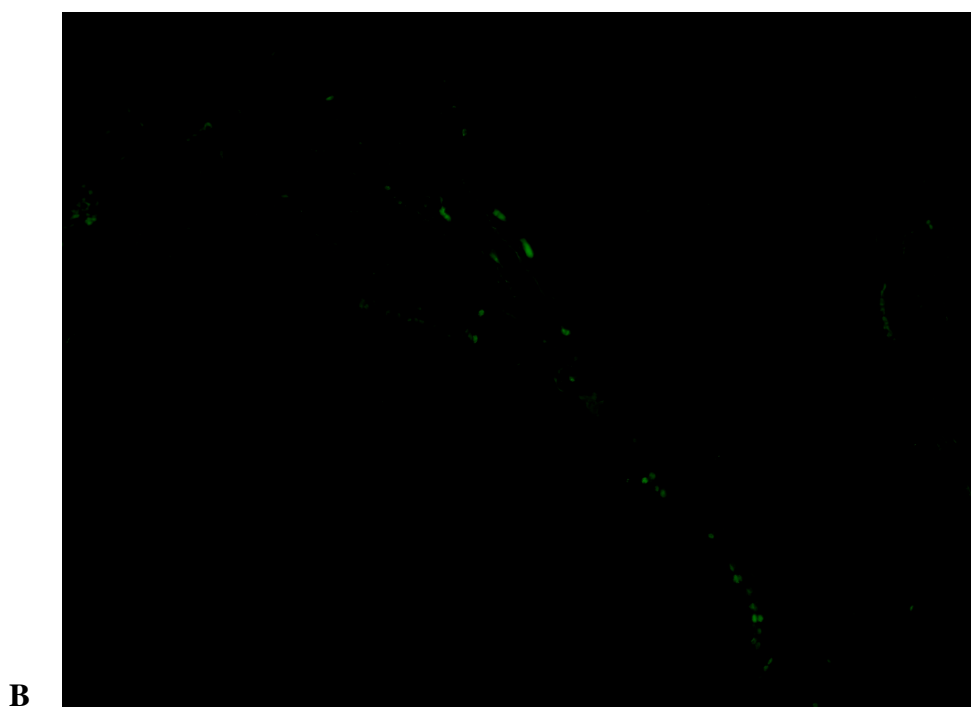
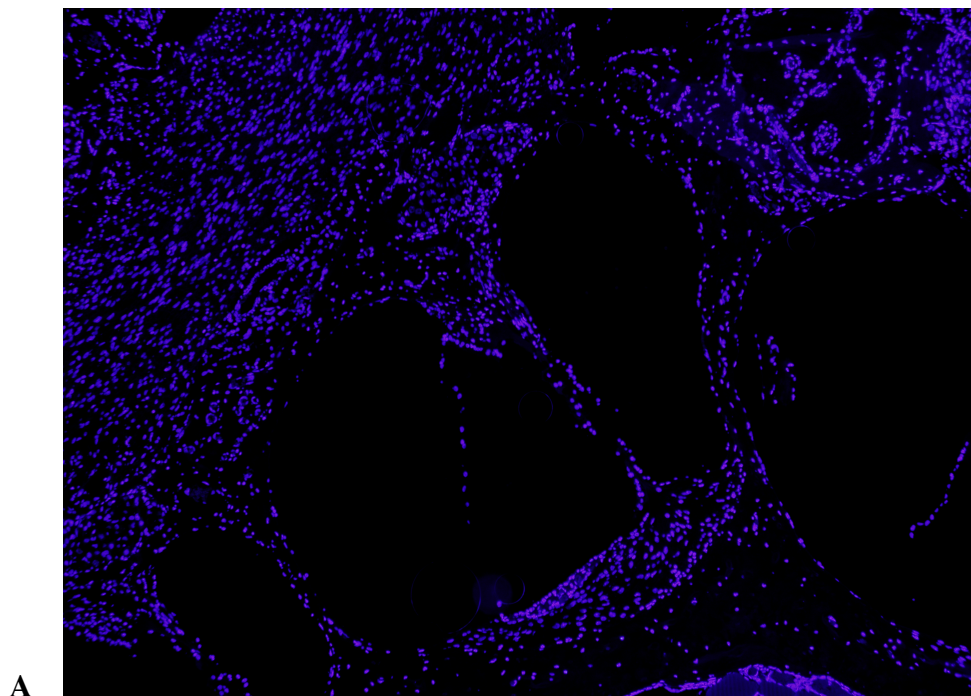


Figure X : Analyses IHC groupe contrôle positif (Gentamicine).

A) Coloration DAPI, B) Coloration FITC

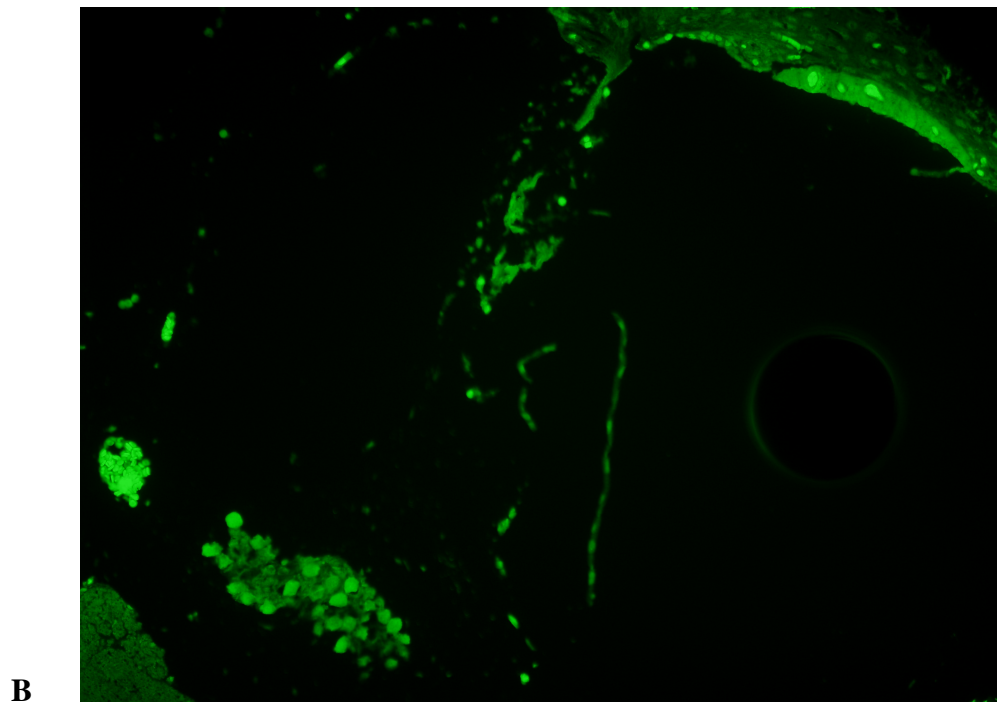
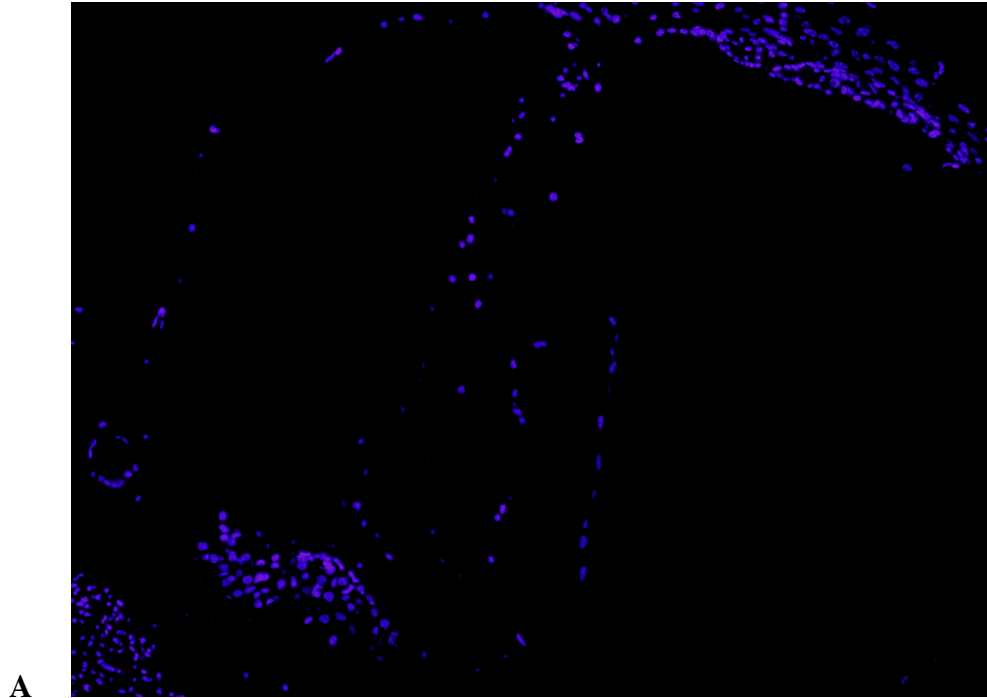
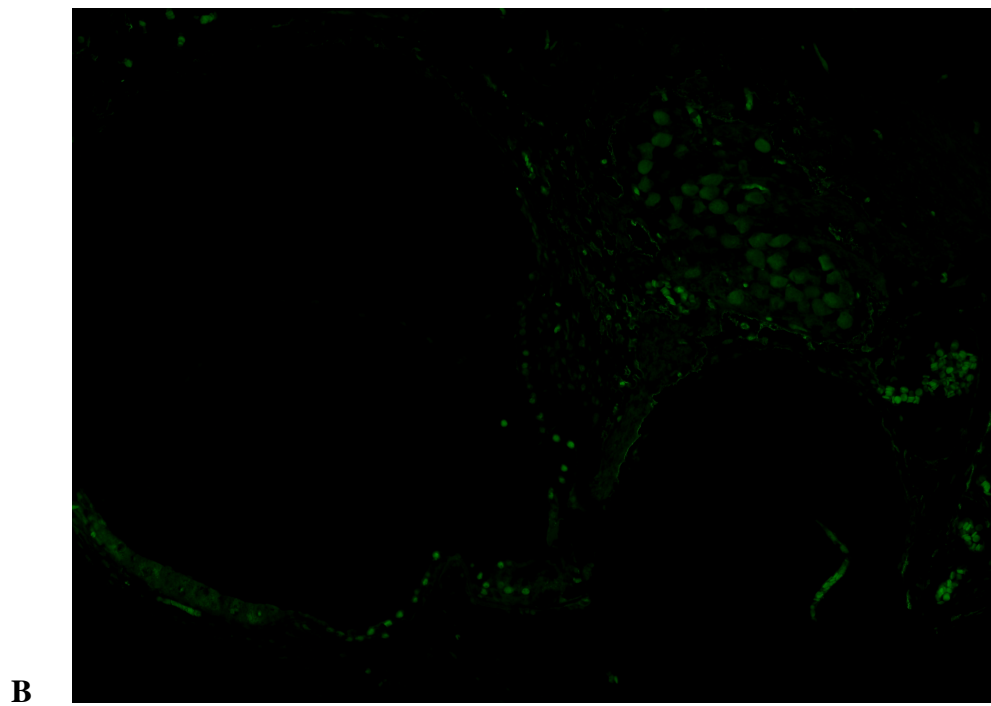
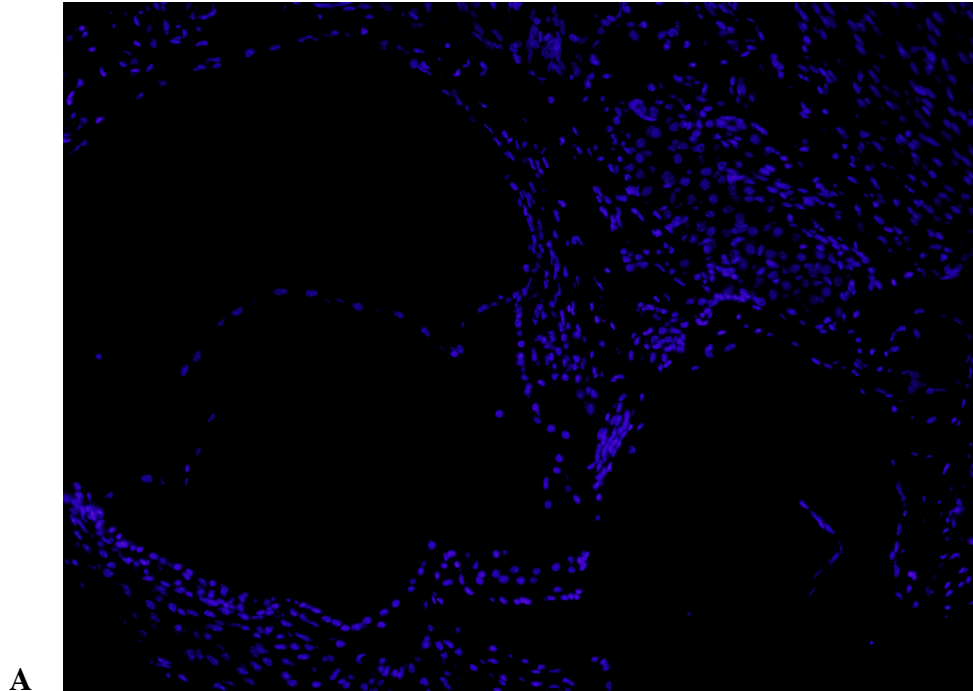


Figure XI : Analyses IHC groupe expérimental (Bleu de méthylène)

A) Coloration DAPI, B) Coloration FITC



Discussion

Avant l'apparition des antibiotiques, les pathologies infectieuses étaient la cause première de mortalité aux États-Unis d'Amérique et la morbidité et la mortalité secondaires aux causes infectieuses étaient communes (45). La découverte de la pénicilline en 1928 par Alexander Fleming a marqué un point tournant dans l'histoire de la prise en charge des maladies infectieuses. Des pathologies jusque-là fatales étaient maintenant traitables. Dans les années 40 et 50, les cliniciens ont réalisé qu'une résistance bactérienne se développait. De ce fait jusqu'en 1957, de nouveaux agents sont apparus, tels la tétracycline, les macrolides, les aminoglycosides, les glycopeptides, le polyène, ainsi que la polymyxine. Il y a également eu le développement de dérivés semi-synthétiques de la pénicilline, tel la méthicilline. Par contre, depuis la découverte de ces principales classes d'antibiothérapie, peu de nouveaux développements sont apparus. L'émergence de la résistance bactérienne a grandi. Après avoir atteint un pic dans les années 60 et 70, le nombre de nouvelles classes d'antibiotiques n'a cessé de diminuer. Une des principales raisons de ce déclin est le coût élevé associé à la recherche de nouveaux mécanismes d'antibiothérapie, ainsi que la nature transitoire du traitement des infections aiguës (46), par opposition aux pathologies chroniques. Les deux dernières décennies n'ont vu apparaître que deux nouveaux agents antimicrobiens avec des mécanismes d'action différents, soit le linezolid et la daptomycine (47).

Le premier cas de résistance bactérienne reporté à la pénicilline remonte en 1940, et en 1947, l'émergence de souches bactériennes résistantes à la pénicilline a été décrite comme alarmante (48). En effet, l'utilisation grandissante de la pénicilline a permis le développement de souches de *Staphylococcus aureus* produisant de la pénicillinase dans les années 40, devenant pandémique dans les années 1950 (49). En 2004, il était estimé que plus de 70% des bactéries pathogènes étaient résistantes à au moins un antibiotique, et que la résistance à la pénicilline secondaire à la production de bêta-lactamases se rapprochait de 100% (27,50,51). Il existe plusieurs mécanismes à l'origine de la résistance bactérienne, et ceux-ci dépendent du site ainsi que du mode d'action de l'antibiotique (50). Ceux-ci peuvent être sous-classifiés comme étant intrinsèques ou acquis. Dans le cas où le mécanisme est intrinsèque, le site ciblé est perdu ou absent, telle la résistance des gram-négatifs à la vancomycine. Lorsque le

mécanisme est acquis, il y a présence d'une adaptation de l'hôte, comme la production d'enzymes d'inactivation et d'altération du site ciblé. L'augmentation de cette résistance bactérienne est entretenue par l'utilisation inappropriée des antibiotiques, tel pour le traitement d'infections virales ainsi que la non-observance des patients. Il est à noter que l'utilisation inappropriée des antibiotiques varie de 35% à 53% selon les régions du monde (51).

Si non ou mal traitée, l'otite moyenne chronique suppurée (OMCS) est une pathologie ayant des implications cliniques ainsi que des complications importantes. La complication la plus fréquente de l'OMCS est la perte auditive : conductive ou neurosensorielle. Si présent chez un jeune enfant, ceci peut affecter le développement du langage ainsi que son développement psycho-moteur et ses progrès scolaires. La présence d'inflammation et d'infection chronique au niveau de l'oreille moyenne, avec œdème, sécrétions, perforation tympanique et possiblement atteinte de la chaîne ossiculaire peut causer une perte auditive de nature conductive de 20 à 60 dB. La présence de médiateurs inflammatoires au niveau de l'oreille moyenne traversant au niveau de l'oreille interne peut également causer une perte auditive de type neurosensorielle (12,52). Une étude rétrospective sur des os temporaux humains a démontré que la présence d'OMCS affecte les cellules ciliées externes et internes surtout au niveau du tour basal de la cochlée (53), ce qui explique l'atteinte neurosensorielle affectant davantage les hautes fréquences chez les patients affectés (52).

L'OCMS peut causer des complications extra-crâniennes et intra-crâniennes sérieuses, variant de 0.7% à 3.2 % (12,14). Les complications extra-crâniennes les plus fréquentes sont la paralysie faciale, l'abcès sous-périosté, la mastoïdite ainsi que la labyrinthite. Les complications intra-crâniennes les plus fréquentes sont la méningite, l'abcès cérébral, la thrombose du sinus latéral, l'abcès extra-dural et l'encéphalite (12,54). En 2002, les décès associés à l'otite moyenne chronique ont été estimés à 3599 cas (14), dont 90% se retrouvent dans les pays en développement.

L'émergence croissante de la résistance bactérienne a stimulée la recherche de nouvelles avenues thérapeutiques. L'utilisation de la thérapie photodynamique antimicrobienne avec le bleu de méthylène s'est démontrée prometteuse dans l'éradication de nombreux pathogènes. L'émergence de souches bactériennes résistantes entraîne un défi de taille pour le clinicien. La résistance médicamenteuse à un grand nombre de germes qui augmente tel le SARM, est associée à une augmentation de la morbidité des soins administrés aux patients. Par conséquent, la recherche se penche sur des moyens alternatifs de traitement et contrôle des infections.

La thérapie photodynamique utilise un agent dit photosensibilisant, telle une molécule aromatique, qui lorsqu'exposée à une certaine lumière, absorbe son énergie et subit ainsi des transitions électroniques à l'état « singlet ». Cette molécule peut soit perdre son énergie et ainsi retourner à son état de base, ou peut subir une seconde transition à l'état « triplet ». Encore une fois celle-ci peut retourner à l'état de base ou subir des réactions redox avec l'environnement, où son énergie peut être transférée à la molécule d'oxygène, formant ainsi une molécule d'oxygène labile, laquelle cause une bactériolyse.

Les phénothiazines, comme le bleu de méthylène et le bleu de toluidine, constituent une famille de colorants bleus. Le bleu de méthylène est utilisé en histologie depuis plus d'un siècle. Le premier cas rapporté de son action photodynamique contre les bactériophages ainsi que les virus, remonte à 1928 et a été décrit par Schultz and Krueger (55). Le bleu de méthylène est utilisé pour l'identification des tissus en chirurgie à des concentrations raisonnablement élevées (normalement 1 g/ml). La toxicité du bleu de méthylène demeure une condition rare. Les effets néfastes les plus rapportés sont généralement bénins, tels qu'une douleur au niveau du site d'injection, une pseudo-cyanose; soit une coloration bleutée de la peau et des muqueuses, et une coloration verdâtre des urines. Toutefois, lorsqu'administré en doses élevées, des effets secondaires majeurs peuvent être rencontrés. Il peut s'agir d'arythmie cardiaque, d'œdème pulmonaire ou d'insuffisance rénale (1). De plus, l'allergie à cet agent est possible. Des cas d'anaphylaxie ou de réaction de type urticaire ont notamment été décrits. *Majithia et al.* (56) ont rapporté un cas de toxicité au bleu de méthylène secondaire à

l'administration de cet agent dans la localisation d'un adénome parathyroïdien peropératoire. Les symptômes rapportés étaient de la confusion, de la désinhibition et de l'aphasie transitoire, avec un retour à l'état de base après 48 heures.

Dans le domaine otologique, l'utilisation du bleu de méthylène est peu décrite, et touche surtout la tympanoplastie (57). En effet, *Talas et al.* ont décrit son utilisation afin de faciliter la mise en place de la greffe tympanique. Aucun effet indésirable n'a été rencontré avec l'utilisation de bleu de méthylène dans leur technique. Également, une étude de *Vaiman et al.* (58) a investigué l'utilité de cet agent dans la tympanoplastie pour l'apprentissage de cette technique dans l'enseignement chirurgical à travers une étude randomisée. Lors des tympanoplasties, les auteurs ont utilisé des greffes imprégnées de bleu de méthylène dans un groupe, comparativement à la technique habituelle sans bleu de méthylène dans le groupe contrôle. Des tests audiologiques ont par la suite été effectués dans les deux groupes. Ceux-ci n'ont pas révélé d'atteinte sur l'audition ou d'autres signes d'ototoxicité.

Cependant à notre connaissance, aucune étude ne décrit directement son potentiel ototoxique. Nos résultats d'analyse par étude de PEATC n'ont pas démontré de perte auditive statistiquement significative dans le groupe ayant été traité par bleu de méthylène intra-tympanique. En effet, la moyenne des pertes auditives pour toutes les fréquences combinées dans le groupe expérimental était de 1,50 dB et n'a pas été illustré comme étant statistiquement significative ($p=0.688$). Par opposition, le groupe contrôle positif ayant été traité avec gentamicine, a présenté une perte moyenne des seuils auditifs pour toutes les fréquences combinées de 66,25 dB ($p<0.001$). De plus, afin de compléter l'analyse du potentiel ototoxique du bleu de méthylène, nous avons mené une étude par immunohistochimie. La caspase-3, un marqueur apoptotique, a été utilisé afin d'étudier l'atteinte cellulaire au niveau de la cochlée. Alors que le groupe contrôle positif traité à la gentamicine a présenté une forte captation de caspase-3, le groupe traité au bleu de méthylène n'a pas exposé d'apoptose cellulaire significative. Par conséquent, nous n'avons pas mis en évidence d'ototoxicité en utilisant des doses de bleu de méthylène de 300 mcg/ml en injection intra-tympanique chez le cochon d'Inde.

La TPDa a été démontrée efficace contre une vaste variété de pathogènes in vitro, tels le *Staphylococcus* et le *Pseudomonas* (59), ainsi que des mycoses comme le *Candida* (39,60). Plusieurs études ont même démontré l'efficacité de cette modalité de traitement dans des modèles in vivo. *Zolfaghari et al.*(3) ont démontré que la TPDa in vivo était efficace pour la réduction du nombre total de SARM viable dans une plaie sur un modèle vivant de souris en utilisant du bleu de méthylène comme agent photosensibilisant à des doses de 100 mcg/ml. De plus, l'étude histologique des plaies n'a pas démontré de nécrose aux tissus collatéraux ou de modifications de l'architecture cellulaire. Il a même été démontré que la dose nécessaire en thérapie photodynamique, étant largement plus petite, est bien moins élevée que celle causant une toxicité chez des kératinocytes et fibroblastes humains (55). Une étude de *Usacheva et al* (61) a étudié l'efficacité de la thérapie photodynamique antimicrobienne du bleu de méthylène ainsi que le bleu de toluidine sur l'éradication de plusieurs bactéries. Les doses minimales efficaces pour l'éradication de grams positifs (*S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *S. aureus*) et grams négatifs (*H. influenzae*, *E. Coli*, *P. aeruginosa*) ont été étudiées. Les concentrations minimalement efficaces variaient de 25 à 250 micromoles. Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence un potentiel ototoxique en utilisant des doses de 300 mcg/ml (ce qui équivaut à environ 938 micromoles considérant que la masse molaire du bleu de méthylène est de 319,85 g/mol), soit des doses supérieures à celles démontrées efficaces dans la TPDa avec le bleu de méthylène comme agent photosensibilisant.

À la lumière des résultats des PEATC et de l'étude histologique et immunohistochimique des cochlées des cochons d'Inde, notre étude n'a pas mis en évidence d'effet ototoxique du bleu de méthylène. Ce dernier n'a pas été associé à une augmentation des seuils post-injection et ce, pour toutes les fréquences testées. De plus, aucun changement apoptotique significatif n'a été remarqué lors des analyses histologiques et immunohistochimiques.

Limites et directions futures

Bien que les potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral constituent une méthode fiable d'étudier les seuils auditifs chez les cochons d'Inde, cette technique n'est pas sans faille. En effet, l'appareil disponible pour cette recherche ne permet que de tester des fréquences de 8000 Hz et moins, puisqu'il est configuré pour les êtres humains, et non pour les animaux. Par conséquent, les fréquences plus élevées ne pouvaient être testées par cette méthode. Toutefois afin de compléter l'étude et de combler cette lacune technique, nous avons procédé à des analyses histologiques et immunohistochimiques, qui ont permis d'étudier les cochlées sur toutes leurs longueurs. La cochlée possède une organisation tonotopique. Les basses fréquences se retrouvent à l'apex, alors que les hautes fréquences se retrouvent à sa base. En analysant l'ensemble de la cochlée par histologie et immunohistochimie, nous étudions donc l'ensemble des fréquences, ce qui comble la limite rencontrée par PEATC.

Cette étude s'est penchée sur l'effet ototoxique du bleu de méthylène non photoactivé. Il serait intéressant que des études subséquentes étudient l'effet du bleu de méthylène photoactivé dans l'oreille moyenne, notamment sur son utilisation sécuritaire sur les fonctions motrices et sensibles du nerf facial. En effet celui-ci passe dans l'oreille moyenne et sa partie horizontale est déhiscente dans 20% des cas, ce qui le laisse exposé et donc plus à risque. De plus une branche du nerf facial, la corde du tympan, traverse aussi l'oreille moyenne à nue et sans aucune protection entre l'enclume et le marteau. Celle-ci est responsable de la sensibilité gustative des deux tiers antérieurs de la langue.

D'un autre côté une question se pose : bien que le bleu de méthylène ne s'est pas révélé ototoxique, le serait-il une fois photoactivé?

Pourrait-on étendre les indications du traitement aux patients ayant été opérés pour des mastoïdectomies avec abaissement du mur chez qui des otorrhées persistent?

Des études cliniques sur des êtres humains s'avèrent donc nécessaires afin de préciser les indications ainsi que les limites de cette modalité thérapeutique.

Conclusion

À la lumière de notre étude, en utilisant un modèle animal, nous avons démontré que l'utilisation du bleu de méthylène en injection intratympanique n'avait pas d'effet ototoxique, et donc d'impact délétère sur l'audition.

Cependant, notre étude n'a pas évalué l'effet ototoxique du bleu de méthylène photoactivé, et ceci pourrait faire l'objet de projets futurs. De plus, des recherches supplémentaires sont toutefois nécessaires afin de préciser son utilisation sécuritaire chez l'être humain. D'une part il serait intéressant de se pencher sur l'étude de l'ototoxicité du bleu de méthylène seul, et photoactivé d'autre part.

De plus, la photoactivation du bleu de méthylène pour le traitement de l'otite moyenne chronique suppurée serait-elle applicable cliniquement?

Bibliographie

1. Ginimuge PR, Jyothi SD. Methylene Blue : Revisited. 2010;26(4):517–20.
2. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1:1–21.
3. Zolfaghari PS, Packer S, Singer M, Nair SP, Bennett J, Street C, et al. In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. *BMC Microbiol* [Internet]. 2009 Jan [cited 2012 Nov 26];9:27. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2642833&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Wainwright M, Crossley KB. Methylene Blue--a therapeutic dye for all seasons? *J Chemother* [Internet]. 2002 Oct;14(5):431–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12462423>
5. Nakonechny F, Nisnevitch M. New techniques in antimicrobial photodynamic therapy: scope of application and overcoming drug resistance in nosocomial infections. *Sci against Microb ...* [Internet]. 2011;684–91. Available from: <http://www.formatex.info/microbiology3/book/684-691.pdf>
6. Merrill A. Biel, MD PhD^{1, 2}, Chet Sievert², Marina Usacheva, PhD, MSc² MT, Balcom³ and J. Antimicrobial Photodynamic Therapy Treatment of Chronic Recurrent Sinusitis Biofilms. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2012;1(5):329–34.
7. Peloi LS, Soares RRS, Biondo CEG, Souza VR, Hioka N, Kimura E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci* [Internet]. 2008 Jun;33(2):231–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18535357>
8. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007;86:694–707.
9. Runge-samuelson CL, Friedland DR. *Flint : Cummings Otolaryngology : Head & Neck Surgery*, 5th ed . CHAPTER 128 – Anatomy of the Auditory System Cochlear Anatomy Osteology. 2010;
10. Chien W, Lee DJ. *Flint : Cummings Otolaryngology : Head & Neck Surgery*, 5th ed . CHAPTER 129 – Physiology of the Auditory System. 2010;
11. Future Programme Developments For Prevention Of Deafness And Hearing Impairment. Geneva: Report of the 4th Informal Consultation WHO, 2000;

12. Verhoeff M, Van Der Veen EL, Rovers MM, Sanders E a M, Schilder AGM. Chronic suppurative otitis media: A review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2006;70:1–12.
13. Bluestone CD. Epidemiology and pathogenesis of chronic suppurative otitis media: implications for prevention and treatment. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1998;42(November 1996):207–23.
14. Acuin J. Ear , nose , and throat disorders Chronic suppurative otitis media Search date January 2007 Ear , nose , and throat disorders Chronic suppurative otitis media. 2007;(May 2010):1–41.
15. Bluestone CD. Studies in otitis media: Children’s Hospital of Pittsburgh-University of Pittsburgh progress report--2004. *Laryngoscope*. 2004;114(November):1–26.
16. Bluestone CD. Pathogenesis of otitis media: role of eustachian tube. *The Pediatric infectious disease journal*. 1996. p. 281–91.
17. Velepik MM, Velepik MS, Starcevic R, Manestar D, Rozmanic V. Gastroesophageal reflux and sequelae of chronic tubotympanal disorders in children. *Acta Otolaryngol*. 2004;124:914–7.
18. Temporal Bone Histopathology in Chronically Infected Ears With Intact and Perforated Tympanic Membranes.pdf.
19. Deb T, Ray D. A Study of the Bacteriological Profile of Chronic Suppurative Otitis Media in Agartala. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;64(December):326–9.
20. Ho Ahn J, Kim M-N, Suk Y, Moon BJ. Preoperative, Intraoperative, and Postoperative Results of Bacterial Culture From Patients With Chronic Suppurative Otitis Media. *Otol Neurotol*. 2012;33:54–9.
21. Lewis KIM, Lewis KIM, Suspects THEU, Suspects THEU. Riddle of Bio Im Resistance. *Society*. 2001;45(4):999–1007.
22. Stewart PS, William Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358:135–8.
23. Stenfors LE, Raisanen S. Immunoglobulin-coated bacteria in effusions from secretory and chronic suppurative otitis media. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg*. 1991;12:161–4.
24. Acuin J, Smith a, Mackenzie I. WITHDRAWN: Interventions for chronic suppurative otitis media. *Cochrane Database Syst Rev*. 1998;(4):CD000473.

25. Hannley MT, Denny JC, Holzer SS. Use of otological antibiotics in treating 3 common ear diseases. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;122:934–40.
26. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001;74(5):656–69.
27. Tubby S. The effect of light-activated antimicrobial agents on bacterial virulence factors and key modulators of inflammation. 2011; Available from: <http://discovery.ucl.ac.uk/1318137/>
28. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers Med Sci.* 2009;24(2):259–68.
29. Wainwright M. The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2:263–72.
30. Dai T, Huang Y-Y, Hambiln MR. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. 2010;6(617):170–88.
31. Amaral L, Viveiros M, Molnar J. Antimicrobial activity of phenothiazines. In *Vivo* (Brooklyn). 2004;18:725–32.
32. Hajim KI, Salih DS, Rassam YZ. Laser light combined with a photosensitizer may eliminate methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Lasers Med Sci.* 2010;25:743–8.
33. Miyabe M, Junqueira JC, Costa ACBP Da, Jorge AOC, Ribeiro MS, Feist IS. Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus* spp. *Braz Oral Res* [Internet]. 2011;25(3):230–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21359491>
34. Rolim JPML, De-Melo M a S, Guedes SF, Albuquerque-Filho FB, De Souza JR, Nogueira N a P, et al. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;106:40–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.10.001>
35. Schneider M, Kirfel G, Berthold M, Frentzen M, Krause F, Braun A. The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. *Lasers Med Sci.* 2012;27:615–20.
36. Hashimoto MCE, Prates R a., Kato IT, Núñez SC, Courrol LC, Ribeiro MS. Antimicrobial photodynamic therapy on drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-induced infection. An in vivo study. *Photochem Photobiol.* 2012;88(15):590–5.

37. Lyon JP, Moreira LM, de Moraes PCG, dos Santos FV, de Resende MA. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. *Mycoses*. 2011;54:1–7.
38. Gomer CJ. Photodynamic Therapy Methods and Protocols [Internet]. *Journal of the ...* 1998. Available from: <http://jnci.oxfordjournals.org/content/90/12/889.short>
39. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2005;78:1–6.
40. Giroldo LM, Felipe MP, De Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2009;24:109–12.
41. Borges B, Barros DC, Santos J, Andrade C De, I LBG, Ribeiro G, et al. MODELS , BIOLOGICAL Micro-endoscopic ear anatomy of guinea pig applied to experimental surgery 1. 29:7–11.
42. Olfert E (Ccpa), Cross B, McWilliam A. Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation [Internet]. 1993. 1-311 p. Available from: http://ccac.ca/Documents/Normes/Lignes_directrices/Experimentation_animaux_Vol1.pdf
43. Snedecor GW. Calculation and interpretation of analysis of variance and covariance. 1934;3–20.
44. Nader M-E, Saliba I. Ototoxicity of Intratympanic Docusate Sodium and Mineral Oil in the Guinea Pig. *Otolaryngol -- Head Neck Surg*. 2012;146(3):455–60.
45. Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot (Tokyo)*. 2009;62(November 2008):5–16.
46. Ball P. Conclusions : the future of antimicrobial therapy – Augmentin ® and beyond □. 2007;139–41.
47. Owens RC. Antimicrobial stewardship: concepts and strategies in the 21st century. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;61:110–28.
48. Barber M. Staphylococcal Infection due to Penicillin-resistant Strains. *Br Med J*. 1948;1:27–8.
49. Deleo FR, Deleo FR, Chambers HF, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant. 2009;119(9).

50. Perera G, Hay R. A guide to antibiotic resistance in bacterial skin infections. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2005;19:531–45.
51. Katz ML, Mueller L V, Polyakov M, Weinstock SF. Where have all the antibiotic patents gone? *Nat Biotechnol*. 2006;24(12):1529–31.
52. Papp Z, Rezes S, Jókay I, Sziklai I. Sensorineural hearing loss in chronic otitis media. *Otol Neurotol* [Internet]. 2003;24:141–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12621323>
53. Cureoglu S, Schachern P a, Paparella MM, Lindgren BR. Cochlear changes in chronic otitis media. *Laryngoscope*. 2004;114(April):622–6.
54. Trimis G, Mostrou G, Lourida a., Prodromou F, Syriopoulou V, Theodoridou M. Petrositis and cerebellar abscess complicating chronic otitis media. *J Paediatr Child Health*. 2003;39(December 2002):635–6.
55. Wainwright M, Pr P. Review Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998;42:13–28.
56. Majithia a, Stearns MP. Methylene blue toxicity following infusion to localize parathyroid adenoma. *J Laryngol Otol*. 2006;120(July 2005):138–40.
57. Talas D, Nguyen-Huynh A, Blevins NH. Intraoperative staining of tympanoplasty grafts: A technique to facilitate graft placement. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2008. p. 682–3.
58. Vaiman M, Sarfaty S, Gavriel H, Kraus M, Kaplan D, Puterman M. Intravital staining with methylene blue in tympanoplasty. *Eur Arch Otorhinolaryngol* [Internet]. 2010 Sep [cited 2012 Dec 20];267(9):1351–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20563593>
59. Nakonechny F, Firer M a, Nitzan Y, Nisnevitch M. Intracellular antimicrobial photodynamic therapy: a novel technique for efficient eradication of pathogenic bacteria. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2010 [cited 2012 Dec 1];86(6):1350–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880227>
60. Haidaris CG, Foster TH, Waldman DL, Mathes EJ, McNamara J, Curran T. Effective photodynamic therapy against microbial populations in human deep tissue abscess aspirates. *Lasers Surg Med*. 2013;45(August):509–16.
61. Usacheva MN, Teichert MC, Biel M a. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*. 2001;29(February):165–73.

