

Université de Montréal

**Le rôle du lactate et du N-acétylcystéine
intra-tympanique dans la prévention de l'ototoxicité
secondaire au cisplatine**

par

Marc-Elie Nader, M.D.

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.
en Sciences Biomédicales

Août, 2010

© Marc-Elie Nader MD, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

Le rôle du lactate et du N-acétylcystéine intra-tympanique dans la prévention de
l'ototoxicité secondaire au cisplatine

Présenté par :

Marc-Elie Nader M.D.

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Chantal Giguère M.D, M.Sc, F.R.C.S.C
Président-rapporteur

Issam Saliba M.D, F.R.C.S.C
Directeur de Recherche

Louis Guertin M.D, F.R.C.S.C
Membre du jury

I. RÉSUMÉ FRANÇAIS

Objectifs

Aucun agent n'a été approuvé pour prévenir l'ototoxicité secondaire au cisplatine. Nos objectifs consistaient à évaluer la protection auditive offerte par le lactate et le N-acétylcystéine (NAC) intra-tympaniques après injection de cisplatine, ainsi que l'absorption systémique du NAC intra-tympanique.

Méthodes

Seize cochons d'inde formaient 2 groupes ayant reçu une solution de lactate et de NAC à 20% dans l'oreille testée. L'oreille contro-latérale a reçu une solution saline contrôle. Après 30 minutes, une injection intrapéritonéale de 3 mg/kg de cisplatine a été effectuée et répétée une fois par semaine jusqu'à une dose finale de 24 mg/kg. Les potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral (PEATC) ont été mesurés avant les injections, après 9 mg/kg et 24 mg/kg de cisplatine. Les cochlées ont été analysées au microscope électronique à balayage. La diffusion systémique du NAC a été évaluée par chromatographie en phase liquide.

Résultats

Pour les oreilles contrôles, les seuils auditifs des PEATC ont augmenté uniformément sur toutes les fréquences (28,4 dB en moyenne). Le groupe lactate montrait une augmentation moins importante (17,0 dB). Les basses fréquences étaient nettement moins affectées. Le groupe NAC a subi une augmentation des seuils de 89 dB. La microscopie électronique a démontré une préservation partielle des cellules ciliées externes des cochlées traitées au lactate et une destruction complète de celles traitées au NAC. La chromatographie n'a démontré aucune diffusion de NAC.

Conclusions

Le lactate offre une protection partielle significative contre l'ototoxicité induite par le cisplatine. Les injections de NAC n'offrent pas de protection lorsque administrées en concentrations élevées. Le NAC intra-tympanique ne se diffuse pas systémiquement.

Mots-clés : Cisplatine, ototoxicité, intra-tympanique, transtympanique, lactate, n-acétylcystéine, chromatographie, microscopie électronique

II. RÉSUMÉ ANGLAIS – ABSTRACT

Objectives

There is no approved agent to prevent cisplatin-induced ototoxicity. Our objectives are to identify and compare the protective effect of intratympanic injections of lactate or N-acetylcysteine (NAC) in the prevention of cisplatin-induced ototoxicity and to study systemic diffusion of intratympanic NAC.

Methods

Sixteen guinea pigs, forming two groups, received respectively intratympanic lactate and 20% NAC in one ear. The contra-lateral ears received a control saline solution. After 30 minutes, an intra-peritoneal cisplatin injection of 3 mg/kg was performed and repeated once a week to achieve a final dose of 24mg/kg. Auditory brainstem responses (ABR) were recorded before any injection, after 9mg/kg and after 24mg/kg of cisplatin for the frequencies 2, 4, 6 and 8kHz. Cochleas were analyzed under scanning electron microscope. Systemic diffusion of NAC was studied using high performance liquid chromatography.

Results

For the control ears, ABR thresholds increased uniformly by an average of 28.4dB. The lactate group showed a lower threshold increase by an average of 17.0dB. The NAC showed an important threshold increase of 89.0dB. Lactate showed a significant hearing protection at 2000Hz ($p < 0.01$). Electron microscopy revealed partial preservation of cochlear outer hair cells stereocilia for the ears treated with lactate and severe disruption for NAC group. No systemic diffusion of NAC was observed with chromatography.

Conclusion

Lactate offers significant partial protection against cisplatin-induced ototoxicity. NAC does not offer any protection when administered in high concentrations. Intratympanic NAC does not diffuse systemically.

Keywords : Cisplatin, ototoxicity, intra-tympanic, transtympanic, lactate, n-acetylcysteine, chromatography, electronic microscopy

III. LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN = acide désoxyribonucléique

EDTA = acide éthylènediaminetétraacétique

ERO = espèces réactives oxygénées

GST = glutathione-S-transférases

Gy = unité gray

LDH = lactate déhydrogénase

mAU = milli-absorbance unit

mg/m² = Milligramme par la surface corporelle du patient mesurée en mètre carré; mesure de dosage de chimiothérapie

NAC = N-acétylcystéine

NADH = état réduit de la nicotinamide adénine dinucléotide

NFkB = facteur nucléaire kappa B

PEATC = potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral

P = valeur de signification statistique

XPC = xeroderma pigmentosum complementary group C

IV. TABLE DES MATIÈRES

I. Résumé français	i
II. Résumé anglais	ii
III. Liste des sigles et abréviations	iii
IV. Table des matières	iv
V. Dédicace	vi
VI. Remerciements	vii
VII. Introduction	1
VIII. Objectifs	4
IX. Recension des écrits	5
IX.I Anatomie et physiologie de l'audition	5
IX.I.a Figure I	7
IX.II Caractéristiques de l'ototoxicité secondaire au cisplatine	7
IX.II.a Présentation clinique	7
IX.II.b Trouvailles histologiques	9
IX.II.c Prédispositions génétiques	10
IX.II.d Pathophysiologie cellulaire et moléculaire	11
IX.III La prévention de l'ototoxicité secondaire au cisplatine	14
IX.III.a Études cliniques	14
IX.III.b Études animales	16
X. Méthodologie	21
X.I Modèle animal	21
X.II Administration de la chimiothérapie et des agents protecteurs	22

X.III	Protocole d'anesthésie	23
X.IV	Enregistrement des PEATC	23
X.V	Chromatographie à haute pression en phase liquide	24
X.VI	Protocole de microscopie électronique	25
X.VI.a	Fixation initiale par perfusion intracardiaque	25
X.VI.b	Dissection de l'os temporal	26
X.VI.c	Dissection des cochlées	26
X.VII	Analyse statistique	27
XI.	Résultats	28
XI.I	PEATC : groupe contrôle	28
XI.II	PEATC : groupe lactate	28
XI.III	PEATC : groupe NAC	29
XI.IV	Chromatographie à haute pression en phase liquide	29
XI.V	Microscopie électronique	29
XI.VI	Table I	30
XI.VII	Table II	31
XI.VIII	Figure II	32
XI.IX	Figure III	33
XI.X	Figure IV	34
XI.XI	Figure V	35
XII.	Discussion	36
XIII.	Conclusion	42
XIV.	Bibliographie	43

V. DÉDICACE

À mes parents et à mes professeurs qui ont été pour moi un exemple de persévérance, de soif de connaissances et sans qui ce projet n'aurait pu être réalisé.

VI. REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble de mes professeurs qui ont investi temps et énergie pour me permettre d'accomplir mes travaux, et plus particulièrement Dr Saliba qui m'a transmis sa passion pour la recherche par sa générosité et son enthousiasme contagieux.

Je remercie aussi toute l'équipe de l'animalerie, celle de la microscopie électronique ainsi que Mlle Valérie Ouellette et Dr Théorêt pour leur support technique et leurs conseils judicieux.

VII. INTRODUCTION

Le cisplatine est un agent chimiothérapeutique à base de platine qui a révolutionné le traitement de certaines néoplasies dans les trois dernières décennies. Son efficacité a été démontrée pour les tumeurs solides affectant les organes tels les poumons et l'œsophage, les systèmes gastrointestinaux et génito-urinaires de même que la région de la tête et du cou.¹ Un concept de base en oncologie médicale stipule que l'action chimiothérapeutique est déterminée par la dose de médicament administrée et tolérée par les patients. Celle-ci dépend à son tour des toxicités et effets secondaires associés à l'agent chimiothérapeutique qui montrent souvent une corrélation au dosage de ce dernier. Ainsi, l'utilisation clinique du cisplatine s'est vue limitée par des effets indésirables incluant la neurotoxicité, la myélosuppression, la toxicité gastro-intestinale, la néphrotoxicité et l'ototoxicité. Comme la réponse au traitement chimiothérapeutique et, ultimement, la survie des patients dépendent de l'administration d'un dosage adéquat, plusieurs efforts ont été mis en place pour limiter ou prévenir ces toxicités. Des techniques ont pu donc être développées pour limiter la plupart des effets secondaires associés au cisplatine à l'exception de l'ototoxicité pour laquelle aucun traitement médical ou moyen de prévention n'est présentement approuvé pour l'usage clinique. La perte auditive résultant de l'usage du cisplatine est permanente et irréversible et affecte un nombre substantiel de patients. Elle est donc devenue un important facteur qui limite le dosage et la tolérance à cet agent chimiothérapeutique.²

Actuellement, la recherche médicale a été axée sur des modèles animaux afin de mettre au point des techniques pouvant prévenir cette ototoxicité. Celles-ci sont basées sur

l'administration d'un agent concomittant à la chimiothérapie qui inactiverait l'effet du cisplatine sur l'oreille interne et qui, idéalement, n'affecterait pas sa fonction anti-néoplasique sur la tumeur. Certaines études ont montré des résultats prometteurs avec l'utilisation d'agents aux propriétés anti-oxydantes. Différentes voies d'administration ont aussi été étudiées, incluant l'injection systémique, l'injection intra-tympanique et l'instillation de la fenêtré ronde. L'injection systémique, bien qu'elle soit une méthode plus pratique pour l'administration de médicaments, pose le risque que l'agent injecté neutralise la chimiothérapie et diminue son efficacité anti-tumorale. Par contre, l'injection intra-tympanique est une technique facilement applicable dans le contexte clinique qui permet l'administration de médicaments directement dans l'oreille moyenne à travers la membrane tympanique, évitant ainsi théoriquement leur diffusion systémique.

Pour ce projet, le lactate et le N-acétylcystéine (NAC) ont été choisis, car leur utilisation chez l'humain est reconnue sécuritaire et parce qu'une étude antérieure a dévoilé des résultats prometteurs avec ces deux produits. En effet, Choe et al. ont évalué la protection auditive offerte par le lactate intra-tympanique lors de l'administration de cisplatine chez le cobaye et ont trouvé une préservation quasi totale des émissions otoacoustiques de distorsion. À notre connaissance, aucune autre étude n'a confirmé ces propriétés oto-protectrices du lactate en utilisant d'autres méthodes plus approfondies que les émissions otoacoustiques. Similairement, le même groupe a découvert qu'une solution de NAC à 2% intratympanique permettait la préservation partielle des émissions otoacoustiques.³ Finalement, la diffusion systémique du NAC après injection dans l'oreille moyenne n'a

jamais été analysée. Ceci pourrait être une source de problème, car le NAC contient un groupe thiol qui pourrait former un complexe avec le cisplatine et le désactiver s'il se retrouve dans la circulation systémique.

VIII. OBJECTIFS

Le premier objectif de ce travail vise à identifier et à comparer l'effet protecteur sur l'audition du lactate et du NAC à 20% intra-tympaniques lors de traitements au cisplatine.

Le second objectif est d'évaluer les effets de ces injections sur l'architecture histologique de l'oreille interne au microscope électronique à balayage.

Le dernier objectif consiste à mesurer la diffusion systémique d'une solution de NAC à 20% injectée dans l'oreille moyenne à l'aide de la chromatographie à haute pression en phase liquide.

IX. RECENSION DE LA LITTERATURE

IX.I Anatomie et physiologie de l'audition

Une connaissance de concepts de base au sujet de l'anatomie et de la physiologie de l'oreille est essentielle pour comprendre l'effet du cisplatine sur l'organe de l'oreille, les méthodes de mesure de l'audition disponibles en recherche animale et le fonctionnement des techniques de prévention de l'ototoxicité associée à la chimiothérapie.

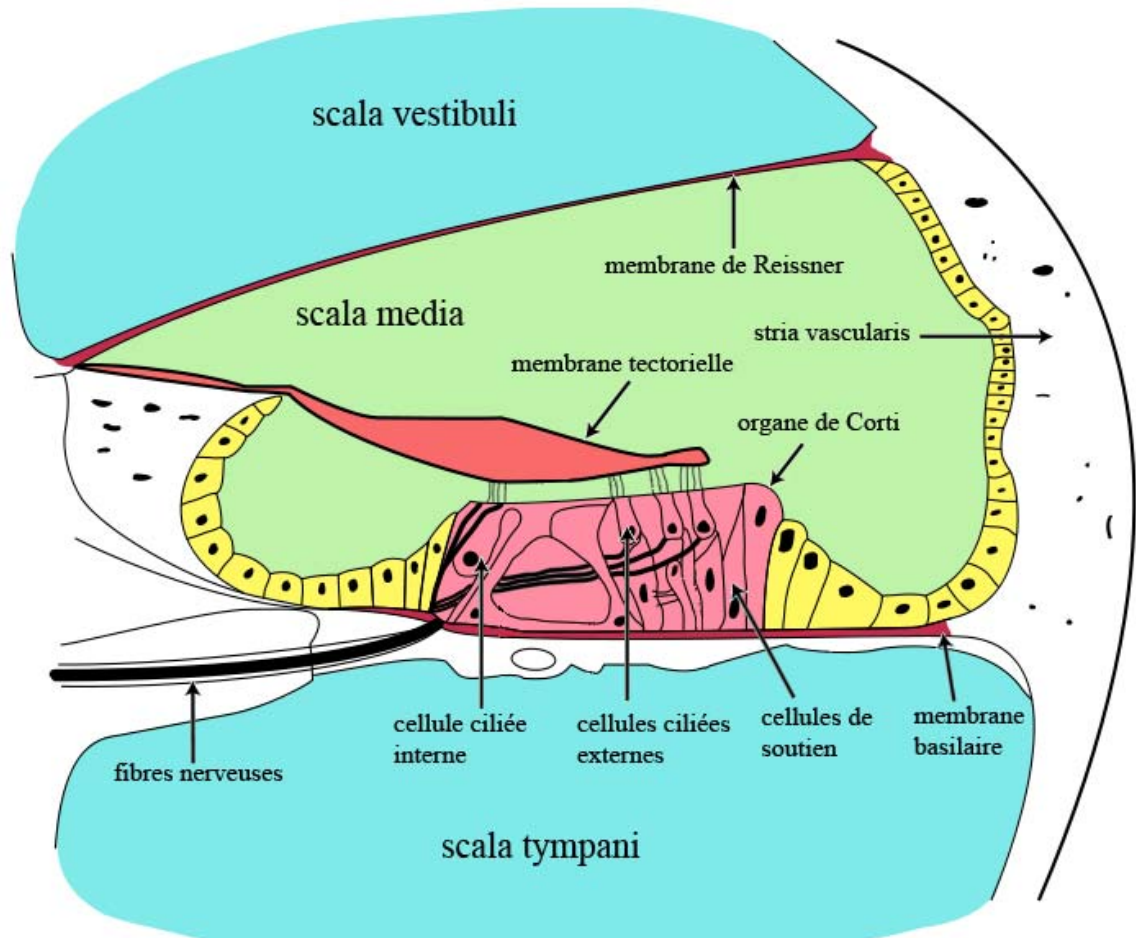
Chez les mammifères, l'organe de l'audition est séparé en trois compartiments. L'oreille externe, composée du conduit auditif externe et de la membrane tympanique, et l'oreille moyenne, contenant trois osselets, permettent une amplification et une transmission mécanique de l'onde sonore jusqu'à l'oreille interne. Celle-ci est contenue dans l'apex pétreux de l'os temporal, plus précisément dans le labyrinthe osseux. Le labyrinthe osseux inclut trois sections, notamment le vestibule, la cochlée et les canaux semi-circulaires. Le point de communication entre l'oreille moyenne et l'oreille interne se fait au niveau de la fenêtre ovale du vestibule où se retrouve la platine de l'étrier. La cochlée montre une morphologie similaire à la coquille d'un escargot avec un canal osseux en forme de spirale qui fait 2 ½ tours chez l'humain, débutant à une base large jusqu'à un apex de diamètre plus fin. Il est à noter que la cochlée montre une organisation tonotopique avec les basses fréquences détectées à l'apex et les hautes fréquences au tour basal. À la base de la cochlée se trouve la fenêtre ronde qui donne sur l'espace de l'oreille moyenne. Les produits injectés dans l'oreille moyenne doivent donc traverser la membrane de la fenêtre ronde pour

atteindre les cellules cochléaires. Le centre de la cochlée est formé par le modiolus duquel provient la lamina spiralis, une étagère osseuse qui divise la cochlée en deux chambres, la scala vestibuli et la scala tympani. Le labyrinthe membraneux suit les formes de l'os cochléaire et délimite une troisième chambre, la scala média. L'organe sensoriel, appelé organe de Corti, se retrouve sur la membrane basilaire qui forme la bordure inférieure du labyrinthe membraneux. La limite supérieure de ce dernier est formée par la membrane de Reissner et sa portion latérale est composée du mur cochléaire où est localisé le ligament spiral. Adjacent à celui-ci, on retrouve la stria vascularis qui est responsable de l'environnement métabolique de la scala média.

L'organe de Corti réside sur la longueur de la membrane basilaire et contient des cellules de support et les cellules ciliées internes et externes. Médialement, au dessus de la lamina spiralis se retrouve le limbus spiral auquel est attachée la membrane de Reissner et qui donne naissance à la membrane tectorielle. Celle-ci, composée d'une substance gélatineuse, recouvre les cellules ciliées. Il existe une rangée de cellules ciliées internes, les véritables récepteurs qui transforment l'onde mécanique en signal électro-chimique envoyé à travers le nerf auditif. Latéralement, les cellules ciliées externes forment trois rangées. Sur chaque cellule ciliée se retrouvent plusieurs rangées de stéréocils, deux ou plus pour les cellules ciliées internes et trois ou plus pour les cellules ciliées externes. Entre les cellules ciliées externes résident les cellules de soutien. Les dommages ototoxiques causés par le cisplatine sont localisés au niveau de l'oreille interne. La morphologie et l'organisation spatiale des

stéréocils sont les composantes évaluées lors de l'analyse des cochlées au microscope électronique à balayage (section X.VI).⁴

IX.I.a Figure 1 : Coupe transversale de la cochlée



Source : adaptée de <http://en.wikipedia.org/wiki/Cochlea>

IX.II Caractéristiques de l'ototoxicité secondaire au cisplatine

a) Présentation clinique

L'ototoxicité secondaire au cisplatine est une complication reconnue depuis plus de 35 ans.⁵

Elle varie de 23 à 54%² chez les patients adultes bien que certaines séries démontrent une

atteinte qui peut s'élever jusqu'à 75 à 100% des patients.⁶ Plusieurs facteurs de risque augmentant la fréquence et l'amplitude des symptômes otologiques ont été identifiés. La dose cumulative de chimiothérapie est l'un des facteurs les plus importants auquel est corrélié non seulement le pourcentage de patients atteints mais aussi la sévérité des symptômes. Ainsi, Bokemeyer et al. ont déterminé qu'une atteinte ototoxique est présente chez 60% des patients recevant > 600 mg/m² de cisplatine alors qu'elle n'affecte que 20% des patients traités pour cancer testiculaire avec des doses en moyenne moins élevées.⁷ Un historique de perte auditive neurosensorielle et d'exposition au bruit pré-chimiothérapie semble aussi augmenter le risque d'atteinte auditive secondaire au cisplatine, tel que noté dans des études cliniques rétrospectives^{7, 8, 9} et des projets expérimentaux.^{10, 11} D'autres facteurs de risques incluent l'administration conjointe d'agents ototoxiques⁷, l'état nutritionnel¹², ainsi qu'une baisse de marqueurs sanguins tels l'hémoglobine, les globules rouges et l'albumine.¹³ L'irradiation crânienne augmente aussi la probabilité et la sévérité de la perte d'audition surtout lorsqu'une dose dépassant 48 Gy est donnée.^{14, 15} Finalement, l'âge semble influencer la sévérité des symptômes otologiques; les enfants sont plus susceptibles de développer une perte auditive secondaire au cisplatine.^{2, 16} Ceci peut être particulièrement détrimental pour le développement du langage et des aptitudes cognitives et sociales pour les enfants en bas âge.

Les symptômes otologiques associés à l'ototoxicité secondaire au cisplatine incluent une perte auditive, de l'acouphène et moins fréquemment l'otalgie. L'acouphène peut affecter jusqu'à un tiers des patients^{7, 17} mais peut être réversible chez les personnes ayant reçu

moins de 525 mg/m² de cisplatine.⁷ L'hypoacousie, quant à elle, est souvent bilatérale, permanente et irréversible. Elle touche d'abord les hautes fréquences, mais les fréquences moyennes peuvent aussi être affectées surtout avec des dosages plus élevés de chimiothérapie.⁷ La perte auditive peut survenir quelques heures ou quelques jours après l'administration du cisplatine. Toutefois, elle peut continuer à progresser plusieurs semaines, voire plusieurs mois après la fin des traitements et son apparition peut être, elle aussi, tardive. En effet, une étude avait montré un temps médian de 135 jours avant l'apparition d'une perte auditive significative chez des enfants recevant un traitement de chimiothérapie à base de cisplatine.^{18, 19}

b) Trouvailles histologiques

L'ototoxicité secondaire au cisplatine engendre de multiples changements cellulaires au niveau de la cochlée. Les cellules ciliées externes et leurs cellules de support sont les principaux éléments atteints. On retrouve une corrélation entre la localisation et le degré du dommage de ces cellules et la sévérité et la fréquence de la perte auditive.²⁰ Ainsi ce sont les cellules ciliées externes du tour basal qui sont principalement détruites, ce qui correspond à une perte auditive des hautes fréquences expliquée par l'organisation tonotopique de la cochlée telle que décrite ci-dessus. La destruction peut progresser vers les tours moyens et apicaux avec l'administration de doses plus élevées de cisplatine.²¹ La dégénérescence de ces cellules est caractérisée par la formation de vacuoles intracellulaires et par la perte des stéréocils de surface.²² D'autres composantes de la cochlée peuvent aussi subir des altérations, notamment les cellules ciliées internes, la stria vascularis, le ganglion

spiral et le nerf cochléaire.²¹ Un affaissement de la membrane de Reissner a aussi été décrit après l'administration de doses élevées de cisplatine.²¹ Les études d'os temporaux humains ont révélé que les modifications histologiques chez les humains sont similaires à celles chez les animaux avec l'exception d'une atteinte des cellules ciliées internes chez l'homme.^{21, 23}

c) Prédispositions génétiques

Récemment, des liens ont été mis en évidence entre des polymorphismes génétiques et une susceptibilité à développer une ototoxicité secondaire au cisplatine. Oldenburg et al. ont étudié les polymorphismes des gènes correspondant aux enzymes qui détoxifient et éliminent le cisplatine, notamment les glutathione-S-transférases (GST), chez des patients traités pour un cancer testiculaire. Ils ont noté que la perte auditive était jusqu'à quatre fois plus fréquente chez les patients présentant les polymorphismes 105Ile/105Ile-GSTP1 et 105Val/105Ile-GSTP1 comparé à 105Val/105 Val -GSTP1. Ils ont pu ainsi identifier des profils génétiques spécifiques à ces enzymes qui modifient la probabilité d'atteinte auditive.²⁴ De même, Barahmani et al. ont découvert que la présence d'un génotype nul pour certains polymorphismes de ces enzymes, les GSTM1 et GSTT1, octroyait un risque accru d'ototoxicité chez des patients pédiatriques.²⁵

Comme le cisplatine produit des liaisons croisées au sein de l'ADN, les gènes réparateurs par excision de nucléotides ont été le sujet d'études récentes. Caronia et al. ont analysé huit polymorphismes de ces gènes chez des patients traités par cisplatine pour ostéosarcome. L'ototoxicité était associée à un polymorphisme distinct du *xeroderma pigmentosum complementary group C* (XPC), le génotype CC du XPC Lys939Gln.²⁶

La mégaline, une lipoprotéine de basse densité, est retrouvée en grande quantité dans le rein et la stria vascularis de la cochlée, deux tissus qui tendent à accumuler des adduits d'ADN-platine. Riedemann et al. ont observé qu'un polymorphisme spécifique de cette lipoprotéine était retrouvé plus fréquemment chez les patients souffrant d'hypoacousie suite au cisplatine.²⁷

d) Pathophysiologie cellulaire et moléculaire

Le cisplatine est un complexe métallique inorganique qui exerce son action cytotoxique à travers sa forme aqueuse hydrolysée, le cisdiammineaquachloroplatinum (II). Il est efficace pendant tous les cycles de division cellulaire, et produit des liaisons croisées au niveau de l'ADN inhibant ainsi la synthèse et la fonction de celui-ci.^{1, 28} Les mécanismes intracellulaires responsables de son ototoxicité ont été le sujet d'intenses recherches au cours de la dernière décennie. Le cisplatine interagit avec les composantes tissulaires de la cochlée décrites dans la section IX.I pour engendrer la formation d'espèces réactives oxygénées (ERO) qui sont au cœur de la destruction cellulaire de l'oreille interne.^{29, 30, 31, 32,}
³³ Simultanément, le cisplatine produit une déplétion des enzymes antioxydantes dont le rôle est de neutraliser ces ERO.³⁴ Vue la localisation anatomique spécifique de la cochlée qui s'apparente à un système clos, le cisplatine et les ERO ont tendance à s'accumuler dans les tissus cochléaires. Cette surcharge d'ERO combinée à un système enzymatique antioxydant moins efficace explique l'importance des dommages cellulaires.

Ces ERO sont à l'origine de plusieurs réactions chimiques : ils peuvent (1) interagir avec le monoxyde d'azote et former des peroxy-nitrites qui produisent une nitrosylation et une désactivation des protéines^{35, 36} (2) former des radicaux libres qui, après interaction avec le fer, réagissent avec les acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire pour créer l'aldéhyde 4-hydroxynonéal, une molécule hautement toxique^{35, 36} cette dernière a été associée à une augmentation de l'influx calcique dans les cellules ciliées externes provoquant leur apoptose^{29, 37} (3) inactiver les enzymes antioxydantes qui incluent la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathione peroxydase et la glutathione réductase³⁸, et (4) endommager les mitochondries, laissant s'échapper le cytochrome c dans le cytoplasme activant ainsi les caspases 3 et 9. Celles-ci causent une désinhibition de la *caspase activated deoxyribonuclease* qui agit comme une nucléase et clive l'ADN promouvant ainsi l'apoptose cellulaire.^{39, 40}

Une source importante de ces ERO serait une variante de l'enzyme NADPH oxydase, la NOX3. Bânfi et al. ont démontré que cette isoforme enzymatique se retrouve en une concentration 50 fois plus élevée dans l'organe de Corti et dans le ganglion spiral que dans les autres tissus du corps. Ils ont aussi montré que la fonction enzymatique du NOX3 est fortement augmentée dès 24h après administration de cisplatine chez le rat.³³ La monoxyde d'azote synthase inductible est une autre enzyme responsable de la production d'importantes quantités de radicaux libres. Cette molécule a été identifiée au niveau du ligament spiral et de la stria vascularis et sa fonction est régulée par le facteur nucléaire kappa B (NFkB).⁴¹ So et al. ont démontré une augmentation de la transcription du NFkB dans les cochlées de rat traitées par cisplatine. Selon le même groupe, la fonction

otoprotective de deux agents, l'étanercept et la flunarazine, serait secondaire à une sous-régulation de la transcription du gène qui code pour ce facteur nucléaire.⁴² La production des ERO dépend aussi des canaux membraneux qui permettent l'influx intracellulaire de cisplatine, notamment le récepteur vanilloïde de type 1. Celui-ci semble jouer un rôle important dans la dégénérescence des cellules ciliées externes : non seulement permet-il une augmentation du cisplatine dans ces cellules mais aussi une élévation de l'influx calcique et une activation des caspases qui mènent à l'apoptose. De plus, l'expression de ces canaux serait elle-même sur-régulée par les ERO. Le rôle de ce canal a été confirmé par une étude chez le rat qui a montré qu'une suppression de cette molécule par modification génétique diminuait l'expression du NOX3, la production d'ERO et la concentration de calcium intracellulaire, protégeant ainsi les cellules ciliées externes des dommages causés par le cisplatine.⁴³

D'autres voies ont été identifiées par lesquelles le cisplatine promouvoit la destruction cellulaire indépendamment des ERO. Ainsi, le cisplatine active les canaux potassiques de grande conductance dans les fibrocytes du ligament spiral. Ceci affecte la fonction métabolique de la stria vascularis qui conserve en temps normal un environnement ionique adéquat et un haut potentiel membranaire de repos. L'activation de ces canaux mène à une augmentation de l'efflux de potassium, une diminution de la concentration ionique intracellulaire et une perte de la pression osmotique intracellulaire, ce qui active les caspases et mène à l'apoptose.^{44, 45, 46} Un autre mécanisme indépendant des ERO responsable du dommage du cisplatine serait une dysrégulation du système de réparation du

génomique par excision de nucléotide. Tel que décrit précédemment, le cisplatine produit des liaisons croisées avec l'ADN. Ces adduits de cisplatine-ADN sont éliminés par les gènes réparateurs. Une dysfonction de certains de ces gènes tels les *xeroderma pigmentosum complementary group A* et *C* a été identifiée dans les cochlées de rat traitées au cisplatine.⁴⁷

IX.III La prévention de l'ototoxicité secondaire au cisplatine

a) Études cliniques

Jusqu'à présent, aucun produit n'a été approuvé pour prévenir l'ototoxicité secondaire au cisplatine chez l'humain. Peu d'agents ont été évalués dans des projets de recherche clinique. Le thiosulfate, déjà reconnu comme un agent pouvant protéger de la néphrotoxicité due au cisplatine,⁴⁸ est inclus dans certains protocoles de chimio-radiothérapie. Toutefois, il n'a démontré aucune valeur otoprotectrice. Zuur et al. ont étudié les facteurs de risques de développer une perte auditive chez 146 patients recevant un traitement de chimio-radiothérapie à base de cisplatine combiné à un traitement de thiosulfate pour des cancers avancés de la tête et du cou. Malgré l'utilisation du thiosulfate, 23% des oreilles avaient subi une perte auditive suffisamment importante pour justifier l'emploi de prothèses auditives.⁴⁹ L'amifostine est le second produit qui a été évalué dans quelques projets cliniques et qui a montré des résultats mitigés. Certaines études n'ont démontré aucune protection contre l'ototoxicité lorsque ce produit était administré conjointement au cisplatine chez des patients souffrant de mélanome métastatique⁵⁰ ou chez des enfants traités pour des tumeurs germinales par une combinaison de cisplatine, étoposide et bléomycine.^{51, 52} Par contre, une étude plus récente a mis en évidence une protection

auditive significative de ce produit lorsqu'il était donné de façon intra-veineuse à des enfants traités par cisplatine et irradiation crânienne pour un méduloblastome. Un an post-traitement, 14.5% des patients ayant reçu l'amifostine démontraient une perte auditive comparé à 37.1% chez le groupe contrôle. L'amifostine ne semblait pas affecter l'efficacité de la chimiothérapie. Il est à noter que cette étude ne comprenait que 21 patients et que ces résultats n'ont pas été confirmés.⁵³

b) *Études animales*

Puisqu'il n'existe aucun produit approuvé pour l'usage clinique afin de prévenir l'hypoacousie causée par le cisplatine, plusieurs études animales *in vitro* et *in vivo* ont été menées à terme pour découvrir quels agents et quelles voies d'administration seraient les plus efficaces. Comme décrit précédemment, les ERO semblent jouer un rôle prédominant dans l'ototoxicité due au cisplatine. Ainsi, les stratégies de protection auditive incluent l'usage d'agents qui (1) piègent ou captent les radicaux libres, (2) augmentent la production d'antioxydants endogènes, ou (3) diminuent la production de radicaux libres.⁵⁴ D'autres techniques *in vitro* ont utilisé des méthodes de modification de l'ADN afin de supprimer ou d'inactiver les protéines qui participent à l'apoptose cellulaire.⁴³ De même, plusieurs voies d'administrations ont été employées, incluant, pour les études *in vivo*, l'administration systémique ou orale, les injections intra-tympaniques et les injections intracochléaires⁵⁵ et, pour les études *in vitro*, la transfection cellulaire.⁴³

i) *Administration systémique*

La voie d'administration orale ou systémique est la méthode la plus simple pour administrer ces agents chez les patients. Par contre, on doit tenir compte de deux considérations si l'on prévoit employer cette technique. D'une part, le produit doit être capable de passer la barrière entre le sang et l'oreille interne et la concentration sanguine de l'agent doit être suffisante pour se retrouver en quantité adéquate dans la cochlée sans toutefois causer des effets indésirables qui ne peuvent être tolérés. D'autre part, il faut s'assurer que ces produits ne réagissent pas avec le cisplatine et n'inactivent pas son effet

anti-tumoral. Plusieurs des produits testés chez l'animal contiennent un groupe thiol comprenant la molécule de soufre. Celle-ci donne une qualité fortement nucléophile à ces produits qui peuvent alors interagir et former des complexes avec les médicaments à base de platine qui sont eux-mêmes électrophiles.^{56, 57} Il faut aussi tenir compte de la possibilité de condensation par contre-ions qui est un autre mécanisme qui peut affecter l'efficacité de la chimiothérapie. Ceci s'explique par l'agglomération de molécules chargées positivement autour de l'ADN lui-même chargé négativement qui empêche alors la formation d'adduits ADN-platine. Ceci pourrait se produire plus particulièrement avec les agents qui incluent un groupe amine, car celui-ci est chargé positivement au pH physiologique.⁵⁶

La voie d'administration systémique a été évaluée dans plusieurs modèles animaux. Iraz et al. ont étudié les valeurs otoprotectrices de l'aminoguanidine, un inhibiteur de l'enzyme monoxyde d'azote synthase qui empêche la formation de radicaux libres à base d'azote. Ce médicament a été injecté intrapéritonéalement chez un groupe de rats une journée précédant l'injection d'une dose de cisplatine puis cinq jours consécutifs après celle-ci. Une conservation significative des émissions otoacoustiques a été démontrée grâce à cet agent. Toutefois, la fonction sur l'efficacité anti-tumorale du cisplatine n'a pas été étudiée dans ce projet.⁵⁸ Dickey et al. ont étudié le NAC injecté à raison de 400mg/kg de façon intraveineuse 15 minutes avant l'administration de cisplatine. Leur étude a montré une préservation importante des seuils des PEATC.⁵⁹ Par contre, l'impact du NAC sur la fonction du cisplatine n'a pas été étudié. Ceci serait un problème potentiel, car le NAC

contient un groupe thiol qui pourrait causer une interaction telle que décrite ci-dessus. Le salicylate de sodium est un autre agent testé pour sa fonction antioxydante. Minami et al. ont montré qu'une administration sous-cutanée de salicylate de sodium lors d'un traitement à base de cisplatine permettait de réduire l'augmentation des seuils des PEATC. La même étude a démontré une augmentation des antioxydants endogènes de la cochlée après utilisation de cet agent.⁶⁰ La fonction otoprotectrice du salicylate de sodium a été confirmée par Li et al. qui ont démontré une préservation des seuils des PEATC et une conservation partielle des cellules ciliées externes à l'étude histologique des cochlées. De même, leur modèle animal ne montrait pas d'interférence avec la fonction anti-néoplasique du cisplatine.⁶¹ Par contre, la toxicité rénale associée au salicylate de sodium pourrait limiter l'utilisation de ce produit chez l'humain.⁶² Ceci pourrait être particulièrement problématique chez les patients traités par cisplatine à cause de la néphrotoxicité déjà causée par la chimiothérapie. La vitamine E est un capteur de radicaux libres qui a montré un potentiel de protection auditive. Kalkanis et al. ont montré que 4 g/kg de vitamine E donnés 30 minutes avant l'injection de cisplatine chez le rat permettait une préservation des seuils des PEATC aux hautes fréquences. Cet effet protecteur a été confirmé au microscope électronique.⁶³ Cependant, bien que la vitamine E soit bien tolérée chez l'humain à des doses inférieures à 1600 UI/jour, certaines études mettent en garde contre l'utilisation chronique de ce produit qui pourrait augmenter le risque d'insuffisance cardiaque et de mortalité.⁶⁴ Finalement, l'allopurinol, un inhibiteur de la xanthine oxydase, et l'ebiselen qui agit comme la glutathione peroxydase, ont été étudiés en combinaison chez le rat. Ainsi,

ces produits utilisés ensemble montraient une protection auditive et ne semblaient pas affecter la fonction anti-néoplasique du cisplatine.⁶⁵

ii) Administration intra-tympanique

La perfusion intra-tympanique est la deuxième voie d'administration des agents otoprotecteurs applicable dans le contexte clinique. Cette approche permettrait d'éviter certains des désavantages de l'administration systémique. Ainsi, grâce à cette technique, une plus grande concentration de médicament pourrait être introduite dans l'oreille interne en évitant des effets secondaires systémiques et les altérations de l'effet anti-tumoral du cisplatine.⁶⁶ Même si cette technique semble plus invasive que la voie systémique, elle est déjà utilisée de façon routinière dans le traitement de la maladie de Menière.⁶⁷ Il existe deux techniques de perfusions intra-tympaniques. D'une part, on peut injecter en bolus une petite quantité de produit dans l'oreille moyenne. La seconde technique prévoit l'installation d'un dispositif de perfusion, comme les pompes osmotiques, placé en regard de la fenêtre ronde qui libère lentement le médicament. La technique la plus appropriée serait probablement l'injection de bolus d'agent otoprotecteur juste avant chaque thérapie de cisplatine.⁶⁶

Une considération importante à prévoir lors des injections intra-tympaniques est la perfusion du médicament à travers la fenêtre ronde pour passer de l'oreille moyenne à l'oreille interne. Cette facilité de diffusion dépend des propriétés de la fenêtre ronde et de plusieurs caractéristiques du produit injecté, tel son poids moléculaire, sa liposolubilité et sa

charge électrique.⁶⁶ Il est important de noter qu'il existe des différences d'épaisseur entre la fenêtre ronde des animaux et celle des humains. L'épaisseur de cette dernière est de 70 μm alors que celle des rongeurs, comme le chinchilla, mesure de 10 à 14 μm , une différence à considérer lors de l'extrapolation des résultats d'études animales.⁶⁸

L'administration d'agents otoprotecteurs par injection intra-tympanique a déjà été évaluée dans quelques modèles animaux. Korver et al. ont testé la D-méthionine instillée directement sur la fenêtre ronde avant l'administration de cisplatine instillé lui aussi au niveau de la fenêtre ronde. Cette étude a montré une préservation complète des PEATC et une corrélation à la microscopie électronique.⁶⁹ L'effet protecteur du L-méthionine a aussi été prouvé dans une autre étude dans laquelle l'agent a été injecté par mini pompe osmotique sur la fenêtre ronde chez des rats traités par cisplatine systémique.⁷⁰ Comme mentionné précédemment, Choe et al. ont montré que l'administration intra-tympanique de lactate permettait une conservation complète des émissions otoacoustiques chez le cobaye traité au cisplatine et que le NAC intra-tympanique permettait une préservation partielle des émissions otoacoustiques dans le même modèle animal.³ Par contre, cette étude n'a pas évalué la diffusion systémique du NAC intra-tympanique ou son effet sur l'efficacité antitumorale du cisplatine.

X. MÉTHODOLOGIE

X.I Modèle animal

L'étude a été effectuée sur 16 cobayes de type Hartley avec un poids moyen de 393 ± 40 g. Le cochon d'inde a été choisi, car notre laboratoire a une expérience poussée avec cet animal et parce qu'il s'agit d'un modèle animal reconnu pour l'étude de l'ototoxicité. En effet, cet animal possède une membrane tympanique large et une oreille moyenne relativement grande. De plus sa cochlée fait une projection importante dans l'oreille moyenne facilitant ainsi les procédures microchirurgicales.⁷¹ Bien qu'il existe une forte ressemblance entre l'anatomie de l'oreille moyenne et interne du cochon d'inde et celle de l'humain, quelques différences sont à noter. Le cochon d'inde ne possède que deux osselets, avec le marteau et l'enclume formant un complexe osseux compact. De plus, le système des cellules mastoïdiennes est nettement simplifié et ne consiste qu'en quatre larges cellules sans les trabéculationes fines retrouvées chez l'humain. En outre, la cochlée du cochon d'inde comporte de $3 \frac{1}{4}$ à $4 \frac{1}{4}$ tours comparée aux $2 \frac{1}{2}$ tours retrouvés dans la cochlée humaine.^{72, 73} Finalement, l'épaisseur de la fenêtre ronde mesure de 10 à 30 μm chez le cochon d'inde comparée à 70 μm chez l'humain.⁷⁴

Les animaux ont été randomisés dans deux groupes et chaque animal a été utilisé comme son propre contrôle. Le groupe I était composé de 9 sujets qui ont reçu du lactate dans une oreille et une solution de contrôle de 0,9% salin (NS) dans l'oreille contro-latérale. Sept animaux ont été inclus dans le second groupe et ils ont reçu une solution de NAC à 20% dans l'oreille test et la solution de NS dans l'oreille contrôle.

Les animaux ont été traités selon les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux. L'étude a été effectuée suite à l'approbation du comité d'éthique en recherche du centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine.

X.II Administration de la chimiothérapie et des agents protecteurs

Après avoir nettoyé le conduit auditif externe de tout débris au microscope opératoire, le lactate a été injecté lentement à travers le quadrant antéro-inférieur de la membrane tympanique à l'aide d'une aiguille spinale Whitacre. La tête a été positionnée de façon à ce que le conduit auditif externe pointe vers le haut et cette position a été maintenue pendant 30 minutes. L'oreille contro-latérale a été injectée de façon similaire avec une solution de NS. Par la suite, les animaux ont reçu une injection intra-péritonéale de 3 mg/kg de cisplatine. Cette procédure a été répétée une fois par semaine pendant 8 semaines permettant l'administration d'un dosage cumulatif de chimiothérapie de 24 mg/kg. Le même protocole a été employé pour le second groupe traité au NAC.

Le lactate injecté faisait partie d'une solution de Lactate Ringer et le NAC à 20% a été obtenu à partir d'une solution stérile de 200 mg/ml (Sandoz Canada Inc.). Le lactate et le NAC ont été injectés 30 minutes avant l'administration de cisplatine. Afin de prévenir le développement de la toxicité rénale, les animaux ont été hydratés agressivement avec des injections sous-cutanées de 20 ml de NS trois fois par jour pendant la journée des traitements et le lendemain. La voie d'administration intrapéritonéale du cisplatine a été

choisie, car cette méthode a déjà été utilisée dans plusieurs études traitant de l'ototoxicité du cisplatine.^{3, 70, 75}

X.III Protocole d'anesthésie

L'induction et le maintien de l'anesthésie ont été effectués grâce à une solution d'isoflurane à 1% pour les injections intra-tympaniques et intrapéritonéales, les enregistrements des PEATC, et les prises sanguines. Avant de procéder à la perfusion intracardiaque et au sacrifice des animaux, une anesthésie plus profonde a été obtenue à partir d'un mélange de 40 mg/kg de kétamine et de 5 mg/kg de xylazine injectés intrapéritonéalement.

X.IV Enregistrement des PEATC

Les potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral ont été enregistrés avec un système BRAVO (Nicolet Bravo System; Nicolet Biomedical, Madison, WI, É-U). L'activité électrique a été captée à partir d'électrodes aiguilles sous-cutanées. Une électrode a été placée à la base du pavillon de chaque oreille. L'électrode de mise à terre a été placée au niveau du cou et l'électrode positive sur le vertex. L'impédance a été vérifiée et acceptée à 0,5-3 k Ω .

Les stimuli acoustiques ont été présentés par des écouteurs de type TIP-300. Des bouffées tonales de 2000, 4000, 6000 et 8000 Hz ont été générées avec une polarité de condensation. Les filtres passe-haut et passe-bas étaient établis à 30 Hz et 3000 Hz, et la fenêtre d'observation temporelle à 20 ms. Pour chaque réponse, la moyenne de 1500 itérations a

été prise avec une vitesse de présentation de 27,7 itérations par seconde. Nous avons défini le seuil électrophysiologique comme étant l'intensité sonore la plus faible permettant d'obtenir une onde avec un pic V reproductible au moins trois fois. Les seuils des PEATC n'ont pas été testés avec des stimuli de moins de 2000 Hz, car l'ototoxicité secondaire au cisplatine touche principalement les hautes fréquences.

Initialement, les PEATC ont été enregistrés pour chaque oreille de tous les animaux avant de commencer l'expérimentation. Ces enregistrements ont été répétés une semaine après que les animaux aient reçu une dose cumulative de 9 mg/kg (donc avant la 4^e dose), une semaine après la dose de 15 mg/kg, 18 mg/kg, 21 mg/kg et une semaine après la dernière injection de cisplatine. Nous avons dû administrer 24 mg/kg de cisplatine intrapéritonéalement pour obtenir une perte auditive bilatérale. Avant chaque enregistrement, l'oreille externe a été inspectée et nettoyée de tout débris au microscope opératoire.

X.V Chromatographie à haute pression en phase liquide

Des échantillons sanguins ont été obtenus à partir de la veine saphène 30 minutes, 1 et 3 heures après l'injection intra-tympanique de NAC aux animaux du second groupe. Le sang a été centrifugé et 250 µL de plasma a été obtenu pour chaque échantillon. L'analyse a été effectuée avec une machine Hitachi LaChrom Elite utilisant un protocole établi pour l'extraction de l'homocystéine et d'autres dérivatifs de la cystéine.⁷⁶ Cette méthode utilise le tributylphosphine/ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazide-4-sulphonate (TBP/SBD-

F) pour la réduction et la dérivation. Les échantillons ont été réduits avec 30 μL de 10% tri-n-butylphosphine (mélangé dans la diméthylformamide) et incubés à 4°C pour 30 minutes. La déprotéinisation a été effectuée avec 300 μL de 0,6 M d'acide perchlorique dans 1 mM d'acide éthylénédiaminetétraacétique (EDTA). Après centrifugation pendant 1 minute, le supernatant a été mélangé à 10 μL de 1,55 M de NaOH, 125 μL de solution tampon de borate et 50 μL de 1 mg/ml de SBD-F puis incubé pendant 1 heure à 60°C. Nous avons recueilli 100 μL de la solution qui a été mélangée avec la phase mobile (200 mM d'acide acétique et 200 mM d'acétate de sodium avec 1% méthanol). Dix points de référence ont été obtenus initialement à partir d'une solution ne contenant que du NAC pour calculer l'équation de régression et s'assurer que la méthode employée était reproductible et adéquate. Nos échantillons de plasma ont été analysés sur trois jours consécutifs. Comparé aux autres dérivés de la cystéine, le NAC est la seule molécule montrant un pic de diffusion à 4,2 minutes.

X.VI Protocole de microscopie électronique

a) Fixation initiale par perfusion intracardiaque

Après les derniers enregistrements de PEATC, les animaux ont été sacrifiés et leurs tissus fixés par une perfusion intracardiaque de glutaraldehyde à 2,5% dans une solution de tampon de 0,1 M de phosphate. Cette procédure, en résumé, consiste à effectuer une incision de la peau abdominale et du péritoine verticalement jusqu'à la cage thoracique. Celle-ci a été disséquée latéralement afin d'exposer le cœur. Une incision de 3 mm a été faite dans le ventricule gauche pour permettre l'insertion d'un cathéter jusqu'à l'ouverture

de l'aorte ascendante. Celle-ci a été irriguée avec une solution de lactate Ringer pendant 20 secondes puis l'oreillette droite a été poncturée. Une irrigation suffisante a été signalée par le blanchiment du foie et la perfusion de glutaraldehyde a alors été débutée. Un flot rapide a été maintenu pour 3 minutes suivi d'une vitesse d'irrigation plus lente pour les 20 minutes subséquentes.

b) Dissection de l'os temporal

Suite à la perfusion intracardiaque, les têtes ont été placées dans une solution de glutaraldehyde pendant 24 heures à 4°C. Elles ont été ensuite décalcifiées pendant une semaine dans une solution de Plank-Rychlo diluée à 1:4. Celle-ci contient 0,3 M de chlorure d'aluminium, 3% d'acide hydrochlorique, et 5% d'acide formique. Après décalcification, les cochlées ont été disséquées des os temporaux, rincées et placées dans une solution de tampon de 0,1 M de phosphate.

c) Dissection des cochlées

Avant de procéder aux dissections finales, les cochlées ont été rincées dans de l'eau distillée pendant 30 minutes. Au microscope, le labyrinthe osseux a été délicatement coupé longitudinalement à la périphérie avec une lame de rasoir afin d'exposer la localisation de la membrane basilaire et de la membrane de Reissner. Trois coupes ont été effectuées perpendiculairement au modiolus entre ces deux membranes. Les échantillons ont été analysés au microscope électronique à balayage à pression variable (JEOL JSM-6460LV).

X.VII Analyse statistique

Nous avons comparé les enregistrements initiaux des PEATC aux enregistrements effectués après la troisième et la dernière injection de cisplatine pour chaque côté avec le test de Mann-Whitney. Les oreilles tests ont été comparées aux oreilles contrôle avec le même outil. L'analyse a été effectuée pour chaque fréquence puis pour toutes les fréquences combinées. Le programme SPSS version 14.0 a été utilisé pour effectuer l'analyse statistique (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée statistiquement significative et les intervalles de confiance ont été calculés.

Le calcul de la taille de l'échantillon a été basé sur une étude préliminaire qui a montré un écart type de 18 dB pour les PEATC. La différence minimale détectable a été établie à 30 dB. Les erreurs de type I and type II ont été choisies à 0,05 et 0,1, respectivement.

XI. RÉSULTATS

XI.I PEATC: groupe contrôle

Les enregistrements initiaux de PEATC pour toutes les fréquences combinées ont montré un seuil moyen de $12,4 \pm 3,3$ dB. Après une dose cumulative de 9 mg/kg de cisplatine, le seuil moyen a augmenté à $17,7 \pm 4,7$ dB ($p > 0,05$). Après la dose finale de cisplatine, le seuil a atteint une moyenne de $40,8 \pm 6,2$ dB ($p < 0,05$). L'augmentation des seuils était très similaire pour chaque fréquence. Les seuils des PEATC selon chaque fréquence sont exposés dans la table I.

XI.II PEATC: groupe lactate

Les enregistrements initiaux de PEATC pour toutes les fréquences combinées ont montré un seuil moyen de $17,5 \pm 4,1$ dB. Après une dose cumulative de 9 mg/kg de cisplatine, le seuil moyen a augmenté à $23,7 \pm 6$ dB ($p > 0,05$) et a atteint $34,5 \pm 6,1$ dB ($p < 0,05$) après la dose finale. Nous avons noté une différence importante de l'augmentation des seuils selon les fréquences. Les fréquences moyennes ont subi une augmentation nettement moins grande que les hautes fréquences (i.e. 2000 Hz: 7,5 dB, 4000 Hz: 18,0 dB, 6000 Hz: 20,0dB et 8000 Hz: 23,0 dB). L'augmentation des seuils à 2000 Hz n'était pas statistiquement significative. Les seuils des PEATC selon chaque fréquence sont exposés dans la table II. En comparant le groupe lactate au groupe contrôle, la moyenne de l'augmentation des seuils pour toutes les fréquences combinées était significativement moins grande pour le groupe expérimental ($p < 0,05$) et ceci était le plus marqué à 2000 Hz. (Figure 2).

XI.III PEATC: groupe NAC

Les enregistrements initiaux de PEATC pour toutes les fréquences combinées ont montré un seuil moyen de $10,0 \pm 3,5$ dB. Après une dose cumulative de 9 mg/kg de cisplatine, le seuil moyen a augmenté à $81,5 \pm 8,4$ dB ($p < 0,05$) puis est resté à $79,6 \pm 8,2$ dB ($p < 0,05$) après la dose finale. L'augmentation des seuils était similaire pour toutes les fréquences.

XI.IV Chromatographie à haute pression en phase liquide

La technique de chromatographie développée permet la détection du NAC à des concentrations aussi basses que 4 μ M avec moins de 100 μ L de plasma. Un exemple de détection de 2 mM de NAC dans un échantillon de référence est représenté dans la Figure 3. L'analyse par chromatographie des échantillons sanguins des cobayes à 30 minutes, 1 et 3 heures n'a pas montré de diffusion systémique. Un exemple typique d'analyse du plasma du cobaye est illustré dans la Figure 4.

XI.V Microscopie électronique

L'analyse des cochlées traitées avec la solution contrôle a démontré une destruction presque complète des stéréocils des cellules ciliées externes. L'étendue des trouvailles pour le groupe contrôle comprenait des échantillons avec des altérations sévères ainsi que certains avec une destruction complète des stéréocils. Les cochlées traitées au lactate ont montré une altération partielle nettement moins sévère des cellules ciliées externes. À noter, un des animaux traités au lactate avait montré une préservation presque totale des stéréocils bilatéralement. Toutes les oreilles traitées au NAC ont subi une ostéite sévère et l'analyse

de leur cochlée a révélé une destruction de l'organe de Corti qui a affecté toutes les cellules (Figure 5).

XI.VI Table I: Seuils des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral pour le groupe contrôle

Fréquence	Seuils initiaux (dB)	Post injection 9 mg/kg	Hausse des seuils (dB)	Valeur P	Post injection 24 mg/kg	Hausse des seuils (dB)	Valeur P
2 kHz	23,0 (10-40)	25,0 (15-40)	2,0	0,699	48,0 (15-65)	25,0	< 0,01
4 kHz	16,5 (10-25)	23,3 (10-35)	6,8	0,199	48,5 (10-70)	32,0	< 0,01
6 kHz	9,5 (0-20)	17,5 (10-30)	8,0	0,066	38,5 (0-65)	29,0	< 0,01
8 kHz	0,5 (0-5)	5,0 (0-15)	4,5	0,075	28,0 (0-55)	27,5	< 0,01
Résultats globaux	12,4	17,6	5,2	0,073	40,8	28,4	< 0,01

Les valeurs entre parenthèses reflètent l'étendue des seuils.

"Post injection 9 mg/kg" et "post injection 24 mg/kg" reflètent les seuils des PEATC obtenus après l'injection cumulative de 9 mg/kg et 24 mg/kg de cisplatine respectivement.

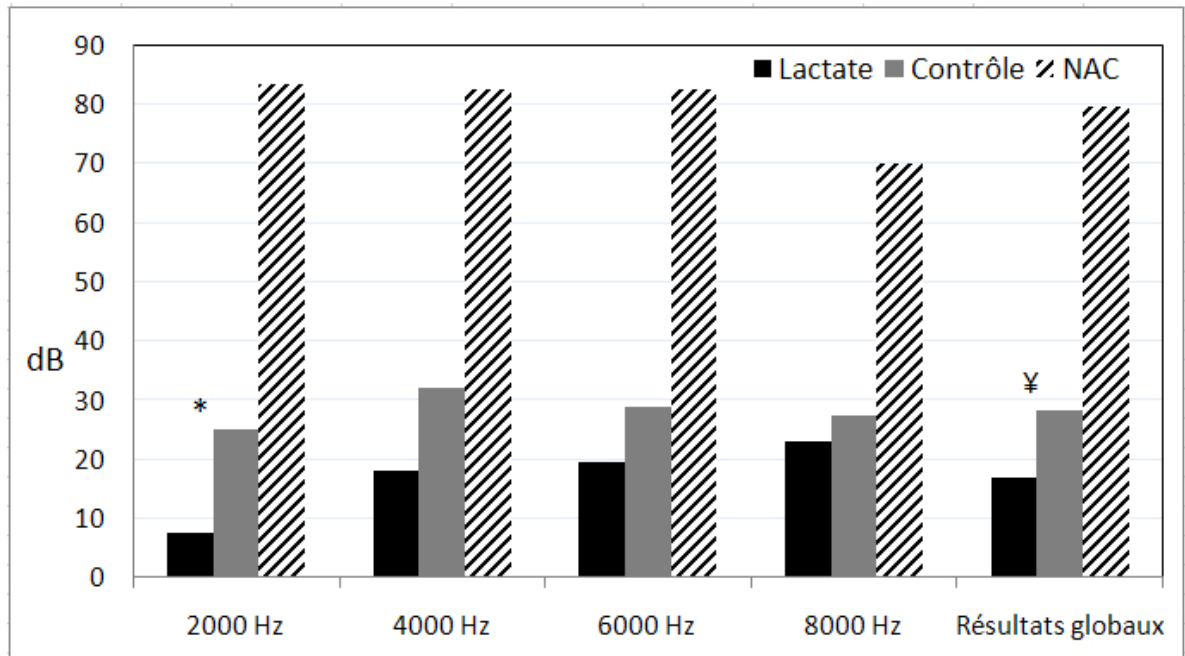
XI.VII Table II: Seuils des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral pour le groupe lactate

Fréquence	Seuils initiaux (dB)	Post injection 9 mg/kg	Hausse des seuils (dB)	Valeur P	Post injection 24 mg/kg	Hausse des seuils (dB)	Valeur P
2 kHz	27,5 (10-50)	33,3 (15-50)	5,8	0,376	35,0 (15-65)	7,5	0,564
4 kHz	23,5 (10-40)	33,3 (25-45)	9,8	0,101	41,5 (15-75)	18,0	< 0,05
6 kHz	15,5 (5-30)	20,0 (10-30)	4,5	0,345	35,0 (10-65)	20,0	< 0,05
8 kHz	3,5 (0-15)	8,3 (0-20)	4,8	0,221	26,5 (0-55)	23,0	< 0,05
Résultats globaux	17,5	23,7	6,2	0,091	34,5	17,0	< 0,01

Les valeurs entre parenthèses reflètent l'étendue des seuils.

"Post injection 9 mg/kg" et "post injection 24 mg/kg" reflètent les seuils des PEATC obtenus après l'injection cumulative de 9 mg/kg et 24 mg/kg de cisplatine respectivement.

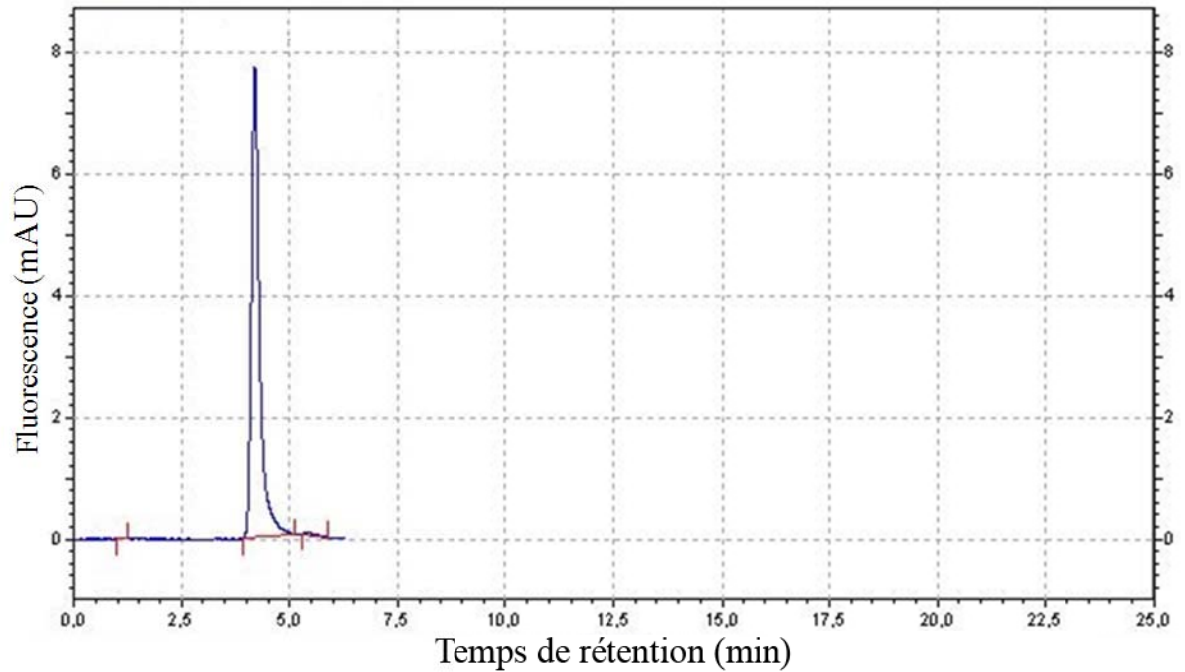
XI.VIII Figure 2: Comparaison de l'augmentation des seuils entre le groupe contrôle et les groupes expérimentaux après administration de 24 mg/kg de cisplatine.



* Représente une différence statistiquement significative entre le groupe contrôle et le groupe lactate à 2000 Hz.

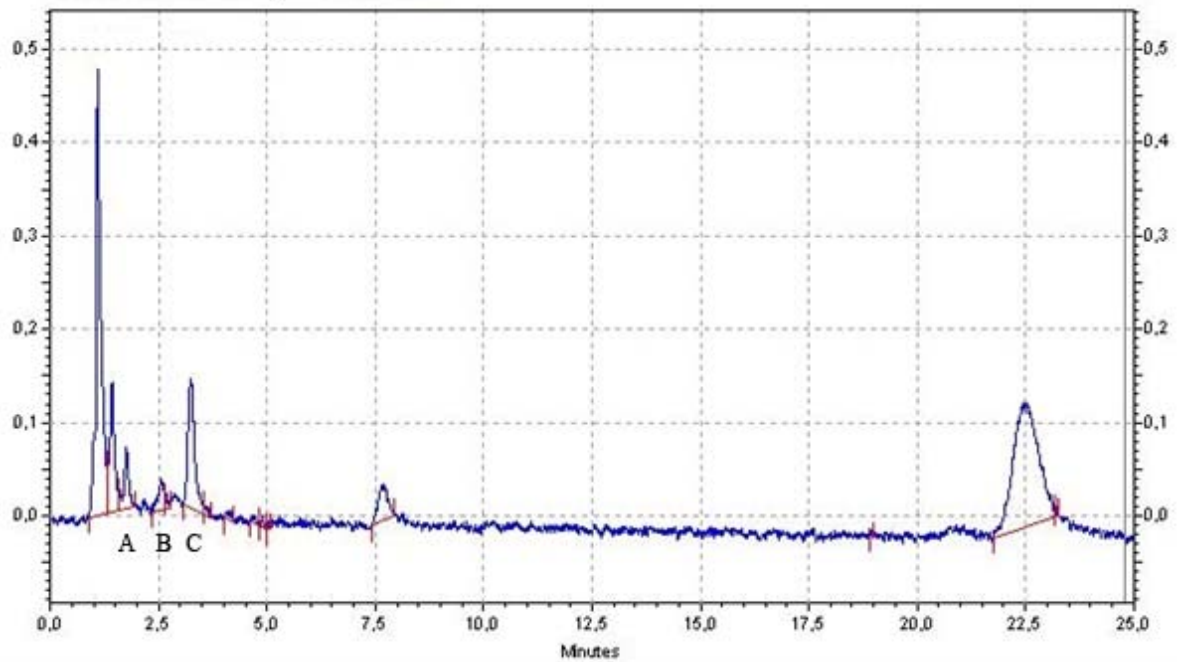
¥ Représente une différence statistiquement significative entre le groupe contrôle et le groupe lactate pour toutes les fréquences combinées.

XI.IX Figure 3: Détection du N-acétylcystéine dans une solution de référence analysée à la chromatographie à haute pression en phase liquide.



À noter, le temps de rétention de 4,2 minutes (min) avant l'apparition du pic de NAC. L'aire sous la courbe représente la concentration du NAC. Cet exemple illustre la détection de 2 mM de NAC. [mAU = milli-absorbance unit].

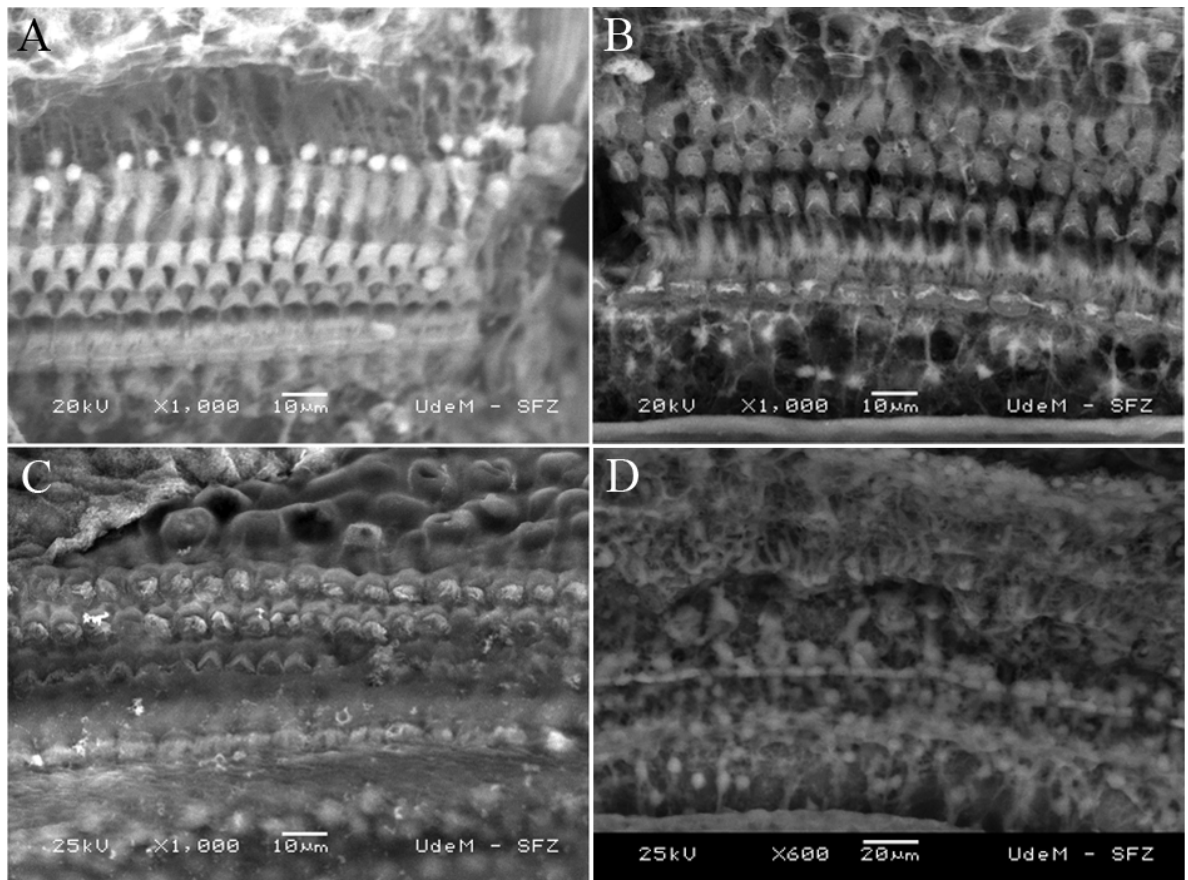
XI.X Figure 4: Analyse du plasma de cobaye à la chromatographie à haute pression en phase liquide après injection transtympanique de NAC.



À noter, l'absence de pic de NAC à 4,2 minutes (min).

(A: L-Cystéine; B: Homocystéine; C: Glutathion) [mAU = milli-absorbance unit].

XI.XI Figure 5: Exemple d'analyse des cochlées des cochons d'inde au microscope électronique à balayage après administration de doses ototoxiques de cisplatine (B, C and D).



A: Cochlée normale; B: Groupe contrôle; C: Cochlée traitée au lactate; D: Cochlée traitée au N-acétylcystéine.

XII. DISCUSSION

L'usage clinique du cisplatine est limité par les toxicités qu'il engendre. La néphrotoxicité affecte de 20 à 41% des patients. Sa pathophysiologie inclut la nécrose et l'apoptose cellulaire et les ERO semblent jouer un rôle important dans ces mécanismes. La neurotoxicité, qui affecte de 30 à 86% des adultes, est le résultat de dommage au niveau du ganglion spiral. La myélosuppression est la complication la moins fréquente qui touche moins de 5% des patients.² L'ototoxicité reste un facteur important qui limite les doses de cisplatine tolérées par les patients. Jusqu'à présent, les études cliniques faites sur les humains n'ont pas permis de découvrir un médicament qui peut prévenir cet effet secondaire. Lors de la préparation d'une étude clinique à notre institution, nous avons analysé les différents produits qui ont été testés chez l'animal afin de déterminer lequel serait le plus prometteur chez l'humain. Choe et al. ont montré que le lactate injecté dans l'oreille moyenne de cobayes traités au cisplatine permettait la préservation complète des émissions otoacoustiques.³ Puisque ce produit est déjà utilisé de façon sécuritaire chez l'humain, nous avons entrepris cette étude afin de confirmer son efficacité. Les propriétés otoprotectrices du lactate seraient reliées à la présence de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) à l'intérieur des mitochondries des cellules ciliées externes.⁷⁷ Cette enzyme permet la conversion du lactate en pyruvate et mène à la production de la forme réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH). La NADH est un antioxydant endogène et une étude a montré une diminution de sa concentration intracellulaire dans des cultures de cellules rénales traitées au cisplatine.⁷⁸ Le lactate peut ainsi prévenir l'ototoxicité secondaire

au cisplatine en agissant au niveau du métabolisme cellulaire et en réplétant les niveaux de NADH.

Nos résultats globaux combinant toutes les fréquences testées montrent une augmentation des seuils en moyenne de 28,4 dB pour le groupe contrôle comparé à 17,0 dB pour le groupe lactate. Le lactate a donc offert une protection auditive statistiquement significative de 11,4 dB. La différence pour les deux groupes était plus importante pour les fréquences de 2000 et 4000 Hz pour lesquelles le lactate donne une protection de 17,5 dB et 14,0 dB respectivement. L'évaluation au microscope électronique a confirmé les résultats des examens physiologiques en démontrant une préservation partielle des stéréocils des cellules ciliées externes des oreilles traitées au lactate. La divergence entre nos résultats et ceux de Choe et al. s'explique par une différence des méthodologies. D'une part, notre expérience antérieure avec des patients adultes a montré qu'une perte auditive de moins de 15 dB pourrait être associée avec la présence d'émissions otoacoustiques. Ainsi, un petit changement des seuils aux PEATC pourrait ne pas être détecté par l'évaluation des émissions otoacoustiques. Ceci rejoint les résultats de Migirov et al. qui n'ont découvert aucun changement des émissions otoacoustiques chez des cochons d'inde ayant reçu une solution topique de gentamycine, un agent reconnu ototoxique. Cette étude concluait que les changements des émissions otoacoustiques reflètent plus le degré d'inflammation de l'oreille moyenne que la fonction de l'oreille interne.⁷⁹ De plus, l'utilisation des PEATC dans notre étude nous a permis d'obtenir une évaluation quantitative de la perte auditive alors que l'analyse des émissions otoacoustiques n'aurait permis qu'une appréciation

qualitative de l'audition. La différence entre nos résultats et ceux de Choe et al. s'explique aussi par le fait qu'ils n'ont pas utilisé les cobayes comme leur propre contrôle et les animaux qui formaient le groupe expérimental ont reçu des injections de lactate dans les deux oreilles. Puisque les injections intrapéritonéales ont un taux d'échec de 10 à 20%,⁸⁰ il leur était alors impossible de s'assurer que tous leurs animaux avaient reçu une dose adéquate de cisplatine. La dose cumulative cible rapportée par Cardinaal et al. pour obtenir une preuve définitive de dommage à l'oreille interne était au moins de 1,5 mg/kg/jour sur 8 jours (donnant une dose cumulative de 12 mg/kg). Après l'administration de 1,25 mg/kg/jour sur 8 jours (une dose cumulative de 10 mg), aucun effet ototoxique n'avait été décelé.⁷⁵ En fait, dans notre étude, les PEATC des oreilles contrôles n'ont pas montré de perte auditive après 15, 18 ou 21 mg/kg. Il aura fallu administrer 24 mg/kg de cisplatine intrapéritonéalement pour obtenir une perte auditive significative et cette dose est devenue notre cible pour chaque sujet. Néanmoins, bien que notre étude ait montré des résultats moins impressionnants avec l'usage du lactate que celle de Choe et al, la protection auditive fournie par ce produit était considérable, surtout aux fréquences utiles pour la parole.

Ainsi, de tous les produits testés de façon intra-tympanique, nous considérons le lactate comme le plus prometteur. De tous les anti-oxydants testés, le poids moléculaire du lactate est le plus petit, expliquant une facilité de diffusion à travers la fenêtre ronde pour atteindre les cellules de l'oreille interne. De plus, ce produit est souvent utilisé de façon sécuritaire chez l'humain en tant que solution de Ringer.

Le NAC était aussi un médicament pour lequel nous avons initialement beaucoup d'attentes. Choe et al. avaient aussi étudié le NAC qui est un autre agent utilisé sécuritairement chez l'humain dans le contexte de l'overdose à l'acétaminophen. Ils avaient découvert que ce produit injecté dans l'oreille moyenne à une basse concentration de 2% permettait une préservation partielle des émissions otoacoustiques chez le cobaye traité au cisplatine.³ Ainsi, le second objectif de notre étude était de déterminer si une plus grande concentration de NAC offrait une protection complète de l'ototoxicité secondaire au cisplatine. Puisque le NAC est souvent utilisé chez l'humain pour traiter l'empoisonnement à l'acétaminophen avec des doses élevées de 150 mg/kg à partir d'ampoules de 200 mg/ml (20%), nous avons proposé l'hypothèse qu'une solution de concentration similaire devrait être bien tolérée par le cobaye. Toutefois, nous avons observé une réaction inflammatoire importante dans le conduit auditif externe après la troisième dose. Les seuils des PEATC ont augmenté de façon très importante même après n'avoir donné que 9 mg/kg de cisplatine qui n'est pas une dose reconnue comme ototoxique. De plus, lors de la préparation de cochlées pour l'analyse au microscope électronique, nous avons noté une inflammation très importante de la muqueuse de l'oreille moyenne et une ostéite significative. La microscopie électronique a révélé une destruction complète de l'architecture de l'oreille interne. Le changement des seuils aux PEATC était alors probablement secondaire à une inflammation de l'oreille moyenne et de l'oreille interne causant une perte auditive mixte. Une réaction inflammatoire similaire mais moins importante avait été notée dans une de nos études précédentes avec l'utilisation de NAC transtympanique à une concentration de 4%.⁸¹ La cause des effets indésirables du NAC à 20% sur les tissus de l'oreille moyenne et interne

n'est pas facilement explicable. La solution utilisée était stérile. Elle ne comprenait pas d'agents reconnus ototoxiques et son pH était balancé. L'hypertonie de la solution pourrait être la caractéristique qui la rend si irritante. Une solution de NAC à 20% correspond à 1200 mOsm/L alors que l'isosmolarité cellulaire est considérée de 280 à 300 mOsm/L. L'effet de l'hypertonie des liquides sur la muqueuse de l'oreille moyenne serait alors un sujet intéressant à explorer.

Une autre inquiétude associée à l'utilisation d'antioxydants est la possibilité qu'ils réagissent avec la chimiothérapie et inactivent son effet anti-tumoral. Le NAC contient un groupe thiol, qui peut réagir et former des complexes avec les médicaments à base de platine. Dicket et al. avaient réalisé l'importance de ce facteur limitant lorsqu'ils ont utilisé le NAC de façon systémique chez le rat.⁵⁹ Ils ont ainsi indiqué que leur approche serait utile pour le traitement des tumeurs du système nerveux central, car le NAC ne passe pas à travers la barrière sang-cerveau. Dans ce contexte, le NAC n'inactiverait pas l'effet du cisplatine même s'il était injecté de façon intraveineuse. Par contre, le cisplatine est un médicament de choix non seulement pour les tumeurs du cerveau mais pour une multitude d'autres néoplasies solides. Il était alors essentiel de déterminer si le NAC était absorbé systémiquement lorsqu'il était injecté dans l'oreille moyenne avant de commencer à l'utiliser conjointement avec le cisplatine. Le protocole de chromatographie que nous avons adopté permettait la détection fiable de très petites concentrations de NAC dans le plasma. Nos résultats montrent une absence d'absorption systémique après injection transtympanique de ce médicament à 30 minutes, 1 et 3 heures post administration. Nous

pouvons nous demander toutefois si ces résultats peuvent être extrapolés aux autres antioxydants.

XIII. CONCLUSION

Nous avons déterminé que les injections intra-tympaniques de lactate permettent une préservation partielle des cellules ciliées externes et offrent une protection auditive qui est significative seulement à 2000 Hz lors des traitements au cisplatine. Cette protection n'est pas statistiquement significative aux fréquences plus hautes. Une concentration élevée de NAC produit plus de dommage à l'oreille moyenne et interne que le cisplatine seul. Le NAC administré en haute concentration n'est donc pas une solution viable pour la prévention de l'ototoxicité secondaire au cisplatine. Finalement, le NAC ne semble pas diffuser systémiquement lorsqu'il est injecté dans l'oreille moyenne. Des projets futurs devront déterminer si ceci est le cas pour les autres antioxydants qui pourraient être utilisés dans la prévention de l'ototoxicité due au cisplatine. Il est aussi à noter que l'étude actuelle n'a pas évalué l'effet protecteur du lactate intra-tympanique sur l'ototoxicité tardive associée au cisplatine, un sujet qui devra être investigué dans des études ultérieures.

XIV. BIBLIOGRAPHIE

1. Brunton L, Blumenthal D, Buxton I, Parker K. Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics: McGraw-Hill, p. 642, 2007.
2. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev.* 2007 33 (1): 9-23.
3. Choe WT, Chinosornvatana N, Chang KW. Prevention of cisplatin ototoxicity using transtympanic N-acetylcysteine and lactate. *Otol Neurotol.* 2004 25 (6): 910-5.
4. Runge-Samuelson CL, Friedland DR. Anatomy of the Auditory System. Cummings Otolaryngology - Head and Neck Surgery. 5th ed: Mosby, 2010.
5. Piel IJ, Meyer D, Perlia CP, Wolfe VI. Effects of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875) on hearing function in man. *Cancer Chemother Rep.* 1974 58 (6): 871-5.
6. McKeage MJ. Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. *Drug Saf.* 1995 13 (4): 228-44.
7. Bokemeyer C, Berger CC, Hartmann JT, Kollmannsberger C, Schmoll HJ, Kuczyk MA, Kanz L. Analysis of risk factors for cisplatin-induced ototoxicity in patients with testicular cancer. *Br J Cancer.* 1998 77 (8): 1355-62.
8. van der Hulst RJ, Dreschler WA, Urbanus NA. High frequency audiometry in prospective clinical research of ototoxicity due to platinum derivatives. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1988 97 (2 Pt 1): 133-7.
9. Vermorken JB, Kapteijn TS, Hart AA, Pinedo HM. Ototoxicity of cis-diamminedichloroplatinum (II): influence of dose, schedule and mode of administration. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1983 19 (1): 53-8.
10. Gratton MA, Salvi RJ, Kamen BA, Saunders SS. Interaction of cisplatin and noise on the peripheral auditory system. *Hear Res.* 1990 50 (1-2): 211-23.
11. Laurell GF. Combined effects of noise and cisplatin: short- and long-term follow-up. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1992 101 (12): 969-76.
12. Lautermann J, Song B, McLaren J, Schacht J. Diet is a risk factor in cisplatin ototoxicity. *Hear Res.* 1995 88 (1-2): 47-53.
13. Blakley BW, Gupta AK, Myers SF, Schwan S. Risk factors for ototoxicity due to cisplatin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994 120 (5): 541-6.

14. Huang E, Teh BS, Strother DR, Davis QG, Chiu JK, Lu HH, Carpenter LS, Mai WY, Chintagumpala MM, South M, Grant WH, 3rd, Butler EB, Woo SY. Intensity-modulated radiation therapy for pediatric medulloblastoma: early report on the reduction of ototoxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002 52 (3): 599-605.
15. Chen SH, Liang DC, Lin HC, Cheng SY, Chen LJ, Liu HC. Auditory and visual toxicity during deferoxamine therapy in transfusion-dependent patients. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2005 27 (12): 651-3.
16. Li Y, Womer RB, Silber JH. Predicting cisplatin ototoxicity in children: the influence of age and the cumulative dose. *Eur J Cancer.* 2004 40 (16): 2445-51.
17. Reddel RR, Kefford RF, Grant JM, Coates AS, Fox RM, Tattersall MH. Ototoxicity in patients receiving cisplatin: importance of dose and method of drug administration. *Cancer Treat Rep.* 1982 66 (1): 19-23.
18. Knight KR, Kraemer DF, Neuwelt EA. Ototoxicity in children receiving platinum chemotherapy: underestimating a commonly occurring toxicity that may influence academic and social development. *J Clin Oncol.* 2005 23 (34): 8588-96.
19. Bertolini P, Lassalle M, Mercier G, Raquin MA, Izzi G, Corradini N, Hartmann O. Platinum compound-related ototoxicity in children: long-term follow-up reveals continuous worsening of hearing loss. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004 26 (10): 649-55.
20. Hoeve LJ, Mertens zur Borg IR, Rodenburg M, Brocaar MP, Groen BG. Correlations between cis-platinum dosage and toxicity in a guinea pig model. *Arch Otorhinolaryngol.* 1988 245 (2): 98-102.
21. Hinojosa R, Riggs LC, Strauss M, Matz GJ. Temporal bone histopathology of cisplatin ototoxicity. *Am J Otol.* 1995 16 (6): 731-40.
22. Laurell G, Bagger-Sjoberg D. Degeneration of the organ of Corti following intravenous administration of cisplatin. *Acta Otolaryngol.* 1991 111 (5): 891-8.
23. Wright CG, Schaefer SD. Inner ear histopathology in patients treated with cisplatin. *Laryngoscope.* 1982 92 (12): 1408-13.
24. Oldenburg J, Kraggerud SM, Cvancarova M, Lothe RA, Fossa SD. Cisplatin-induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione S-transferase genotypes in testicular cancer survivors. *J Clin Oncol.* 2007 25 (6): 708-14.
25. Barahmani N, Carpentieri S, Li XN, Wang T, Cao Y, Howe L, Kilburn L, Chintagumpala M, Lau C, Okcu MF. Glutathione S-transferase M1 and T1

polymorphisms may predict adverse effects after therapy in children with medulloblastoma. *Neuro Oncol.* 2009 11 (3): 292-300.

26. Caronia D, Patino-Garcia A, Milne RL, Zalacain-Diez M, Pita G, Alonso MR, Moreno LT, Sierrasesumaga-Ariznabarreta L, Benitez J, Gonzalez-Neira A. Common variations in ERCC2 are associated with response to cisplatin chemotherapy and clinical outcome in osteosarcoma patients. *Pharmacogenomics J.* 2009 9 (5): 347-53.
27. Riedemann L, Lanvers C, Deuster D, Peters U, Boos J, Jurgens H, am Zehnhoff-Dinnesen A. Megalin genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Pharmacogenomics J.* 2008 8 (1): 23-8.
28. Huang Z, Timerbaev AR, Keppler BK, Hirokawa T. Determination of cisplatin and its hydrolytic metabolite in human serum by capillary electrophoresis techniques. *J Chromatogr A.* 2006 1106 (1-2): 75-9.
29. Clerici WJ, DiMartino DL, Prasad MR. Direct effects of reactive oxygen species on cochlear outer hair cell shape in vitro. *Hear Res.* 1995 84 (1-2): 30-40.
30. Clerici WJ, Yang L. Direct effects of intraperilymphatic reactive oxygen species generation on cochlear function. *Hear Res.* 1996 101 (1-2): 14-22.
31. Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, Jacono A, Feghali J, Spray D, Garcia P, Steinman H, Malgrange B, Ruben RJ, Rybak L, Van de Water TR. Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol.* 1997 18 (5): 559-71.
32. Dehne N, Lautermann J, Petrat F, Rauen U, de Groot H. Cisplatin ototoxicity: involvement of iron and enhanced formation of superoxide anion radicals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001 174 (1): 27-34.
33. Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem.* 2004 279 (44): 46065-72.
34. Rybak LP, Husain K, Morris C, Whitworth C, Somani S. Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. *Am J Otol.* 2000 21 (4): 513-20.
35. Lee JE, Nakagawa T, Kim TS, Endo T, Shiga A, Iguchi F, Lee SH, Ito J. Role of reactive radicals in degeneration of the auditory system of mice following cisplatin treatment. *Acta Otolaryngol.* 2004 124 (10): 1131-5.

36. Lee JE, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F, Endo T, Shiga A, Lee SH, Ito J. Mechanisms of apoptosis induced by cisplatin in marginal cells in mouse stria vascularis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2004 66 (3): 111-8.
37. Ikeda K, Sunose H, Takasaka T. Effects of free radicals on the intracellular calcium concentration in the isolated outer hair cell of the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol.* 1993 113 (2): 137-41.
38. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev.* 1990 51 (3): 283-97.
39. Wang J, Ladrech S, Pujol R, Brabet P, Van De Water TR, Puel JL. Caspase inhibitors, but not c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor treatment, prevent cisplatin-induced hearing loss. *Cancer Res.* 2004 64 (24): 9217-24.
40. Watanabe K, Inai S, Jinnouchi K, Baba S, Yagi T. Expression of caspase-activated deoxyribonuclease (CAD) and caspase 3 (CPP32) in the cochlea of cisplatin (CDDP)-treated guinea pigs. *Auris Nasus Larynx.* 2003 30 (3): 219-25.
41. Watanabe K, Inai S, Jinnouchi K, Bada S, Hess A, Michel O, Yagi T. Nuclear-factor kappa B (NF-kappa B)-inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) pathway damages the stria vascularis in cisplatin-treated mice. *Anticancer Res.* 2002 22 (6C): 4081-5.
42. So H, Kim H, Lee JH, Park C, Kim Y, Kim E, Kim JK, Yun KJ, Lee KM, Lee HY, Moon SK, Lim DJ, Park R. Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NF-kappaB. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2007 8 (3): 338-55.
43. Mukherjea D, Jajoo S, Whitworth C, Bunch JR, Turner JG, Rybak LP, Ramkumar V. Short interfering RNA against transient receptor potential vanilloid 1 attenuates cisplatin-induced hearing loss in the rat. *J Neurosci.* 2008 28 (49): 13056-65.
44. Liang F, Schulte BA, Qu C, Hu W, Shen Z. Inhibition of the calcium- and voltage-dependent big conductance potassium channel ameliorates cisplatin-induced apoptosis in spiral ligament fibrocytes of the cochlea. *Neuroscience.* 2005 135 (1): 263-71.
45. Hughes FM, Jr., Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA. Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem.* 1997 272 (48): 30567-76.
46. Bortner CD, Cidlowski JA. A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 1998 56 (12): 1549-59.

47. Guthrie OW, Li-Korotky HS, Durrant JD, Balaban C. Cisplatin induces cytoplasmic to nuclear translocation of nucleotide excision repair factors among spiral ganglion neurons. *Hear Res.* 2008 239 (1-2): 79-91.
48. Goel R, Cleary SM, Horton C, Kirmani S, Abramson I, Kelly C, Howell SB. Effect of sodium thiosulfate on the pharmacokinetics and toxicity of cisplatin. *J Natl Cancer Inst.* 1989 81 (20): 1552-60.
49. Zuur CL, Simis YJ, Lansdaal PE, Hart AA, Rasch CR, Schornagel JH, Dreschler WA, Balm AJ. Risk factors of ototoxicity after cisplatin-based chemo-irradiation in patients with locally advanced head-and-neck cancer: a multivariate analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 68 (5): 1320-5.
50. Ekborn A, Hansson J, Ehrsson H, Eksborg S, Wallin I, Wagenius G, Laurell G. High-dose Cisplatin with amifostine: ototoxicity and pharmacokinetics. *Laryngoscope.* 2004 114 (9): 1660-7.
51. Marina N, Chang KW, Malogolowkin M, London WB, Frazier AL, Womer RB, Rescorla F, Billmire DF, Davis MM, Perlman EJ, Giller R, Lauer SJ, Olson TA. Amifostine does not protect against the ototoxicity of high-dose cisplatin combined with etoposide and bleomycin in pediatric germ-cell tumors: a Children's Oncology Group study. *Cancer.* 2005 104 (4): 841-7.
52. Sastry J, Kellie SJ. Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine. *Pediatr Hematol Oncol.* 2005 22 (5): 441-5.
53. Fouladi M, Chintagumpala M, Ashley D, Kellie S, Gururangan S, Hassall T, Gronewold L, Stewart CF, Wallace D, Broniscer A, Hale GA, Kasow KA, Merchant TE, Morris B, Krasin M, Kun LE, Boyett JM, Gajjar A. Amifostine protects against cisplatin-induced ototoxicity in children with average-risk medulloblastoma. *J Clin Oncol.* 2008 26 (22): 3749-55.
54. Rybak LP, Kelly T. Ototoxicity: bioprotective mechanisms. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 11 (5): 328-33.
55. van den Berg JH, Beijnen JH, Balm AJ, Schellens JH. Future opportunities in preventing cisplatin induced ototoxicity. *Cancer Treat Rev.* 2006 32 (5): 390-7.
56. Treskes M, Nijtmans LG, Fichtinger-Schepman AM, van der Vijgh WJ. Effects of the modulating agent WR2721 and its main metabolites on the formation and stability of cisplatin-DNA adducts in vitro in comparison to the effects of thiosulphate and diethyldithiocarbamate. *Biochem Pharmacol.* 1992 43 (5): 1013-9.
57. Dickey DT, Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and in vivo levels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 314 (3): 1052-8.

58. Iraz M, Kalcioglu MT, Kizilay A, Karatas E. Aminoguanidine prevents ototoxicity induced by cisplatin in rats. *Ann Clin Lab Sci.* 2005 35 (3): 329-35.
59. Thomas Dickey D, Muldoon LL, Kraemer DF, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced ototoxicity by N-acetylcysteine in a rat model. *Hear Res.* 2004 193 (1-2): 25-30.
60. Minami SB, Sha SH, Schacht J. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. *Hear Res.* 2004 198 (1-2): 137-43.
61. Li G, Sha SH, Zotova E, Arezzo J, Van de Water T, Schacht J. Salicylate protects hearing and kidney function from cisplatin toxicity without compromising its oncolytic action. *Lab Invest.* 2002 82 (5): 585-96.
62. D'Agati V. Does aspirin cause acute or chronic renal failure in experimental animals and in humans? *Am J Kidney Dis.* 1996 28 (1 Suppl 1): S24-9.
63. Kalkanis JG, Whitworth C, Rybak LP. Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope.* 2004 114 (3): 538-42.
64. Miller ER, 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med.* 2005 142 (1): 37-46.
65. Lynch ED, Gu R, Pierce C, Kil J. Combined oral delivery of ebselen and allopurinol reduces multiple cisplatin toxicities in rat breast and ovarian cancer models while enhancing anti-tumor activity. *Anticancer Drugs.* 2005 16 (5): 569-79.
66. Light JP, Silverstein H. Transtympanic perfusion: indications and limitations. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004 12 (5): 378-83.
67. Hoffmann KK, Silverstein H. Inner ear perfusion: indications and applications. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 11 (5): 334-9.
68. Goycoolea MV, Lundman L. Round window membrane. Structure function and permeability: a review. *Microsc Res Tech.* 1997 36 (3): 201-11.
69. Korver KD, Rybak LP, Whitworth C, Campbell KM. Round window application of D-methionine provides complete cisplatin otoprotection. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002 126 (6): 683-9.
70. Li G, Frenz DA, Brahmblatt S, Feghali JG, Ruben RJ, Berggren D, Arezzo J, Van De Water TR. Round window membrane delivery of L-methionine provides protection from cisplatin ototoxicity without compromising chemotherapeutic efficacy. *Neurotoxicology.* 2001 22 (2): 163-76.

71. Asarch R, Abramson M, Litton WB. Surgical anatomy of the guinea pig ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1975 84 (2 PART 1): 250-5.
72. Sehitoglu MA, Uneri C, Celikoyar MM, Uneri A. Surgical anatomy of the guinea pig middle ear. *Ear Nose Throat J.* 1990 69 (2): 91-7.
73. Goksu N, Haziroglu R, Kemaloglu Y, Karademir N, Bayramoglu I, Akyildiz N. Anatomy of the guinea pig temporal bone. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1992 101 (8): 699-704.
74. Tanaka K, Motomura S. Permeability of the labyrinthine windows in guinea pigs. *Arch Otorhinolaryngol.* 1981 233 (1): 67-73.
75. Cardinaal RM, de Groot JC, Huizing EH, Veldman JE, Smoorenburg GF. Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. *Hear Res.* 2000 144 (1-2): 135-46.
76. te Poele-Pothoff MT, van den Berg M, Franken DG, Boers GH, Jakobs C, de Kroon IF, Eskes TK, Trijbels JM, Blom HJ. Three different methods for the determination of total homocysteine in plasma. *Ann Clin Biochem.* 1995 32 (Pt 2): 218-20.
77. Spector GJ, Carr C. The electron transport system in the cochlear hair cell: the ultrastructural cytochemistry of respiratory enzymes in hair cell mitochondria of the guinea pig. *Laryngoscope.* 1974 84 (10): 1673-1706.
78. Zhang JG, Lindup WE. Differential effects of cisplatin on the production of NADH-dependent superoxide and the activity of antioxidant enzymes in rat renal cortical slices in vitro. *Pharmacol Toxicol.* 1996 79 (4): 191-8.
79. Migirov L, Himmelfarb M. Methodology for studying the effects of topically applied ear drops on otoacoustic emissions in guinea pigs. *J Laryngol Otol.* 2003 117 (9): 696-9.
80. Gaines Das R, North D. Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures. *Lab Anim.* 2007 41 (3): 312-20.
81. Saliba I, El Fata F, Ouelette V, Robitaille Y. Are intratympanic injections of N-acetylcysteine and methylprednisolone protective against Cisplatin-induced ototoxicity? *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010 39 (3): 236-43.

