

IMPACT D'UN ANTIBIOTIQUE AMINOGLYCOSIDIQUE SUR LES CELLULES SENSORIELLES CILIÉES

Ayad-Loucif*
Bensouilah. M*
Ould el Bachir. L*
Denizot J-P**

RESUME

Les antibiotiques aminoglycosidiques tels que la gentamicine sont bien connus en thérapeutique clinique comme des molécules toxiques pour les cellules sensorielles ciliées.

*L'étude de la structure et l'ultrastructure des cellules sensorielles ciliées du système de la ligne latérale a été entreprise après exposition d'un poisson téléostéen – *Gambusia affinis* – à une dose déterminée de gentamicine (80 mg/l).*

Nos observations montrent, chez les spécimens traités par cet antibiotique une altération des cellules sensorielles ciliées; cette altération se manifeste, à l'extérieur, par la perte de la ciliature de l'apex de la cellule et dans le cytoplasme sensoriel, par la perte de vésicules et de rubans synaptiques. Cependant, les terminaisons nerveuses afférentes et efférentes restent intactes.

Nos données montrent, qu'à la dose de gentamicine administrée, la dégénérescence des cellules sensorielles ciliées est partielle et n'altère pas l'intégrité de l'architecture de l'épithélium sensoriel

ABSTRACT

The aminoglycoside antibiotics, as gentamicin, are well known for their indisputable clinical efficacy and their toxic effect for the sensory hair cells.

*The structural and ultrastructural features of the sensory hair cells were studied in the lateral line system of *Gambusia affinis* (Teleost fosh) after exposure to a gentamicin known dose (80mg/l).*

Our observations show, in antibiotic treated specimen, a damage of the sensory hair cells revealed by a loss of the apical ciliary bundles

and in the sensory cytosol, a loss of synaptic bodies and surrounded synaptic vesicles.

Our data indicate that a given dose of gentamicin destroys partially the sensory hair cell but does not damage architectural integrity of the sensory epithelium

Mots clés: Antibiotique; Aminoglycoside; cellules sensorielles ciliées; toxicité.

INTRODUCTION

Les antibiotiques aminoglycosidiques (AA) ont été découverts et caractérisés par Waksman dans les années 40; Ces aminoglycosidiques appartiennent à une famille d'antibiotiques très utilisée dans le traitement d'infection causée par les bactéries Gram.- Les antibiotiques aminoglycosidiques tels que la gentamicine sont bien connus en thérapeutique clinique comme des molécules pouvant engendrer des pathologies secondaires envers des structures sensorielles de l'oreille interne: le vestibule (organe de l'équilibre) et la cochlée (organe de l'audition). cette toxicité se manifeste par une perte sélective et irréversible des cellules ciliées et, en particulier au niveau de la cochlée, des cellules ciliées externes (CCEs)(Waksman, 1953; Aran et al., 1982; Dulon et al., 1992).

Des études récentes réalisées in vitro sur des cellules ciliées isolées démontrent que les AA bloquent l'activité des canaux de mécanotransduction (Kroese et al., 1989) et des canaux calcium voltage-dépendants des cellules ciliées (Dulon et al., 1989; Dulon et al., 1992; Nakagawa et al., 1992). Ces effets semblent correspondre à une phase extracellulaire initiale et réversible de l'action toxique de ces molécules, dans une deuxième phase, ces molécules aminoglycosidiques traversent la membrane plasmique, vraisemblablement par endocytose, et viennent s'accumuler dans les lysosomes présents sous la plaque cuticulaire (Hiel et al., 1992; De Groot et al., 1990).

Des données récentes ont montré que l'administration de gentamicine à un poisson Téléostéen, *Astronotus ocellatus*, provoque une altération des cellules ciliées de la lagena et de l'utricule de l'oreille interne mais pas celle du saccule (Yan et al., 1991). L'exposition de ce même poisson à différentes doses de gentamicine a montré l'altération des cellules ciliées de neuromastes des canaux mais pas celles des neuromastes superficiels; La destruction de la ciliature de la cellule ciliée du neuromaste est similaire à celle des cellules ciliées de l'oreille de ce même poisson (Yan et al., 1991), de l'oreille du poisson rouge (Platt et Yan, 1993) et du vestibule de mammifère (Wersäll, 1960; Lindman, 1969).

Les neuromastes sont des mécanorécepteurs présents chez tous les vertébrés aquatiques; Ces organes sensoriels de la ligne latérale auraient comme origine les placodes latérales, à partir desquelles se sont formés les organes sensoriels des labyrinthes. L'origine commune et les similitudes rencontrées dans la structure de base entre les neuromastes et les organes des labyrinthes justifierait l'appellation « organes du système acoustico-latéral » donnée à ces deux systèmes.

La description de la morphologie des cellules sensorielles ciliées traitées aux antibiotiques aminoglycosidiques a surtout été réalisée grâce à l'utilisation de la microscopie électronique à balayage (Lombarte *et al.*, 1993; Janas *et al.*, 1995; Forge *et al.*, 1998).

Le présent travail consiste à observer, à l'aide d'un microscope électronique à transmission, l'ultrastructure des cellules sensorielles ciliées de neuromastes de la ligne latérale d'un poisson Téléostéen, *Gambusia affinis*, traitées par une dose déterminée de gentamicine.

MATERIEL ET METHODES

Pour la réalisation de cette étude, des poissons de l'espèce *Gambusia affinis*, de taille égale sont placés chacun dans un bac contenant 1 litre d'eau aérée à l'aide d'une pompe.

Le traitement des spécimens est réalisé par simple dilution dans l'eau du bac du contenu d'une ampoule de 2ml dosée à 80 mg de sulfate de gentamicine. Les poissons traités reçoivent ainsi une dose quotidienne d'antibiotique aminoglycosidique pendant un à plusieurs jours successifs; l'eau du bac étant renouvelée chaque jour.

Le poisson est fixé, après avoir été soumis à une dose létale de MS222, juste après l'arrêt du traitement. Les fragments d'épiderme des lèvres, du front et des joues de poissons traités et non traités sont prélevés et fixés par immersion dans une solution de glutaraldéhyde à 4% dans un tampon phosphate à 0,1M pendant une nuit à 4°C.

Après lavage, les fragments sont ensuite post-fixés par immersion dans une solution d'acide osmique à 2% dans le même tampon, pendant une heure à 4°C. Après lavage au tampon phosphate à 0,1M, les pièces sont déshydratées, puis incluses dans une résine époxy (spurr).

Par la suite, l'épiderme est débité à l'ultramicrotome en coupes semi-fines (1 à 2 micromètres) et fines (800 Angström).

Les coupes semi-fines collées sur des lames histologiques sont colorées au bleu de toluidine (Trump *et al.*, 1961) pour être observée au microscope photonique.

Les coupes fines sont récupérées sur des grilles de cuivre puis contrastées à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb (Reynolds, 1963) pour être observées au microscope électronique à transmission (Philips CM 10)

RESULTATS

Structure des mécanorécepteurs

Non traités: Les mécanorécepteurs sont formés d'un épithélium sensoriel simple comprenant différentes zones (Fig.A):

- une zone centrale sensorielle (1) composée de cellules sensorielles ciliées piriformes et des cellules de soutien allongées. Les cellules sensorielles ciliées occupent les 2/3 supérieurs de l'organe et possèdent un cytoplasme très basophile et un gros noyau dans leur partie basale. Les cellules accessoires de soutien qui entourent les cellules sensorielles partent de la membrane basale de l'organe jusqu'à son apex.

- une zone du manteau (2), composée d'un ensemble de cellules filiformes qui entoure la zone sensorielle.

- l'épiderme ou zone épidermique (3) où sont rencontrées des cellules épidermiques disposées en strates et des cellules à mucus superficielles.

- Une cupule couvre l'apex des cellules composant la zone sensorielle et celle du manteau.

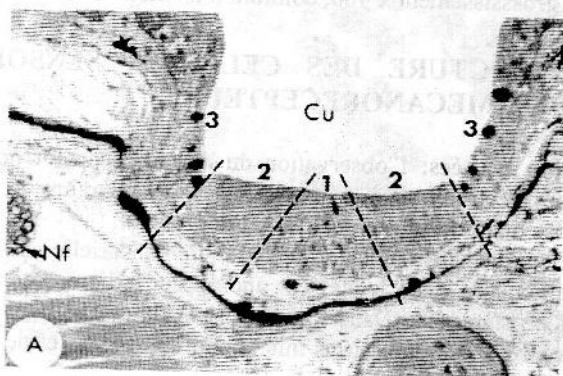


Fig.A : Mécanorécepteur de *Gambusia affinis* non traité Coupe semi-fine montrant les différentes zones composant l'épithélium du mécanorécepteur : la zone sensorielle (1), la zone du manteau (2) et l'épiderme ou "zone épidermique" (3) où sont rencontrées des cellules épidermiques disposées en strates et des cellules à mucus superficielles. Cu : cupule, Nf : nerf ;

(grossissement x 400, coloration au bleu de toluidine)

Traités: L'exposition du mécanorécepteur à une dose quotidienne de 80 mg de gentamicine pendant quinze jours provoque une désolidarisation de la ciliature de l'apex de la cellule sensorielle; les cils se détachent de la cellule sensorielle et se retrouvent dans la cupule qui coiffe l'organe (Fig. B). Cependant, les différentes zones composant l'organe ont conservé leur intégrité structurale.

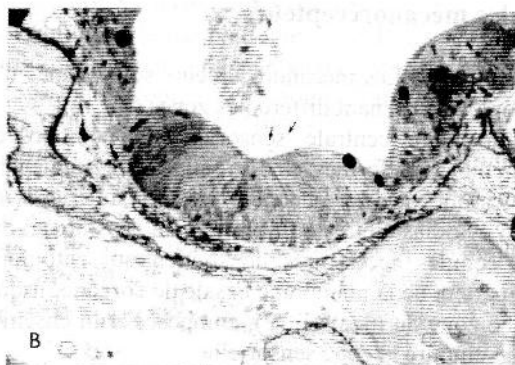


Fig. B : Mécanorécepteur de *Gambusia affinis* après 15 jours d'exposition à une dose quotidienne de 80mg de gentamicine. Le traitement provoque une désolidarisation de la ciliature de l'apex de la cellule sensorielle; les cils sont localisés dans la cupule (flèche); (grossissement x 400, coloration au bleu de toluidine)

ULTRASTRUCTURE DES CELLULES SENSORIELLES CILIEES DU MECANORECEPTEUR

Non traitées: L'observation du mécanorécepteur non traité, au microscope électronique à transmission, fait apparaître le cytoplasme électrodense de la cellule sensorielle ciliée (Fig.C).

Dans la partie apicale de la cellule sensorielle est localisée un plateau cuticulaire dans lequel est ancrée une ciliature composée d'un kinocil et de stéréocils. Dans le cytoplasme de ces cellules sensorielles sont rencontrées de nombreuses mitochondries (Fig.C) et de nombreuses vésicules (Fig.D);

La partie basale des cellules sensorielles de ces organes présentent les deux types d'innervation: l'innervation afférente et l'innervation efférente; la première comprend une terminaison nerveuse afférente apposée à la membrane de la cellule dont le cytoplasme voisin est occupé par des rubans synaptiques entourés de vésicules synaptiques (Fig.D) et la seconde est constituée par une terminaison nerveuse efférente riche en vésicules synaptiques et dans le cytoplasme de la cellule sensorielle ciliée, face à la terminaison, se trouve un saccule de réticulum endoplasmique (Fig.D).

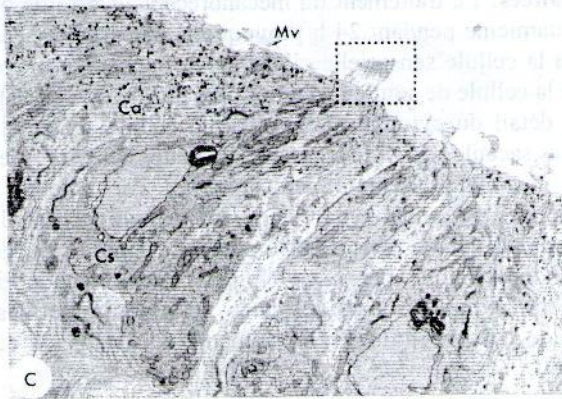


Fig.C : Ultrastructure de l'épithélium sensoriel de *Gambusia affinis* non traité. Coupe fine montrant une vue d'ensemble du mécanorécepteur; l'encart montre la ciliature sensorielle présente sur l'apex de la cellule sensorielle ciliée (Cs); Mv: microvillosités de l'apex de la cellule accessoire de soutien (Ca);
(grossissement x 5400, coloration à l'acétate d'uranyl et citrate de plomb)

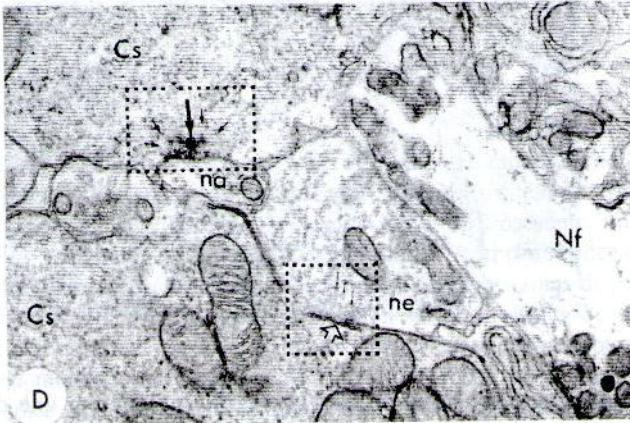


Fig . D: Détail du cytoplasme basal de la cellule sensorielle(Cs) et de son innervation chez *Gambusia affinis* non traité. L'encart rectangulaire montre la terminaison nerveuse afférente (na) apposée à la partie basale de la cellule sensorielle ciliée(Cs) ou sont observés le ruban synaptique (flèche) entoré de nombreuses vésicules synaptiques (patites flèches). L'encart carré montre la terminaison nerveuse efférente (ne) riche en vésicules (petites flèches) et le sacule (flèche vide) présent dans le cytoplasme de la cellule sensorielle ciliée (Cs). Nf: nerf.

(grossissement x 25500, coloration à l'acétate et citrate de plomb)

Traitées: Le traitement du mécanorécepteur à l'aide d'une seule dose de gentamicine pendant 24 h provoque la disparition de la ciliature de l'apex de la cellule sensorielle ciliée; en revanche, les microvillosités de l'apex de la cellule de soutien sont toujours présentes (Fig. E).

Le détail du cytoplasme basal de la cellule sensorielle montre l'absence du saccule dans le cytosol de cette dernière bien que la terminaison nerveuse efférente soit présente; Par ailleurs, le ruban synaptique et les vésicules synaptiques qui l'entourent ont disparu du cytoplasme de la cellule sensorielle où seuls l'appareil de golgi et le réticulum endoplasmique persistent (Fig.F). Les mitochondries et les vésicules sont moins nombreuses dans le cytoplasme des cellules sensorielles de l'organe traité(Fig.F) comparé à celui de la cellule non traitée (Fig.D).

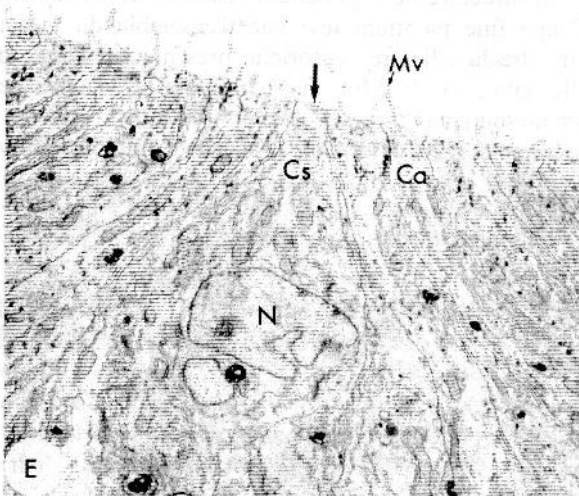


Fig.E : Epithélium sensoriel de *Gambusia affinis* traité par une dose de 80mg de gentamicine pendant 24 heures. Coupe fine du mécanorécepteur montrant une vue d'ensemble de l'organe. Noter la disparition de la ciliature de l'apex (flèche) de la cellule sensorielle (Cs); en revanche les microvillosités (Mv) persistent sur l'apex des cellules accessoires (Ca); N: noyau; (grossissement x 5400, coloration à l'acétate d'uranyl et citrate de plomb)

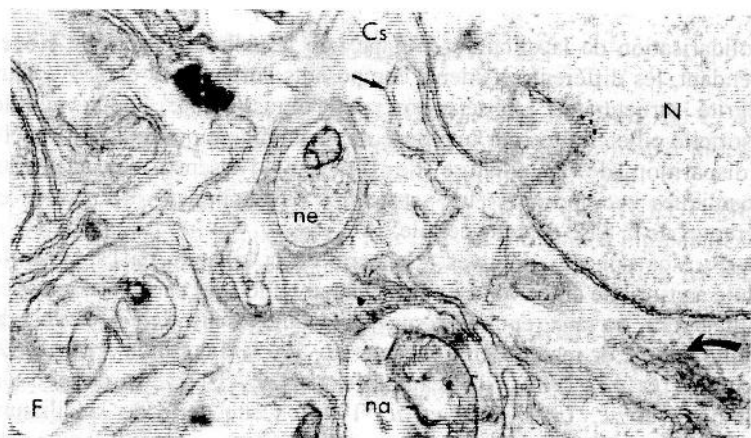


Fig.F: Détail du cytoplasme basal de la cellule sensorielle et de son innervation chez *Gambusia affinis* traité par une dose de 80 mg de gentamicine pendant 24 heures. Présence de la cellule sensorielle ciliée (Cs). Noter la présence de la terminaison nerveuse afférente (na) mais l'absence, dans le cytoplasme ensorielle, de rubans synaptiques et de vésicules synaptiques; seuls persistent du réticulum endoplasmique (flèche) et l'appareil de Golgi (flèche incurvée); N: noyau. (grossissement x 25500, coloration à l'acétate d'uranyl et citrate de plomb)

DISCUSSION

Les résultats de nos observations de microscopie photonique, portant sur la structure des mécanorécepteurs, non traités, de *Gambusia affinis*, montrent que l'organe est épidermique. Il présente une zone sensorielle "centrale" coiffée d'une cupule et composée de cellules sensorielles entourées de cellules de soutien, et d'une zone du manteau "périphérique" plus ou moins importante selon la taille de l'organe considéré. L'observation de nos coupes fines, de mécanorécepteurs non traités, en microscopie électronique à transmission a révélé la présence dans la zone sensorielle, de cellules sensorielles à cytoplasme sombre et de cellules de soutien à cytoplasme clair, et dans la zone périphérique des cellules effilées très nombreuses. Les cellules sensorielles possèdent dans leur cytoplasme basal, au voisinage de la membrane, les structures synaptiques qui composent les synapses afférente (ruban synaptique entouré de vésicules) et efférente (sacculé). Dans la partie apicale de la cellule sensorielle ciliée est présent un plateau cuticulaire à partir duquel naissent des stéréocils et un kinocil qui forment la ciliature de la cellule qui assure le contact avec la cupule.

Nos observations de microscopie photonique montrent que l'exposition du mécanorécepteur à de la gentamicine provoque une

désolidarisation de la ciliature de l'apex de la cellule sensorielle ciliée; cependant, les différents éléments composants l'organe ont conservé leur intégrité structurale. L'observation de l'ultrastructure de la cellule sensorielle ciliée traitée par une dose de gentamicine pendant 24h révèle la disparition de la ciliature de l'apex et l'absence des éléments cytosoliques composants les structures synaptiques afférentes et efférentes de la base de cette cellule.

Nos données relatives à la perte de la ciliature de l'apex de la cellule sensorielle ciliée traitée par la gentamicine sont en accord avec les résultats des travaux entrepris sur les cellules sensorielles ciliées de l'oreille interne de mammifères (Aran *et al.*, 1995; Hayashida *et al.*, 1989; Takumida *et al.*, 1989), d'oiseau (Ofsje *et al.*, 1997), et de poisson (Lombarte *et al.*, 1993; Platt *et al.*, 1993). Cette perte de la ciliature engendrée par l'administration de gentamicine aurait pour origine la destruction du glycocalyx par l'aminoglycoside (Takumida *et al.*, 1989). Le glycocalyx intervient dans le maintien des cils séparés et dans la prévention de la fusion des membranes (Takumida *et al.*, 1988). Nos observations montrent que l'effet de la gentamicine sur les cellules sensorielles ciliées commence déjà après 24h de traitement. Cette rapidité d'action a été rapportée par Aran *et al.*, (1995) qui observent l'antibiotique au 2^e jour du traitement dans une région proche du plateau cuticulaire de la cellule sensorielle ciliée de l'oreille interne de mammifères. Ces observations confortent l'idée de toxicité sélective des aminoglycosides vis à vis des cellules sensorielles ciliées.

L'observation du cytoplasme en microscopie électronique à transmission révèle l'absence des structures cytosoliques composants les synapses aussi bien afférentes qu'efférentes. Ces résultats montrent l'état de dégénérescence dans lequel se trouve la cellule sensorielle ciliée traitée par la gentamicine. Ils expliquent aussi la perte, réversible, de la réaction de la ligne latérale rapportée par Kaus, (1987) après traitement d'*Aplocheilichthys lineatus* (poisson-Cyprinodontidae) par des antibiotiques aminoglycosidiques. Cette perte réversible de la sensibilité s'expliquerait par le maintien des terminaisons nerveuses afférentes et efférentes au voisinage de la cellule sensorielle dont les structures synaptiques cytosoliques sont altérées par l'antibiotique.

Ces premiers résultats montrent que les mécanorécepteurs de *Gambusia affinis*, en raison de leur présence dans des canaux ouverts sur le milieu aquatique, représentent un modèle adéquat pour étudier l'action de substances toxiques sur le fonctionnement de cellules sensorielles et de leur composants spécifiques.

Dans le cas présent, ces organes permettent d'apprécier la sensibilité de structures cellulaires propres aux cellules sensorielles, telles que les vésicules synaptiques, aux effets de toxines diverses ou d'antibiotiques aminoglycosidiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARAN J-M., ERRE J-P, GUILHAUME A., AUROUSSEAU C.** 1982. The comparative ototoxicities of gentamicin, tobramycin, and dibekacin in the guinea pig. *Acta Otolaryngol.*(Stockholm), suppl.390
- ARAN J-M., CHAPPERT C., DULON D., ERRE J-P AUROUSSEAU C.** 1995. Uptake of amikacin by hair cells of the guinea pig cochlea and vestibule and ototoxicity comparison with gentamicin. *Hearing res.* 82(2): 179-83
- DE GROOT J. C. M. J., MEEUWSEN F , RUIZENDAAL W.E., VELDMAN J. E.** 1990 Uptake and intralysosomal accumulation of gentamicin in the cochlea: an immunoelectron microscopy study. *Hearing Res.* 50: 35-42.
- DULON D., ZAJIC G., ARAN J-M, SCHACHT J.** 1989. Aminoglycoside antibiotics impair calcium entry but not viability and motility in isolated cochlear outer hair cells. *J. Neurosci. Res.* 24: 338- 46
- DULON D., SAITO T., HIEL H., ARAN J-M** 1992. Drug ototoxicity tested on inner ear sensory hair cells in vitro. *Proceedings of the Sixth Rhône -Poulenc Rorer Table Conference, In vitro Methods in Toxicology*, Jolles G., Cordier A., eds. academic Press 17: 367-377.
- FORGE A., LI L., NEVILL G.** 1998. Hair cell recovery in the vestibular sensory epithelia of mature guinea pigs. *J. Comp. Neurol.*397: 69-88.
- HAYASHIDA T., HIEL H., DULON D., ERRE J.P , GUILHAUME A., ARAN J.M.** 1989. dynamic changes following combined treatment with gentamicin and ethacrynic acid with and without acoustic stimulation. Cellular uptake and functional correlates. *acta Otolaryngol.* (Stockh.) 108 (5-6): 404-13.
- HIEL H., SCHAMEL A., ERRE J-P, HAYASHIDA T., DULON D., ARAN J-M.** 1993. Cellular and subcellular localization of tritiated gentamicin in the guinea pig cochlea following combined treatment with ethacrynic acid. *Hearing Res.* 57-: 157-65.
- JANAS J. D., COTANCHE D., RUBEL E. W.** 1995. avian cochlear hair cell regeneration: stereological analyses of damage and recovery from a single high dose of gentamicin. *Hear res.* 92: 17-25. Kaus S., 1987. The effect of aminoglycoside antibiotics on the lateral line organ of *Aplocheilus lineatus* (Cyprinodontidae). *acta Otolaryngol.* (Stockh.) 103: 291-98.
- KROESE A. B. A., DAS A., HUDSPETH A.J.** 1989. Blockage of transduction channels of hair cell in bullfrog's sacculus by aminoglycoside antibiotics. *Hearing Res.* 37: 203-18. Lindeman H. H. 1979. Studies on morphology of the sensory regions of the vestibular apparatus. *Erg. Anat.* 42: 7-113.
- LOMBARTE A., YAN H.Y., POPPER A.N., CHANG J.S., PLATT C.** 1993. Damage and regeneration of hair cell ciliary bundles in a fish ear following treatment with gentamicin. *Hearing Res.* 64: 166-74.

- NAKAGAWA T., KAKEHATA S., AKAIKE N., KOMUNE S., TAKASAKA T., UEMURA T.** 1992. Effects of Ca^{2+} antagonists and aminoglycoside antibiotics on Ca^{2+} current in isolated outer hair cells of guinea pig cochlea. *Brain Res.* 580: 345-7.
- OFSIE M.S., HENNIG A.K., MESSANA E.P., COTANCHE D.A.** 1997. Sound damage and gentamicin treatment produce different patterns of damage to the efferent innervation of the chick cochlea. *Hearing Res.* 113(1-2): 207-23.
- PLATT C., AND YAN H.Y.** 1993. Dramatic differences between fish species for gentamicin pharmacotoxicity. *Abstr. Assec. Rec. Otolaryngol.* 16: 562.
- REYNOLDS E.S.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208.
- TAKUMIDA M., HARADA Y., WERSÄLL J., BAGGER-SJOBÄK D.** 1988. The glycocalyx of inner ear sensory and supporting cells. *Acta Otolaryngol. suppl. (stockh.)* 458:84-9.
- TAKUMIDA M., BAGGER-SJOBÄK D., HARADA Y., WERSÄLL J.** 1989. Sensory hair fusion and glycocalyx changes following gentamicin exposure in the guinea pig vestibular organs. *Acta Otolaryngol. (stockh.)* 107 (1-2):39-47.
- TRUMP B.F., SMUCKLER E.A., BENDITT E.P.** 1961. A method for staining epoxy sections for light microscopy. *J. Ultrastruct. Rec* 5: 343-48.
- WAKSMAN S.A.** 1953. Streptomycin: background, isolation, properties and utilisation. *Science* 118: 259-66.
- WERSÄLL J.** 1960. Vestibular receptor cells in fish and mammals. *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.* 163: 25-29.
- YAN H.Y., SAIDEL W.M., CHANG J. S., PRESSON J.C., POPPER A.N.** 1991. Sensory hair cells of the fish ear: evidence of multiple types based on ototoxicity sensitivity. *Proc. R. soc . lond. B.* 245-133-38

* Ce travail a pu être réalisé grâce à une collaboration entre Jean-Pierre DENIZOT et Mourad BENSOUILAH, entrant dans le cadre de l'accord DRU/CNRS.

*Faculté des Sciences, Université d'Annaba; (Algérie)

** Unité de Neurosciences Intégratives et computationnelles; CNRS, Gif sur Yvette (France)