



HAL
open science

Mise au point d'un nouveau modèle animal de pathologie vestibulaire

David Péricat

► **To cite this version:**

David Péricat. Mise au point d'un nouveau modèle animal de pathologie vestibulaire. Neurosciences. 2018. hal-02002089

HAL Id: hal-02002089

<https://ephe.hal.science/hal-02002089>

Submitted on 31 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par

David Péricat

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Mise au point d'un nouveau modèle animal de pathologie
vestibulaire**

Soutenu le 14/12/2018

devant le jury suivant :

Dr Gwenaëlle Catheline, MC EPHE – Présidente
Dr Brahim Tighilet, MCU AMU – Tuteur scientifique
Dr Nadine Mestre-Frances, DE EPHE – Tutrice pédagogique
Dr Stéphane Besnard, MCU-PH – Rapporteur
Dr Maya Elzière, ORL Hopital Européen de Marseille – Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de :

Brahim Tighilet
UMR 7260 - Laboratoire de Neurosciences Sensorielles et Cognitives
(Marseille).
Dirigée par Béatrice Alescio-Lautier

Et de

Nadine Mestre-Frances
UMR_S 1198 Mécanismes moléculaires dans les démences
neurodégénératives (Montpellier).
Dirigée par Phillipe Verdier
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)
Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : Approche
Translationnelle des Maladies Neurodégénératives (TRANS-NEURO)

Remerciements

Ce mémoire signe la fin d'une période d'apprentissage très enrichissante aussi bien sur le plan professionnel que sur le plan personnel. Cette formation m'a permis, à la fois, d'assouvir mon désir d'apprendre, et en même temps d'attiser ma soif de connaissances. Il marque aussi la fin d'une longue période de remise en question et de travail soutenu et complexe en parallèle de mon activité professionnelle pour lequel l'idée d'arrêter m'a plusieurs fois effleuré l'esprit. C'est aussi l'occasion pour moi de remercier les rencontres sans qui ce projet serait resté dans le domaine de l'improbable.

Nadine Mestre-Francès qui a accepté d'être ma tutrice pédagogique.

Brahim Tighilet qui a accepté d'être mon tuteur scientifique et bien au-delà qui, en croyant en moi, a su me remettre le pied à l'étrier après une mauvaise chute et a su susciter chez moi un profond intérêt pour le système vestibulaire.

Christian Chabbert pour son soutien dans cette épreuve, son partage de connaissances et ses conseils dans la rédaction.

"Papa" Yves Cazals qui, par ses conseils, l'intérêt qu'il a porté à ce projet, son honnêteté et sa franchise, a fait que je me suis acharné à aller jusqu'au bout de ma démarche.

Mon "petit poney" Guillaume Rastoldo pour sa joie, sa bonne humeur, et parfois son dilettantisme mais néanmoins fiabilité.

De manière générale, je remercie l'ensemble du laboratoire et plus particulièrement Christian Xerri et Béatrice Aléscio-Lautier qui ont soutenu cette démarche auprès du CNRS. Nadia Mellili pour sa bonne humeur constante, son efficacité à rembourser les frais de missions et pour le plaisir de la côtoyer quotidiennement, Jacques Léonard juste pour le remercier d'exister au sein de ce laboratoire et par son incarnation du sérieux sans se prendre au sérieux. Isabelle Watabé, ma colocataire de bureau pour son calme et sa patience.

Enfin, je remercie Gwenaëlle Catheline en qualité de Présidente de jury, Maya Elzière en qualité d'examinatrice et Stéphane Besnard en qualité de rapporteur d'avoir accepté de lire et d'évaluer le présent travail.

Table des matières

I. Introduction Bibliographique	4
1. Données Epidémiologiques et Générales	5
2. Le système vestibulaire et sa fonction	7
2.1. Système vestibulaire périphérique.....	7
2.1.1. Les récepteurs vestibulaires.....	9
2.1.1.1. Les canaux semi-circulaires.....	9
2.1.1.2. Les récepteurs otolithiques : l'utricule et le saccule.....	9
2.1.1.3. L'épithélium sensoriel et ses cellules ciliées vestibulaires.....	10
2.1.1.4. Le ganglion de Scarpa.....	12
2.2. Le Système vestibulaire central et son organisation anatomo-fonctionnelle.....	13
3. Le syndrome vestibulaire	16
3.1. Le syndrome vestibulaire.....	16
3.2. La compensation vestibulaire : Le retour d'un équilibre électrophysiologique entre les noyaux vestibulaires homologues.....	20
4. Mise au point de modèle	21
4.1. Revue des modèles animaux et limites.....	21
4.2. Des méthodes d'évaluation du syndrome vestibulaire qui manquent de sensibilité.....	23
II. Matériels et Méthodes	24
1. Mise au point de la Neurectomie Vestibulaire Unilatérale (NVU) chez le Rat	25
1.1. Animaux.....	25
1.2. Anesthésie.....	25
1.3. Approche chirurgicale.....	25
1.4. Validation histologique de la neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU).....	28
1.4.1. Collecte et fixation des tissus.....	28
1.4.2. Coupes et coloration histologique.....	28
2. Méthode d'évaluation du syndrome vestibulaire	29
2.1. Méthode d'évaluation subjective des signes vestibulaires.....	29
2.2. Méthode d'évaluation objective automatisée de la répartition pondérale dynamique.....	30
2.2.1. Dispositif d'analyse de la répartition pondérale dynamique.....	30
2.2.2. Acquisition des données en situation normale.....	31
2.2.3. L'analyse des données.....	32
2.2.4. Barycentre.....	34
2.2.5. Acquisition des données en situation après réactivation du syndrome vestibulaire.....	35
3. Etude pharmacologique	35
3.1. Animaux.....	36
3.2. Traitement pharmacologique.....	36
3.3. Acquisition des données.....	36
4. Analyses Statistiques	37
III. Résultats	38
1. Mise au point de la Neurectomie Vestibulaire Unilatérale (NVU) chez le Rat	39
1.1. Validation comportementale de la NVU.....	39
1.2. Validation histologique de la NVU.....	39
2. Evaluation du syndrome vestibulaire	40
2.1. Evaluation subjective des signes vestibulaires.....	40
2.2. Evaluation objective automatisée de la répartition pondérale dynamique.....	44
2.2.1. Comparaison du pourcentage de temps passé sur deux et quatre pattes.....	44
2.2.2. Comparaison du pourcentage de temps passé sur les pattes avant gauche et droite.....	47

2.2.3. Comparaison de la distribution pondérale sur l'axe antéro-postérieur.....	49
2.2.4. Comparaison de la distribution pondérale sur l'axe latéral.....	50
2.2.5. Evolution du barycentre.....	51
3. Etude pharmacologique : Utilisation du modèle rongeur de neurectomie vestibulaire pour tester l'effet antivertigineux de médicaments de référence prescrits en pathologie vestibulaire en France	52
3.1. Traitement à la bétahistine	52
3.1.1. Evaluation subjective du syndrome vestibulaire	52
3.1.2. Comparaison du pourcentage de temps passé sur deux et quatre pattes	54
3.1.3. Comparaison du temps passé sur les pattes avant gauche et avant droite.....	55
3.1.4. Distribution pondérale et évolution du barycentre	56
3.2. Traitement à l'acétyl-DL-Leucine (Tanganil®)	57
3.2.1. Evaluation subjective du syndrome vestibulaire	57
3.2.2. Comparaison du pourcentage de temps passé sur deux et quatre pattes	58
3.2.3. Comparaison du temps passé sur les pattes avant gauche et avant droite.....	59
3.2.4. Distribution pondérale et évolution du barycentre	61
IV. Discussion	62
1. Validation du rat comme modèle animal de pathologie vestibulaire.....	63
2. Utilisation d'un nouveau dispositif d'étude de la répartition pondérale dynamique au sol comme outil de diagnostic et de suivi du syndrome vestibulaire	66
3. Analyse des différents paramètres	67
3.1. Temps passé sur les pattes avant et arrière et répartition pondérale sur l'axe antéro-postérieur	67
3.2. Temps passé sur les pattes avant et répartition pondérale sur l'axe latéral.....	68
3.3. Intérêt de la méthode de réactivation du syndrome vertigineux.....	69
3.4. Comparaison avec l'étude qualitative	70
4. Etude pharmacologique de l'effet de la bétahistine	71
5. Etude pharmacologique de l'effet de l'acétyl-DL-Leucine	72
6. Perspectives	74
6.1. Evolution des tests d'évaluation.....	74
6.2. Tests dynamiques	76
6.3. Intérêt pour la clinique et le patient.....	77
V. Conclusion.....	79
VI. Références Bibliographiques	81
VII. Annexes	87
Description des paramètres d'analyse des acquisitions avec le dispositif de distribution pondérale	88
Complete and irreversible unilateral vestibular loss: A novel rat model of vestibular pathology	90
Adjustment of the dynamic weight distribution as a sensitive parameter for diagnosis of postural alteration in a rodent model of vestibular deficit.....	100

Table des figures

Figure 1 : Illustration anatomique de l'oreille humaine	8
Figure 2 : Le système vestibulaire périphérique	8
Figure 3: Illustration des macules utriculaires et sacculaires.....	9
Figure 4 : Illustration des différents types de cellules sensorielles présent dans le système vestibulaire périphérique.....	10
Figure 5 : Illustration de la mécanique d'activation des cellules sensorielles	12
Figure 6 : Projection du système vestibulaire périphérique sur les noyaux vestibulaires	13
Figure 7 : Illustration des cibles de projection des noyaux vestibulaire	14
Figure 8 : Organisation anatomo-fonctionnelle du système vestibulaire central et les conséquences fonctionnelles de la neurectomie vestibulaire unilatérale	17
Figure 9 : Illustration de l'approche chirurgicale pour réaliser la neurectomie vestibulaire unilatérale	27
Figure 10 : Ensemble des éléments qui composent le dispositif et leur assemblage.....	31
Figure 11 : Illustration du dispositif en situation d'acquisition	32
Figure 12 : Ecran d'analyse type	33
Figure 14 : Confirmation histologique de la neurectomie vestibulaire unilatérale	40
Figure 15 : Illustration des différents comportements spécifiques du syndrome vestibulaire observés durant la phase aiguë (3 jours) suivant la neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU).	41
Figure 16 : Représentation de l'évaluation subjective des signes vestibulaires	43
Figure 17 : Représentation du temps passé sur 2 et 4 pattes par les animaux du groupe contrôle (NaCl) avant et après la NVU	46
Figure 18 : Représentation du temps passé sur les pattes Avant Droite et Gauche par les animaux du groupe contrôle (NaCl) avant et après la NVU	48
Figure 19 : Représentation de la distribution pondérale sur l'axe antéro-postérieur.....	49
Figure 20 : Représentation de la distribution pondérale sur l'axe latéral	50
Figure 21 : Représentation de l'évolution du barycentre moyen avant neurectomie vestibulaire unilatérale et aux différents délais post-lésionnels	51
Figure 22 : Représentation de l'évaluation qualitative du syndrome vestibulaire avant et après réactivation	53
Figure 23 : Représentation du temps passé sur 2 et 4 pattes par les animaux du groupe traité oralement à la bétahistine avant et après la NVU	54
Figure 24 : Représentation du temps passé sur les pattes Avant Droite et Gauche des animaux du groupe traité à la bétahistine per os avant et après la NVU.....	55
Figure 25 : Représentation de l'évolution du barycentre aux différents délais des rats traités à la bétahistine aux différents délais	56
Figure 26 : Représentation de l'évaluation qualitative du syndrome vestibulaire avant et après réactivation.....	58
Figure 27 : Représentation du temps passé sur 2 et 4 pattes par les animaux du groupe traité à l'acétyl-DL-Leucine (Tanganil®) per os avant et après la NVU	59
Figure 28 : Représentation du temps passé sur les pattes Avant Droite et Gauche des animaux du groupe traité à l'acétyl-DL-Leucine (Tanganil®) per os avant et après la NVU	60
Figure 29 : Représentation de l'évolution du barycentre des rats traités à l'acétyl-DL-Leucine aux différents délais.....	61

I. Introduction Bibliographique

1. Données Epidémiologiques et Générales

En France, comme aux États Unis, le vertige constitue le 3^e motif de consultation chez le généraliste et représente 5% des urgences hospitalières (Bennet, 2008 ; Jalinière, 2014).

Les pathologies vestibulaires se caractérisent par des épisodes imprévisibles et souvent récurrents de vertiges, associés à des déséquilibres posturaux, au repos ou lors du déplacement. Ces atteintes sont souvent accompagnées d'étourdissements et de nausées, ainsi que de difficultés à fixer le regard pendant le mouvement. Cet ensemble de symptômes impacte considérablement les activités les plus élémentaires de la vie quotidienne. Le traumatisme psychologique lié à la crise aiguë de vertige et à la phobie de sa récurrence, associé à l'incapacité physique qui accompagne les désordres vestibulaires peuvent avoir des conséquences socioprofessionnelles importantes, accompagnées de troubles cognitifs pouvant conduire à un isolement psychologique et social (Jacob and Furman, 2001; Yardley et al., 1992).

Les solutions thérapeutiques actuelles à ces pathologies manquent de spécificité et d'efficacité malgré le fort besoin médical dans le domaine de la pathologie vestibulaire. Par exemple, les traitements reposent actuellement, en France, sur seulement deux médicaments : le Tanganil® et la bétahistine. Cette conjoncture faible en solutions thérapeutiques pourrait être due au fait, qu'aujourd'hui, peu de laboratoires sont impliqués dans cette thématique de recherche. Par conséquent, nous manquons de modèles d'étude adaptés pour comprendre les mécanismes physiopathologiques qui supportent les différents troubles vestibulaires, ainsi que de bio marqueurs spécifiques pour discriminer les différents types et stades des atteintes vestibulaires permettant de diriger des approches thérapeutiques adaptées (Chabbert, 2013). Par ailleurs, le système vestibulaire, comparé aux autres systèmes sensoriels, est un système hétéromodalitaire. Les informations traitées au niveau des noyaux vestibulaires (premières structures centrales dédiées au décodage de l'information vestibulaire) sont issues des afférences vestibulaires primaires, mais également des autres modalités sensorielles (tactiles, proprioceptives et visuelles). Les centres vestibulaires doivent avoir une forte capacité de stockage et de traitement de l'information. Au niveau neurochimique, on retrouve dans le système vestibulaire (central et périphérique),

pratiquement tous les systèmes de neurotransmetteurs, les systèmes hormonaux mais également la famille des neurotrophines (Soto and Vega, 2010). Si l'on considère les récepteurs de ces différentes familles neurochimiques comme de potentielles cibles pharmacologiques, on comprend pourquoi nous n'avons pas encore découvert un médicament antivertigineux efficace. Il existe ainsi aujourd'hui un fort besoin médical pour comprendre comment une atteinte vestibulaire se développe au sein de l'oreille interne et comment ses caractéristiques gouvernent l'hétérogénéité des symptômes vertigineux.

L'objectif de cette étude s'inscrit dans le cadre d'un diplôme SVT de L'EPHE et réside donc dans la mise au point d'un nouveau modèle animal de pathologie vestibulaire afin de répondre à ces questionnements, ou afin de réunir de nouvelles informations pour la compréhension de la physiopathologie vestibulaire. Pour cela nous avons entrepris, dans un premier temps, de développer la neurectomie vestibulaire unilatérale chez le rongeur, et plus précisément chez le Rat. Dans un deuxième temps, nous avons abordé un nouveau mode d'évaluation quantitative du syndrome vestibulaire. En dernier lieu, nous avons testé l'efficacité de médicaments antivertigineux prescrits en clinique dans les troubles d'ordre vestibulaire avec notre modèle lésionnel et notre mode d'évaluation. Les résultats de cette étude ouvrent des perspectives aussi bien sur le plan technique en améliorant les dispositifs et les tests pour les optimiser que sur le plan clinique permettant un meilleur diagnostic et suivi de la pathologie vestibulaire chez le patient.

2. Le système vestibulaire et sa fonction

Pour maintenir l'équilibre du corps, statique ou en mouvement, le système nerveux central dispose d'informations visuelles, somesthésiques (proprioceptives et tactiles), cérébelleuses, et vestibulaires. L'appareil vestibulaire renseigne sur la position de la tête dans l'espace grâce aux récepteurs vestibulaires, situés dans l'oreille interne, et la position du corps par-rapport à la gravité terrestre, en détectant les accélérations linéaires et angulaires de la tête ainsi que la gravité terrestre. Ainsi, le système vestibulaire participe au maintien de l'équilibre statique et dynamique via la coordination des réflexes d'équilibration des muscles du corps, des yeux, et du cou.

2.1. Système vestibulaire périphérique

Le système vestibulaire périphérique des mammifères se compose de récepteurs spécialisés localisés dans l'os temporal, plus précisément dans l'oreille interne (Fig. 1). Dans chaque oreille, il est composé, de trois canaux semi-circulaires et de deux récepteurs otolithiques (utricule et saccule) qui sont protégés par une structure osseuse appelée le labyrinthe osseux (Fig. 2). Ce dernier comprend une série de cavités dans lesquelles se trouve un liquide similaire au liquide céphalo-rachidien : la périlymphe.

De plus, il est tapissé par le labyrinthe membraneux, réceptacle d'un autre liquide : l'endolymphe, riche en ions potassium K^+ .

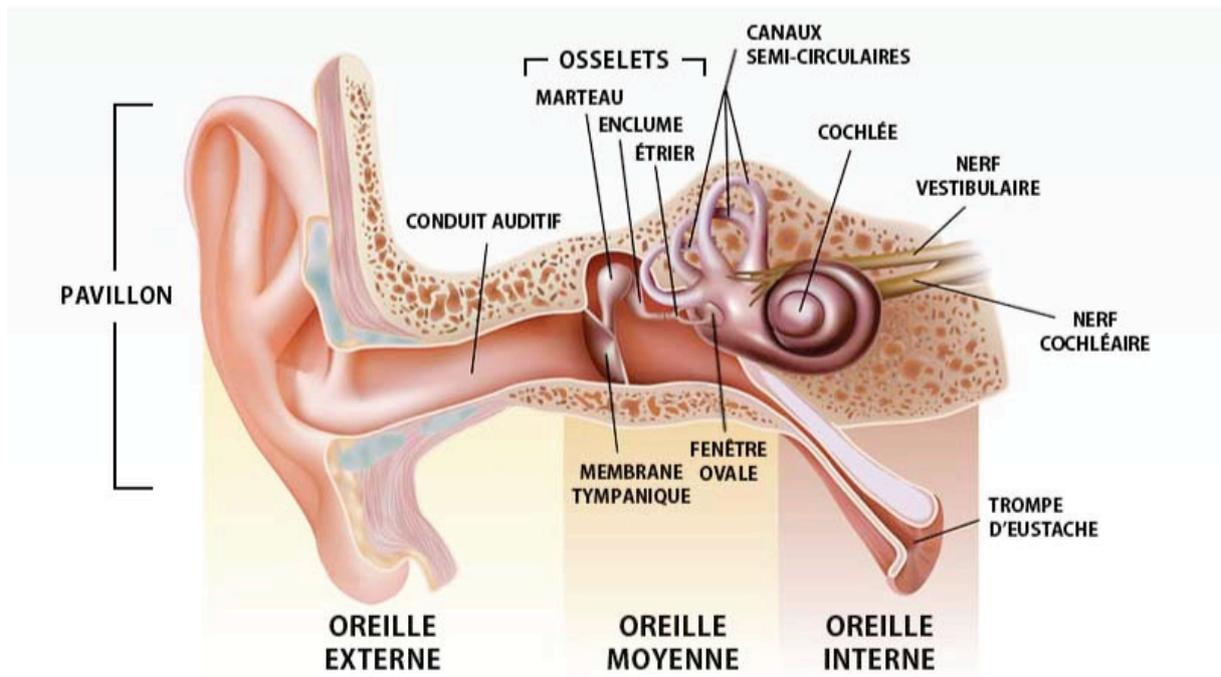


Figure 1 : Illustration anatomique de l'oreille humaine (<https://www.capa.dz/index.php/votre-audition?id=12>)

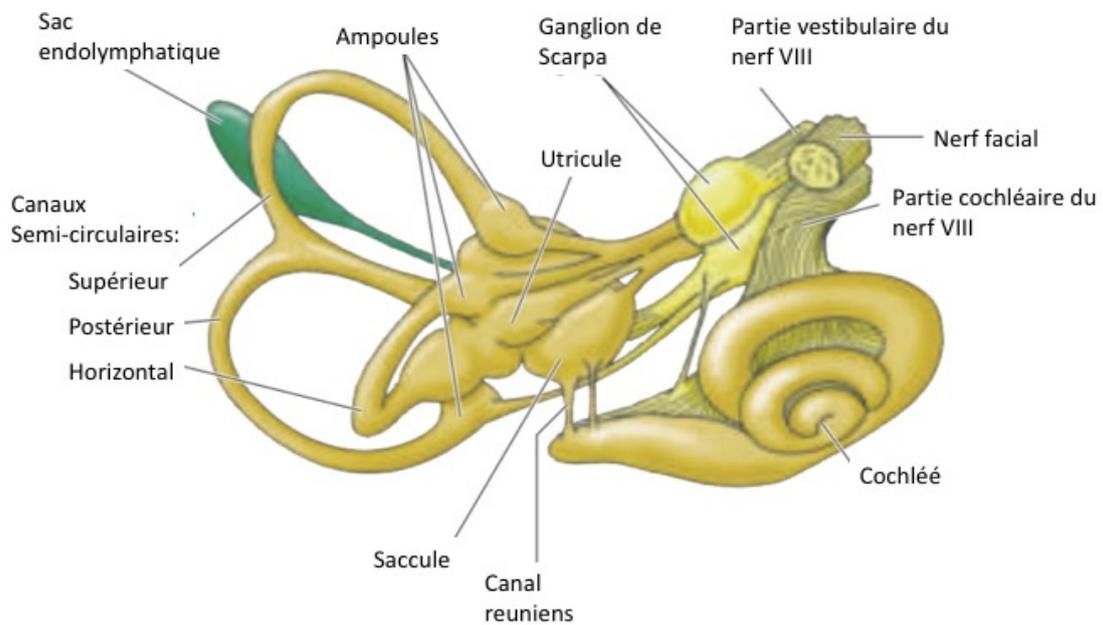


Figure 2 : Le système vestibulaire périphérique (Neurosciences, Purves, 3^{ème} édition).

2.1.1. Les récepteurs vestibulaires

2.1.1.1. Les canaux semi-circulaires

Les canaux semi-circulaires sont orientés approximativement de façon orthogonale dans les 3 dimensions de l'espace. On distingue les canaux semi-circulaires antérieurs, postérieurs et horizontaux (ou latéraux) qui débouchent à leurs bases sur les ampoules qui abritent les épithéliums sensoriels. Les cellules ciliées constituant ces épithéliums détectent les accélérations angulaires.

2.1.1.2. Les récepteurs otolithiques : l'utricule et le saccule

Ils détectent les accélérations linéaires verticales et horizontales et sont considérés comme les principaux senseurs de la gravité terrestre du corps humain.

La macule utriculaire est disposée sur un plan horizontal sensiblement parallèle au plan des canaux semi-circulaires horizontaux, tandis que la macule sacculaire est disposée sur un plan vertical proche de celui des canaux antérieurs (Fig. 3).

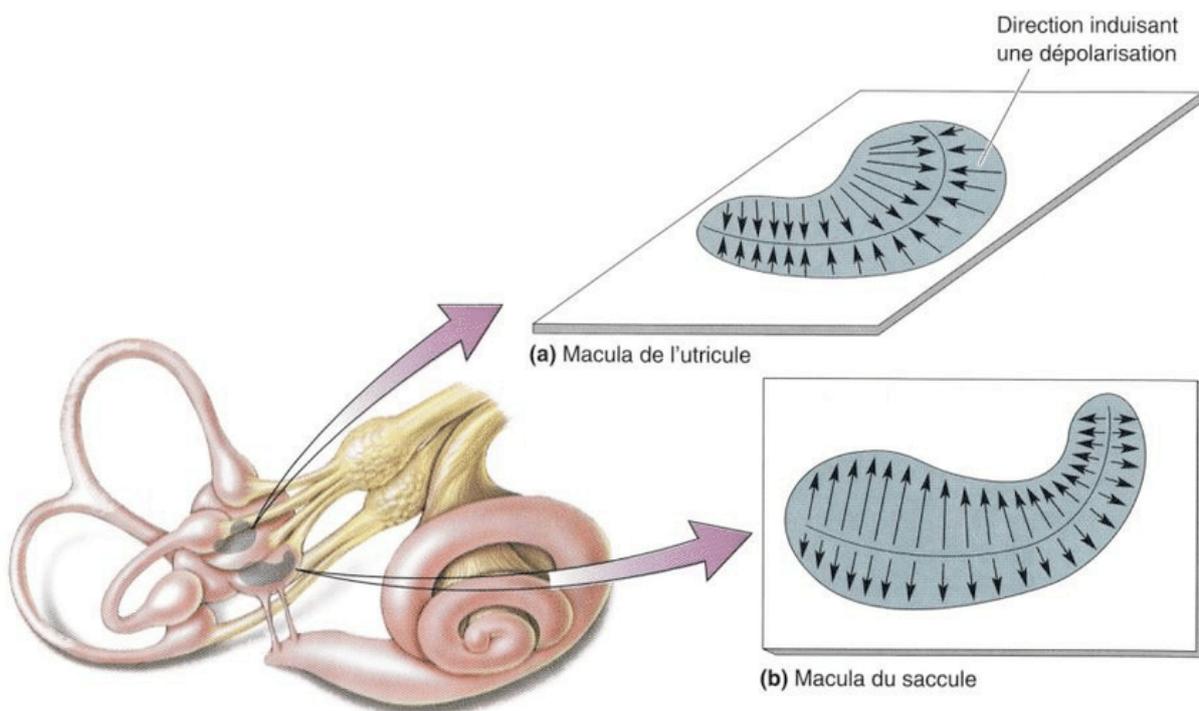


Figure 3: Illustration des macules utriculaires et sacculaires (Neurosciences, Purves, 3^{ème} édition)

2.1.1.3. L'épithélium sensoriel et ses cellules ciliées vestibulaires

Un épithélium constitué de cellules de soutien et de deux types de cellules sensorielles recouvre l'intérieur des ampoules des canaux semi-circulaires ainsi que des macules utriculaires et sacculaires. Les cellules de type I, piriformes, possèdent la forme d'une bouteille évasée et sont réparties de manière hétérogène dans les différents récepteurs vestibulaires. Les cellules de type II, quant à elles, sont de forme cylindrique (Fig. 4). Chacune de ces cellules est coiffée d'un assortiment de 50 à 110 stéréocils répartis sur trois rangées parallèles, ainsi que d'un kinocil plus long polarisé dans un axe spécifique.

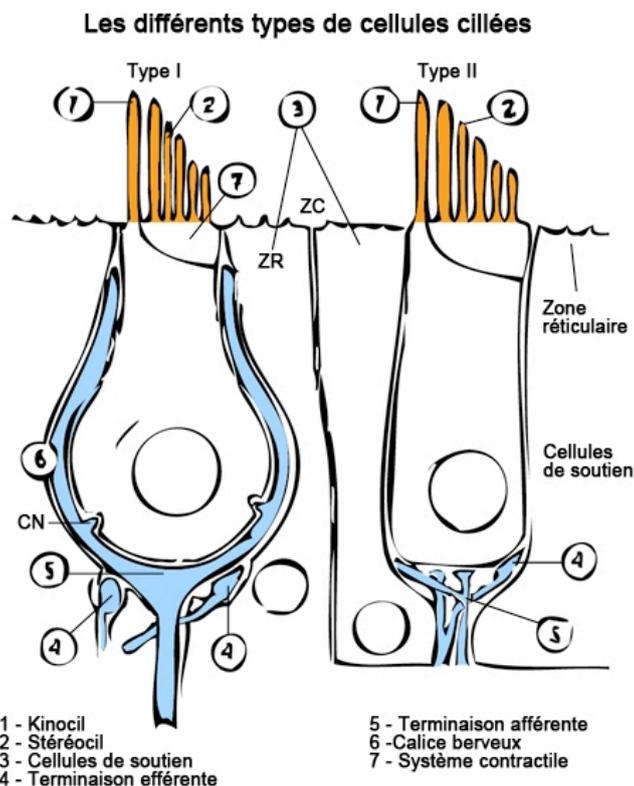


Figure 4 : Illustration des différents types de cellules sensorielles présent dans le système vestibulaire périphérique. Les cellules de type I sont dites "en calice", les cellules de type II sont dites en bouton.

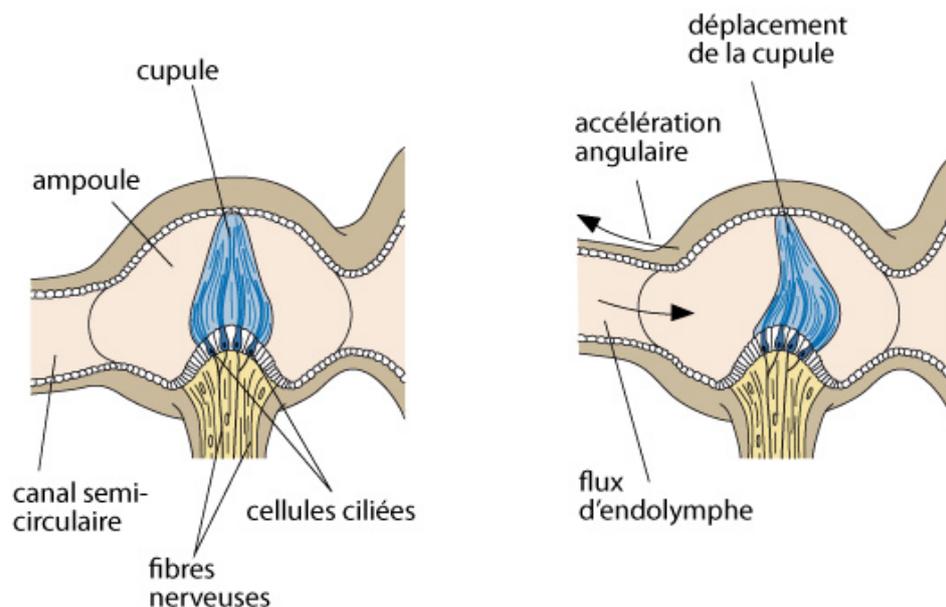
Au niveau des ampoules des canaux semi-circulaires, les cils de ces différentes cellules sont inclus dans un maillage protéique de consistance gélatineuse dénommée cupule tandis qu'au niveau de l'utricule et du saccule, ce maillage est recouvert de cristaux de carbonate de calcium, les otoconies ou otolithes.

Lors d'un déplacement, par suite des forces d'inertie, les stéréocils sont animés d'un mouvement. L'inclinaison des stéréocils dans la direction du kinocil induit l'ouverture de canaux ioniques (Chabbert, 2015) (fig. 5).

Ces derniers laissant passer des ions potassium, il s'en suit une dépolarisation de la cellule ciliée, déclenchant la libération de glutamate sur les fibres nerveuses vestibulaires. La transduction mécano-électrique du message nerveux se caractérise ainsi par une augmentation de la fréquence de décharge du nerf vestibulaire.

En revanche, le déplacement des stéréocils dans la direction opposée à celle du kinocil, induit une fermeture des canaux, ce qui hyperpolarise la cellule ciliée et réduit l'activité du nerf vestibulaire. Ainsi de très petites accélérations, de l'ordre de quelques dixièmes de g, et de très faibles inclinaisons de la tête, sont détectées par ces capteurs qui jouent un rôle d'accéléromètre et d'inclinomètre.

A



B

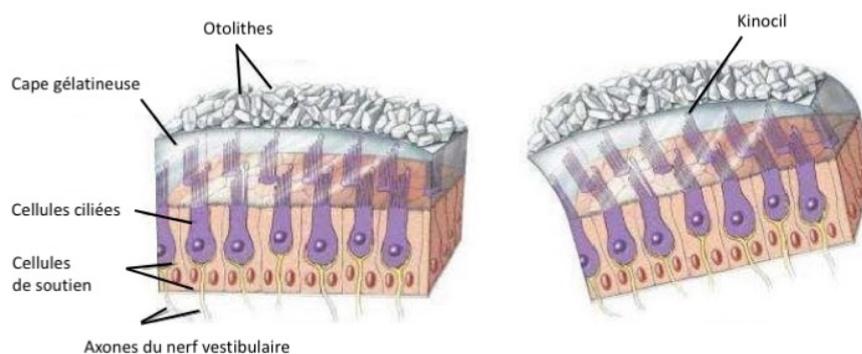


Figure 5 : Illustration de la mécanique d'activation des cellules sensorielles.

A : Au niveau des ampoules des canaux semi circulaires (<https://www.neurophysiologie.be/2-2-contenu-c.php>).

B : Au niveau des récepteurs otolithiques (Neurosciences, Purves, 3^{ème} édition)

2.1.1.4. Le ganglion de Scarpa

Les corps cellulaires des afférences vestibulaires sont situés dans le ganglion de Scarpa et projettent sur les noyaux vestibulaires ipsilatéraux situés dans le tronc cérébral. Les fibres de ces neurones bipolaires constituent le nerf VIII ou nerf vestibulo-cochléaire qui relie les récepteurs vestibulaires (cellules ciliées vestibulaires) aux noyaux vestibulaires du tronc cérébral.

Les informations captées de manière symétrique par l'ensemble de ces récepteurs permettent de rendre compte des déplacements de la tête et du corps de l'individu dans l'espace.

2.2. Le Système vestibulaire central et son organisation anatomo-fonctionnelle

Une fois captées par les récepteurs vestibulaires périphériques, les informations sont acheminées par les axones des neurones afférents constituant la branche vestibulaire du nerf vestibulo-cochléaire.

Ce nerf se projette ipsilatéralement sur les noyaux vestibulaires (NV) situés dans le tronc cérébral, au niveau de la jonction ponto-bulbaire et du plancher du IV^e ventricule (Fig. 6).

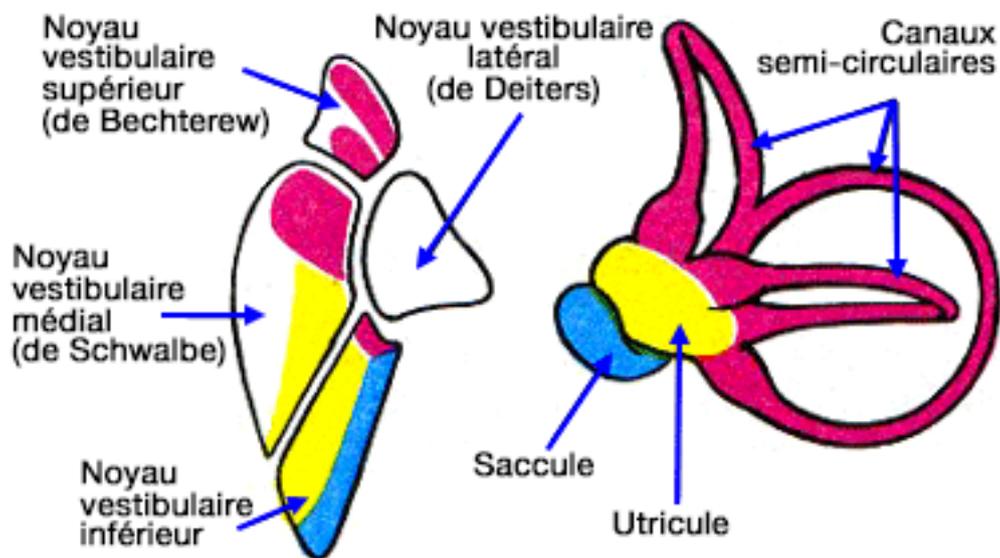


Figure 6 : Projection du système vestibulaire périphérique sur les noyaux vestibulaires (vetopsy.fr d'après Kahle)

Le complexe des NV se caractérise par quatre noyaux distinguables sur la base de leur position par rapport à l'axe symétrique, leur morphologie et leurs cibles de projection (Fig. 7).

1. Le noyau vestibulaire médian (NVM), appelé aussi noyau de Schwalbe ou triangulaire, est l'un des NV les plus volumineux. Il se projette aussi bien au niveau spinal via le faisceau vestibulo-spinal médian (FVSM), que sur le cervelet ou encore sur les noyaux oculomoteurs. Il contrôle les mouvements du cou et est en charge de la régulation yeux-tête-cou.

2. Le noyau vestibulaire inférieur (NVI), appelé également descendant, spinal ou encore noyau de Roller est principalement dévolu au contrôle de la posture. Il se projette essentiellement sur le cervelet, le noyau fastigial et la moelle épinière à travers le FVSM.

3. Le noyau vestibulaire latéral (NVL), ou encore noyau de Deiters, impliqué exclusivement dans le contrôle postural et duquel se projette la majeure partie des neurones constituant les voies vestibulo-spinales. Les neurones du NVL se projettent ipsilatéralement sur les motoneurones de la moelle épinière (à partir du niveau cervical jusqu'au niveau lombaire) via le faisceau vestibulo-spinal latéral (FVSL) et sur le cervelet.

4. Le noyau vestibulaire supérieur (NVS) désigné parfois noyau de Bechterew est un noyau essentiellement oculomoteur. Il est le seul à n'envoyer aucune projection directe vers la moelle épinière et à contacter principalement les noyaux oculomoteurs grâce au faisceau longitudinal médian ascendant (FLM).

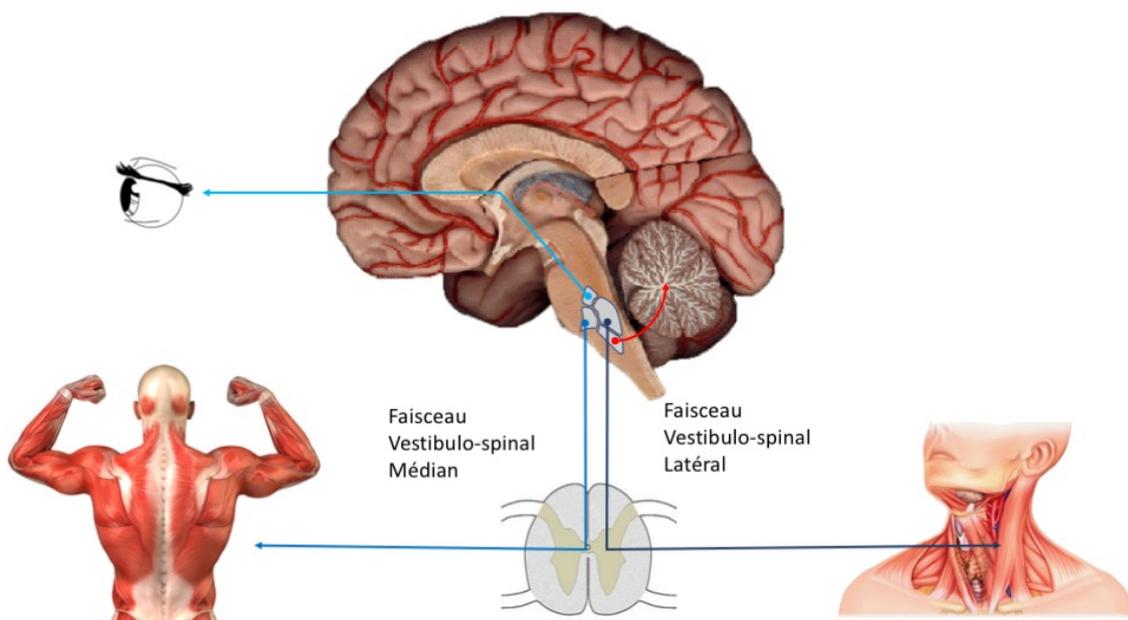


Figure 7 : Illustration des cibles de projection des noyaux vestibulaire.

Ainsi, les projections des NV propagent les messages vestibulaires vers un ensemble de structures très diversifiées :

1. Les structures oculomotrices du tronc cérébral via le faisceau longitudinal médian et le faisceau ascendant de Deiters. Les NV sont ainsi en relation avec les muscles oculomoteurs recevant également des projections des nerfs oculomoteur (nerf III), trochléaire (nerf IV) et abducens (nerf VI). Cet ensemble constitue le système vestibulo-oculaire. Ces voies sont dévolues essentiellement à la stabilisation du regard lors de mouvements de la tête par les réflexes vestibulo-oculaires (RVO).

2. La moelle épinière dont les étages médullaires reçoivent les axones des neurones des noyaux vestibulaires qui participent au système vestibulo-spinal. Ces voies sont dédiées essentiellement à la régulation de la posture et de la locomotion.

3. Le cervelet, qui fait partie du système vestibulo-cérébelleux. On parle de la boucle vestibulo-cérébelleuse impliquée à la fois dans la régulation des fonctions oculomotrice, posturale et locomotrice.

4. Enfin, les informations vestibulaires traitées au niveau des noyaux vestibulaires, transitent par des noyaux thalamiques pour aboutir au niveau d'un ensemble d'aires corticales spécialisées : le cortex vestibulaire pariéto-insulaire (CVPI), les aires 3a et 2v. A l'instar des noyaux vestibulaires, ces aires corticales sont multi sensorielles et intègrent donc, en plus des informations vestibulaires, des signaux divers issus de modalités sensorielles telles que la proprioception et la vision. L'existence d'un cortex traitant exclusivement les informations vestibulaires reste débattu. Il n'existe pas de cortex typiquement vestibulaire comme c'est le cas pour les autres modalités sensorielles, mais les données de la littérature attribuent au CVPI un rôle prioritaire (Lopez and Blanke, 2011). Ces aires corticales « vestibulaires » assurent des fonctions d'ordre perceptives et cognitives telles que la perception de la verticale subjective, la navigation et mémoire spatiale ainsi que la représentation du corps dans l'espace

3. Le syndrome vestibulaire

3.1. Le syndrome vestibulaire

Les informations vestibulaires sont acheminées par les nerfs vestibulaires de manière symétrique vers les noyaux vestibulaires (NV) homologues situés dans le tronc cérébral. Du fait de son organisation anatomo-fonctionnelle, une perte unilatérale partielle ou complète des informations vestibulaires engendre systématiquement, chez une grande variété d'espèces y compris l'homme, un syndrome vestibulaire caractéristique. En raison des interactions existantes entre les différentes modalités sensorielles et les noyaux vestibulaires centraux, cette atteinte unilatérale se répercute à différents niveaux. Quatre grandes classes de désordres peuvent être répertoriées :

- 1) oculo-moteurs, 2) posturo-locomoteurs, 3) végétatifs, et 4) perceptivo-cognitifs (Fig. 8).

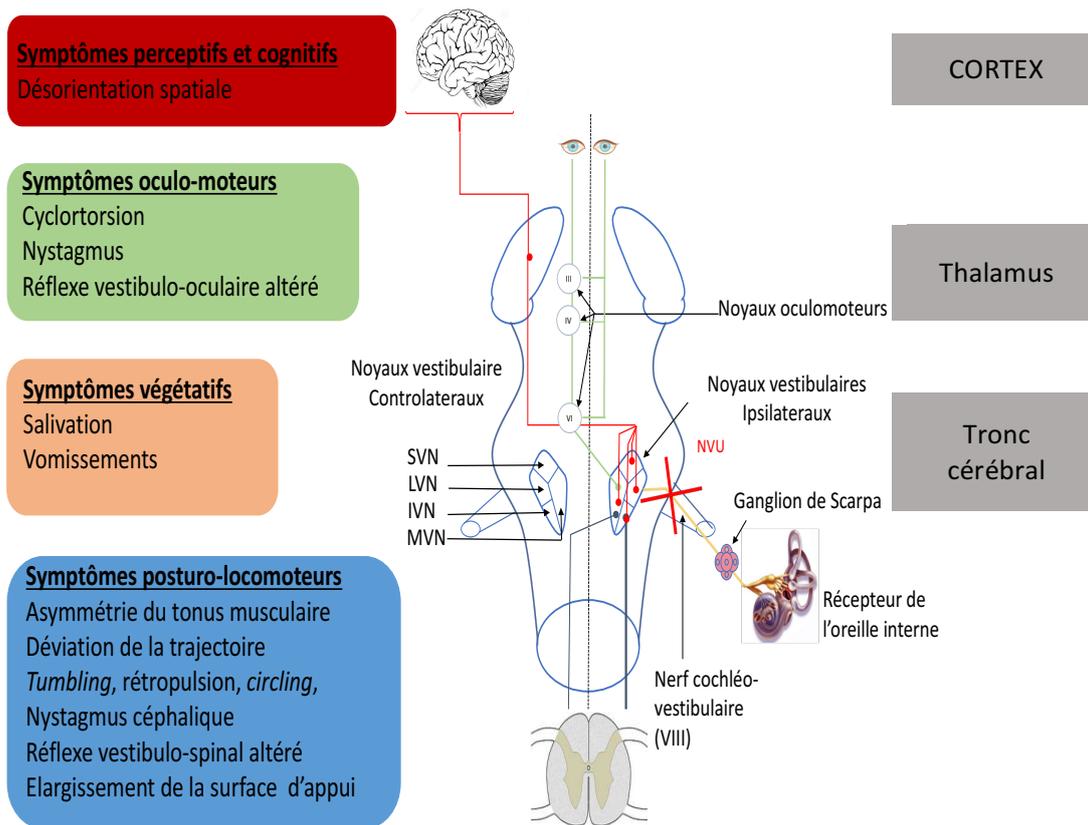


Figure 8 : Organisation anatomo-fonctionnelle du système vestibulaire central et les conséquences fonctionnelles de la neurectomie vestibulaire unilatérale.

Le nerf vestibulaire communique avec les cellules sensorielles des récepteurs vestibulaires (canaux semi-circulaires, utricule et saccule) et projette ipsilatéralement sur quatre noyaux vestibulaires : médian (MVN), inférieur (IVN), latéral (LVN) et supérieur (SVN). Les noyaux vestibulaires sont situés dans la partie dorso-latérale de la jonction ponto-bulbaire du tronc cérébral sous le plancher du IV^e ventricule. Ils constituent le premier relais des réflexes vestibulo-oculaires, vestibulo-spinal et vestibulo-végétatif, et des voies ascendantes vestibulo-corticales impliquées dans l'orientation spatiale. Les noyaux vestibulaires sont à l'origine des messages pré-moteurs (contrôle de la musculature oculaire et somatique) impliqués dans la régulation de la posture et la stabilisation du regard lors des mouvements de la tête. Ils projettent, à travers le faisceau longitudinal médian (MLF) sur les noyaux oculomoteurs (noyau oculomoteur III, noyau cochléaire ou abducens IV) dont les motoneurons contrôlent les muscles oculaires pour produire des réactions compensatoires de l'œil pour stabiliser les images sur la rétine lors des mouvements de la tête. Les projections vestibulo-spinales, issues du LVN ipsilatéral, atteignent tous les stades médullaires par le faisceau vestibulo-spinal latéral (VSLF). Les projections controlatérales médianes du noyau vestibulaire médian, inférieur et latéral constituent le faisceau vestibulo-spinal médian (MVSF) et contrôlent les motoneurons du cou et la partie supérieure de l'axe du corps. Les noyaux vestibulaires reçoivent des afférences cérébelleuses, médullaires (proprioceptives) et visuelles (optocinétiques) des noyaux vestibulaires controlatéraux et des aires corticales. Chez l'homme, plusieurs aires corticales sont impliquées dans la réception des messages vestibulaires multi-sensoriels (zone 3a zone 2v, cortex vestibulaire pariéto-insulaire) passant par le faisceau thalamocortical. Chez les rongeurs, l'apport vestibulaire au cortex est très répandu, affectant de nombreuses zones fonctionnellement différentes. Certaines de ces zones sont homologues avec les cartes vestibulaires des primates (par exemple, cortex cingulaire et somato-sensoriel), tandis que d'autres semblent être spécifiques aux rongeurs (par exemple, le cortex préfrontal médian). Compte tenu de cette organisation anatomo-fonctionnelle du système vestibulaire et de ses cibles de projection, la section du nerf vestibulaire unilatéral induit un quadruple syndrome : posture locomotrice (bleue), oculomotrice (verte), végétative (orange) et perceptive-cognitive (rouge).

On oppose classiquement les symptômes statiques aux symptômes dynamiques. Les symptômes dits statiques sont observables au stade aigu d'une lésion vestibulaire, en l'absence de mouvement de la tête ou de déplacement du corps dans l'espace.

1) Un syndrome oculomoteur statique se manifeste par un nystagmus oculaire horizontal spontané d'origine canalaire. Le nystagmus est un mouvement involontaire et saccadé du globe oculaire qui comprend deux composantes, une dérive lente du côté désafférenté et une saccade de rappel rapide dirigée vers le côté sain. Les globes oculaires sont également déviés vers le bas pour l'œil du côté ipsilatéral et vers le haut pour l'œil opposé ; il existe également une cyclotorsion du globe oculaire du côté de la lésion.

2) Un syndrome postural statique, caractérisé par une torsion générale de l'animal et une inclinaison de la tête du côté ipsilatéral à la lésion, est quelquefois accompagné d'un mouvement saccadé de la tête. La tonicité musculaire des membres se répartit asymétriquement, avec une hypotonie du côté lésé et une hypertonie des muscles du côté sain. Par conséquent, l'animal a tendance à chuter fréquemment et à élargir la surface de son polygone de sustentation afin d'abaisser son centre de gravité.

3) Des symptômes végétatifs se traduisent notamment chez l'homme par des épisodes nauséux, une sudation, une accélération du rythme cardiaque, ainsi qu'une modification de la pression artérielle et une hypothermie. Chez l'animal, ils se traduisent essentiellement par des vomissements et une salivation excessive.

4) Enfin, un syndrome statique se manifeste aussi par des désordres cognitifs, une perception erronée de la verticale visuelle subjective chez l'humain, ainsi que par des sensations illusoire de déplacement angulaire du corps et des vertiges rotatoires.

Les symptômes dits dynamiques sont observables lorsque l'individu ou l'animal initie un mouvement de la tête et/ou de l'ensemble du corps (Lacour, 2006). Ils comprennent des troubles survenant en réponse à des accélérations linéaires ou angulaires, liées à des déplacements du corps. Après lésion vestibulaire unilatérale, le gain du réflexe vestibulo-oculaire est altéré lors d'un mouvement de la tête du côté lésé (vitesse de la phase lente de

l'œil / vitesse angulaire de la tête). D'ordinaire, ce réflexe sert à stabiliser le regard, et donc les images sur la rétine, lors de rotation de la tête en opérant une rotation compensatoire de l'œil. Il permet de stabiliser l'image sur la rétine et de voir clairement l'environnement dans lequel la tête tourne. Il imprime à l'œil une rotation d'amplitude et de vitesse égales, mais de sens opposé à celle de la tête, de sorte que l'axe visuel est maintenu stable dans l'espace. Après une lésion vestibulaire unilatérale, les gains des réflexes vestibulo-oculaires et optocinétiques diminuent et sont incapables de compenser les rotations de la tête surtout du côté lésé. L'environnement visuel bascule dans le sens de la rotation de la tête et génère des oscillopsies. A cela, s'ajoute un syndrome postural dynamique caractérisé par une dégradation des propriétés des réflexes vestibulo-spinaux et vestibulo-nucal responsables de déséquilibres posturaux et chutes.

Les modifications de l'amplitude de réponse des muscles fléchisseurs et extenseurs participent également à l'inadéquation des réflexes posturaux. Les réflexes de redressement d'origine vestibulaire sont fortement altérés et associés à des mouvements giratoires.

L'expression de la majorité de ces symptômes diminue peu à peu, voire disparaît totalement grâce au phénomène de « compensation vestibulaire » qui correspond à la restauration des fonctions vestibulaires à un niveau comportemental. Celle-ci s'opère relativement rapidement selon les espèces (Borel et al., 2001; Lacour, 2006). Dans la majeure partie des cas, les symptômes statiques se dissipent complètement alors que les symptômes dynamiques rétrocedent partiellement avec une cinétique temporelle bien plus longue (Lacour and Bernard-Demanze, 2014; Lacour and Tighilet, 2010).

Après atteinte vestibulaire unilatérale, deux phases peuvent être distinguées :

- 1) La phase aiguë. Elle dure environ une semaine chez le chat et les symptômes sont extrêmement invalidants. Au fil du temps, les asymétries régressent et le chat peut à nouveau se déplacer sur quelques courtes distances sans chuter (Tighilet et al., 2015). Cette période dure entre 3 et 5 jours chez l'homme (Redon et al., 2011).

- 2) La phase de compensation. Progressivement les déficits oculomoteurs et posturo-locomoteurs diminuent jusqu'à disparaître pour certains. Cette phase s'étend d'un à deux mois chez le chat et plus de trois mois chez l'homme. Selon l'atteinte vestibulaire (périphérique ou touchant le nerf vestibulaire) la cinétique de ces désordres comportementaux peut varier. Cette récupération comportementale est un outil d'investigation singulier pour l'étude des mécanismes post-lésionnels du système nerveux central et de leurs corrélats comportementaux.

3.2. La compensation vestibulaire : Le retour d'un équilibre électrophysiologique entre les noyaux vestibulaires homologues.

Wolfgang Precht a été le premier à postuler en 1966 que l'expression des symptômes consécutifs à une atteinte vestibulaire s'explique notamment par l'asymétrie de l'activité électrique spontanée entre les noyaux vestibulaires (NV) sains et lésés. Une atteinte vestibulaire unilatérale rompt en effet toute communication entre les récepteurs vestibulaires et les NV ipsilatéraux à la lésion. Les neurones primaires dont le corps cellulaire se situe dans le ganglion de Scarpa sont la principale source excitatrice dirigée vers les NV. La perte de ces afférences laisse ainsi les neurones des NV ipsilatéraux privés de stimulations vestibulaires : ils deviennent quasiment silencieux. Par ailleurs, les neurones inhibiteurs ipsilatéraux décussant et se projetant sur les NV controlatéraux sont également réduits au silence, ce qui accroît d'autant plus l'activité électrique spontanée des NV controlatéraux (Markham and Yagi, 1984). Ces phénomènes ont été étayés par de nombreuses études (Precht et al., 1966; Ris et al., 1995; Zennou-Azogui et al., 1993). Habituellement, ce déséquilibre électrophysiologique se réajuste avec une cinétique variable en fonction des espèces parallèlement aux désordres vestibulaires qui s'atténuent. Chez le chat par exemple, environ trois semaines après une neurectomie vestibulaire unilatérale, l'activité électrique spontanée du NVL recouvre des valeurs similaires aux enregistrements pré-opératoires (Zennou-Azogui et al., 1993).

Des résultats identiques ont été rapportés chez le cobaye et la grenouille pour des délais légèrement inférieurs (Ris et al., 1995; Smith and Curthoys, 1988a, 1988b), établissant qu'un équilibre électrique est restauré entre les noyaux vestibulaires homologues. Le retour à une homéostasie électro-physiologique entre les NV est considéré comme le paramètre crucial de la compensation vestibulaire. Les mécanismes de plasticité qui supportent ce retour à l'équilibre sont nombreux et diverses. Ils comprennent des gènes, des neurotransmetteurs, des hormones, des facteurs de croissance, des facteurs de l'inflammation, etc... (Lacour and Tighilet, 2010). L'identification de cette mosaïque de mécanismes et de voies de signalisation intracellulaires permettrait de mettre en évidence des cibles thérapeutiques et de potentiels médicaments antivertigineux.

4. Mise au point de modèle

4.1. Revue des modèles animaux et limites

Différents modèles animaux ont été développés depuis plusieurs décennies afin de reproduire les symptômes de la pathologie vestibulaire rencontrés chez l'homme. Ces modèles permettent entre autres d'étudier les mécanismes neurobiologiques à la base de l'expression du syndrome vestibulaire et de sa compensation, et de tester de nouvelles solutions thérapeutiques via des approches pharmacologiques ou rééducationnelles.

Parmi ces modèles, nous pouvons répertorier 1) les lésions oto-toxiques spécifiques de l'oreille interne reproduisant une toxicité de médicaments tels que les aminoglycosides ou encore d'origine alimentaire (Hirvonen et al., 2005; Vignaux et al., 2012; Xia et al., 2012; Zhang et al., 2003); 2) Les lésions excito-toxiques reproduisant des conséquences néfastes sur la première synapse de cellules sensorielles en souffrance (Brugeaud et al., 2007; Desmadryl et al., 2012; Dyhrfeld-Johnsen et al., 2013; Gaboyard-Niay et al., 2016; O'Neill et al., 1999) ; 3) les lésions par labyrinthectomie chirurgicale permettant la destruction des récepteurs périphériques (Hitier et al., 2010; Patkó et al., 2003; Smith and Curthoys, 1989) ; 4) La neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU), qui consiste en une section du nerf vestibulo-cochléaire (nerf VIII), qui transmet les informations des organes sensoriels vestibulaires aux noyaux vestibulaires du tronc

cérébral. La NVU représente un outil de choix pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il s'agit d'une approche précise, contrôlable et reproductible, ce qui n'est pas le cas d'autres approches telles que la labyrinthectomie chimique. De plus, le modèle NVU reproduit l'ensemble des symptômes rencontrés chez l'homme dans plusieurs pathologies vestibulaires, avec une sévérité quasi maximale. De ce fait, ce modèle de section du 8^{ème} nerf crânien est particulièrement propice pour quantifier le syndrome vestibulaire et la cinétique de récupération des fonctions vestibulaires après lésion. Le modèle NVU est également bien adapté pour tester l'efficacité de composés antivertigineux.

Un modèle de neurectomie vestibulaire unilatérale chez le chat a été développé de longue date au laboratoire (Xerri and Lacour, 1980). Ce modèle induit un quintuple syndrome, caractérisé par un déficit postural, locomoteur, oculomoteur, végétatif et perceptif (Tighilet et al., 2015). Ce modèle rend compte de la cinétique particulière du syndrome vertigineux, composé d'une phase aiguë, au cours de laquelle l'exacerbation des symptômes est corrélée à une asymétrie électrophysiologique entre les noyaux vestibulaires, suivie d'une phase compensée au cours de laquelle les différents symptômes disparaissent progressivement en suivant des cinétiques propres à chaque symptôme, et correspondant à un rééquilibrage électrophysiologique entre les noyaux vestibulaires (Darlington and Smith, 2000). Ce modèle représente dans le champ des neurosciences un très bon exemple de plasticité post-lésionnelle adaptative connue dans la littérature sous l'appellation « compensation vestibulaire ». On sait aujourd'hui que ces différentes phases sont supportées par des mécanismes de neuroplasticité s'exprimant surtout dans les noyaux vestibulaires désafférentés et mettant en jeu des voies de signalisation et des mécanismes neurophysiologiques distincts, impliquant différents effecteurs (systèmes de neurotransmetteurs, systèmes hormonaux, neurotrophines, récepteurs membranaires, canaux ioniques,...) (Dieringer, 1995; Dutia, 2010; Lacour and Tighilet, 2010; Smith and Curthoys, 1989; Smith and Darlington, 1991). C'est sur la base de ces connaissances que s'est développée depuis plusieurs décennies la pharmacologie antivertigineuse actuellement utilisée (Chabbert, 2016). Pour des considérations éthiques et financières, il devient de plus en plus difficile d'utiliser le chat pour ces études. Il est alors indispensable de transférer le modèle NVU chez une autre espèce, le rongeur idéalement.

4.2. Des méthodes d'évaluation du syndrome vestibulaire qui manquent de sensibilité

Une des principales difficultés rencontrées dans la mise au point de nouveaux médicaments antivertigineux est le manque de sensibilité des méthodes d'évaluation du syndrome vestibulaire. Les études en préclinique de nouveaux composés sont rendues difficiles de par le manque de systèmes d'analyse suffisamment sensibles pour rendre compte des différents aspects de la pathologie et surtout, des effets médicamenteux potentiels. A l'heure actuelle, en ce qui concerne les méthodes d'évaluations non invasives, la méthode la plus répandue dans la littérature est la méthode d'évaluation subjective. Cette méthode consiste à évaluer, à l'aide d'échelles non paramétriques, les différents niveaux de sévérité du syndrome vertigineux consécutif à l'atteinte vestibulaire (Günther et al., 2015 ; Tighilet et al., 2015). Cependant, jusqu'à présent, il a été difficile d'obtenir des effets dose-réponse lors de tests médicamenteux en utilisant cette méthode. Il est donc nécessaire de concevoir de nouveaux paradigmes d'évaluation permettant d'accéder à une quantification objective et paramétrique du syndrome vertigineux, suffisamment sensible pour évaluer l'efficacité médicamenteuse.

Pour les raisons évoquées précédemment (éthiques et financières), nous avons choisi dans cette étude, comme objectif premier de transférer au rat le modèle NVU initialement développé chez le chat, et ainsi valider un nouveau modèle rongeur de pathologie vestibulaire.

Un deuxième objectif a été de mettre au point une méthode quantitative du syndrome vestibulaire. Pour cela, nous avons utilisé un dispositif entièrement nouveau dans le domaine, dont l'acquisition résulte d'une collaboration scientifique avec la société BIOSEB (Vitrolles). Ce dispositif, à l'origine conçu pour l'évaluation et la quantification de la sensibilité à la douleur des rongeurs, est basé sur l'analyse de la distribution pondérale de l'animal. Ce dispositif permet donc de déterminer et mesurer la façon dont l'animal répartit son poids sur les différentes parties de son corps, et plus particulièrement sur ses pattes. Ce paramètre est important, car il nous renseigne sur l'état d'équilibration posturale de l'animal, fonction altérée chez l'animal vestibulo-lésé. Ce second objectif de notre étude consiste donc à valider ce dispositif comme outil de diagnostic du syndrome vestibulaire. Enfin, un troisième objectif a été d'utiliser ce dispositif pour tester l'efficacité de deux médicaments antivertigineux prescrits en clinique : la bétahistine et l'acétyl-DL-Leucine.

II. Matériels et Méthodes

1. Mise au point de la Neurectomie Vestibulaire Unilatérale (NVU) chez le Rat

1.1. Animaux

L'étude est réalisée sur 11 rats mâles Long Evans âgés de 10 à 12 semaines (250/350 g) provenant de notre propre élevage et de parents provenant de Charles River (St Germain sur l'Arbresle, France). Les animaux sont hébergés en cages de type 3 Techniplast (Lyon, France) sous un rythme nycthéméral de 12h/12h. Les animaux ont un accès libre à l'eau de boisson et aux aliments. Les animaux sont hébergés à l'animalerie de la Fédération 3C (Campus Saint-Charles, Aix-Marseille Université).

1.2. Anesthésie

Les animaux sont anesthésiés par injection intra-péritonéale d'un mélange de ketamine 1000 (Virbac, 100 mg / kg, i.p.) / médétomidine (Domitor® Orion Pharma 0,2 mg / kg, i.p.).

1.3. Approche chirurgicale

Dans cette étude, la neurectomie vestibulaire unilatérale est pratiquée du côté gauche. Après le rasage de la zone d'intérêt (sous l'oreille externe), les animaux sont placés sur le $\frac{3}{4}$ dos (Fig. 9A). La bulle tympanique est localisée par tâtonnement et le plan cutané est incisé avec une paire de ciseaux. La dissection est effectuée jusqu'à l'apparition des plans musculaires. L'écarteur et les trombones sont positionnés (Fig. 9B). Nous procédons ensuite au dégagement des plans musculaires jusqu'à la mise en évidence de la bulle tympanique (Fig. 9C). La bulle tympanique est largement fraisée pour exposer l'artère stapédienne et le promontoire de la cochlée (Fig. 9D). Le promontoire cochléaire est perforé en plusieurs points à l'aide de la fraise (Fig. 9E). En utilisant une aiguille biseautée pliée 25G insérée dans l'une des perforations (Fig. 9F), un mouvement de levier est effectué pour détacher le promontoire et exposer la cochlée (Fig. 9G). Après avoir alésé les vestiges du promontoire aussi près que possible de l'artère stapédienne, la cochlée est retirée en la tirant avec l'aiguille. La partie

osseuse de la cochlée est soigneusement enlevée avec une pince fine. À ce niveau, le nerf cochléaire est apparent. Nous agrandissons le méat du nerf cochléaire en coupant l'os avec un micro-porte-aiguille. Le 8ème nerf crânien (cochléovestibulaire) est mis sous tension avec l'aspiration chirurgicale (Fig. 9H) afin de le couper, avec l'aiguille pliée, au ras du tronc cérébral (Fig. 9I). La plaie est ensuite refermée à l'aide d'une agrafeuse. Nous procédons au réveil de l'animal par injection intrapéritonéale d'Antisedan® (Orion-Pharma 1mg / kg) et une solution de Ringer Lactate (Virbac, 10 ml / kg) est administrée par voie sous-cutanée afin d'atténuer la déshydratation résultant de l'incapacité de l'animal à boire normalement à la suite de la lésion. Au réveil, tous les animaux présentent un syndrome vestibulaire composé à la fois d'un comportement de *tumbling* (tonneaux) et d'un nystagmus horizontal spontané (battement horizontal des globes oculaires) confirmant la réussite de la neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU). Il est à noter que des précautions particulières sont prises afin d'éviter d'endommager l'artère carotide lors de la dissection des plans cutanés et musculaires, de l'artère stapédienne au cours du fraisage du promontoire et de la lésion du tronc cérébral au cours de la section du 8ème nerf crânien.

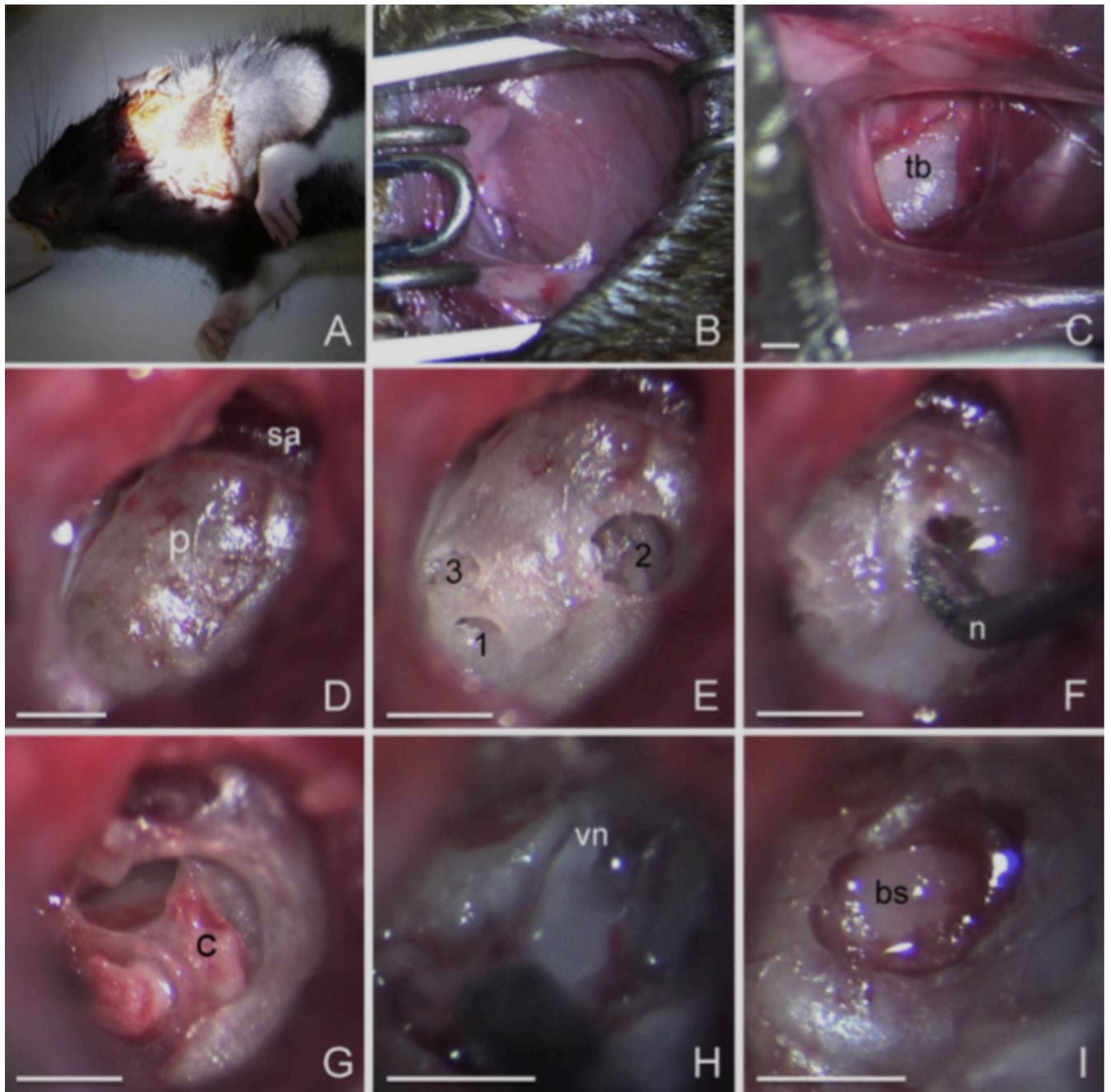


Figure 9 : Illustration de l'approche chirurgicale pour réaliser la neurectomie vestibulaire unilatérale. (A) Position 3/4 dos de l'animal pour l'approche chirurgicale. (B) Incision du plan cutané-et placement des écarteurs. (C) Dissection des plans musculaires afin de dégager la bulle tympanique (tb). (D) Après le fraisage de la bulle tympanique, le promontoire (p) et l'artère stapédienne (sa) sont exposés. (E) Perforation du promontoire à différents points (1-3) pour faciliter l'ouverture d'une fenêtre d'accès à la cochlée. (F) Introduction de l'aiguille 25G (n) avec extrémité repliée pour exercer un mouvement de levier et créer la fenêtre d'accès. (G) Une fois ouverte, la cochlée (c) est visible. (H) Après cochléotomie, tension du nerf vestibulaire (vn) afin de le couper. (I) Tronc cérébral (bs) après section du nerf cochléo-vestibulaire. La barre d'échelle 2 mm s'applique à toutes les images. (Figure issue de Péricat et al., 2017).

1.4. Validation histologique de la neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU)

1.4.1. Collecte et fixation des tissus

Les rats sont anesthésiés puis perfusés par injection intracardiaque d'un fixateur. On procède d'abord à l'ouverture de la cage thoracique et du péricarde donnant accès au cœur. Une canule est insérée dans la pointe du ventricule gauche jusqu'à l'aorte où elle est maintenue en place par une pince de Mohr. L'oreillette droite est ouverte pour empêcher le reflux du sang et l'aorte abdominale est clampée afin de limiter la perfusion et la fixation à la partie supérieure de l'animal. Une pompe péristaltique (Masterflex, Biobloc) est utilisée pour injecter 200 ml d'une solution saline isotonique de rinçage (0,9% de NaCl contenant de l'anticoagulant, 0,1% d'héparine) suivie de 500 ml d'une solution fixatrice de Zamboni (paraformaldehyde à 4% et 0,2% d'acide picrique dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4) à 4 ° C pendant 30 minutes. A la fin de la perfusion, le cerveau est extrait de la boîte crânienne et post fixé à 4 ° C dans le même mélange fixatif que celui utilisé pendant la perfusion.

1.4.2. Coupes et coloration histologique

Pour ce travail, une collaboration avec l'Institut Paoli Calmettes a été établie. Les procédures de coupe et de coloration des cerveaux ont été réalisées sur la plateforme ICEP (Institut Paoli Calmettes, Marseille, France). D'abord les cerveaux fixés sont inclus en paraffine, puis des coupes sériées de 3 µm sont réalisées en utilisant un microtome (Microm HM340E avec Section-Transfer-System). La coloration HES (Hématoxyline / Eosine / Safran) permet une analyse morphologique de la zone d'intérêt. L'HES colore spécifiquement les noyaux cellulaires en violet, leur cytoplasme en rose et les fibres en dégradé d'orange. Celle-ci est réalisée en utilisant un automate de coloration (Dako Coverstainer). Les coupes colorées sont ensuite scannées via un NanoZoomer (grossissement x40, Hamamatsu) puis les lames sont observées à l'aide du logiciel Calopix (Tribvn).

2. Méthode d'évaluation du syndrome vestibulaire

2.1. Méthode d'évaluation subjective des signes vestibulaires

Le syndrome vestibulaire induit chez le rat après neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) est composé de symptômes typiques rapportés précédemment dans d'autres modèles de lésions vestibulaires, tels que le modèle NVU chez le chat (Tighilet et al., 2015), les modèles rongeurs de désafférentation vestibulaire unilatérale transitoire induits par excitotoxicité (Desmadryl et al., 2012; Dyhrfjeld-Johnsen et al., 2013; Gaboyard-Niay et al., 2016) ou les modèles rongeurs de labyrinthectomie unilatérale chimique (Günther et al., 2015). Ces symptômes sont tous présents et s'expriment à leur apogée pendant la phase aiguë. Ils disparaissent séquentiellement au cours de la compensation. Le comportement dit de tonneaux (*tumbling*) décrit des roulements spontanés ou évoqués des animaux le long de leur axe corporel. Ce paramètre spécifique, considéré dans notre évaluation comme le déficit vestibulaire le plus sévère, apparaît au réveil de l'animal sujet à la NVU et dure plusieurs heures (scoré 5 dans notre échelle d'évaluation). La rétropulsion caractérise les mouvements de locomotion vers l'arrière des animaux. Ce paramètre (scoré 4) apparaît dès que le rat est capable de se tenir sur ses quatre pattes et de marcher à nouveau, et disparaît après quelques jours. Le *circling* (scoré 3) décrit les mouvements circulaires des rats dans le plan horizontal et préférentiellement en direction de la lésion. Ce symptôme commence avec le comportement de rétropulsion, mais dure plus longtemps. Le *Bobbing* assimilé au nystagmus céphalique se rapporte à un mouvement répétitif et rapide de la tête vers l'arrière. Ce comportement (scoré 2) est observé sur plusieurs semaines. L'inclinaison de la tête par rapport à l'axe du corps appelé *head tilt* (scoré 1) suit toute la durée du syndrome vestibulaire et est induite également par les lésions vestibulaires légères et réversibles (Dyhrfjeld-Johnsen et al. 2013). Le score de 0 est donné quand aucun de ces comportements n'est observé. Dans la réalité ce score est difficilement atteint car l'inclinaison de la tête est un symptôme qui peut persister des mois voire jusqu'au décès de l'animal ayant subi une NVU. Dans la présente étude, nous procédons à des séances d'évaluation de 2 minutes en *open field* sur une fenêtre temporelle s'étalant du jour 1 (J1) au jour 21 (J21). Sur la même fenêtre temporelle, une évaluation qualitative est

effectuée après avoir soumis l'animal au test du soulèvement par la queue (THL = *Tail Hanging-Landing*). Ce test consiste à prendre l'animal par la queue et à le soulever verticalement sur une hauteur d'environ 50 cm et de le reposer sur le sol. Ce test réactive le syndrome vestibulaire en soumettant l'animal à une accélération linéaire verticale qui stimule les récepteurs utriculaires et sacculaires du système otolithique. Ce test permet également de supprimer totalement les informations tactiles plantaires et une partie de l'information issue de la proprioception (joints, tendons et tonus musculaire modifié).

Nous distinguons les cinq états suivants : un premier état dans lequel tous les symptômes sont exprimés et les scores additionnés (scoré 15) suivi d'un deuxième stade dans lequel le *tumbling* n'est plus présent et retranché du score (scoré 10). Un troisième état dans lequel les comportements de *tumbling* et de rétropulsion ont disparu est scoré 6 suivi d'un état scoré 3 dans lequel le *tumbling*, la rétropulsion et le *circling* ont disparu. Enfin, deux états dans lesquels figurent le *bobbing* associé à l'inclinaison de la tête (scoré 2), ou l'inclinaison de la tête seule (scoré 1). Cette méthode d'évaluation subjective du syndrome vestibulaire induit par NVU chez le rat vient de faire l'objet d'une publication dans la revue méthodologique « *Journal of Neuroscience Methods* » (Péricat et al., 2017).

2.2. Méthode d'évaluation objective automatisée de la répartition pondérale dynamique

2.2.1. Dispositif d'analyse de la répartition pondérale dynamique

Afin de quantifier le syndrome postural après NVU, nous utilisons, pour la première fois, un dispositif (DWB® de BIOSEB, Vitrolles) mesurant la répartition du poids à tous les points de contact du corps de l'animal avec le sol (Fig. 10). Ce dispositif a été conçu à l'origine pour quantifier la douleur notamment dans des modèles d'arthrose des membres chez le rongeur (Ghilardi et al., 2012). Nous avons détourné l'utilisation de cet appareil pour mettre en évidence des altérations posturales consécutives à des atteintes vestibulaires unilatérales. Ce dispositif se compose d'une cage de plexiglass (25x25 cm) dans laquelle l'animal peut se

déplacer librement. Le plancher de cette cage est entièrement recouvert d'une plaque de capteurs de force 2000. Les capteurs sont connectés à une interface électronique qui convertit le courant qui le traverse en une mesure de poids, l'ensemble étant connecté à un ordinateur. La cage est fermée par un couvercle sur lequel est fixé une caméra vidéo haute définition, également connectée à l'ordinateur via un câble USB. L'objectif a été de valider ce dispositif comme outil de diagnostic du syndrome vestibulaire.

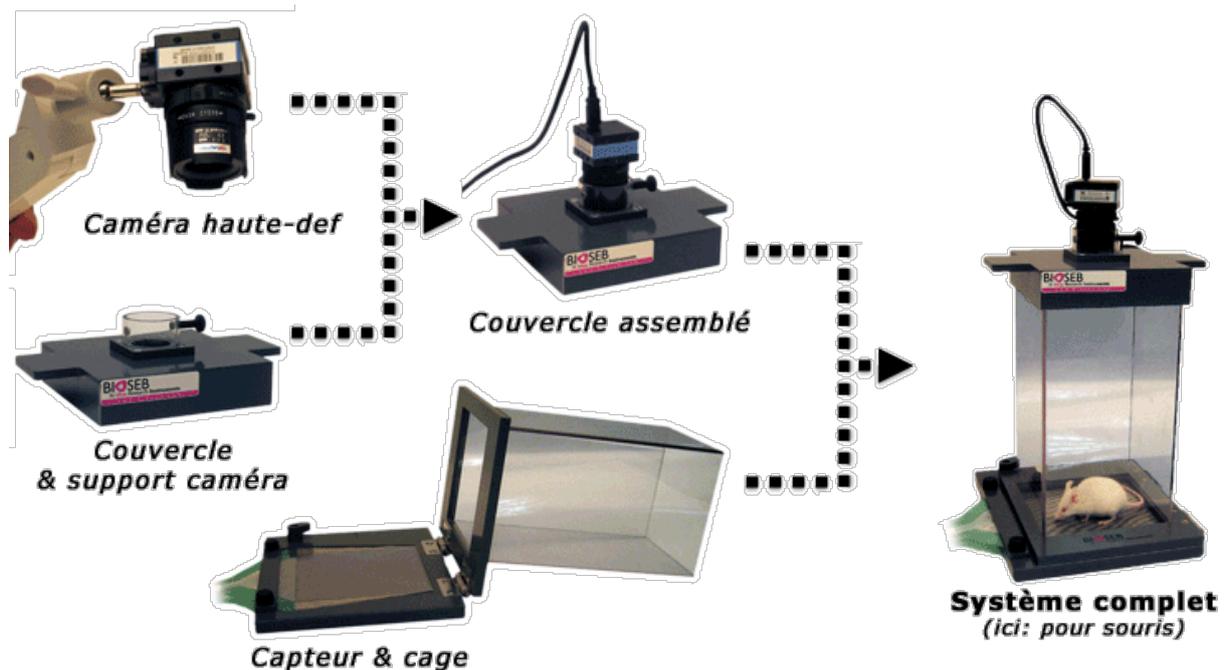


Figure 10 : Ensemble des éléments qui composent le dispositif et leur assemblage.

2.2.2. Acquisition des données en situation normale

L'enregistrement des différents paramètres est effectué à différents délais pré et post-opératoires : une première acquisition est effectuée la veille de la lésion (Pré-op), qui sert de valeur de référence. Les acquisitions sont ensuite effectuées aux jours (j) 1, 2, 3, 7, 10, 17 et 21 post-lésion. Pour chaque session d'acquisition, l'animal est placé dans la cage en plexiglass et se déplace librement pendant les 5 minutes d'enregistrement (Fig. 11).

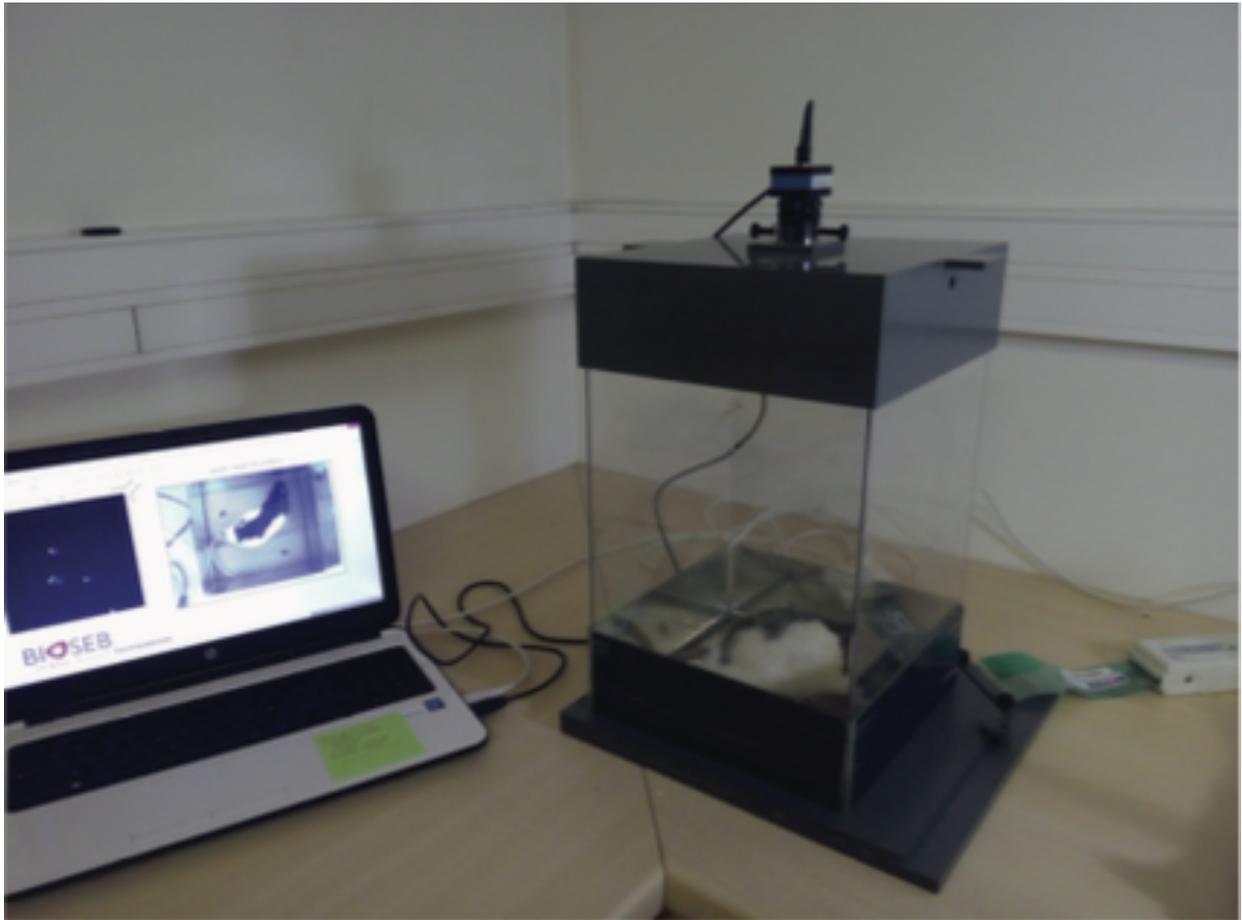


Figure 11 : Illustration du dispositif en situation d'acquisition. Le rat est dans le dispositif et se déplace sur les capteurs. Les points d'appui de l'animal et le film vidéo de ses déplacements sont retransmis en direct sur l'ordinateur grâce au logiciel d'acquisition.

2.2.3. L'analyse des données

L'analyse consiste à attribuer à chaque patte le groupe de capteurs activés. Le logiciel effectue une première analyse automatique du fichier d'acquisition, puis une analyse visuelle de l'expérimentateur complète et corrige la première analyse effectuée (Fig. 12). La performance de l'analyse dépend des paramètres de sensibilité choisis initialement (cf. annexe "Description des paramètres d'analyse des acquisitions avec le dispositif de distribution pondérale"). Ces paramètres sont maintenus constants tout au long de la durée de l'étude. L'analyse permet d'acquérir de nombreux paramètres. Nous nous sommes intéressés aux paramètres suivants :

1) le temps que l'animal passe sur quatre, trois ou deux pattes pendant l'enregistrement de 5 minutes. Après une première analyse des données, nous avons choisi le temps passé sur quatre et deux pattes comme étant le comportement le plus représentatif de l'animal.

2) le temps passé sur chaque patte donne des indications sur les pattes que l'animal utilise le plus souvent. Étant donné qu'il passe le maximum de son temps sur ses pattes postérieures, nous avons choisi de ne représenter que le temps passé sur chacune des pattes avant (gauche et droite).

3) le poids réparti sur chaque patte permet de savoir comment l'animal distribue son poids sur chaque patte pendant l'acquisition afin de trouver son équilibre. Nous avons choisi de représenter d'une part la répartition du poids sur l'axe antéro-postérieur (les deux pattes avant en opposition aux deux pattes postérieures) et, d'autre part, la répartition du poids sur l'axe latéral (les pattes avant et arrière gauche en opposition avec les pattes avant et arrière droite). Afin de compenser la variabilité pondérale des animaux et la variabilité du temps analysé au cours de l'acquisition de 5 min, chacun des paramètres étudiés a été exprimé en pourcentage du poids de l'animal le jour de l'acquisition et en pourcentage de l'analyse temps. Le choix de cette méthode d'analyse permet de normaliser ces deux paramètres variables d'un animal à l'autre et d'une acquisition à une autre.

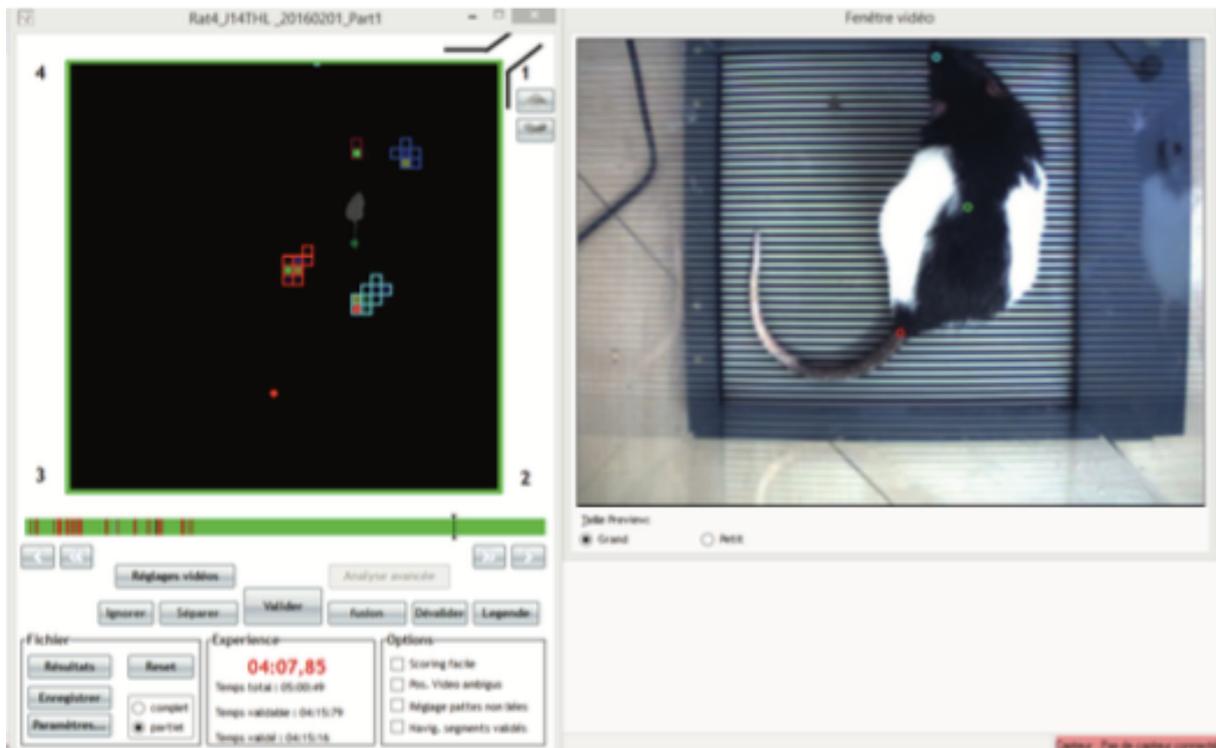


Figure 12 : Ecran d'analyse type. A gauche apparaît une représentation de l'ensemble des capteurs. Une couleur est attribuée à chaque zone de contact avec le corps de l'animal. La barre verte située en dessous représente

les 5 minutes d'acquisition. Le vert correspond au temps analysé, le rouge aux segments non analysables (Annexe1).

2.2.4. Barycentre

En prenant en compte le fait que nous avons seulement mesuré le poids réparti sur les pattes, nous avons défini un barycentre « *barycenter-like computation* » qui modélise la répartition du poids sur les pattes de rat. Ce paramètre représente l'équivalent du centre de pression chez l'Homme. Ces calculs sont respectivement représentés par les équations 1 et 2 (ci-dessous), le PRP étant le pourcentage du poids réparti sur les pattes droites, WFRP, le poids réparti sur la patte avant droite, WRRP, le poids réparti sur la patte arrière droite, PFP, le pourcentage du poids réparti sur les pattes avant, WFLP, le pourcentage de poids réparti sur la patte avant gauche, et TWP, la répartition totale du poids réparti sur les quatre pattes de l'animal. Dans les figures de représentation du barycentre, l'abscisse représente le pourcentage de poids réparti sur les pattes droites (poids cumulé sur les pattes avant et arrière droites en pourcentage du poids cumulé sur les quatre pattes), tandis que l'ordonnée représente le pourcentage de poids réparti sur les pattes avant de l'animal (poids cumulé sur les pattes avant gauche et avant droite en pourcentage du poids cumulé sur les quatre pattes).

$$\text{Equation 1 : } PRP = \frac{WFRP + WRRP}{TWP} \times 100$$

$$\text{Equation 2 : } PFP = \frac{WFRP + WFLP}{TWP} \times 100$$

Le calcul actuel du barycentre tel que défini précédemment n'est pas la représentation du centre de masse de l'animal car il ne tient pas compte des véritables coordonnées des pattes de l'animal sur le tapis de capteurs et du poids réparti sur les autres parties du corps (queue, ventre) autre que les Pattes. Au lieu de cela, nous avons modélisé les répartitions de poids sur les pattes gauche et droite ainsi que sur les pattes avant et arrière.

2.2.5. Acquisition des données en situation après réactivation du syndrome vestibulaire

Sur la même fenêtre temporelle (J1 à J21), une évaluation qualitative de 2 min ainsi qu'une acquisition de 5 minutes ont été effectuées après avoir soumis l'animal au test du soulèvement par la queue (THL = *Tail Hanging-Landing*).

Cette méthode d'évaluation quantitative du syndrome vestibulaire basée sur les différents paramètres fournis par le dispositif de la distribution pondérale dynamique vient de paraître dans la revue « PlosOne» (Tighilet et al., 2017). C'est la première fois que l'on quantifie le paramètre de distribution pondérale de l'animal pour rendre compte d'une altération posturale consécutive à une atteinte vestibulaire.

3. Etude pharmacologique

Cette étude a eu pour objectif de tester l'efficacité de composés antivertigineux ayant fait leurs preuves chez l'homme sur la cinétique de compensation des paramètres vestibulaires issus de l'analyse quantitative effectuée avec le dispositif DWB et de l'analyse qualitative. L'objectif étant par ailleurs d'évaluer la sensibilité du dispositif DWB lors de tests pharmacologiques.

Nous avons opté pour les deux médicaments antivertigineux prescrits couramment en clinique humaine dans le domaine de la pathologie vestibulaire : la bétahistine et l'acétyl-DL-Leucine (Tanganil®).

3.1. Animaux

La première étude a été réalisée sur un échantillon de 24 rats mâles Long Evans âgés de 10 à 12 semaines (250/350 g) provenant de notre propre élevage de parents provenant de Charles River (St Germain sur l'Arbresle, France) ayant subi une NVU. Les animaux sont hébergés en cages unitaires de type 3 Techniplast (Lyon, France) sous un rythme nyctéméral de 12h/12h. Les animaux ont un accès libre à l'eau de boisson et aux aliments. Les animaux sont hébergés à l'animalerie de la Fédération 3C.

3.2. Traitement pharmacologique

Les animaux ont été répartis en 3 groupes :

Le groupe 1 (N=6) a reçu un traitement quotidien par injection *per os* d'acétyl-DL-leucine (Tanganil®) (60mg/kg).

Le groupe 2 (N=7) a reçu un traitement quotidien par injection *per os* de bêtahistine (10mg/kg).

Le groupe 3 (N=11) a reçu quotidiennement par injection *per os* une solution saline (NaCl) pour servir de groupe contrôle.

Le choix des doses utilisées dans cette études sont basées sur les publications du laboratoire (Tighilet et al., 2015 ; Tighilet et al., 2005)

3.3. Acquisition des données

Une première acquisition a été effectuée la veille de la lésion, servant de valeur de référence, puis des acquisitions ont été effectuées aux jours (J) 1, 2, 3, 7, 10, 17 et 21 post-lésion.

Pour les groupes 1, 2 et 3 les traitements ont été administrés à partir du jour de la lésion, jusqu'à la fin de l'étude. Le mode d'administration pouvant induire un stress chez les animaux, nous avons choisi d'administrer les traitements en fin de journée afin que cela n'ait pas d'influence sur l'état des rats au moment des acquisitions.

Les acquisitions ont été réalisées pour les 3 groupes en situation normales et réactivées (Fig. 13).

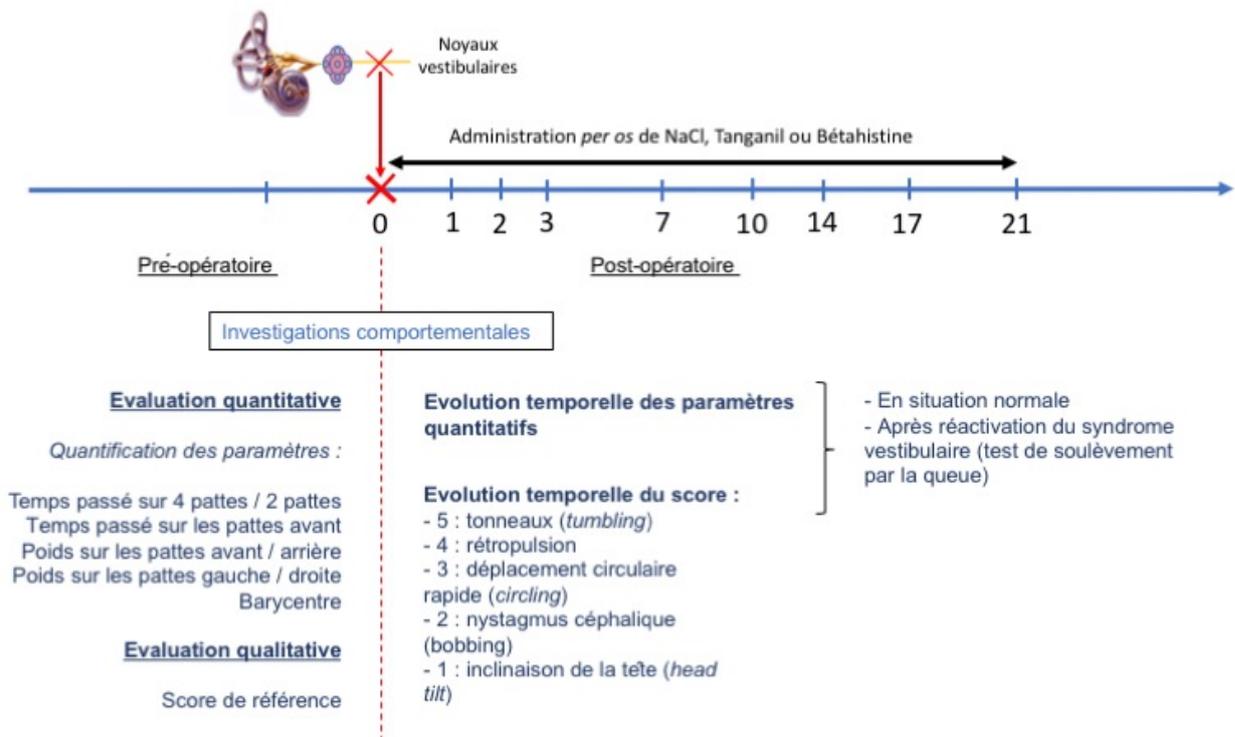


Figure 13 : Illustration du protocole expérimental. Le Tanganil®, la bétahistine et le NaCl (groupe contrôle) sont administrés quotidiennement par voie orale à partir du jour de la neurectomie vestibulaire unilatérale jusqu' au 21 ème jour post-lésionnel (J21). Les études quantitatives et qualitatives sont réalisées en parallèle pour évaluer les différents niveaux de sévérité du syndrome vestibulaire consécutif à l'atteinte vestibulaire chez les animaux de chaque groupe.

4. Analyses Statistiques

Pour chacun des paramètres évalués, l'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Matlab. Nous avons réalisé une analyse de la variance (ANOVA à mesures répétées à plusieurs facteurs), pour tester l'effet de la NVU combinée ou non à un traitement pharmacologique. Des analyses post-hoc ont été effectuées avec le test de comparaisons multiples de Tukey-Kramer, qui est la version adaptée de la correction de Tukey adaptée pour les comparaisons d'échantillons de tailles différentes.

III. Résultats

1. Mise au point de la Neurectomie Vestibulaire Unilatérale (NVU) chez le Rat

1.1. Validation comportementale de la NVU

Dès son réveil, l'animal présente un syndrome vestibulaire caractérisé par : une forte inclinaison de la tête du côté lésé, une succession de rotation sur lui-même (tonneaux) du côté de la lésion, et une asymétrie du tonus musculaire des membres supérieurs et inférieurs (hypertonie du côté intact, hypotonie du côté lésé). L'animal est incapable de tenir sur ses quatre pattes. Au niveau oculomoteur, on peut observer un nystagmus oculaire horizontal (battement de l'œil dans l'orbite) et torsionnel accompagné d'un strabisme.

1.2. Validation histologique de la NVU

Afin de valider la réussite de la neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU, section complète du nerf vestibulaire d'un côté de l'animal), nous avons réalisé une étude anatomique par observation de coupes histologique du tronc cérébral en microscopie optique.

Les cerveaux des rats vestibulo-lésés sont fixés, prélevés, et coupés selon les méthodes décrites dans la partie Matériel et Méthodes (4.1 et 4.2).

L'observation en microscopie optique de ces sections fines a démontré l'absence des organes sensoriels de l'oreille interne (vestibule et cochlée), du côté déafférenté. Cette absence est accompagnée d'une section complète des fibres constituant le nerf vestibulo-cochléaire (8^e nerf crânien). Inversement, du côté intact, les organes sensoriels vestibulaires sont bien conservés et le ganglion de Scarpa est caractérisé par sa densité élevée de corps cellulaires de neurones primaires vestibulaires. Le 8^e nerf crânien entier est visible jusqu'à ce qu'il entre dans le tronc cérébral. Cette observation confirme que la procédure NVU induit une section complète et irréversible du nerf vestibulo-cochléaire au niveau post-ganglionnaire (Fig. 14).

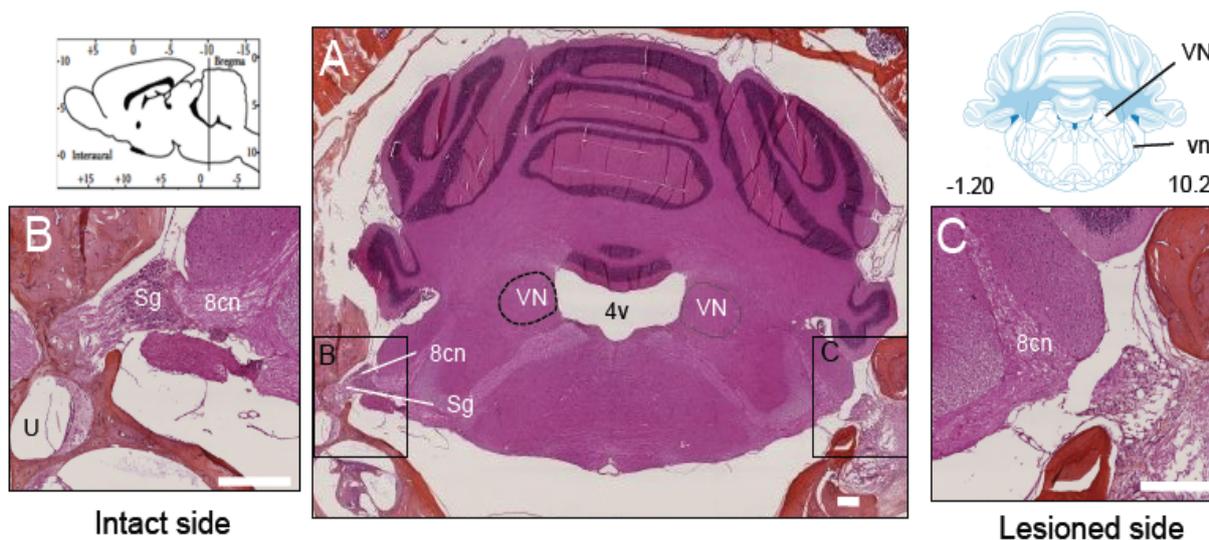


Figure 14 : Confirmation histologique de la neurectomie vestibulaire unilatérale. (A) Microphotographie d'une coupe histologique d'un cerveau de rat adulte (40 jours après NVU) au niveau interaural -1.20 mm et Bregma -10,20 mm de l'atlas stéréotaxique Paxinos et Watson. Ce niveau de coupe contient une partie du vestibule (utricle, U) au sein de l'oreille interne, le départ des fibres constituant le 8ème nerf crânien (8cn) au niveau pré-ganglionnaire, le ganglion de Scarpa (Sg), le segment post-ganglionnaire du nerf vestibulaire entrant dans le tronc cérébral) vers les noyaux vestibulaires (NV). Après la neurectomie vestibulaire gauche (C), l'épithélium sensoriel vestibulaire et le ganglion de Scarpa ont dégénéré, laissant place à un tissu cicatriciel. Le tronc cérébral apparaît complètement déafférenté, confirmant la section complète du nerf vestibulo cochléaire à ce niveau. En comparaison, le côté droit a un système vestibulaire intact (B). 4v : Quatrième ventricule ; vn: nerf vestibulaire.

2. Evaluation du syndrome vestibulaire

2.1. Evaluation subjective des signes vestibulaires

Le syndrome vestibulaire induit chez le rat après neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) est composé de symptômes typiques rapportés précédemment dans d'autres modèles de lésions. Ces symptômes sont tous présents et s'expriment à leur apogée pendant la phase aiguë. Ils disparaissent séquentiellement au cours de la compensation. (Fig. 15).

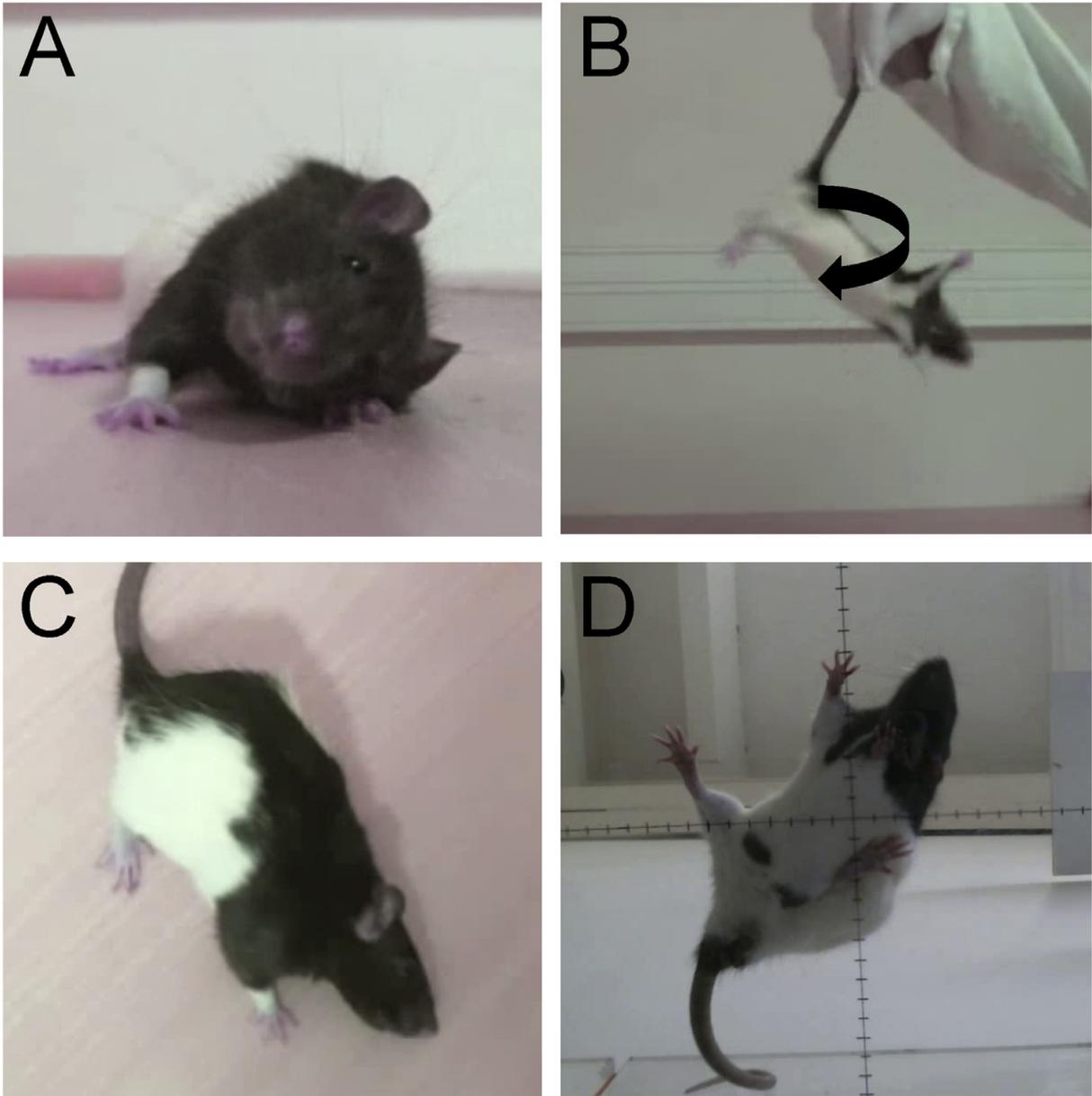
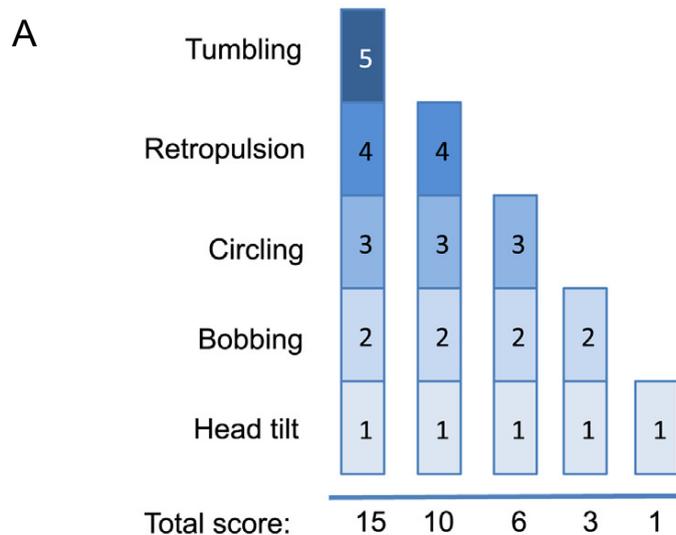


Figure 15 : Illustration des différents comportements spécifiques du syndrome vestibulaire observés durant la phase aiguë (3 jours) suivant la neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU). Après NVU, l'animal présente une inclinaison de la tête du côté de la lésion pouvant atteindre un angle de 90° par rapport à l'axe du corps (A). Une traction par la queue induit une rotation rapide et continue de l'animal et une incapacité à atterrir sur ses pattes (B). A l'état statique, l'animal vestibulo lésé présente une asymétrie du tonus musculaire, avec une hypertonie musculaire coté sain et une hypotonie musculaire coté lésé (C). On peut noter aussi un élargissement du polygone de sustentation représenté par l'aire entre les quatre points d'appui.

Afin de quantifier les différents symptômes qui composent le syndrome vestibulaire après NVU, nous avons utilisé une grille d'évaluation subjective des signes vestibulaires comme détaillé dans le paragraphe Matériel & Méthodes (II-1).

L'évaluation subjective des signes vestibulaires atteint un score de 14,25 ($\pm 0,75$) /15 dans les heures suivant la NVU (Fig. 16). Vingt-quatre heures après la lésion, le syndrome vestibulaire a été fortement réduit. Le comportement de tonneaux (*tumbling*) a disparu, et est remplacé à la fois par la rétropulsion et par le comportement de rotations (*circling*). Un retour de la capacité de se déplacer est observé à ce stade post lésionnel. Le score vestibulaire moyen était de 6,1 ($\pm -0,4$) /15 sur l'échelle qualitative. Au fil du temps, les conséquences du dommage vestibulaire ont diminué : score moyen : 5,7 ($\pm 0,6$)/15 au jour 2 ; 5,4 (± 1)/15 au jour 3, 4,2 ($\pm 0,7$)/15 au jour 7 ; 2,8 ($\pm 0,5$)/15 au jour 10, 2,3 ($\pm 0,5$)/15 au jour 14 et 2,1 ($\pm 0,3$)/15 au jour 17. Au jour 21, tous les rats présentaient encore une inclinaison de la tête et pour certains, un nystagmus céphalique. Le score vestibulaire moyen était de 2,4 ($\pm 0,3$) /15. Ainsi, le modèle rongeur de NVU induit un syndrome vestibulaire est composé, comme chez l'homme, d'une phase aiguë, suivi d'une phase intermédiaire. Cette phase intermédiaire se caractérise par une atténuation du syndrome. Finalement, une phase compensée avec une disparition complète du syndrome est atteinte dans les deux semaines.



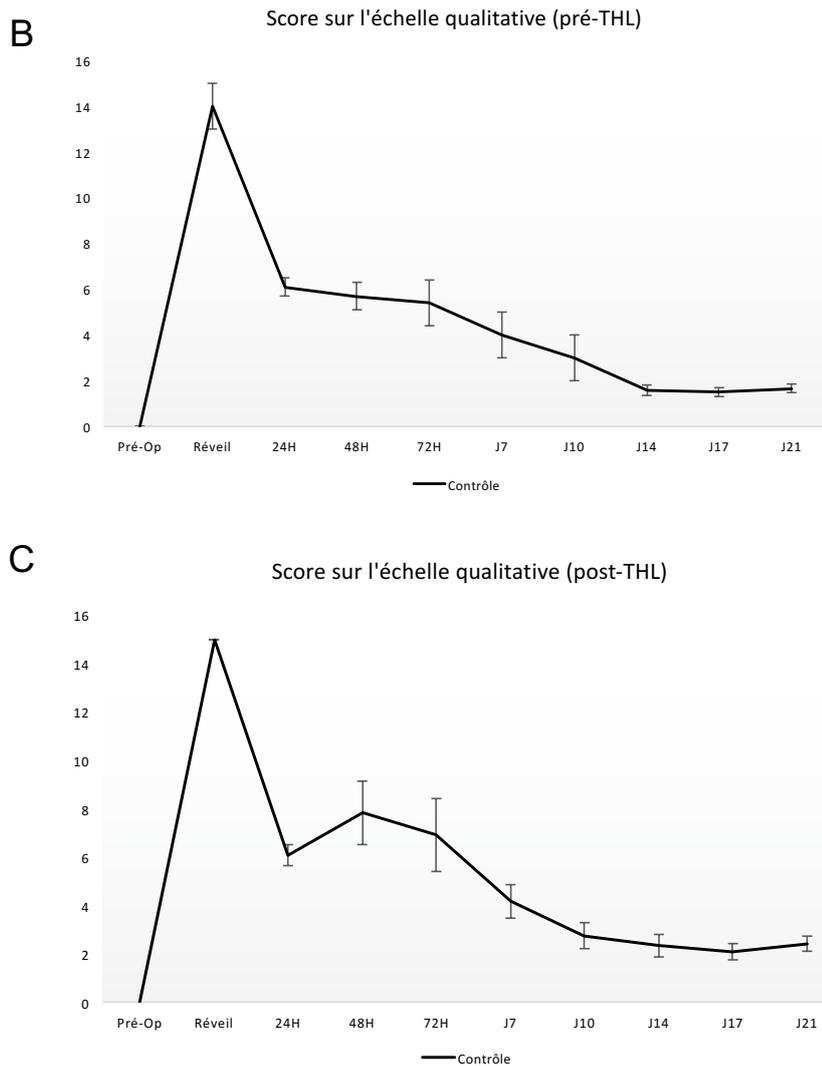


Figure 16 : Représentation de l'évaluation subjective des signes vestibulaires. (A) Illustration de la grille d'évaluation utilisée dans la présente étude. Un premier état dans lequel tous les symptômes sont exprimés a un score de 15. Un deuxième état dans lequel le comportement de tonneaux a disparu et fait place à un comportement de rétropulsion obtient le score de 10 sur notre échelle. Un troisième état caractérisé par la disparition des comportements de tonneaux et de rétropulsion et par l'apparition d'un comportement de déplacements circulaires sans objectif est noté 6. Les deux derniers symptômes notés 3 et 1 correspondent respectivement à un comportement de nystagmus céphalique et à une inclinaison de la tête qui perdure dans le temps (figure issue de Pericat et al ; 2017). (B) Illustration de l'évolution du score comportemental au fil du temps en situation normale (pré-THL) et réactivée (post-THL). (C). La cinétique d'expression du syndrome montre clairement différentes phases : une phase aiguë de haute intensité suivant la lésion (qui perdure du réveil jusqu'à huit heures), une phase intermédiaire avec une réduction drastique de la sévérité du syndrome durant la première semaine post lésionnelle, et une phase compensée à la fin de la première semaine post lésionnelle entraînant une disparition presque complète des symptômes à l'exception de l'inclinaison de la tête. Chaque point de

données représente le score vestibulaire moyen, avec des barres d'erreur représentant la SEM (erreur type en statistiques).

2.2. Evaluation objective automatisée de la répartition pondérale dynamique

Afin de compléter notre analyse subjective des symptômes vestibulaires, nous procédons à une analyse objective et automatisée des atteintes posturo-locomotrices consécutives à la neurectomie vestibulaire unilatérale. Nous utilisons, pour cela, un dispositif permettant de mesurer la distribution pondérale de l'animal libre de ses mouvements et nous analysons les conséquences de la NVU sur différents paramètres :

- Le pourcentage de temps passé sur deux ou quatre pattes
- Le pourcentage de temps passé sur les pattes avant gauche et droite
- Le pourcentage de poids distribué sur les pattes avant et arrière
- Le pourcentage de poids distribué sur les pattes gauches et les pattes droites

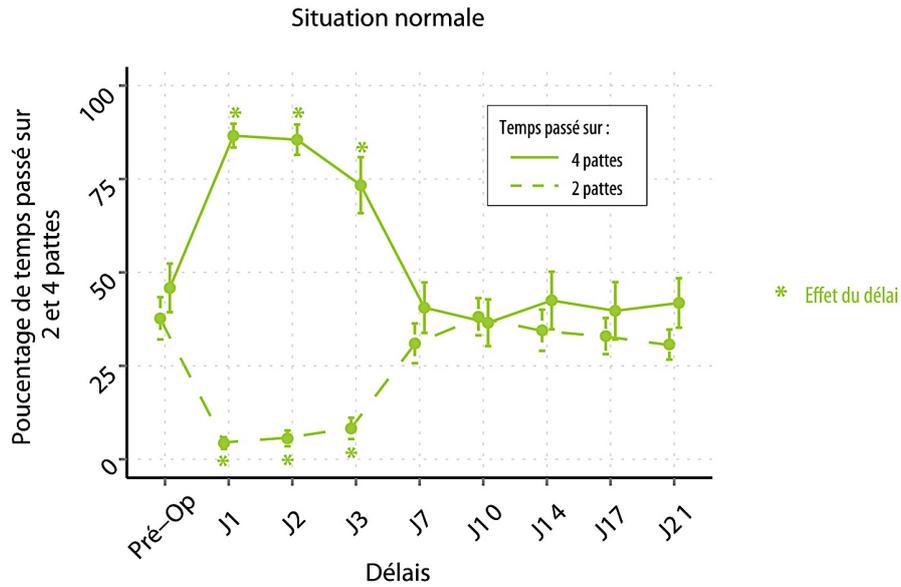
Nous avons aussi extrapolé ces résultats pour obtenir une représentation de l'évolution du barycentre.

2.2.1. Comparaison du pourcentage de temps passé sur deux et quatre pattes

Avant la lésion, les rats passent le même temps sur quatre pattes (moyenne \pm SEM = 45,8% \pm 6,5) et sur deux pattes (37,7% \pm 5,6). Après la lésion, le temps passé sur quatre pattes au premier jour (86,6% \pm 3,2 ; $p < 0,001$), deuxième jour (85,5% \pm 4,1 ; $p < 0,001$) et troisième jour (73,3% \pm 7,5 ; $p < 0,03$) est significativement élevé, tandis que le temps passé sur deux pattes aux mêmes délais post NVU est significativement réduit (4,3% \pm 1,6 le premier jour, $p < 0,001$; 5,6% \pm 2,1 le deuxième jour, $p < 0,001$; 8,25% \pm 2,8 le troisième jour, $p < 0,001$). À partir du jour 7 (J7), ces deux paramètres se rééquilibrent et retrouvent des valeurs pré-lésionnelles (Fig. 17-A).

Dans les conditions de réactivation du syndrome vestibulaire (Fig. 17-B), on observe la même tendance que celle décrite dans les conditions normales au cours des trois premiers jours après la NVU, avec : une augmentation du pourcentage de temps passé à quatre pattes de J1 à J3 (moyenne : $89,5\% \pm 2$; $p < 0,001$) et une diminution du temps passé sur deux pattes aux mêmes délais (moyenne : $3,2\% \pm 1,0$; $p < 0,001$). À partir de J7, le pourcentage de temps passé sur quatre pattes diminue, tandis que le pourcentage de temps passé sur deux pattes augmente, sans pour autant retrouver des valeurs pré opératoires, contrairement à la condition normale. En particulier, le temps passé sur deux pattes reste sensiblement inférieur aux valeurs préopératoires jusqu'à J21 après la lésion (moyenne : $18,6\% \pm 2,1$; $p < 0,01$). De J7 à J21, le pourcentage de temps passé sur quatre pattes après la réactivation du syndrome vestibulaire ($62,7\% \pm 3,6$) est significativement plus élevé ($p < 0,05$) que le temps passé sur quatre pattes en situation normale ($40,22\% \pm 3,0$). De même, le pourcentage de temps passé sur deux pattes en condition réactivée ($18,6\% \pm 2,1$) est nettement inférieur au pourcentage de temps passé sur deux pattes ($33,5\% \pm 2,2$) en situation normale aux mêmes jours post NVU ($p < 0,01$).

A



B

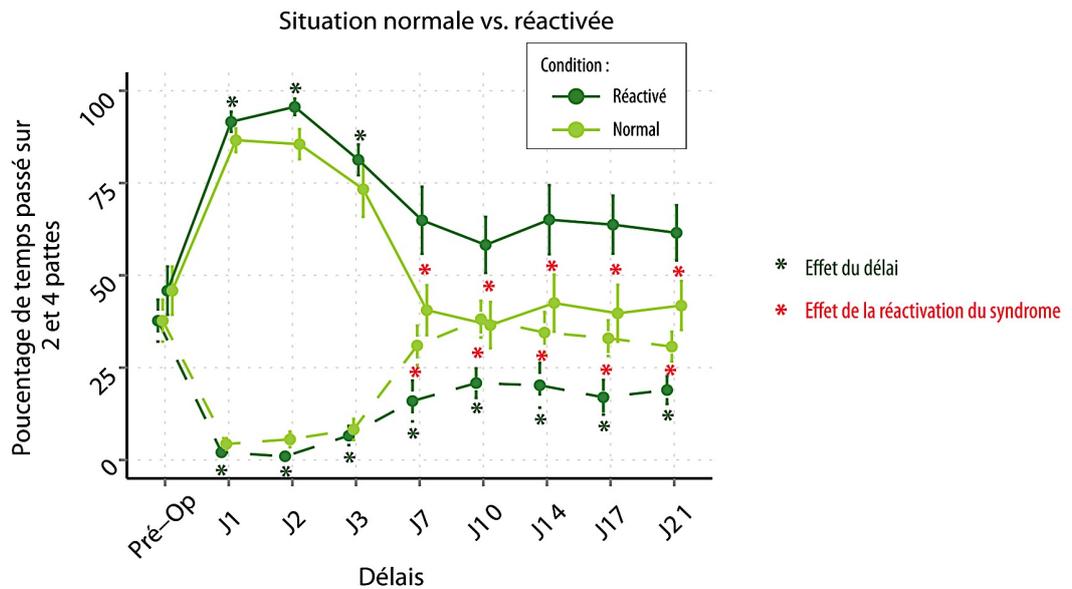


Figure 17 : Représentation du temps passé sur 2 et 4 pattes par les animaux du groupe contrôle (NaCl) avant et après la NVU.
 A : Avant la réactivation du syndrome vestibulaire ; B : Après la réactivation du syndrome vestibulaire. Le temps passé sur deux et quatre pattes est représenté en pourcentage de temps par rapport au temps analysé sur les 5 minutes d'acquisition. Il y a une augmentation significative du temps passé sur quatre pattes et une diminution significative du temps passé sur 2 pattes les trois premiers jours après la lésion ($p < 0,05$). Ces changements sont suivis d'un retour aux valeurs pré-opératoires à partir de J7 dans la condition normale (temps sur quatre pattes et sur deux pattes), mais pas dans la condition réactivée (temps sur quatre pattes seulement).

2.2.2. Comparaison du pourcentage de temps passé sur les pattes avant gauche et droite

Avant la lésion vestibulaire (Fig. 18-A), les rats passent autant de temps sur leur patte avant gauche ($53,8\% \pm 6,7$) que sur leur patte avant droite ($55,0\% \pm 5,7$; $p > 0,05$, NS). Au cours des trois premiers jours qui suivent la lésion, les rats passent significativement plus de temps sur leurs pattes avant gauche (en moyenne : $89,1\% \pm 1,9$; $p < 0,05$) et droite ($86,9\% \pm 2,7$; $p < 0,05$), mais toujours de manière équilibrée ($p > 0,05$, NS). A partir de J7, le temps passé sur les pattes avant diminue, mais de manière inégale : les rats passent significativement plus de temps sur la patte avant ipsilatérale à la lésion (en moyenne, de J7 à J21 : $61,4\% \pm 2,3$) que sur la patte avant droite controlatérale à la lésion ($45,9\% \pm 2,8$; $p < 0,03$).

Après avoir induit une réactivation du syndrome vestibulaire (Fig. 18-B), le temps passé sur chaque patte avant est de nouveau augmenté de manière significative durant les trois premiers jours suivant la lésion (en moyenne : $92,7\% \pm 1,9$ du temps passé sur la patte avant gauche, $p < 0,001$; $94,0\% \pm 1,2$ sur la patte avant droite, $p < 0,001$). Le temps passé sur la patte avant gauche reste significativement augmenté par rapport aux valeurs préopératoires de J7 à J21 (en moyenne : $77,3\% \pm 2,4$, $p < 0,01$), tandis que le temps passé sur la patte avant droite diminue pour retrouver des valeurs proches des valeurs pré-lésionnelles ($67,1\% \pm 3,2$; $p > 0,05$, NS).

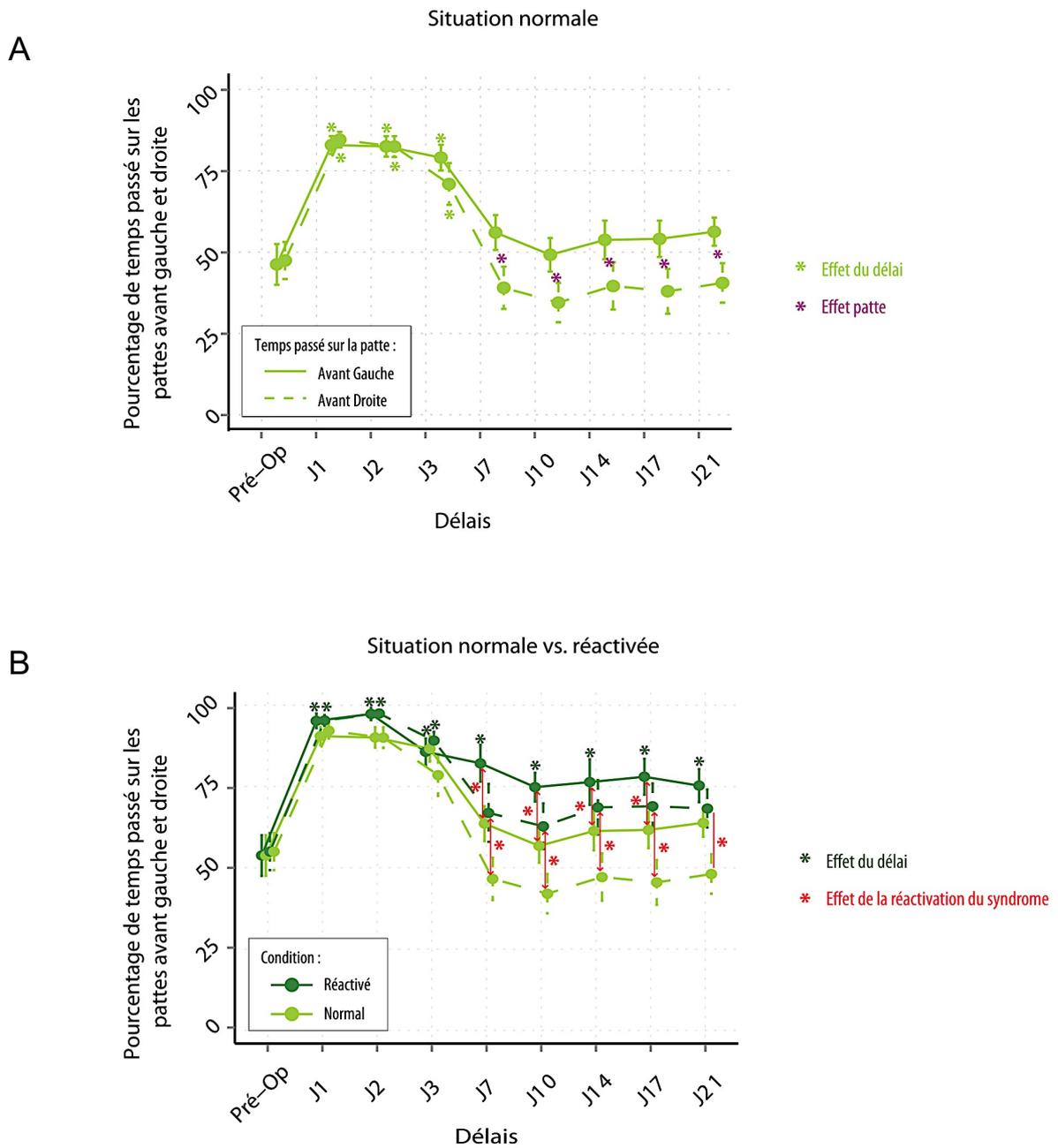


Figure 18 : Représentation du temps passé sur les pattes Avant Droite et Gauche par les animaux du groupe contrôle (NaCl) avant et après la NVU. A : Avant réactivation du syndrome. Après J7, les rats passent plus de temps sur la patte avant gauche que sur la patte avant droite. B : Après réactivation du syndrome. A partir de J7, la différence de temps passé sur la patte avant gauche et la patte avant droite est toujours présente mais n'est pas significative. La réactivation du syndrome vestibulaire induit une augmentation significative du temps passé sur les pattes avant de J7 à J21.

2.2.3. Comparaison de la distribution pondérale sur l'axe antéro-postérieur

Les rats sains ont une distribution pondérale asymétrique sur l'axe antéro-postérieur : ils répartissent $72,8\% \pm 1,6$ de leur poids sur les pattes arrière contre $25,7\% \pm 1,2$ sur les pattes avant (Fig. 19-A). Après la NVU (Fig. 19-B), les rats basculent significativement leur poids vers l'avant : aux délais de J1 et J2, il y a une augmentation du poids appliqué sur les pattes avant (en moyenne : $30,8\% \pm 0,8$; $p < 0,01$) et à l'inverse, une diminution du poids appliqué sur les pattes arrière (en moyenne : $67,4\% \pm 1,0$; $p < 0,01$). A partir de J3, la distribution pondérale redevient identique à celle observée avant la NVU avec $23,8\% \pm 0,4$ du poids appliqué sur les pattes avant ($p > 0,05$, NS), contre $76,1\% \pm 0,4$ sur les pattes arrière ($p > 0,05$, NS).

La réactivation du syndrome n'a pas d'effet sur la répartition pondérale quel que soit le délai post-lésionnel ($p > 0,05$, NS).

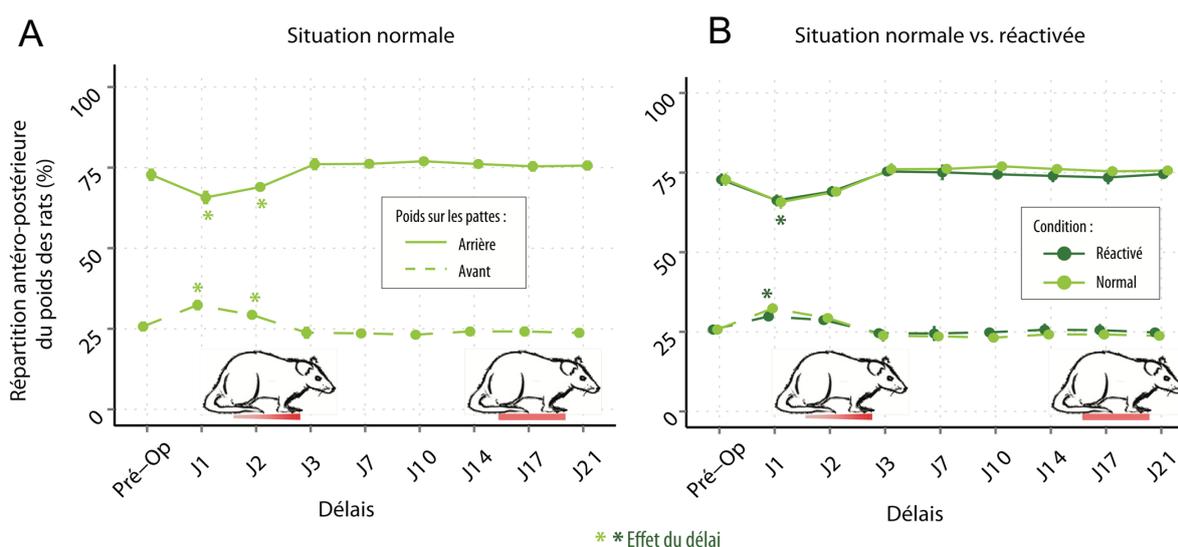


Figure 19 : Représentation de la distribution pondérale sur l'axe antéro-postérieur. A : en situation normale ; B : après réactivation. On observe un basculement du poids des rats vers l'avant les premiers jours, avec une augmentation du poids appliqué sur les pattes avant et une diminution du poids sur les pattes arrière. La réactivation du syndrome vestibulaire n'ajoute aucun effet sur la distribution pondérale sur l'axe antéro-postérieur.

2.2.4. Comparaison de la distribution pondérale sur l'axe latéral

Les rats sains distribuent leur poids de manière équivalente entre le côté gauche (46,6% ± 1,7) et le côté droit (49,3% ± 1,6) de leur corps ($p > 0,05$, NS) (Fig. 20-A). Dès le premier jour après la NVU (Fig. 20-B), une légère augmentation du pourcentage de poids appliqué du côté droit est observée (54,2% ± 2,1 ; $p > 0,05$, NS). Cette donnée est contrebalancée par une perte du poids appliqué du côté lésé (42,2% ± 2,3 ; $p > 0,05$, NS). La répartition pondérale entre la patte gauche et la patte droite aux délais post-lésionnels de J1 et J2 est significativement différente ($p < 0,05$). Cette tendance s'inverse à partir de J7 : les rats distribuent majoritairement leur poids vers la gauche, et ce jusqu'au délai de 21 jours ($p < 0,001$).

Après réactivation, la même tendance qu'en situation normale est observée : il y a un basculement du poids vers la droite (56,40% ± 0,7 du poids à droite, 40,7% ± 0,9 du poids à gauche, $p < 0,001$) aux jours J1 et J2, suivi d'un retour à l'équilibre entre la gauche et la droite au jour J3 ($p > 0,05$, NS), puis d'un léger basculement du poids des rats vers la gauche à partir de J7 ($p > 0,05$, NS). De nouveau, il n'y a aucune différence significative entre la situation normale et la condition de réactivation du syndrome.

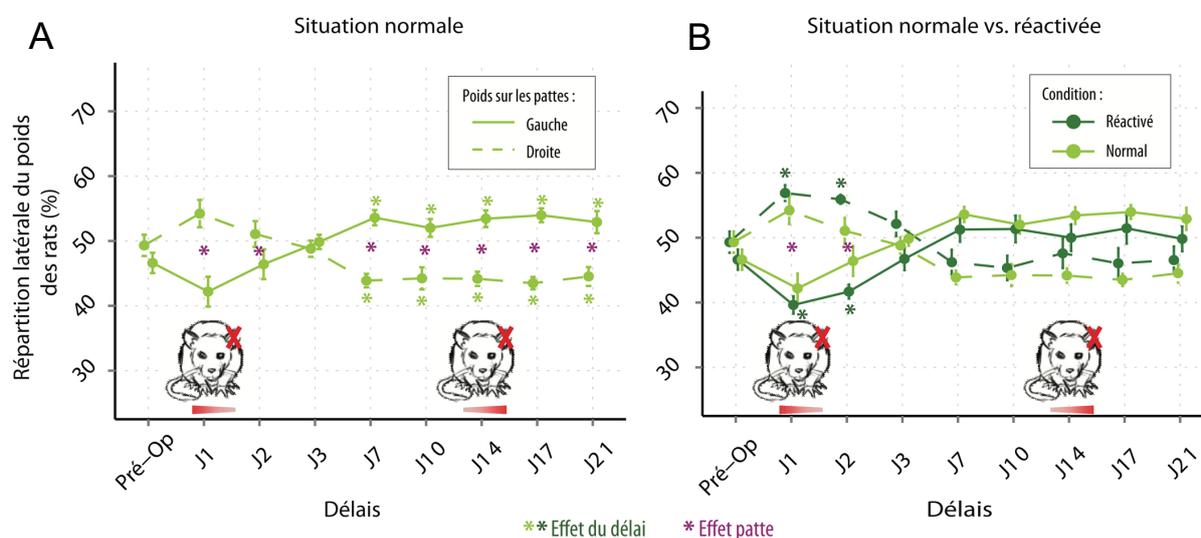


Figure 20 : Représentation de la distribution pondérale sur l'axe latéral.

A : en condition normale ; B : en condition de réactivation du syndrome vestibulaire. Les rats ont tendance à appliquer légèrement plus de poids du côté controlatéral (droite) à la NVU les deux premiers jours, puis du côté ipsilatéral à la NVU (gauche) à partir de J7. Il n'y a pas d'effet de la réactivation du syndrome sur la répartition pondérale.

2.2.5. Evolution du barycentre

D'après nos observations concernant l'évolution de la répartition du poids, nous avons calculé le barycentre de l'animal sur l'ensemble des données recueillies. Le barycentre correspond au point d'équilibre moyen de l'animal. Il permet d'avoir une représentation globale de la stratégie d'équilibration posturale utilisée aux différents délais pré et post opératoires. Les résultats montrent une cohérence avec les résultats décrits ci-dessus. Le point d'équilibre se déplace vers l'avant droite, aux jours J1 et J2 après lésion, puis se déplace vers la position avant gauche du jour J7 jusqu'au jour J21 (Figure 21).

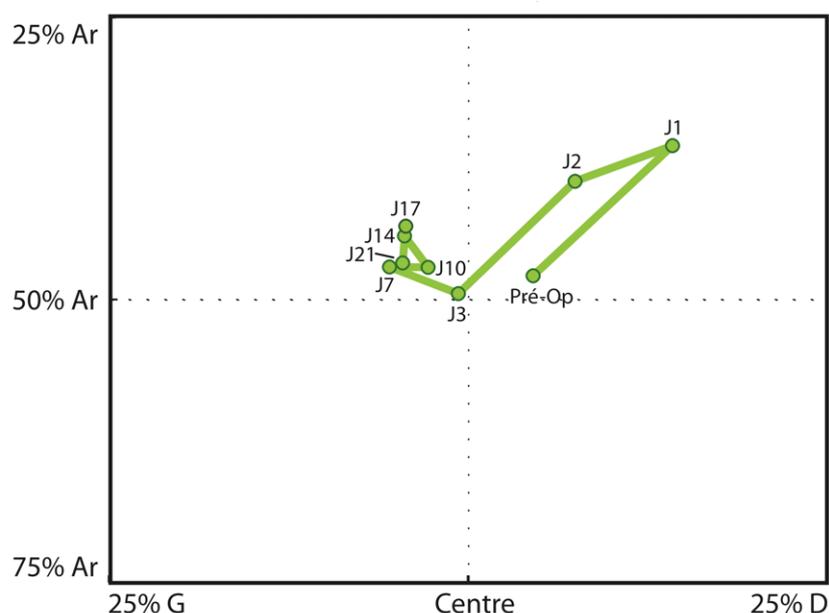


Figure 21 : Représentation de l'évolution du barycentre moyen avant neurectomie vestibulaire unilatérale et aux différents délais post-lésionnels. Etant donné l'absence de différence dans la façon dont l'animal répartit son poids entre la situation normale et après réactivation du syndrome vestibulaire, le barycentre est calculé sur l'ensemble de ces données. Le point d'équilibre de l'animal est déplacé vers l'avant droite les deux premiers jours, puis vers la gauche à partir du jour J7. Ces résultats sont cohérents avec l'ensemble des données sur la distribution pondérale.

3. Etude pharmacologique : Utilisation du modèle rongeur de neurectomie vestibulaire pour tester l'effet antivertigineux de médicaments de référence prescrits en pathologie vestibulaire en France

Nous avons utilisé le dispositif de distribution pondérale pour tester quantitativement les effets de médicaments antivertigineux de référence utilisés de manière courante en France à la fois sur l'intensité du syndrome vestibulaire et sur la cinétique de restauration de la fonction d'équilibration posturale chez le rat soumis à une neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU).

3.1. Traitement à la bétahistine

En pharmacologie clinique, la bétahistine, administrée par voie orale, à des doses répétées, atténue la symptomatologie fonctionnelle de la fonction labyrinthique des patients souffrant de la maladie de Ménière.

Grâce à la bétahistine, nous nous attendons donc à une atténuation plus rapide du syndrome vestibulaire pour les tests d'évaluation subjective ainsi qu'une facilitation de la restauration de la fonction posturale pour les tests d'évaluation objective automatisée de la répartition pondérale dynamique.

3.1.1. Evaluation subjective du syndrome vestibulaire

Notre méthode d'évaluation subjective montre que les rats traités à la bétahistine se comportent de la même manière que les rats du groupe contrôle ($p > 0,05$, NS), avec un syndrome maximal au réveil, suivi d'une diminution progressive du syndrome mais qui ne disparaît jamais complètement (Fig. 22-A). De la même manière, la réactivation du syndrome ne montre aucun effet de la bétahistine par rapport aux rats contrôles ($p > 0,05$, NS) (Fig. 22-B).

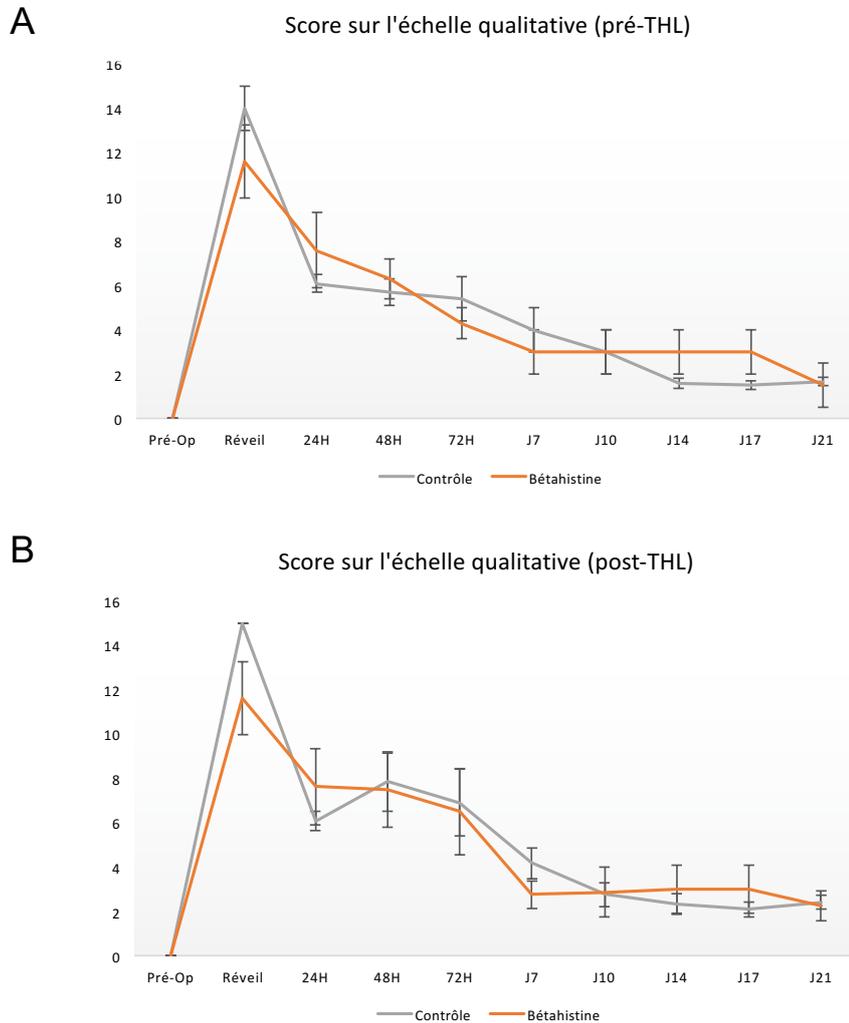


Figure 22 : Représentation de l'évaluation qualitative du syndrome vestibulaire avant et après réactivation. A : Comparaison du groupe traité à la bétahistine contre le groupe contrôle traité au NaCl. B : après réactivation du syndrome vestibulaire. Les rats obtiennent un score maximal au réveil (aux environs de 15) indiquant un syndrome maximal et la réussite de la lésion. A J1, la sévérité du syndrome a diminuée puisque les rats obtiennent à peu près un score de 6, correspondant à un comportement de *circling* (animal qui tourne en rond de manière très rapide dans l'espace dans lequel il se trouve). Ensuite, le syndrome diminue avec le temps mais ne disparaît jamais complètement. Ces résultats sont valables quel que soit la condition (normale ou réactivée).

3.1.2. Comparaison du pourcentage de temps passé sur deux et quatre pattes

Chez les rats traités à la bétahistine, nous observons la même tendance que chez les rats qui ont reçu une solution saline (groupe contrôle), à savoir : une diminution du temps passé sur deux pattes (de J1 à J3 : $p < 0,002$) et une hausse du temps passé sur quatre pattes ($p < 0,01$) les deux premiers jours suivant la lésion, suivi d'un retour à l'équilibre à partir de J7. La bétahistine induit une baisse significative du temps passé sur quatre pattes aux jours 2 ($p < 0,05$) et 3 ($p < 0,01$) par rapport aux rats du groupe NaCl, mais n'a pas d'effet sur le temps passé sur deux pattes ($p > 0,05$, NS) (Fig. 23-A).

Les mêmes résultats que précédemment sont observés après réactivation du syndrome : une hausse significative du temps passé sur quatre pattes les deux premiers jours ($p < 0,05$) et une baisse du temps passé sur deux pattes de J1 à J3 ($p < 0,001$). Les temps passés sur deux et quatre pattes ne diffèrent pas en condition normale ou après réactivation du syndrome. A J2, les rats traités à la bétahistine passent moins de temps sur quatre pattes que les rats non traités. Il n'y a aucune autre différence entre le groupe bétahistine et le groupe contrôle en situation de réactivation du syndrome (Fig. 23-B).

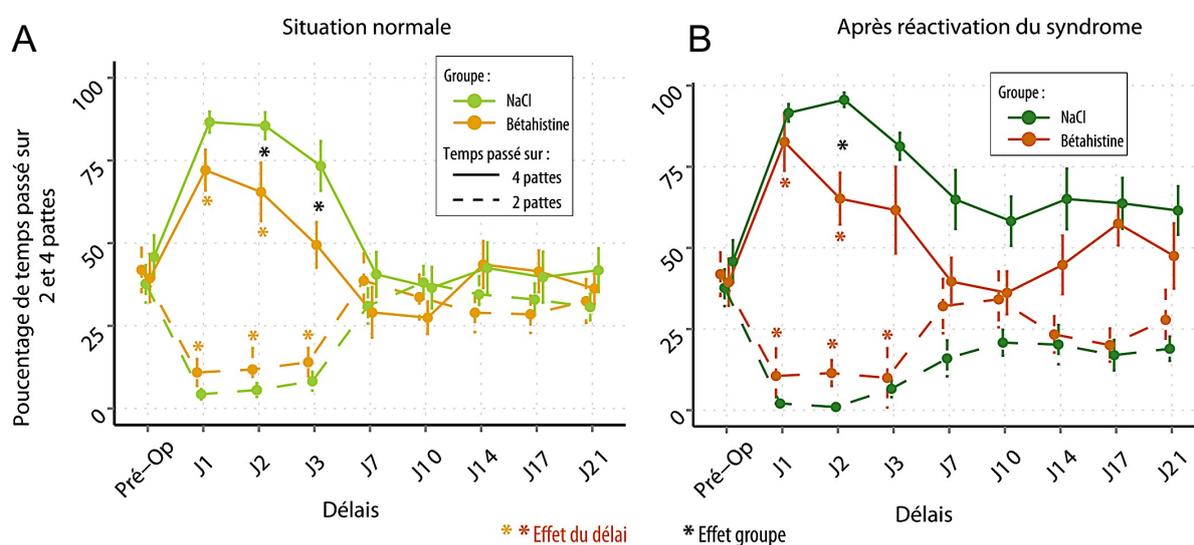


Figure 23 : Représentation du temps passé sur 2 et 4 pattes par les animaux du groupe traité oralement à la bétahistine avant et après la NVU. Pourcentage de temps passé sur 2 et 4 pattes en comparaison avec les rats non traités (NaCl) en situation normale (A) et après réactivation du syndrome (B). Les rats traités à la bétahistine diminuent le temps passé sur quatre pattes à J1 et J2 seulement, contrairement aux rats non traités (J1 à J3). Les rats traités passent significativement moins de temps sur 4 pattes que les rats non traités aux jours 2 et 3. La réactivation du syndrome n'a pas d'effet sur le temps passé sur deux ou quatre pattes.

3.1.3. Comparaison du temps passé sur les pattes avant gauche et avant droite

Comme pour le groupe contrôle, le temps passé sur les pattes avant gauche et droite augmente significativement et de manière égale les trois premiers jours après la NVU ($p < 0,01$). Une différence significative du temps passé sur la patte avant gauche ($66,0\% \pm 2,2$) par rapport à la patte avant droite ($44,5\% \pm 2,3$) apparaît à partir de J7 et persiste jusqu'au délai J21 ($p < 0,01$). Le traitement à la bétahistine ne semble pas avoir d'effet significatif sur ce paramètre en condition normale ($p > 0,05$, NS) (Fig. 24-A).

La réactivation du syndrome donne des résultats identiques à la situation normale ($p > 0,05$, NS), mais la différence de temps passé entre la patte avant gauche ($68,9\% \pm 3,2$) et la patte avant droite ($40,2\% \pm 4,8$) à partir de J7 n'est pas significative ($p > 0,05$, NS). Une différence de temps passé sur la patte avant droite apparaît aux jours 2 et 3 ($p < 0,05$) puis aux jours 7 et 10 ($p < 0,05$) entre les rats traités à la bétahistine et les rats non traités (Fig. 24-B).

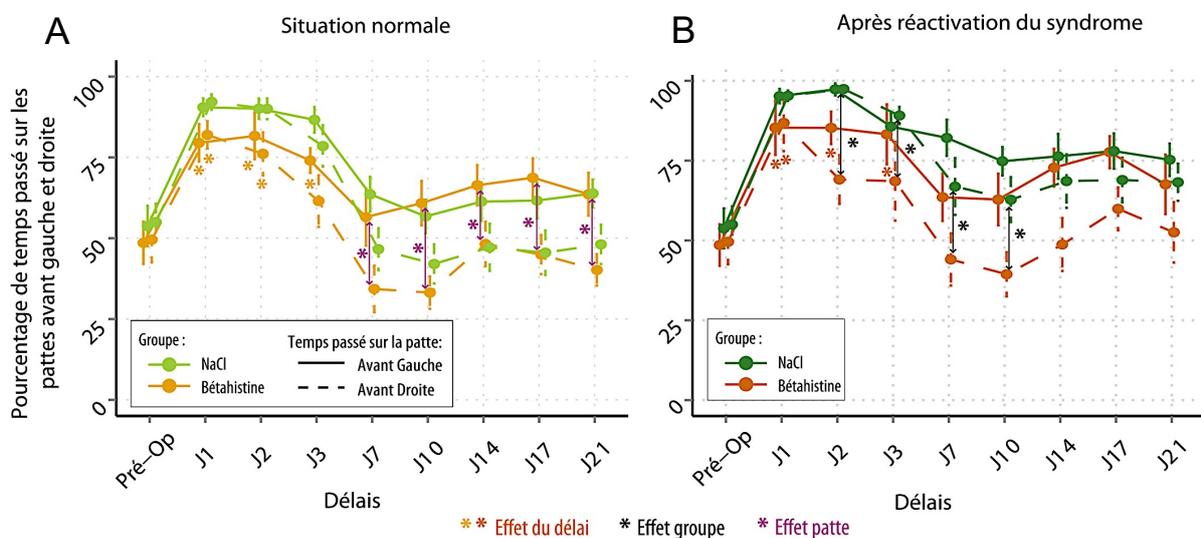


Figure 24 : Représentation du temps passé sur les pattes Avant Droite et Gauche des animaux du groupe traité à la bétahistine per os avant et après la NVU. Pourcentage de temps passé sur les pattes Avant Droite et Gauche en comparaison avec les rats non traités (NaCl) avant (A) et après réactivation du syndrome (B). A partir de J7, les rats traités passent plus de temps sur la patte avant gauche (pas de différence avec les rats NaCl). La réactivation du syndrome n'a pas d'effet sur le temps passé sur les pattes avant.

3.1.4. Distribution pondérale et évolution du barycentre

Les rats traités à la bétahistine répartissent leur poids sur les pattes avant, arrière, gauche et droite de la même façon que les rats du groupe contrôle : dans un premier temps, il y a un basculement du poids vers l'avant droite, puis à partir de J7, la tendance s'inverse avec un basculement du poids à gauche. Ni le traitement ni la réactivation du syndrome ne semblent avoir un effet sur la répartition pondérale (Fig. 25).

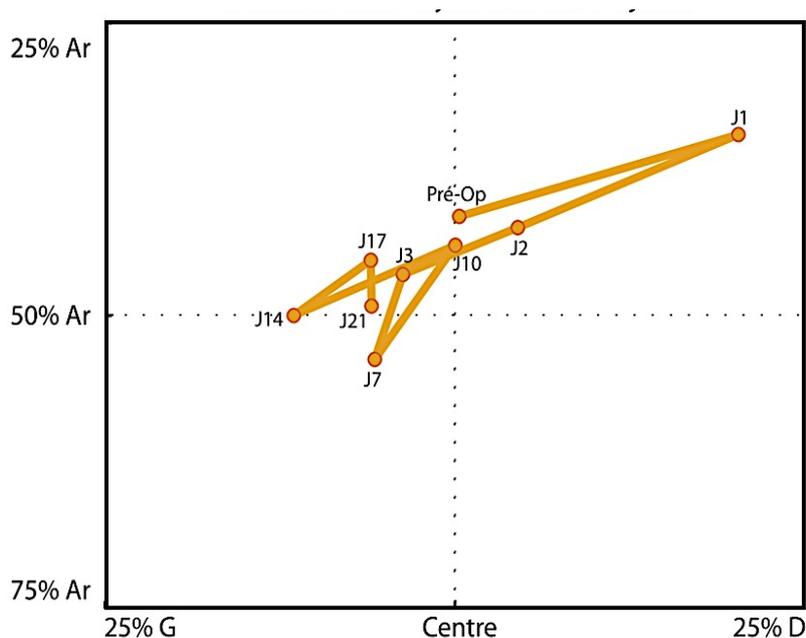


Figure 25 : Représentation de l'évolution du barycentre aux différents délais des rats traités à la bétahistine aux différents délais. Là encore, le point d'équilibre des rats tend à basculer vers l'avant droite dans un premier temps, puis vers la gauche dans un second temps.

3.2. Traitement à l'acétyl-DL-Leucine (Tanganil®)

3.2.1. Evaluation subjective du syndrome vestibulaire

De même que pour le bétahistine, les rats traités au tanganyl se comportent de la même manière que les rats du groupe contrôle ($p > 0,05$, NS), avec un syndrome maximal au réveil, suivi d'une diminution progressive du syndrome mais qui ne disparaît jamais complètement (Fig. 26-A). La réactivation du syndrome ne met pas en évidence un effet du traitement au tanganyl par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$, NS) (Fig. 26-B).

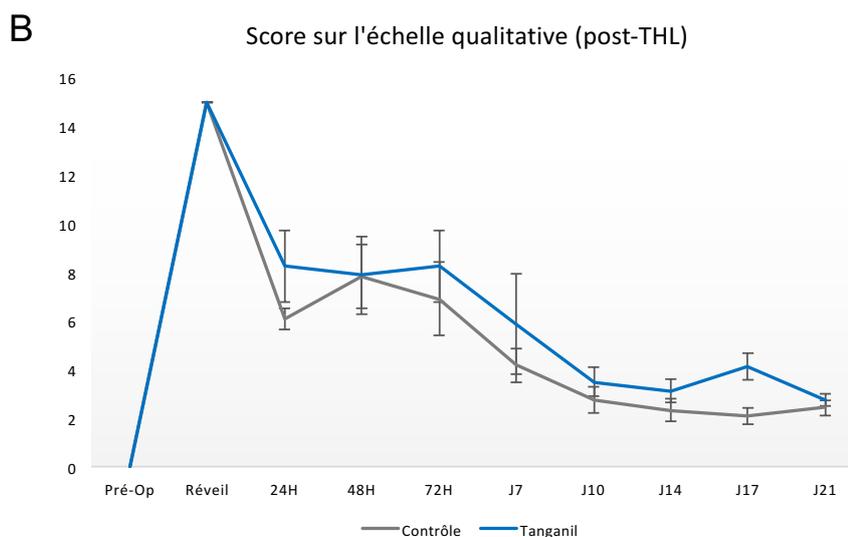
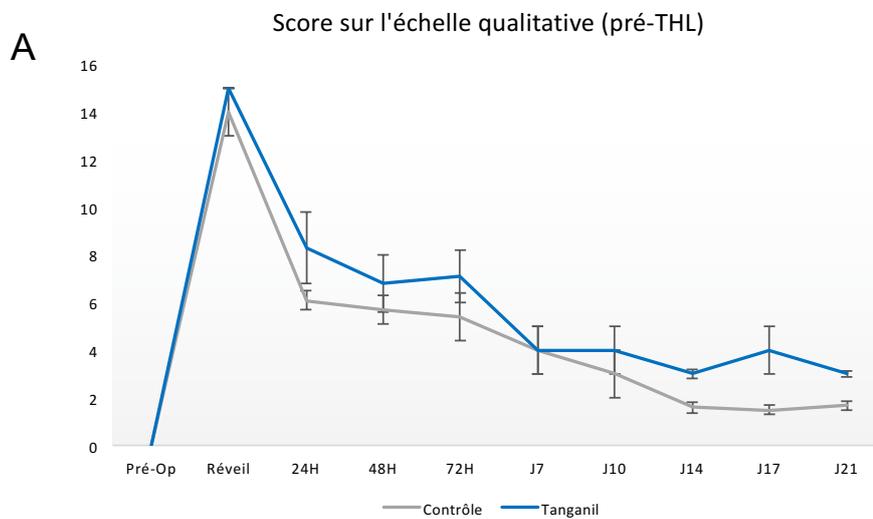


Figure 26 : Représentation de l'évaluation qualitative du syndrome vestibulaire avant et après réactivation. A : Comparaison du groupe traité au Tanganil® contre le groupe témoin traité au NaCl. B : après réactivation du syndrome vestibulaire. Les rats obtiennent un score maximal au réveil (aux environs de 15) indiquant un syndrome maximal et la réussite de la lésion. A J1, la sévérité du syndrome a diminuée puisque les rats obtiennent à peu près un score de 8, correspondant à un comportement de rétropulsion et de *circling* (animal qui tourne en rond de manière très rapide dans l'espace dans lequel il se trouve). Ensuite, le syndrome diminue avec le temps mais ne disparaît jamais complètement. Ces résultats sont valables quel que soit la condition (normale ou réactivée).

3.2.2. Comparaison du pourcentage de temps passé sur deux et quatre pattes

De nouveau, le temps passé sur quatre pattes est significativement augmenté les trois premiers jours qui suivent la NVU ($p < 0,05$), et le temps passé sur deux pattes diminué ($p < 0,001$). A partir de J7, on retrouve des valeurs préopératoires pour ces deux modalités (Fig. 27-A).

Après réactivation du syndrome, on retrouve l'augmentation du temps passé sur quatre pattes les trois premiers jours ($p < 0,001$). La diminution du temps passé sur deux pattes quant à elle, dure sur toute la durée de l'expérience ($p < 0,001$) (Fig. 27-B).

Quel que soit la condition (normale ou après réactivation du syndrome), il n'y a pas de différence significative entre le groupe traité et le groupe non traité ($p > 0,05$, NS) (Fig. 27-A et 27-B). Il n'y a pas non plus d'effet de la réactivation du syndrome sur la façon dont se comportent les rats pour ce paramètre.

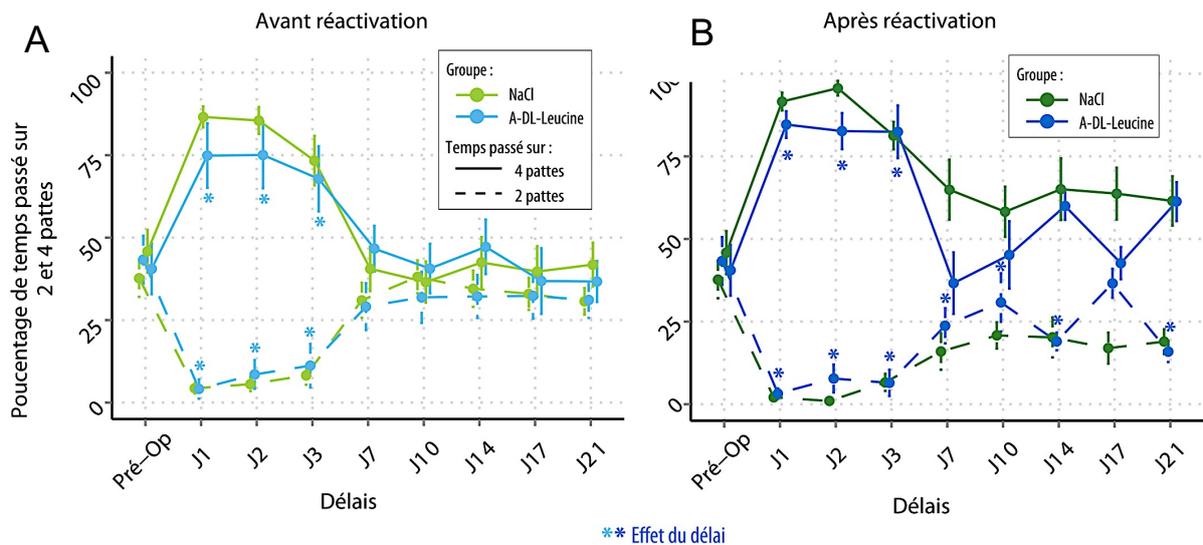


Figure 27 : Représentation du temps passé sur 2 et 4 pattes par les animaux du groupe traité à l'acétyl-DL-Leucine (Tanganil®) per os avant et après la NVU. Pourcentage de temps passé sur 2 et 4 pattes en comparaison avec les rats non traités (NaCl) en situation normale (A) et après réactivation du syndrome (B). Les rats traités à l'A-DL-Leucine montrent exactement les mêmes résultats que les rats non traités : le temps passé sur deux pattes est diminué et le temps passé sur quatre pattes est augmenté les trois premiers jours. Après réactivation du syndrome, le temps passé sur deux pattes ne retrouve jamais des valeurs pré-opératoires.

3.2.3. Comparaison du temps passé sur les pattes avant gauche et avant droite

Les rats traités à l'Acétyl-DL-Leucine se comportent de la même manière que les rats du groupe "contrôle", avec un temps passé sur les pattes avant qui augmente de manière significative les trois premiers jours ($p < 0,05$), puis à partir de J7 un temps passé sur la patte avant gauche supérieur au temps passé sur la patte avant droite ($p > 0,05$, NS) (Fig. 28-C).

Après réactivation du syndrome vestibulaire, le temps passé sur la patte avant gauche reste significativement augmenté par rapport aux valeurs préopératoires sur toute la durée de l'expérience ($p < 0,01$) tandis que le temps passé sur la patte avant droite augmente de J1 à J3 ($p < 0,001$) mais diminue à partir de J7 (Fig. 28-D). Il n'y a pas de différence significative entre le groupe non traité et le groupe traité à l'acétyl-DL-Leucine ($p > 0,05$, NS), quel que soit la condition (normale ou après réactivation du syndrome).

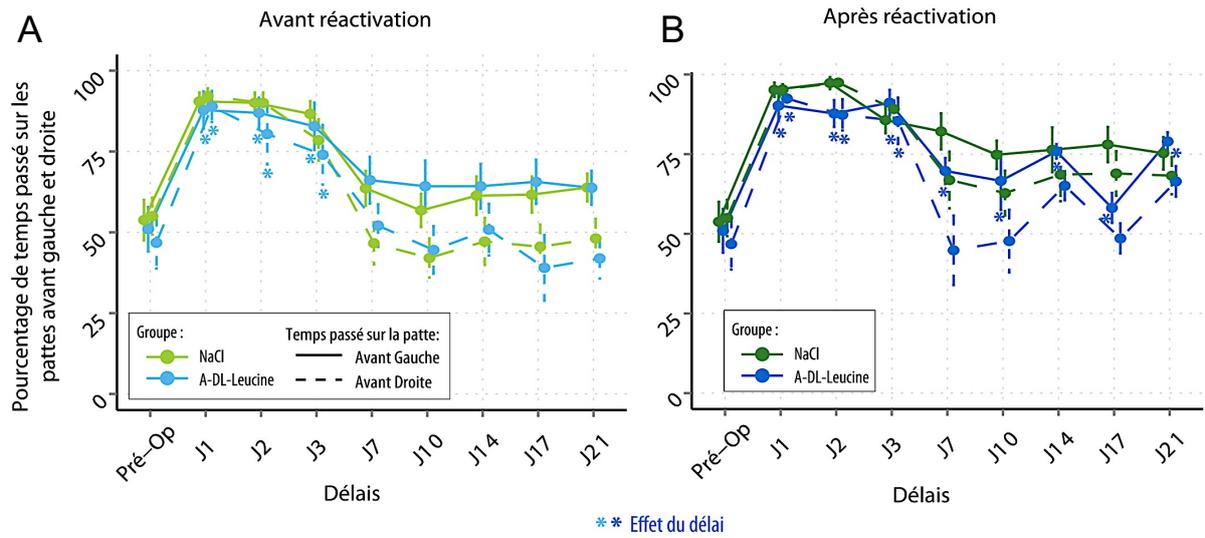


Figure 28 : Représentation du temps passé sur les pattes Avant Droite et Gauche des animaux du groupe traité à l'acétyl-DL-Leucine (Tanganil®) per os avant et après la NVU. Pourcentage de temps passé sur les pattes Avant Droite et Gauche en comparaison avec les rats non traités (NaCl) avant (C) et après réactivation du syndrome (D). Les rats ont tendance à passer plus de temps sur la patte avant gauche à partir de J7 mais de façon non significative. Après réactivation du syndrome, le temps passé sur la patte avant gauche ne retrouve jamais les valeurs pré-opératoires.

3.2.4. Distribution pondérale et évolution du barycentre

Les rats, comme pour les groupes précédents, présentent un léger basculement du poids vers l'avant le premier jour après la lésion ($p < 0,01$) suivi d'un retour progressif au point d'équilibre de départ.

On observe également l'augmentation du poids appliqué à droite les deux premiers jours contrebalancée par une diminution du poids appliqué à gauche ($p < 0,01$) suivi par une inversion de la stratégie posturale avec un poids appliqué à gauche supérieur au poids appliqué à droite ($p < 0,01$) à J10, J17 et J21 (Fig. 29). Ni le traitement ni la réactivation du syndrome n'ont un effet sur la répartition pondérale.

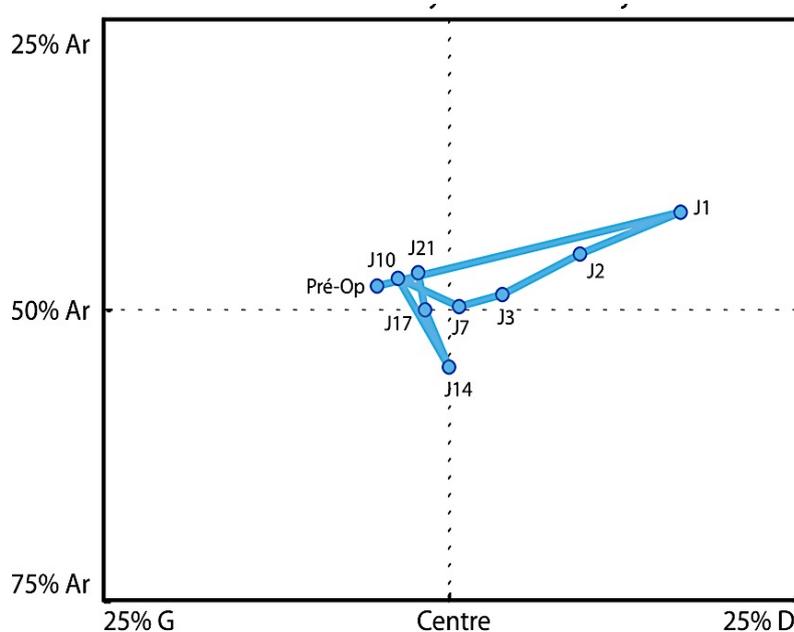


Figure 29 : Représentation de l'évolution du barycentre des rats traités à l'acétyl-DL-Leucine aux différents délais. Le point d'équilibre des rats tend à basculer vers l'avant et la droite dans un premier temps, puis légèrement vers la gauche dans un second temps.

IV. Discussion

Ce travail s'inscrit dans une démarche d'optimisation des méthodes d'induction et d'évaluation des désordres vestibulaires sur modèle animal. Au cours de cette étude, nous avons d'une part, mis en place un modèle animal d'atteinte vestibulaire unilatérale chez une nouvelle espèce animale, le rat, et d'autre part, développé un nouveau mode d'évaluation quantitative du syndrome vestibulaire. Ainsi, cette méthode d'évaluation quantitative du syndrome vestibulaire a été également utilisée pour tester l'efficacité de médicaments antivertigineux prescrits en clinique dans les troubles d'ordre vestibulaire : la bétahistine et l'acétyl-DL-Leucine. Les résultats de cette étude ouvrent des perspectives aussi bien sur le plan technique en améliorant les dispositifs et les tests pour les optimiser, que pour la clinique et le patient permettant un diagnostic et un suivi plus précis.

1. Validation du rat comme modèle animal de pathologie vestibulaire

Pour des considérations éthiques et financières, nous avons transposé au Rat le modèle de neurectomie vestibulaire unilatérale précédemment développé au laboratoire chez le Chat (Xerri and Lacour, 1980). Aujourd'hui, le félin est de moins en moins utilisé dans les laboratoires au profit du rongeur. Au-delà des questions éthiques, ceci permet une économie substantielle en particulier au regard des tests pharmacologiques et moléculaires, qui demandent souvent de grands échantillons d'animaux.

L'intérêt du modèle NVU rat est qu'il reproduit à l'identique une majorité des symptômes composant le syndrome vestibulaire rencontré chez différentes espèces, dont l'Homme. Nous avons ainsi pu observer que la NVU induit des altérations posturales, locomotrices, oculomotrices et perceptives (Figure 8), dont la cinétique est comparable à celle du syndrome vertigineux humain (Strupp et al., 2004). Nous avons en effet relevé une phase précoce de crise aiguë au cours de laquelle les différents symptômes sont à leur apogée, suivie d'une phase d'atténuation de ces symptômes illustrant les conséquences d'un processus de compensation vestibulaire (Tighilet et al., 2007). On peut même inclure une phase intermédiaire qui pourrait correspondre à la phase du premier lever chez le patient soumis à une neurectomie curative pour qui la thérapie pharmacologique actuelle reste sans effets.

En outre, nous apportons les preuves, dans le présent travail, que les médicaments antivertigineux administrés en clinique humaine dans les pathologies vestibulaires peuvent altérer chez le rat de manière significative l'expression temporelle de certains paramètres, comme le temps passé sur deux ou quatre pattes, ce qui reflète directement les altérations de stratégies posturales consécutives à l'atteinte vestibulaire.

Nos résultats démontrent donc que le modèle NVU rat peut être considéré comme un outil reproduisant la pathologie vestibulaire même en ayant conscience des limites de ce modèle. En effet, il s'agit là d'une section du nerf VIII dans son intégralité et ce phénomène reste une cause très rare chez le patient atteint de déficit vestibulaire. Cette approche chirurgicale bien que rare est encore pratiquée en France lorsque les crises vertigineuses sont fréquentes et rebelles à toute pharmacologie (Magnan et al., 1991) mais également dans des cas de schwannome (tumeur bénigne) du nerf vestibulaire.

De plus, il faut prendre en considération la difficulté de cette chirurgie. Il y a principalement trois étapes pour lesquelles l'imprécision peut entraver la réussite de cet acte. La dissection des plans musculaires nucaux peut nuire à l'étude posturale de l'animal lésé. En effet, la douleur induite peut entraîner chez l'animal des postures dites de soulagement parasitant ainsi les données recueillies lors de l'analyse posturale. L'isolement de l'artère stapédienne qui, en cas de lésion directe de cette dernière, entraîne une hémorragie difficilement maîtrisable et le volume de sang perdu engage, de manière générale la survie de l'animal. Dans le cas où l'hémorragie est maîtrisée, le sang résiduel peut empêcher d'avoir un visuel clair du champ opératoire. En dernier lieu, il faut avoir un geste précis pour réaliser la section. En effet, une section trop loin du tronc cérébral ne permet pas de procéder à l'ablation du ganglion de Scarpa et le syndrome vestibulaire risque d'être aléatoire. Une section trop rase risque d'endommager le tronc cérébral empêchant ainsi la restauration fonctionnelle post-lésionnelle.

Néanmoins, ce modèle reste fiable étant donné sa reproductibilité, tant sur le geste chirurgical que sur le comportement induit par la lésion contrairement aux modèles excito-toxiques reproduisant des conséquences néfastes sur la première synapse de cellules sensorielles en souffrance ou oto-toxiques comme la gentamycine, utilisée en clinique humaine dans certains

services ORL pour des cas de vestibulopathie périphérique aiguë (CHU Toulouse) par injection transtympanique. En effet, nous n'avons aucune idée de la quantité de produit ayant agi sur les cellules ciliées vestibulaires au vu du nombre de barrières à traverser et, par voie de conséquence, sur le degré de lésion infligé qui n'est révélé que par des études histologiques en fin d'expérimentation. Enfin, la NVU reste un modèle idéal pour l'étude de la plasticité cérébrale post-lésionnelle du cerveau adulte. Ce type de déafférentation soudaine, totale et irréversible provoque des réactions dans les noyaux vestibulaires déafférentés se traduisant par l'expression d'une mosaïque de mécanismes de neuroplasticité responsables de l'atténuation du syndrome et de la restauration des fonction vestibulaires (stabilisation posturale, locomotrice et oculomotrice lors de mouvements de la tête et du corps (Lacour and Tighilet, 2010). La connaissance de ces mécanismes est d'une importance inestimable car elle nous permet de déchiffrer des cibles potentielles pour des traitements pharmacologiques antivertigineux (Tighilet et al., en révision).

La démarche de transfert de la NVU chat au rongeur a été reconnue par l'Association Française des Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire (AFSTAL) et validé par l'attribution du prix Chantal Autissier. Ce prix a pour vocation de récompenser les travaux relevant des objectifs de l'AFSTAL, en particulier concernant l'éthique animale.

2. Utilisation d'un nouveau dispositif d'étude de la répartition pondérale dynamique au sol comme outil de diagnostic et de suivi du syndrome vestibulaire

L'utilisation d'un dispositif d'étude de la répartition pondérale dynamique au sol pour évaluer le déficit vestibulaire et sa compensation est une première. D'une évaluation essentiellement qualitative, basée sur des mesures catégorielles et subjectives, nous apportons par ce travail une nouvelle méthode d'analyse quantitative, basée sur des mesures physiques objectives. Le travail effectué au cours de cette étude a permis de valider l'intérêt et la sensibilité de cette approche pour l'évaluation de l'atteinte vestibulaire et sa compensation. L'approche quantitative apporte une meilleure sensibilité pour l'évaluation du syndrome vestibulaire et présente l'intérêt de supprimer le biais expérimental dû à l'expérimentateur puisque l'acquisition est totalement automatisée. Nous pouvons donc, d'ores et déjà, anticiper que ce dispositif pourra devenir un outil d'évaluation majeur pour tester l'efficacité de composés anti-vertigineux et diagnostiquer un syndrome vestibulaire.

En outre, ces informations sur les stratégies posturales adoptées après atteinte vestibulaire, peuvent orienter les démarches ré-éducationnelles afin d'optimiser la restauration fonctionnelle. La richesse des données recueillies grâce au dispositif de distribution pondérale dynamique commercialisé par la société BIOSEB (temps passé sur chaque patte, répartition pondérale, barycentre, ...) est susceptible d'améliorer l'analyse des signes cliniques des atteintes vestibulaires et d'optimiser leur prise en charge. Par ailleurs, l'utilisation de ce dispositif pourrait permettre d'identifier de nouveaux marqueurs des différents types et stades d'atteintes vestibulaires et permettre ainsi l'identification de nouveaux outils de diagnostic pour les pathologies vestibulaires et le suivi de la médication.

3. Analyse des différents paramètres

3.1. Temps passé sur les pattes avant et arrière et répartition pondérale sur l'axe antéro-postérieur

Les rats sains, dans un nouvel environnement, ont un comportement exploratoire très développé, mis en avant par le fait qu'ils passent environ la moitié de leur temps sur les deux pattes arrière. Ce comportement exploratoire est significativement altéré chez le rat vestibulo-lésé, puisqu'on constate une augmentation significative du temps passé sur quatre pattes, contrebalancé par une diminution du temps passé sur les deux pattes arrière et ce, durant les trois premiers jours post-lésionnels uniquement. Ces changements sont suivis d'un retour aux valeurs préopératoires à partir du 7^e jour. Ces paramètres reflètent clairement une stratégie tendant à stabiliser l'équilibre postural de l'animal : compte tenu de l'altération du sens de l'équilibre dans la phase aiguë, l'animal favorise une stratégie posturale quadrupède plutôt que bipède, à l'inverse de ce qui est observé en condition contrôle, où l'animal passe environ 50% de son temps sur les deux pattes arrière.

Ce comportement se normalise dès que les processus neurobiologiques supportant la compensation vestibulaire sont mis en place. Cette asymétrie du tonus postural observée dans la phase aiguë résulte vraisemblablement du déséquilibre d'excitabilité entre les deux noyaux vestibulaires homologues (activité spontanée faible du côté déafférenté, activité élevée du côté sain). L'activité de ces noyaux qui emprunte les voies vestibulo-spinales est à l'origine du tonus musculaire du corps (pattes, tronc, cou, dos, etc...). A l'inverse, dans la phase compensée, nous assistons à un retour à l'homéostasie électrophysiologique entre les noyaux vestibulaires, qui supporte la restauration de l'équilibre postural (Lacour and Tighilet, 2010). L'analyse de la distribution pondérale sur les pattes avant et arrière démontre une asymétrie de distribution pondérale sur l'axe antéro-postérieur de l'animal. Le poids est réparti de manière significative sur les pattes arrière en condition normale. Au cours de la phase aiguë (J1 à J2), les rats basculent leur poids vers l'avant. Ensuite, un rééquilibrage de la répartition pondérale a lieu, identique à celui observé avant la neurectomie. Ces observations valident une perte d'équilibre de l'animal et sont donc en cohérence avec l'augmentation du temps passé sur quatre pattes.

3.2. Temps passé sur les pattes avant et répartition pondérale sur l'axe latéral

En ce qui concerne le temps passé sur les pattes avant, il n'y a pas chez le rat en phase aiguë (entre J1 et J3) de tendance à privilégier un appui sur l'une ou l'autre des pattes avant. Cela s'explique par le fait qu'à ces délais, les rats passent presque 100% du temps sur quatre pattes. Néanmoins, même si les temps d'appui sont équivalents sur l'axe latéral, l'animal a tendance à exercer plus de pression sur les pattes contra-latérales à la lésion. En revanche, dès lors que le temps passé sur quatre pattes diminue (à partir de J7), une stratégie privilégiant un appui sur la patte ipsilatérale à la lésion (patte gauche) est observée.

Ces données sur la stratégie posturale de l'animal sont encore plus visibles, lorsque l'on s'intéresse à l'évolution temporelle du barycentre (point d'équilibre) de l'animal. Nous pouvons en effet observer chez le rat, un déplacement du barycentre du côté contra-latéral dans les premiers jours après la lésion vestibulaire gauche, suivi d'une tendance inverse à partir du 7^e jour post-lésionnel. Chez le chat, un effet en miroir est constaté, avec une répartition pondérale s'effectuant majoritairement vers le côté ipsilatéral dans les premiers jours qui suivent la NVU, et s'inversant à partir du 7^e jour post-lésionnel (Xerri and Lacour, 1980). Le rat privilégie d'abord un appui postural sur le côté valide, présentant un tonus musculaire normal au stade post-lésionnel précoce comme observé chez l'homme. La différence avec le chat pourrait s'expliquer par le fait que la posture du rongeur est mixte, avec une alternance de position deux/quatre pattes qui conditionne sa capacité à interagir avec l'environnement.

3.3. Intérêt de la méthode de réactivation du syndrome vertigineux

La réactivation transitoire du syndrome vestibulaire par suspension brève de l'animal par la queue a pour objectif d'appréhender la part des composantes sensorielles spécifiquement vestibulaires dans le processus de compensation vestibulaire. La réactivation du syndrome altère majoritairement les informations tactiles, proprioceptives et visuelles. Le seul système qui reste alors accessible au rat pour disposer d'informations sur la position de son corps est le système vestibulaire. Dans ces nouvelles conditions, l'accélération verticale et la suppression des informations proprioceptives et tactiles provoquent un désordre vestibulaire massif correspondant à une situation décompensée. Cette opération met en évidence en particulier, la mise en place de stratégies de substitutions sensorielles visant à mettre à contribution les informations tactiles, proprioceptives et visuelles au processus de compensation vestibulaire.

De manière intéressante, en particulier pour le paramètre temps passé sur deux et quatre pattes, la compensation vestibulaire prend l'essentiel de son expression à J7 et se maintient sur les trois semaines de notre évaluation. L'opération de décompensation empêche les rats de retrouver une exploration normale à partir de J7, mais ne permet pas pour autant de retrouver l'intégralité du syndrome observé à J1-J2. Ceci peut s'interpréter par le fait que la contribution des modalités tactiles, proprioceptives et visuelles dans la restauration de l'équilibre postural n'est pas exclusive, mais dépend également de remodelages des réseaux neuronaux intrinsèques aux noyaux vestibulaires. C'est au cours de la période post-lésionnelle de J1-J3 que s'expriment dans les noyaux vestibulaires déafférentés, toute une batterie de marqueurs de la plasticité neuronale (prolifération cellulaire, facteurs de croissance nerveuses, facteurs de l'inflammation, neuromodulateurs etc...). Ces mécanismes de neuroplasticité attestent de remodelages de réseaux neuronaux responsables du rééquilibrage de l'excitabilité entre les deux noyaux vestibulaires considéré dans la littérature comme un paramètre clé de la compensation vestibulaire (théorie vestibulo centrique (Lacour and Tighilet, 2010)).

3.4. Comparaison avec l'étude qualitative

L'analyse qualitative du syndrome vertigineux après NVU (mesurée avec l'échelle d'évaluation décrite dans la partie Matériels et Méthodes) met en évidence un syndrome maximal dès le réveil de l'animal. Ce syndrome maximal disparaît dès les premières 24h puisque qu'entre J1 et J3, le comportement le plus sévère observé est le *circling* (*l'animal tourne en rond en effectuant des cercles*). A compter de J7, le syndrome vertigineux se réduit progressivement, se stabilisant sous la forme d'un plateau entre J10 et J21. Ainsi, il est possible de rendre compte du fait que certains symptômes (l'inclinaison de la tête en particulier) persistent sur une durée de plusieurs semaines après la lésion et tendent à ne jamais disparaître complètement, à l'inverse des paramètres posturaux mesurés avec le dispositif BIOSEB.

Contrairement au paramètre temps passé sur 2 et 4 pattes, le protocole de réactivation ne permet pas d'exacerber le syndrome vertigineux. Cette observation illustre les limites de sensibilité de l'évaluation qualitative, qui ne permet pas de visualiser de manière aussi sensible que l'évaluation quantitative les différents paliers d'évolution du comportement vestibulaire altéré. De la même manière, la méthode d'analyse qualitative non paramétrique, n'est pas en mesure de rendre compte de l'impact des autres modalités sensorielles dans la compensation vestibulaire. Néanmoins, l'avantage de l'évaluation qualitative est qu'elle permet de mettre en évidence la persistance de certains symptômes sur le long terme.

Des études supplémentaires vont être réalisées afin de développer des mesures physiques objectives des symptômes persistants sur le long-terme. La combinaison de ces deux méthodes d'analyse subjective et objective de l'évaluation du syndrome vestibulaire constitue donc un gain considérable permettant de quantifier différents aspects du syndrome vertigineux.

4. Etude pharmacologique de l'effet de la bétahistine

La bétahistine est le composé le plus prescrit en Europe chez le patient vertigineux. Son utilisation est principalement réservée à l'accompagnement de l'état vertigineux chronique. En effet, la bétahistine est utilisée depuis longtemps en clinique humaine et permet aux patients de recouvrer plus rapidement l'usage des fonctions vestibulaires déficitaires (Lacour and Sterkers, 2001; Redon et al., 2011). La 1^{ère} preuve expérimentale de l'effet de la bétahistine sur le renouvellement de l'histamine par une action antagoniste des récepteurs histaminergiques de type 3 (H3) a été fournie à partir du modèle NVU chat (Tighilet et al., 2002). Cette action, dose dépendante et fonction de la durée du traitement, serait à l'origine de l'effet bénéfique de la molécule dans le traitement des vertiges (Tighilet et al., 2002, 2007, 2018). L'augmentation de la libération d'histamine due à la bétahistine, participe probablement au rééquilibrage de l'activité spontanée des NV déafférentés par une action excitatrice sur les récepteurs H1 et H2. Plusieurs travaux ont en effet montré que l'activation *in vitro* des récepteurs histaminergiques H1 et H2 induisait une dépolarisation des neurones du NV médian chez le rat (Phelan et al., 1990; Serafin et al., 1991a, 1991b; Wang and Dutia, 1995).

Dans notre étude, la bétahistine a été administrée par voie *per os* de manière quotidienne comme cela se fait en clinique. Le choix de la dose a été fixé par rapport aux études antérieures réalisées chez le chat, montrant un effet optimal à la dose de 10mg/kg (Tighilet et al., 2005). Nos observations démontrent un effet de réduction du syndrome vertigineux, essentiellement visible sur le paramètre « temps passé sur deux et quatre pattes ». Cet effet est observé sous forme d'une réduction significative du syndrome vertigineux aux délais post-lésionnels de J2 et J3 par rapport au groupe contrôle NaCl. Les rats se mettent plus rapidement sur les deux pattes arrière. De plus, la bétahistine induit un léger gain temporel vers un retour à la situation pré-opératoire. En situation de réactivation, le traitement à la bétahistine montre une forte tendance à l'amélioration (bien que non significative sur notre échantillon) qui conduit à une disparition complète du syndrome vertigineux dès J7, alors que ce n'est jamais le cas sans traitement. En comparaison, l'analyse qualitative ne fait ressortir aucune tendance d'effet de ce composé. Ainsi, la mesure du paramètre « temps passé sur deux et quatre pattes » constitue un nouveau paramètre d'évaluation, plus sensible à l'effet de la bétahistine.

De manière intéressante, notre étude met en évidence que dans les conditions normales, les animaux traités ou pas, récupèrent un équilibre postural au 7^e jour post opératoire via le processus de compensation vestibulaire. Le premier effet visible de la bétahistine est ainsi d'atténuer le syndrome vertigineux dans la phase aiguë. Ce résultat pourrait laisser penser qu'il suffit de limiter la fenêtre de traitement à 7 jours. Cependant, dans la condition de réactivation, l'effet antivertigineux de la bétahistine se poursuit tant que le traitement est maintenu. Il permet ainsi de contrôler efficacement le désordre vestibulaire même en situation de décompensation. Cette protection médicamenteuse, appliquée à l'homme, pourrait être particulièrement importante pour limiter les cas de chute en situation de basse vision (la nuit par exemple).

Sur la base de nos observations, il peut être anticipé que la mesure du paramètre « temps passé sur deux et quatre pattes » devienne un critère majeur pour évaluer l'évolution du syndrome vertigineux ainsi que les bénéfices de composés antivertigineux. Cependant, afin de conforter nos résultats et leur interprétation, il demeure nécessaire de réitérer l'étude dans les mêmes conditions, afin d'augmenter nos populations de rats et donc se baser sur des statistiques plus fiables.

5. Etude pharmacologique de l'effet de l'acétyl-DL-Leucine

L'acétyl-DL-leucine (Tanganil[®], Laboratoires Pierre Fabre) est essentiellement prescrit pour combattre les épisodes aigus de vertiges et les désordres végétatifs qui accompagnent les désordres vestibulaires d'origine périphérique (Neuzil and Ravaine, 2002). Ce médicament améliore la compensation posturale chez les patients après neurotomie vestibulaire et labyrinthectomie unilatérale (Ferber-Viart et al., 2009) et chez le chat après neurectomie vestibulaire unilatérale (Tighilet et al., 2015). Bien que son mécanisme d'action reste toujours inconnu, des données électrophysiologiques enregistrées *in vitro* chez le cochon d'inde a suggéré que l'acétyl-DL-leucine pourrait rééquilibrer les potentiels de membrane anormaux des neurones vestibulaires (Vibert and Vidal, 2001).

Nous avons souhaité vérifier l'efficacité d'un traitement à l'acétyl-DL-Leucine sur notre modèle rat de pathologie vestibulaire en utilisant le dispositif BIOSEB. En concertation avec le service d'ORL de l'Hôpital de la Conception à Marseille, nous avons choisi une administration *per os* quotidienne telle qu'elle est dispensée chez l'homme dans les cas d'atteinte graves de type névrite vestibulaire (Venail et al., 2012). Le choix de la dose a été fixé par rapport aux études antérieures réalisées chez le chat, montrant un effet optimal à la dose de 60mg/kg (Tighilet et al., 2015).

La prise d'acétyl-DL-Leucine ne montre pas d'effet de réduction du syndrome vertigineux visible sur le paramètre « temps passé sur deux et quatre pattes ». En situation de réactivation, cette absence d'effet est confirmée par l'absence de retour à des valeurs pré-opératoires du temps passé sur deux pattes. De manière générale, quelques soient les paramètres auxquels on s'intéresse (quantitatifs ou qualitatifs), l'acétyl-DL-Leucine ne semble pas avoir d'effet sur le syndrome vertigineux dans nos conditions expérimentales. L'absence d'effet peut éventuellement s'expliquer par la voie d'administration et par la demi-vie du composé (1,08h) (Neuzil and Ravaine, 2002). Une étude en cours dans le laboratoire, réalisée sur le même modèle animal semble montrer un effet bénéfique sur le syndrome vertigineux lorsque l'acétyl-DL-Leucine est administré par voie intra-péritonéale (doses identiques) et que les rats sont testés 15 minutes après la prise du médicament plutôt que plusieurs heures après, comme c'est le cas dans cette présente étude. L'acétyl-DL-Leucine est administré d'abord par voie intraveineuse en phase aiguë du vertige (3 jours) puis en traitement de fond (30 jours par voie orale) chez le patient vestibulaire. Ce protocole de traitement a montré les mêmes effets bénéfiques chez le chat après NVU (Tighilet et al., 2015). Compte tenu des différences de métabolisme entre ces espèces et de la demi-vie de cette molécule, une réflexion sur l'utilisation et l'optimisation de l'effet de ce médicament chez le modèle rongeur est en cours dans notre laboratoire.

6. Perspectives

6.1. Evolution des tests d'évaluation

A la suite de ces études, il ressort que les tests pourraient être encore optimisés pour évaluer la sévérité du syndrome vestibulaire et son atténuation de manière encore plus fine.

Tout d'abord le dispositif d'analyse de distribution pondérale dynamique nécessiterait une amélioration majeure pour notre évaluation afin d'avoir la possibilité de déterminer les coordonnées de chaque patte pendant toute la durée de l'acquisition pour plusieurs raisons. Ces coordonnées nous permettraient d'estimer le polygone de sustentation moyen, reconnu comme un des paramètres des plus pertinents pour l'évaluation du déficit de stabilisation posturale chez le chat. Cette information nous permettrait d'évaluer le barycentre de l'animal contrôlé ainsi que les variations de ce paramètre au cours des différentes phases de la compensation vestibulaire. Nous pourrions également concevoir avec les informaticiens programmeurs de l'entreprise BIOSEB, un algorithme permettant de réaliser un suivi de la position des pattes au cours de l'acquisition, permettant ainsi de quantifier les distances parcourues pour chaque patte et étudier le *pattern* locomoteur des animaux sains et vestibulo-lésés. Le paramètre locomoteur est couramment étudié chez le patient vestibulaire. Une comparaison des données issues de la clinique et de notre modèle permettrait de mieux appréhender les caractéristiques de la fonction locomotrice chez le patient vestibulaire pour permettre de trouver des méthodes de rééducation conduisant à une compensation optimale de ce paramètre. Par extension, nous pourrions quantifier le *circling*, étant donné que l'animal présentant ce comportement décrit un cercle autour d'une de ses pattes. Si une des pattes parcourt moins de distance que les autres, il est aisé d'en déduire que l'animal présente un comportement de *circling* autour de cette patte. Ainsi, ce comportement serait automatiquement décelé et quantifié au cours des études posturales et nous pourrions ainsi mieux analyser l'évolution de ce comportement au fil du temps.

Une autre limite du dispositif d'évaluation est de ne disposer que d'une seule sélection « autre zone » en contact avec les capteurs. En réalité, nous aurions besoin de pouvoir discerner le flan et la queue en plus des pattes. En effet, lorsque l'animal est en phase aiguë post-

lésionnelle, il rabaisse son corps et fait toucher son ventre pour être plus en contact avec le sol. Au fil du temps, l'animal adopte une position plus haute sur ses pattes et il serait intéressant de décortiquer et quantifier cette attitude posturale. L'utilisation de la queue est aussi exacerbée après la lésion vestibulaire, celle-ci peut être utilisée comme balancier ou béquille contribuant ainsi à stabiliser l'équilibre de l'animal. Notre objectif est d'apporter un éclairage sur le rôle de la queue chez l'animal vestibulo-lésé.

Au niveau des tests d'évaluation, nous avons remarqué que le symptôme le plus persistant dans le temps après lésion était l'inclinaison de la tête, accompagné d'une torsion de l'axe du corps en direction du côté de la lésion vestibulaire. Pour quantifier cela, l'idée serait de placer un accéléromètre sur le crâne de l'animal et sur la colonne vertébrale afin d'évaluer le retour à la normalité angulaire de la position de la tête par rapport à l'horizontale et à l'axe du corps, permettant ainsi de corrélérer ces valeurs avec la restauration fonctionnelle. Ce paramètre, également bien étudié chez le patient neurectomisé, est le reflet de l'asymétrie électrophysiologique des noyaux vestibulaires intacts et déafférentés. Le retour à l'équilibre électrophysiologique des noyaux vestibulaires est corrélé avec l'atténuation de ce déficit comportemental. L'évolution de ce paramètre renseignerait sur les mécanismes de neuroplasticité s'exprimant dans les noyaux vestibulaires et sur le degré et la qualité de la compensation vestibulaire.

6.2. Tests dynamiques

Pour notre modèle rat de NVU, nous manquons de tests dynamiques permettant d'évaluer le déficit vestibulaire lors de déplacements du corps dans l'espace. Historiquement, au laboratoire, nous utilisons le test de la poutre tournante chez le chat. Les animaux étaient entraînés en phase pré-lésionnelle à traverser une poutre à plusieurs vitesses de rotation et le temps de passage était chronométré jusqu'à leur performance maximale. La même opération était répétée en phase post-lésionnelle, jusqu'au retour des valeurs pré-opératoire et ainsi établir une cinétique de restauration fonctionnelle. Ce même protocole pourrait être utilisé chez le rat malgré la contrainte chronophage due au conditionnement des rats.

Par ailleurs, un test de nage serait également intéressant. Il nous permettrait d'évaluer le comportement de l'animal vestibulo-lésé dans un environnement en apesanteur, par conséquent, avec des informations proprioceptives plus faibles. Nous pourrions alors, porter nos études sur les *patterns* locomoteurs et natatoires en situation pathologique. Ces tests pourraient servir à la rééducation des animaux vestibulo-lésés. En comparaison avec la pharmacologie, il serait intéressant de travailler sur la chronologie et l'ampleur de cette rééducation : quand doit on rééduquer, combien de temps, doit on combiner rééducation et pharmacologie etc... Ces études chez l'animal permettraient de révéler une fenêtre temporelle critique dans laquelle la rééducation va être la plus bénéfique ou au contraire la plus délétère. L'extrapolation à la clinique de ces données est d'une importance considérable pour l'amélioration de l'état du patient.

Nous pourrions aussi imaginer l'intégration d'un système hydraulique ou pneumatique au dispositif Bioseb afin de créer des inclinaisons dans plusieurs axes et ainsi évaluer le comportement des animaux vestibulo-lésés face à l'inclinaison inopinée du plan avec ou sans déplacement. Ces méthodes sont importantes pour évaluer les réflexes vestibulo-spinaux permettant les réajustements posturaux en situation dynamique. Ces tests sont également effectués en clinique et ces réflexes sont très perturbés chez le patient vestibulaire. Une des stratégies de rééducation est de les stimuler à nouveau pour favoriser leur réutilisation au service d'une compensation plus rapide du patient.

Nos résultats concernant les stratégies de redistribution pondérale du rat vestibulo-lésé nous ont permis d'entamer une collaboration avec une équipe du laboratoire experte dans le domaine des représentations des parties du corps au niveau du cortex somesthésique. Chaque partie du corps est représentée au niveau de territoires corticaux qui traitent les informations tactiles et proprioceptives. Notre objectif est de cartographier les représentations somesthésiques des pattes chez le rat à différentes étapes de la compensation vestibulaire. Les premiers résultats montrent un élargissement des cartes corticales somesthésiques des pattes postérieures qui témoigne de remaniements profonds de la sensibilité tactile et proprioceptive des pattes. Ces données qui restent à confirmer attesteraient de substitutions sensorielles contribuant à la restauration de l'équilibre. Un renforcement des informations plantaires compenserait la perte d'informations vestibulaires pour une meilleure gestion de l'équilibre statique et dynamique de l'animal.

6.3. Intérêt pour la clinique et le patient

A ce jour, il n'y a pas d'études comparant des données posturales collectées sur des plateformes de force avec des appareillages permettant des analyses pendant la marche. Les techniques les plus usitées aujourd'hui chez le patient vertigineux ou instable sont axés sur le dysfonctionnement de la voie vestibulo-oculaire (par des tests caloriques, le VHIT -Vestibular Head Impulse Test-, fauteuil rotatif), le dysfonctionnement de la voie vestibulo-spinale (posturographie) ou le dysfonctionnement du vestibule (cVEMP- cortical Vestibular Evoked Myogenic Potential-, VEMP oculaire, ou l'imagerie).

Ces tests permettent également de suivre le patient et surveiller les possibles récupérations de la fonction vestibulaire ainsi que la mise en œuvre des processus de compensation et de substitution. Il est à noter que le VHIT permet la localisation topographique et la quantification du déficit vestibulaire (sur les canaux semi-circulaires) pour révéler une éventuelle récupération de la fonction après le déficit. Il permet également d'observer et de quantifier la mise en œuvre de la stratégie saccadique précoce qui se met en place dans le réflexe vestibulo-oculaire. Il n'a pas été démontré jusqu'à présent, par exemple, que l'observation de toute anomalie sur le VHIT peut être un prédicteur de déficit vestibulaire. On peut citer en

particulier la "presbyvestibulie" (vieillesse de la fonction vestibulaire) qui peut être révélée par le VHIT. De même, pour les déficits unilatéraux, le VHIT ne fournit pas de données qui peuvent être corrélées à des données posturographiques statiques ou dynamiques. Réciproquement, la posturographie permet de suivre l'évolution de la performance vestibulo-spinale chez les patients, mais seulement en position statique en ce qui concerne les plateformes de force conventionnelles. Bien que les données obtenues à partir d'un rongeur ne puissent pas être entièrement transférées à l'homme, en partie car les stratégies posturales d'un bipède sont différentes d'un quadrupède, on peut imaginer que l'étude de la distribution dynamique du poids chez le patient vertigineux ou instable pourrait permettre un diagnostic et un suivi plus documenté, basé sur des paradigmes plus écologiques que ceux utilisés dans les explorations existantes. On pourrait également envisager d'identifier, grâce à ces mesures dynamiques, des indicateurs prédictifs solides du risque de chute, ce qui permettrait également d'élargir les indications à l'examen des personnes âgées.

V. Conclusion

Le modèle expérimental développé dans cette étude est particulièrement adapté pour étudier la cinétique de restauration de la fonction vestibulaire après élimination des entrées vestibulaires périphériques. Il est également approprié pour déterminer les mécanismes neurochimiques et moléculaires sous-jacents aux processus de compensation centraux, ainsi que pour vérifier l'efficacité des médicaments ayant des propriétés antivertigineuses. Enfin, la NVU est un modèle reconnu de plasticité post-lésionnelle impliquant des processus originaux tels que la neurogenèse réactionnelle dans les noyaux vestibulaires.

Au-delà d'une évaluation du trouble vestibulaire essentiellement qualitative, basée sur des mesures subjectives, nous apportons par ce travail une nouvelle méthode d'analyse quantitative, basée sur des mesures objectives. Le travail réalisé au cours de cette étude a permis de valider l'intérêt et la sensibilité de ce paradigme pour l'évaluation du trouble vestibulaire et sa compensation suite à une lésion périphérique définitive. L'approche quantitative offrant une meilleure sensibilité objective à l'évaluation, on peut déjà prévoir qu'elle deviendra un outil d'évaluation essentiel pour diagnostiquer le syndrome vestibulaire, suivre son expression cinétique et tester dans ce créneau l'efficacité de composés antivertigineux. En outre, des informations sur les stratégies posturales adoptées après les lésions vestibulaires peuvent guider les approches rééducatives pour optimiser la restauration fonctionnelle. La richesse des données collectées grâce au dispositif de mesure des altérations de la répartition dynamique du poids (temps passé sur chaque patte, répartition du poids, barycentre ...) est susceptible d'améliorer encore l'analyse des signes cliniques du syndrome vestibulaire et d'optimiser leur prise en charge. Par ailleurs, l'utilisation du dispositif de distribution pondérale dynamique utilisé dans cette étude pourrait permettre l'identification de nouveaux marqueurs de différents types et de stades de lésions vestibulaires, et ainsi permettre l'identification de nouveaux outils de diagnostic et de suivi des pathologies vestibulaires.

VI. Références Bibliographiques

- Bennett, M. (2008). The Vertigo case history. Balance function assessment and management, 45-62.
- Borel, L., Harlay, F., Magnan, J., and Lacour, M. (2001). How changes in vestibular and visual reference frames combine to modify body orientation in space. *Neuroreport* 12, 3137–3141.
- Brugeaud, A., Travo, C., Demêmes, D., Lenoir, M., Llorens, J., Puel, J.-L., and Chabbert, C. (2007). Control of Hair Cell Excitability by Vestibular Primary Sensory Neurons. *J. Neurosci.* 27, 3503–3511.
- Chabbert, C. (2013). New insights into vestibular neuropharmacology: from bench to bedside. *J. Vestib. Res. Equilib. Orientat.* 23, 107–111.
- Chabbert, C. (2015). Anatomie et physiologie du vestibule. *EMC - Oto-rhino-laryngologie* 2015;0(0):1-9 [Article 20-021-A-10].
- Chabbert, C. (2016). Principles of vestibular pharmacotherapy. *Handb. Clin. Neurol.* 137, 207–218.
- Darlington, C.L., and Smith, P.F. (2000). Molecular mechanisms of recovery from vestibular damage in mammals: recent advances. *Prog. Neurobiol.* 62, 313–325.
- Desmadryl, G., Gaboyard-Niay, S., Brugeaud, A., Travo, C., Broussy, A., Saleur, A., Dyhrfeld-Johnsen, J., Wersinger, E., and Chabbert, C. (2012). Histamine H4 receptor antagonists as potent modulators of mammalian vestibular primary neuron excitability. *Br. J. Pharmacol.* 167, 905–916.
- Dieringer, N. (1995). “Vestibular compensation”: neural plasticity and its relations to functional recovery after labyrinthine lesions in frogs and other vertebrates. *Prog. Neurobiol.* 46, 97–129.
- Dutia, M.B. (2010). Mechanisms of vestibular compensation: recent advances. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 18, 420–424.
- Dyhrfeld-Johnsen, J., Gaboyard-Niay, S., Broussy, A., Saleur, A., Brugeaud, A., and Chabbert, C. (2013). Ondansetron reduces lasting vestibular deficits in a model of severe peripheral excitotoxic injury. *J. Vestib. Res. Equilib. Orientat.* 23, 177–186.
- Ferber-Viart, C., Dubreuil, C., and Vidal, P.P. (2009). Effects of acetyl-DL-leucine in vestibular patients: a clinical study following neurotomy and labyrinthectomy. *Audiol. Neurootol.* 14, 17–25.
- Gaboyard-Niay, S., Travo, C., Saleur, A., Broussy, A., Brugeaud, A., and Chabbert, C. (2016). Correlation between afferent rearrangements and behavioral deficits after local excitotoxic insult in the mammalian vestibule: a rat model of vertigo symptoms. *Dis. Model. Mech.* 9, 1181–1192.

- Ghilardi, J.R., Freeman, K.T., Jimenez-Andrade, J.M., Coughlin, K.A., Kaczmarek, M.J., Castaneda-Corral, G., Bloom, A.P., Kuskowski, M.A., and Mantyh, P.W. (2012). Neuroplasticity of sensory and sympathetic nerve fibers in a mouse model of a painful arthritic joint. *Arthritis Rheum.* *64*, 2223–2232.
- Günther, L., Beck, R., Xiong, G., Potschka, H., Jahn, K., Bartenstein, P., Brandt, T., Dutia, M., Dieterich, M., Strupp, M., et al. (2015). N-Acetyl-L-Leucine Accelerates Vestibular Compensation after Unilateral Labyrinthectomy by Action in the Cerebellum and Thalamus. *PLOS ONE* *10*, e0120891.
- Hirvonen, T.P., Minor, L.B., Hullar, T.E., and Carey, J.P. (2005). Effects of Intratympanic Gentamicin on Vestibular Afferents and Hair Cells in the Chinchilla. *J. Neurophysiol.* *93*, 643–655.
- Hitier, M., Besnard, S., Vignaux, G., Denise, P., and Moreau, S. (2010). The ventrolateral surgical approach to labyrinthectomy in rats: anatomical description and clinical consequences. *Surg. Radiol. Anat.* *SRA 32*, 835–842.
- Jacob, R.G., and Furman, J.M. (2001). Psychiatric consequences of vestibular dysfunction. *Curr. Opin. Neurol.* *14*, 41–46.
- Jalinière, H. (2014, mars). Vertiges. *Sciences et Avenir*, 805, 182-183.
- Lacour, M. (2006). Restoration of vestibular function: basic aspects and practical advances for rehabilitation. *Curr. Med. Res. Opin.* *22*, 1651–1659.
- Lacour, M., and Bernard-Demanze, L. (2014). Interaction between Vestibular Compensation Mechanisms and Vestibular Rehabilitation Therapy: 10 Recommendations for Optimal Functional Recovery. *Front. Neurol.* *5*, 285.
- Lacour, M., and Sterkers, O. (2001). Histamine and betahistine in the treatment of vertigo: elucidation of mechanisms of action. *CNS Drugs* *15*, 853–870.
- Lacour, M., and Tighilet, B. (2010). Plastic events in the vestibular nuclei during vestibular compensation: the brain orchestration of a “deafferentation” code. *Restor. Neurol. Neurosci.* *28*, 19–35.
- Lopez, C., and Blanke, O. (2011). The thalamocortical vestibular system in animals and humans. *Brain Res. Rev.* *67*, 119–146.
- Magnan, J., Bremond, G., Chays, A., Gignac, D., and Florence, A. (1991). Vestibular neurectomy by retrosigmoid approach: technique, indications, and results. *Am. J. Otol.* *12*, 101–104.
- Markham, C.H., and Yagi, T. (1984). Brainstem changes in vestibular compensation. *Acta Otolaryngol. Suppl.* *406*, 83–86.
- Neuzil, E., and Ravaine, S. (2002). La N-Acetyl-DL-Leucine, Médicament Symptomatique Des États Vertigineux (*). *Bull. soc. Pharm. Bordeaux* 15–38.

- O'Neill, A.B., Pan, J.-B., Sullivan, J.P., and Brioni, J.D. (1999). Pharmacological evaluation of in vivo model of vestibular dysfunction in the rat. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* *21*, 285.
- Patkó, T., Vassias, I., Vidal, P.P., and De Waele, C. (2003). Modulation of the voltage-gated sodium- and calcium-dependent potassium channels in rat vestibular and facial nuclei after unilateral labyrinthectomy and facial nerve transection: an in situ hybridization study. *Neuroscience* *117*, 265–280.
- Péricat, D., Farina, A., Agavnian-Couquiaud, E., Chabbert, C., and Tighilet, B. (2017). Complete and irreversible unilateral vestibular loss: A novel rat model of vestibular pathology. *J. Neurosci. Methods* *283*, 83–91.
- Phelan, K.D., Nakamura, J., and Gallagher, J.P. (1990). Histamine depolarizes rat medial vestibular nucleus neurons recorded intracellularly in vitro. *Neurosci. Lett.* *109*, 287–292.
- Precht, W., Shimazu, H., and Markham, C.H. (1966). A mechanism of central compensation of vestibular function following hemilabyrinthectomy. *J. Neurophysiol.* *29*, 996–1010.
- Redon, C., Lopez, C., Bernard-Demanze, L., Dumitrescu, M., Magnan, J., Lacour, M., and Borel, L. (2011). Betahistine treatment improves the recovery of static symptoms in patients with unilateral vestibular loss. *J. Clin. Pharmacol.* *51*, 538–548.
- Ris, L., de Waele, C., Serafin, M., Vidal, P.P., and Godaux, E. (1995). Neuronal activity in the ipsilateral vestibular nucleus following unilateral labyrinthectomy in the alert guinea pig. *J. Neurophysiol.* *74*, 2087–2099.
- Serafin, M., de Waele, C., Khateb, A., Vidal, P.P., and Mühlethaler, M. (1991a). Medial vestibular nucleus in the guinea-pig. I. Intrinsic membrane properties in brainstem slices. *Exp. Brain Res.* *84*, 417–425.
- Serafin, M., de Waele, C., Khateb, A., Vidal, P.P., and Mühlethaler, M. (1991b). Medial vestibular nucleus in the guinea-pig. II. Ionic basis of the intrinsic membrane properties in brainstem slices. *Exp. Brain Res.* *84*, 426–433.
- Smith, P.F., and Curthoys, I.S. (1988a). Neuronal activity in the contralateral medial vestibular nucleus of the guinea pig following unilateral labyrinthectomy. *Brain Res.* *444*, 295–307.
- Smith, P.F., and Curthoys, I.S. (1988b). Neuronal activity in the ipsilateral medial vestibular nucleus of the guinea pig following unilateral labyrinthectomy. *Brain Res.* *444*, 308–319.
- Smith, P.F., and Curthoys, I.S. (1989). Mechanisms of recovery following unilateral labyrinthectomy: a review. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *14*, 155–180.
- Smith, P.F., and Darlington, C.L. (1991). Neurochemical mechanisms of recovery from peripheral vestibular lesions (vestibular compensation). *Brain Res. Rev.* *16*, 117–133.
- Soto, E., and Vega, R. (2010). Neuropharmacology of Vestibular System Disorders. *Curr. Neuropharmacol.* *8*, 26–40.
- Strupp, M., Zingler, V.C., Arbusow, V., Niklas, D., Maag, K.P., Dieterich, M., Bense, S., Theil, D.,

- Jahn, K., and Brandt, T. (2004). Methylprednisolone, valacyclovir, or the combination for vestibular neuritis. *N. Engl. J. Med.* *351*, 354–361.
- Tighilet, B., Trottier, S., Mourre, C., Chotard, C., and Lacour, M. (2002). Betahistine dihydrochloride interaction with the histaminergic system in the cat: neurochemical and molecular mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* *446*, 63–73.
- Tighilet, B., Trottier, S., and Lacour, M. (2005). Dose- and duration-dependent effects of betahistine dihydrochloride treatment on histamine turnover in the cat. *Eur. J. Pharmacol.* *523*, 54–63.
- Tighilet, B., Mourre, C., Trottier, S., and Lacour, M. (2007). Histaminergic ligands improve vestibular compensation in the cat: behavioural, neurochemical and molecular evidence. *Eur. J. Pharmacol.* *568*, 149–163.
- Tighilet, B., Leonard, J., Bernard-Demanze, L., and Lacour, M. (2015). Comparative analysis of pharmacological treatments with N-acetyl-DL-leucine (Tanganil) and its two isomers (N-acetyl-L-leucine and N-acetyl-D-leucine) on vestibular compensation: Behavioral investigation in the cat. *Eur. J. Pharmacol.* *769*, 342–349.
- Tighilet, B., Péricat, D., Frelat, A., Cazals, Y., Rastoldo, G., Boyer, F., Dumas, O., and Chabbert, C. (2017). Adjustment of the dynamic weight distribution as a sensitive parameter for diagnosis of postural alteration in a rodent model of vestibular deficit. *PLoS One* *12*, e0187472.
- Tighilet, B., Léonard, J., Watabe, I., Bernard-Demanze, L., and Lacour, M. (2018). Betahistine Treatment in a Cat Model of Vestibular Pathology: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Approaches. *Front. Neurol.* *9*, 431.
- Tighilet B., Leonard J., Mourre C., Chabbert C. Apamin treatment accelerates equilibrium recovery and gaze stabilization in unilateral vestibular neurectomized cats: cellular and behavioral aspects. *Neuropharmacology* 2018. Article en révision (Ms. Ref. No.: NEUROPHARM-D-18-00340R2)
- Venail, F., Biboulet, R., Mondain, M., and Uziel, A. (2012). A protective effect of 5-HT₃ antagonist against vestibular deficit? Metoclopramide versus ondansetron at the early stage of vestibular neuritis: a pilot study. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* *129*, 65–68.
- Vibert, N., and Vidal, P.P. (2001). In vitro effects of acetyl-DL-leucine (tanganil) on central vestibular neurons and vestibulo-ocular networks of the guinea-pig. *Eur. J. Neurosci.* *13*, 735–748.
- Vignaux, G., Chabbert, C., Gaboyard-Niay, S., Travo, C., Machado, M.L., Denise, P., Comoz, F., Hitier, M., Landemore, G., Philoxène, B., et al. (2012). Evaluation of the chemical model of vestibular lesions induced by arsenite in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *258*, 61–71.
- Wang, J.J., and Dutia, M.B. (1995). Effects of histamine and betahistine on rat medial vestibular nucleus neurones: possible mechanism of action of anti-histaminergic drugs in vertigo and motion sickness. *Exp. Brain Res.* *105*, 18–24.

Xerri, C., and Lacour, M. (1980). [Compensation deficits in posture and kinetics following unilateral vestibular neurectomy in cats. The role of sensorimotor activity]. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 90, 414–424.

Xia, L., Chen, Z., and Yin, S. (2012). Ototoxicity of cisplatin administered to guinea pigs via the round window membrane. *J. Toxicol. Sci.* 37, 823–830.

Yardley, L., Todd, A.M., Lacoudraye-harter, M.M., and Ingham, R. (1992). Psychosocial consequences of recurrent vertigo. *Psychol. Health* 6, 85–96.

Zennou-Azogui, Y., Borel, L., Lacour, M., Ez-Zaher, L., and Ouaknine, M. (1993). Recovery of head postural control following unilateral vestibular neurectomy in the cat. Neck muscle activity and neuronal correlates in Deiters' nuclei. *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* 509, 1–19.

Zhang, M., Liu, W., Ding, D., and Salvi, R. (2003). Pifithrin-alpha suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience* 120, 191–205.

VII. Annexes

Description des paramètres d'analyse des acquisitions avec le dispositif de distribution pondérale

Pendant l'expérience, le logiciel du dispositif acquiert le poids de chaque partie du corps de l'animal qui repose sur la plateforme de l'appareil contenant les capteurs. Lors de l'analyse, plusieurs paramètres peuvent être ajustés pour essayer de déterminer le plus correctement possible les forces exercées par les pattes en appui sur les capteurs et la répartition du poids sur chaque patte.

Critères de définition des zones

Seuil poids bas = 1,00g

Seuil poids = 2,00g

Si le poids sur un capteur (un pixel) est supérieur au seuil de poids fixé (ici, 2,00 g), il est comparé aux pixels voisins. Si la valeur d'un des pixel voisin est supérieur au seuil de poids bas, il est considéré comme faisant partie de la même zone que le pixel de départ, et ainsi de suite jusqu'à ce que plus aucun pixel adjacent ne dépasse ces seuils.

Seuil de surface = 2

Le seuil de surface correspond au nombre minimal de pixels adjacents requis pour former une zone.

Critères de rejet des images:

Pour faciliter l'analyse des fichiers d'acquisition, les images successives sont regroupées en fonction de la stabilité de l'animal et donc de leur similitude. Ces regroupements d'images, qui représentent des périodes de stabilité, forment des segments. Certains segments peuvent être analysés, et d'autres sont exclus de l'analyse s'ils ne remplissent pas les critères suivants :

Nombre minimum d'images = 3

Correspond au nombre minimum d'images consécutives et identiques nécessaires pour créer un segment.

Nombre maximal de pixels pour une zone = 20

Nombre maximal de zones = 8

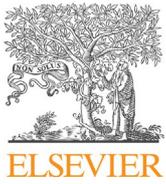
Seuil de mouvement = 15 mm. Le seuil de mouvement correspond à la distance minimale qui doit être détectée entre deux images pour considérer un mouvement de l'animal.

Paramètres d'analyse vidéo

L'acquisition vidéo permet d'améliorer l'analyse grâce à la détection des contours de l'animal, ainsi que trois points distincts sur son corps: le museau, l'origine de la queue et son centre de gravité. La position de ces trois points permet de déterminer l'orientation de l'animal, et donc la position de ses pattes.

Seuil de détection vidéo général = 20

Seuil de fond = 70. Le seuil de fond permet de renforcer la détection de l'animal en dehors des contours de la cage



Complete and irreversible unilateral vestibular loss: A novel rat model of vestibular pathology

David Péricat^a, Anne Farina^b, Emilie Agavnian-Couquiaud^b, Christian Chabbert^{a,*},
Brahim Tighilet^{a,*}

^a Aix Marseille Université, CNRS, UMR 7260, Laboratoire de Neurosciences Intégratives et Adaptatives – Equipe Physiopathologie et Thérapie des Désordres Vestibulaire, 3 Place Victor Hugo, 13331 Marseille Cedex 3, France

^b IPC/CRCM Experimental Pathology (ICEP) Facility, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France

h i g h l i g h t s

- Rodent model of unilateral vestibular loss of the vestibular inputs is lacking.
- Surgical UVN central to Scarpa's ganglion is suitable to suppress inputs from vestibular endorgans.
- Transposition of UVN to the rat opens novel perspectives in term of basic as well as applied studies.

a r t i c l e i n f o

a b s t r a c t

Article history:

Received 20 February 2017

Received in revised form 26 March 2017

Accepted 1 April 2017

Available online 5 April 2017

Keywords:

Vestibule

Vestibular syndrome Vertigo

Background: Both basic and applied studies on the pathophysiology of vestibular disorders are currently impaired by the lack of animal models of controlled vestibular damages.

New methods: In the present study, we describe the procedure to achieve a surgical unilateral vestibular neurectomy (UVN) in the rat and evaluate its functional consequences. This procedure is suitable for reproducing a unilateral, sudden and definitive vestibular areflexia.

Results: Proper induction of a UVN induces a severe vestibular syndrome, which mimics vestibular disorders encountered in humans. This model is also used clinically in the surgical treatment of pharmacological intractable Meniere's disease. Comparison with existing methods unilateral vestibular neurectomy has been essentially used in other species such as cats, monkeys and humans. The current study describes this technique in rats.

Conclusion: This experimental model is particularly adapted to study the restoration kinetics of vestibular function after removal of peripheral inputs. It is also suitable for determining the neurochemical and molecular mechanisms underlying central compensation processes, as well as to check for the efficacy of drugs with potent antivertigo properties. Finally, UVN is an acknowledged model of postlesional plasticity involving original processes such as reactive neurogenesis in the vestibular nuclei.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

recently been underscored (Borel et al., 2008). Afferent fibres contacting the sensory type I and type II hair cells have their cell bodies located in the Scarpa's ganglion. Axons from these cells group into the vestibular nerve and project onto four main branches of the vestibular nerve and project onto four main vestibular nuclei (VN) in the brain stem. These second order vestibular neurons receive convergent multimodal sensory inputs from the visual and somatosensory systems and additionally, from the contralateral VN (via the commissural pathways), the cerebellum and the cerebral cortex. The VN complex projects to ocular and spinal motoneurons and influences the stabilization and orientation of the gaze, head and body in space (Wilson et al., 1979). The VN

* Corresponding authors.

E-mail addresses: christian.chabbert@univ-amu.fr (C. Chabbert),

brahim.tighilet@univ-amu.fr (B. Tighilet).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.04.001> 0165-

0270/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

also projects to various cortical areas implicated in self- as well as extrapersonal perception and, consequently, vestibular inputs contribute to high-level functions like internal spatial representation (Lopez, 2015, 2016).

Vestibular pathologies are characterized by unpredictable and recurring vertigo episodes associated with postural imbalances accompanied by dizziness and nausea, as well as difficulties in stabilizing the gaze during displacement. This set of symptoms greatly affects the most elementary activities of the everyday life. The psychological trauma associated with the acute vertigo crisis and the fear of its recurrence, associated with the physical disability correlated to vestibular disorders (VD), can have important socio-professional consequences, accompanied by cognitive impairments that can lead to psychological and social isolation (Yardley et al., 1992; Jacob and Furman, 2001). The incidence of VD is considerable, affecting one third of adults over forty years of age, two third of those over 60 and 85% of those over 80 years (Agrawal et al., 2009). Vestibular disorders are an important burden on the health system.

Therapeutic solutions, in particular pharmacological solutions, aiming at alleviating the dizziness crisis, protecting the vestibular sensory network or restoring the vestibular function in the event of peripheral damage are currently lacking (Chabbert, 2016). Several locks prevent the development of therapeutic strategies adapted to vestibular deficits. Among these locks, the first is the lack of knowledge about the pathophysiological mechanisms involved in the different types of vestibular impairments. This is due to the small number of teams involved in vertigo research, but also to the few animal models reproducing the symptoms of vestibular pathologies. These animal models of vestibular impairments or damages are necessary to understand how a peripheral insult develops within the inner ear and how its characteristics govern the heterogeneity of the vestibular syndrome. In addition, they allow deciphering the reactive mechanisms that support the post-lesional functional restoration processes. Finally, they are essential to evaluate the efficiency of pharmacological treatments.

Different animal models of vestibular disorders have been developed so far. These models include: (1) ototoxic-based vestibular damages, reproducing inner ear-specific toxicity of drugs such as aminoglycosides or cisplatin, and food-born ototoxicity (Zhang et al., 2003; Hirvonen et al., 2005; Xia et al., 2012; Vignaux et al., 2012); (2) excitotoxically-induced vestibular damages, reproducing the deleterious consequences on the first synapse of sensory cells suffering (O'Neill et al., 1999; Brugeaud et al., 2007; Desmadryl et al., 2012; Dyhrfeld-Johnsen et al., 2013; Gaboyard-Niay et al., 2016); (3) destruction of peripheral receptors through surgical labyrinthectomy (Smith and Curthoys, 1989; Patkó et al., 2003; Hitier et al., 2010); (4) vestibular neurectomy that describes the full section of the vestibular nerve. This operation can be achieved either by severing the vestibular nerve peripherally (between the vestibular endorgans and the Scarpa's ganglion) (Li et al., 1995; Hamann et al., 1998) or centrally (between the Scarpa's ganglion and the brainstem). Peripheral UVN leads to the loss of the inputs from the vestibular endorgans while preserving those arising from the vestibular ganglion neurons. Central UVN induces complete loss of the inputs arising from both the vestibular endorgans and the Scarpa ganglion neurons. Several examples of central UVN have been documented previously in different species such as the monkey (Lacour and Roll, 1976), the cat (Xerri and Lacour, 1980) and the rat (Li et al., 1995).

In this study we aimed to bring more details about the method for achieving surgically central UVN in the rat and studying the time course of the vestibular syndrome through a new behavioural evaluation method allowing considering its multiple components. We believe that this model of controlled vestibular insult may become a widely used model for studying the expression of the vestibular

syndrome, the mechanisms of neuroplasticity involved in functional restoration, as well as to check the efficacy of candidate drugs for both the reduction of acute vertigo crisis and the acceleration of vestibular compensation.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

All experiments were carried out in strict accordance with the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication n° 80-23 revised 1996 for the UK Animals – Scientific Procedures – Act 1986 and associated guidelines, or the Policy on Ethics approved by the Society for Neuroscience in November 1989, and amended in November 1993) and under the veterinary and National Ethical Committee supervision (French Agriculture Ministry Authorization: B13-055-25).

2.2. Animals

Experiments were performed on 11 Long Evans male rats 10–12 weeks old (250/350 g) originating from our own breeding from parents arising from Charles River (St Germain sur l'Arbresle, France). Animals were housed in a large confined space with 12h–12h diurnal light variations with free access to water and food. Animals were housed at the Fédération 3C (Centre Saint-Charles, Aix-Marseille University) animal facility.

2.3. Anaesthesia

Animals were anesthetized with a mixture of ketamine 1000 (Virbac; 100 mg/kg, i.m.)/methomidrine (Domitor® Orion Pharma 0.2 mg/kg, i.p.).

2.4. Surgical approach

Access to the vestibular nerve was achieved through the tympanic bulla approach (Pinilla et al., 2001). After shaving the area of interest, animals were positioned on the 3/4 back (Fig. 1A). The tympanic bulla was located by groping and incised with a pair of scissors. Dissection was conducted until the muscular planes appear and spreader and paper clips were placed (Fig. 1B). We then proceed to the partition of the muscular planes until dissection of the tympanic bulla (Fig. 1C). The tympanic bulla was widely drilled to expose the stapedian artery and the promontory containing the cochlea (Fig. 1D). The cochlear promontory was perforated at several points using a cutter (Fig. 1E). Using a 25G folded bevelled needle inserted into one of the perforations (Fig. 1F), a leverage movement was done to detach the promontory and expose the cochlea (Fig. 1G). After boring the vestiges of the promontory as close as possible to the stapedian artery, the cochlea was removed by pulling with the needle. The bony portion of the cochlea was carefully removed with a fine clip. At this level, the cochlear nerve was apparent. We enlarged the meatus of the cochlear nerve by trimming the bone with a micro needle holder, then aspirated the 8th cranial nerve with the surgical suction so as to put the nerve in tension (Fig. 1H) in order to cut the entire nerve as close as possible to the brain stem with the needle (Fig. 1I). The wound was closed using a stapler. Before awakening the animal by intraperitoneal injection of Antisedan® (Orion-Pharma 1 mg/kg), a solution of Ringer Lactate (Virbac, 10 ml/kg) was administered subcutaneously in order to alleviate the dehydration resulting from the inability of the animal to drink normally as a result of the injury. Upon waking all animals exhibited a vestibular syndrome composed of both a tumbling behaviour and spontaneous nystagmus that confirmed the

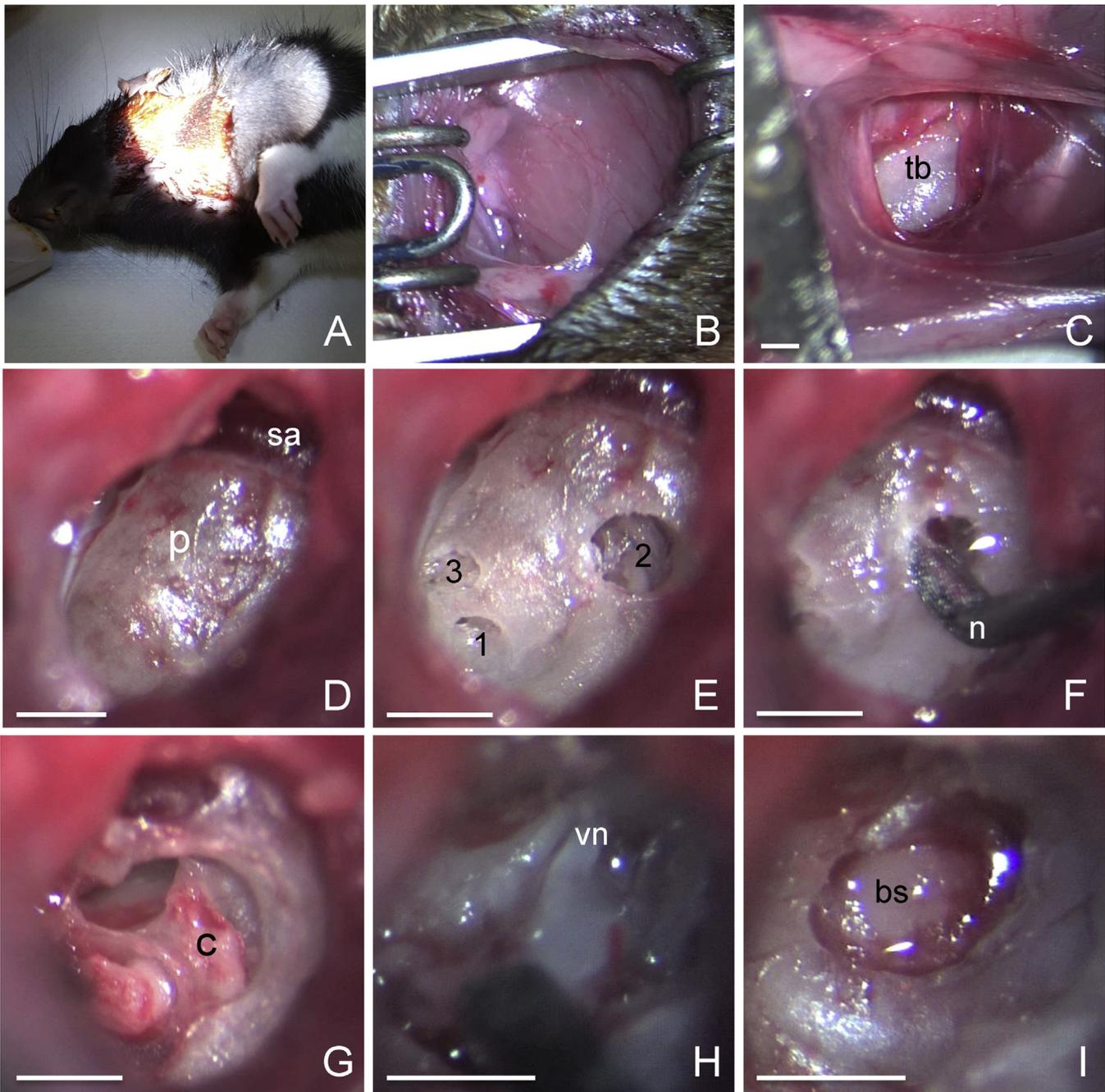


Fig. 1. Illustration of the surgical approach to achieve the unilateral vestibular neurectomy. (A) Position $\frac{3}{4}$ back of the animal for the surgical approach. (B) Incision of the skin plane and placement of spacers. (C) Dissection of the muscular planes in order to remove the tympanic bulla (tb). (D) After milling the tympanic bulla the promontory (p) and the stapedian artery (sa) are exposed. (E) Perforation of the promontory at different points (1–3) to facilitate the opening of an access window into the bone. (F) Introduction of the 25G needle (n) with folded end in order to exert a lever movement and create the access window. (G) Once opened the cochlea (c) is visible. (H) After cochleotomy, tensioning of the vestibular nerve (vn) in order to cut it. (I) Brainstem (bs) after ablation of the vestibulo cochlear nerve. Scale bar 2 mm applies to all panels.

achievement of the unilateral vestibular neurectomy (UNV). Special care was taken to avoid damages of the carotid artery when dissecting cutaneous and muscular planes, stapedial artery during the promontory drilling and lesion of the brainstem during the section of the 8th cranial nerve. The animals received antibiotics for 6 days and cannula was inserted into the tip of the left ventricle and pressed down immediately after surgery. Histological confirmation of the central UNV was performed in four animals after the behavioural evaluation is completed.

2.5. Tissue collection and fixation

The rats were anesthetized and then perfused by intracardiac injection. Opening of the thoracic cage and pericardium gave access to the heart. A cannula was inserted into the tip of the left ventricle and pressed down immediately after surgery. The right atrium was clamped in order to restrict the perfusion and fixation to the upper part of the animal. The injection of 200 ml of isotonic saline (0.9% NaCl containing anticoagulant, 0.1% heparin) was followed by an infusion of 500 ml of Zamboni solution

(4% paraformaldehyde and 0.2% of picric acid in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4), using a peristaltic pump (Masterflex, Biobloc), for 30 min at 4 °C. At the end of the perfusion, the brain was extracted from the skull, cut into blocks and post-fixed at 4 °C in the same fixative mixture as that used during the perfusion.

2.6. Slices and colouration

The procedures for slicing and staining were carried out at the ICEP platform (Paoli Calmettes Institute, Marseille, France). Brains were included in paraffin blocks, then 3 µm sections were made using a microtome (Microm HM340E with Section-Transfer-System). The HES (Hematoxyline/Eosine/Safran) staining of the sections was applied using an automatic colour stainer (Coverstainer, Dako Coverstainer). This colouration allowed staining specifically the cells nuclei in blue purple and their cytoplasm in pink. Sections were then scanned via a NanoZoomer (40 magnification; Hamamatsu) and then observed using the Calopix (Tribvn) software.

2.7. Evaluation of the vestibular syndrome

The vestibular syndrome evoked in the rat after UVN is composed of typical symptoms previously reported in other vestibular disorder models, such as the cat UVN model (Tighilet et al., 2015), the rodent models of unilateral excitotoxically-induced transient vestibular deafferentation (Desmadryl et al., 2012; Dyhrfeld-Johnsen et al., 2013; Gaboyard-Niay et al., 2016) or unilateral chemical labyrinthectomy (Günther et al., 2015). These symptoms, which includes tumbling, retropulsion, circling, bobbing and head tilt, are together present in the acute phase and sequentially disappear following specific time courses. The *tumbling* behaviour describes spontaneous or evoked rotations of the animals along their body axis. This specific parameter, only evoked upon most severe vestibular impairments appears first following UVN and lasts several hours (rated 5 in our evaluation scale). *Retropulsion* characterizes backwards movements of the animals. This parameter (rated 4) appears as soon as the rat is able to stand on his four legs and walk again, and vanishes after few days. *Circling* (rated 3) describes circular movements of the rats in the horizontal plane that starts with the retropulsion behaviour, but last longer, over weeks. *Bobbing* relates to rapid head tilts to the rear and is associated to cephalic nystagmus. This behaviour (rated 2) is observed over weeks. Inclination of the head relative to the body axis called *head tilt* (rated 1) follows the whole duration of the vestibular syndrome and accompanies even slight and reversible vestibular insults (Dyhrfeld-Johnsen et al., 2013). 0 is given when none of these behaviours is observed. In present study, we distinguished the five following states: a first state in which all symptoms are expressed (rated 15) followed by a second stage in which the tumbling has gone (rated 10). A third state in which both the tumbling and the retropulsion behaviours were absent was rated 6. A following state in which tumbling, retropulsion and bobbing were gone was rated 3. Then, two states (rated 2 and 1 respectively) related to states in which both bobbing and head tilt, or head tilt alone remained (Fig. 5A). In Fig. 5B behaviour score values are given as mean ± standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1. Histological confirmation of the unilateral vestibular neurectomy

In order to verify histologically the success of the unilateral vestibular nerve section, we performed histological analysis of the injured rats whole brain. Histological analysis focused on areas of

interest (vestibular endorgans, Scarpa ganglion, vestibular nerves and brain stem vestibular nuclei) (Fig. 2). The observation on thin sections demonstrated the absence of the inner ear sensory organs (vestibule and cochlea), on the deafferented side accompanied by a full section of the fibres constituting the vestibulo-cochlear nerve (8th cranial nerve). Conversely, on the intact side, the vestibular sensory organs were well preserved and the Scarpa ganglion was characterized by its high density of vestibular primary neurons cell bodies. The entire 8th cranial nerve was visible until it enters the brain stem. This observation confirmed that the UVN procedure induced a complete and irreversible section of the vestibulo-cochlear nerve at the post-ganglionic level.

3.2. Qualitative evaluation of the posturo-locomotor syndrome induced by UVN

The expression kinetics of the vestibular syndrome displays different phases: an acute phase of high intensity in the hours following the vestibular lesion (awakening and 4 h), an intermediate phase of drastic reduction of the syndrome during the first post-lesion week (D1–D7), and a compensated phase (1–3 weeks), leading to almost complete disappearance of the symptoms (Figs. 3–5).

Upon awakening, most of the rats displayed a set of symptoms characteristic of the vestibular syndrome (Fig. 3). These symptoms were composed of static and dynamic posturo-locomotor deficits. Static deficits include: asymmetry of the muscle tone of the upper and lower limbs (hypertonic on the intact side and hypotonic on the lesioned side), enlargement of the support surface, cephalic nystagmus (which is expressed by difficulty of the animal to stabilize its head), and inclination of the head towards the side of the lesion. Dynamic deficits are characterized by typical behaviours: retropulsion and propensity of the animals to display tumbling and circling. Vestibulo lesioned rats also displayed alteration of vestibulo spinal reflexes generally causing a deviation of the locomotion path towards the lesioned side. This often led to fall of the animals on the lesion side when attempting to move. When lifted vertically by the tail, injured rats were unable to maintain the position of their body in space (swirl behaviour), associated with a loss of the landing reflex. Spontaneous horizontal and torsional ocular nystagmus (quick phase beats towards the intact side) could often be observed and recorded by the vestibulo nystagmography method (not used in present study). The observation of these typical vestibular behaviours (illustrated in Fig. 4) confirmed the efficacy of the UVN surgical procedure, also attested by histological control (Fig. 2). Qualitative evaluation of the vestibular syndrome reached a score of 14.25 ± 0.75 within the hours following the UVN (Fig. 5). Twenty-four hours after the lesion, the vestibular syndrome was strongly reduced. The tumbling behaviour has disappeared, leaving place to both the retropulsion and circling behaviours, highlighting a return of the ability to move. The mean vestibular score was 6.1 ± 0.4 on the qualitative scale. Over time, the consequences of vestibular damage diminished: mean score: 5.7 ± 0.6 at day 2; 5.4 ± 1 at day 3; 4.2 ± 0.7 at day 7; 2.8 ± 0.5 at day 10; 2.3 ± 0.5 at day 14 and 2.1 ± 0.3 at day 17. At day 21, all rats still presented inclination of the head and cephalic nystagmus persisted in some of them. Mean vestibular score was 2.4 ± 0.3. Thus, the present model of UVN, observed vestibular syndrome appears to be composed, as in man, of an acute vestibular syndrome episode, followed by an intermediate phase as assessed qualitatively. This intermediate phase is characterized by an attenuation of the syndrome. Eventually, a compensated phase with complete disappearance of the syndrome is reached within two weeks.

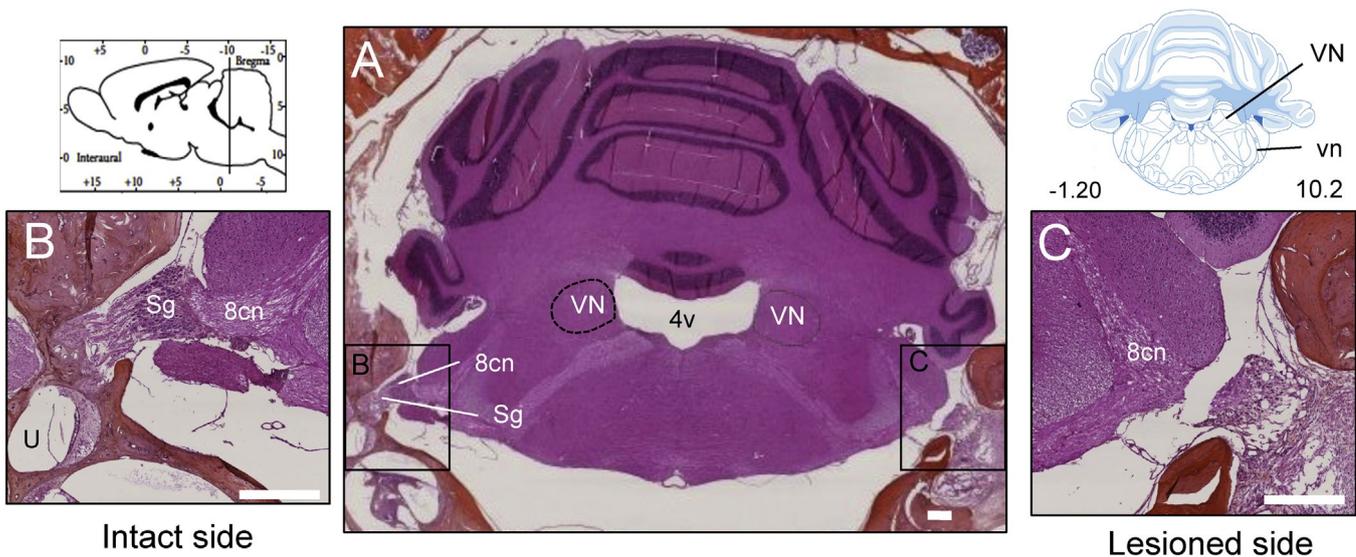


Fig. 2. Histological confirmation of the unilateral vestibular neurectomy. (A) Microphotography of a histological cross section of an adult rat brain (40 days post UVN) at the Interaural -1.20 mm and Bregma -10.20 mm level of the Paxinos and Watson stereotaxic atlas. This level of cut contains a part of the vestibule (utricle, U) within the inner ear, the departure of the fibres constituting the 8th cranial nerve (8cn) at the preganglionic level, the Scarpa ganglion (Sg), the postganglionic segment of the vestibular nerve entering the brain stem towards the vestibular nuclei (NV). After left vestibular neurectomy (C), the vestibular sensory epithelia and the Scarpa ganglion disappeared, leaving room for scar tissue. The brain stem appears completely deafferented, confirming the complete section of the 8th cranial nerve at this level. By comparison the right side has an intact vestibular system (B). 4v: Fourth ventricle; vn: vestibular nerve.

4. Discussion

achieved in rodents through transtympanic application of glutamate agonists to produce excitotoxic-based deafferentation. This paradigm evoked sudden, but also transient vestibular hyporeflexia as demonstrated using histological and functional investigations (Dyhrfeld-Johnsen et al., 2013; Gaboyard-Niay et al., 2016).

4.1. Unilateral vestibular neurectomy versus other types of vestibular insults

Different types of animal models have been developed with UVN mainly differs from labyrinthectomy approach as it completely suppresses both the inputs arising from the vestibular endorgans and the damages (type, stage, severity) govern the heterogeneity of the electrical background activity arising from remaining vestibular primary symptoms that compose the vestibular syndrome. Some of them have been used to decipher the reactive mechanisms that support the first, to perform central UVN in the rat. Through their description, vestibular compensation processes or to decipher the antivertigo it can be assumed that they used a retroauricular approach to selectively section the vestibular nerve in both sides (peripheral vs. central bundle) properties of existing drugs or candidate drugs for the pharmacological treatment of vestibular disorders. Through this sound approach they demonstrated significant differences in term of nerve fibre degeneration within the Scarpa's ganglion. Through this sound approach they demonstrated sensory significant differences in term of nerve fibre degeneration within the brain stem, and time course of the vestibular syndrome depending on whether the Scarpa's ganglion is preserved or not. They especially (Smith and Curthoys, 1989; Patkó et al., 2003; Hitier et al., 2010) were performed. General showed that the circling behaviour period is significantly reduced when or local administrations of compounds bearing potential ototoxic effects were also undertaken (Tabuchi et al., 2011). Though general removed. In the present study, we aimed in assessing the functional (ip) administration of ototoxic compounds was usually used to study consequences on the different symptoms that compose the vestibular both the sequence and mechanisms of bilateral progressive and syndrome, by inducing a complete loss of the inputs arising from the permanent loss of the vestibule inputs, administrations of ototoxic peripheral endorgans and the Scarpa's ganglion. We therefore perform a compounds at low dose in the drinking water were also used to study UVN through the full section of the cochleo-vestibular nerve close to the the development of chronic and reversible vestibular ototoxicity (Sedó-Cabezón et al., 2015). Local (intratympanic or through the round window) administrations of ototoxic compounds were used to induce the neck muscular chain that would affect our monitored behavioural unilateral progressive and permanent loss of the vestibule inputs. We described and quantified the different symptoms Except for the administration of ouabain demonstrated to specifically (tumbling, retropulsion, circling, bobbing and head tilt) previously damage Scarpa's ganglion neurons (Fu et al., 2012), administration of demonstrated to result from the impairment of the vestibular reflexes in oto-toxic drugs resulted in the suppression of the inputs from the mammals (see Fig. 3), at several time points following the UVN. We believe that the present study brings a more accurate picture of the vestibular endorgans, leaving the Scarpa's ganglion neurons alive. Other models were designed to selectively damage the vestibular vestibular syndrome complexity allowing a comparison with the synapses between the sensory cells and their cognate afferents. Acute syndrome observed in humans. In term of terminology, the unilateral vestibular deafferentations are believed to support vestibular vestibular ganglionectomy (UVG) described by Li et al. (1995) can be syndromes such as those encountered in vestibular neuritis (Halmagyi assimilated with the UVN achieved in the present study. Indeed the UVN et al., 2010). They may also extend to other vestibular disorders such described by Li et al. (1995) can be rather assimilated to a as labyrinthitis, vertigo of ischaemic origin and Menière disease labyrinthectomy since this surgery preserves the Scarpa's (Foster and Breeze, 2013). Such conditions were

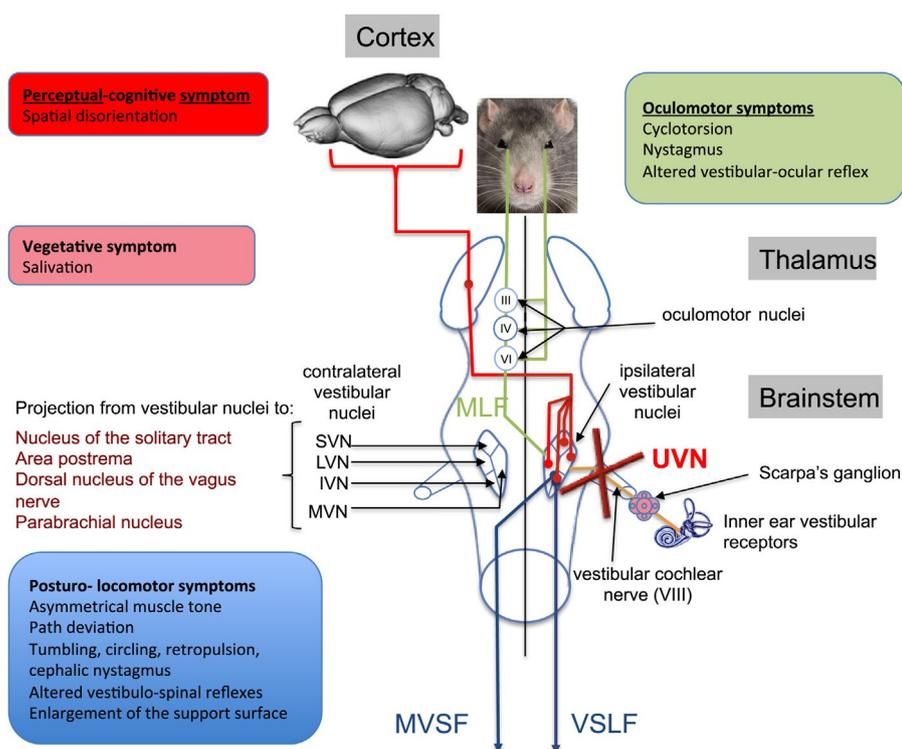


Fig. 3. Anatomico-functional organization of the central vestibular system and functional consequences of the unilateral vestibular neurectomy. The vestibular nerve contacts the sensory cells within the vestibular endorgans (semicircular canals, utricle and saccule) and projects ipsilaterally on four vestibular nuclei (VN): the median (MVN), inferior VN (IVN), lateral (LVN) and superior (SVN) vestibular nuclei. The VNs are located in the dorso-lateral part of the bulbo-protuberantial junction of the brainstem under the floor of the IVth ventricle. They form the first relay of the vestibulo-ocular, vestibulospinal and vestibulo-vegetative reflexes and the vestibulo-cortical ascending pathways involved in spatial orientation. VNs are the origin of pre-motor messages (control of the ocular and somatic musculature) involved in the regulation of the posture and the stabilization of the gaze during head movements. They project, through the medial longitudinal fasciculus (MLF) on oculomotor nuclei (oculomotor nucleus III, cochlear nucleus or abducens IV) whose motoneurons control the eye muscles to produce compensatory reactions of the eye for stabilizing the images on the retina during head movements. Vestibulo-spinal projections, originating from the ipsilateral LVN, reach all medullary stages via the lateral vestibulospinal fasciculus (VSLF). Contralateral projections median of the median, inferior and lateral VN constitute the median vestibulospinal fasciculus (MVSF) and control the motoneurons of the neck and the upper part of the body axis. VNs receive cerebellar, medullary (proprioceptive) and visual (optokinetic) afferents from contralateral vestibular nuclei and cortical areas. In Human, several cortical areas are involved in the reception of multisensorial vestibular messages (3a area 2 v area, parietal-insular vestibular cortex) running through the thalamo-cortical fasciculus. In rodents, vestibular input to the cortex is widespread, affecting many functionally different areas. Some of these areas are homologous with primate vestibular maps (e.g., cingulate and somatosensory cortex), whereas others seem to be specific to rodents (e.g., medial prefrontal cortex). Given this anatomical-functional organization of the vestibular system and its projection targets, unilateral vestibular nerve section induces a quadruple syndrome: posture-locomotor (blue), oculomotor (green), vegetative (pink) and perceptive-cognitive (red).

ganglion. In terms of the kinetics of the vestibular syndrome, it is interesting to note that the central UVN realized by Li et al. (1995) evoked a syndrome with a slower compensation than that observed in our conditions (3 vs. 1 week). This difference could be explained by the fact that they focussed only on the circling component of the vestibular syndrome while we focussed on a set of parameters characterizing the vestibular syndrome. Another possibility to explain the persistence of occasional circling in their study would be the lesion of the sternocleidomastoid muscle during surgery. In our surgical procedure of central section of the vestibular nerve, a special attention has been taken to avoid lesioning this muscle which is known to be involved in the stabilization of head and posture.

We have long developed in the monkey (Lacour et al., 1976) and the cat (Xerri and Lacour, 1980) an *in vivo* model of UVN through the surgical section of the 8th cranial nerve. This model reproduces vestibular pathologies of sudden onset (vestibular neuritis, acoustic neurinoma, curative Meniere surgery). Among the main advantages of UVN, one can cite first the fact that it induces a sudden, complete and permanent deafferentation of the vestibular nuclei. It also causes in all species including man, a reproducible and characteristic severe vestibular syndrome composed of posture-locomotor, oculomotor, vegetative and cognitive symptoms (Lacour and Tighilet, 2010). Similar surgical approach is also

used in human clinic in the surgical treatment of pharmacologically intractable Meniere's disease (Magnan et al., 1991), although special attention is given to preserve the cochlear nerve.

This experimental model is particularly adapted to study the kinetics of restoration of vestibular functions after removal of peripheral inputs (Lacour et al., 1997). It is also suitable for determining the neurochemical and molecular mechanisms underlying central compensation processes (Lacour and Tighilet, 2010, for review). Indeed vestibular neurectomy causes a profound reorganization of the micro environmental factors (neurotransmitters, hormones, neurotrophics and inflammatory factors) in deafferented vestibular nuclei (Tighilet and Lacour, 1998; Tighilet and Lacour, 2001; Tighilet et al., 2009; Liberge et al., 2010). We were the first to demonstrate that UVN in the adult cat induced intense cell proliferation in deafferented VN. Interestingly, most of the reactive newborn cells survived up to 1 month, differentiated into astrocytic cells, microglial cells, and GABAergic neurons (Tighilet et al., 2007a,b), and contributed to the successful recovery of posturo-locomotor function (Dutheil et al., 2009). Such a structural plasticity mechanism after vestibular loss is of particular interest to understand the basic mechanisms of vestibular compensation process and the factors favouring the expression of reactive neurogenesis with functional contribution in the adult damaged brain. We have

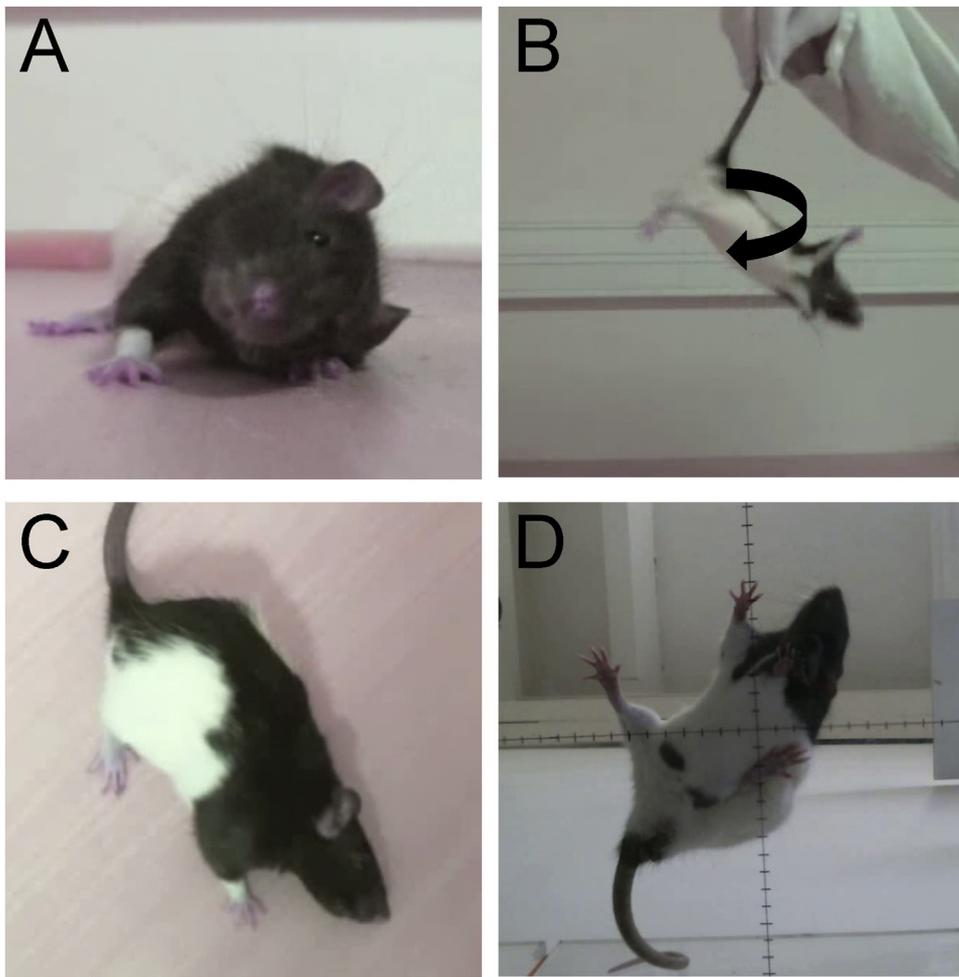


Fig. 4. Illustration of different components of the vestibular syndrome observed at the acute stage following UVN. After UVN, the animal displays a rotation of the head axis on the side of the lesion which can reach an angle of 90° with respect to the body axis (A). Rapid vertical traction of the animal induces a continuous rotation of the body towards the injured side and an inability to land on its legs (B). At the static level, the vestibule-injured animals present an asymmetry of the muscular tone of the upper and lower limbs, with hypertonia on the healthy side and hypotonia on the injured side (C). An enlargement of its supporting polygon (D) which represents the area between the four legs is also visible.

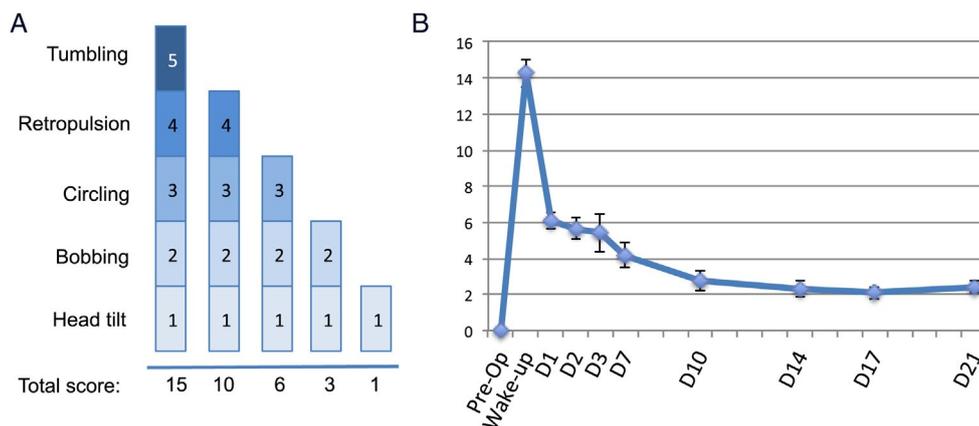


Fig. 5. Qualitative evaluation of the posturo-locomotor components of the vestibular syndrome. (A) Illustration of the evaluation grid used in present study. A first state in which all symptoms are expressed is rated 15. A second stage in which the tumbling has gone is rated 10. A third state in which both the tumbling and the retropulsion behaviours are absent is rated 6. Then, two states (rated 3 and 1 respectively) related to states in which both bobbing and head tilt, or head tilt alone remained. (B) Illustration of the time course of the behavioural evaluation score involving various posturo-locomotor components of the vestibular syndrome according to the procedure described in Materials and Methods. The expression kinetics of the vestibular syndrome displays different phases: an acute phase of high intensity in the hours following the vestibular lesion (awakening and 4 h), an intermediate phase of drastic reduction of the syndrome during the first post-lesion week (D1–D7), and a compensated phase (1–3 weeks), leading to almost complete disappearance of the symptoms. Each data point represents mean vestibular score, with error bars representing SEM.

recently observed that GABA (Dutheil et al., 2013) and TRKB-BDNF signalling (Dutheil et al., 2016) closely interfere with the different steps of vestibular neurogenesis. Finally, we demonstrated that this UVN model induced KCC2 co-transporters down-regulation in the deafferented VN suggesting a depolarizing action of GABA (Dutheil et al., 2016). These novel plasticity mechanisms could explain in part by how the VN returns to electrophysiological homeostasis, considered in the literature to be a key parameter of vestibular compensation. The UVN rat model was also widely used to check for the efficacy of drugs with potent antivertigo properties. Indeed, we demonstrated the potentiating effect of betahistine (Tighilet et al., 1995, 2007b), tanakan (Tighilet et al., 1995) and tan-ganil (Tighilet et al., 2015), three antivertigo drugs prescribed in Europe, on vestibular functional recovery in our animal model of vestibular pathology. We confirmed in humans our pharmacological experiments previously obtained in animal model. Indeed we have demonstrated that betahistine treatment improves the recovery of static symptoms in patients with unilateral vestibular loss (Redon et al., 2011).

4.2. Transposition of the UVN model to the rodent

For ethical and financial considerations, we chose to transpose to the rat, the UVN model previously developed in the laboratory. Primate and feline are currently less and less used in laboratories for both ethical and economic reasons. The interests of the rat UVN are multiple: (i) it reproduces a majority of the symptoms found in the vestibular syndrome previously reported in different species, including man, with similar alterations of the posture, locomotion, vestibulo-ocular reflex (VOR) and cognition; (ii) in both rats and humans, the syndrome is composed of the acute (apogee of the syndrome), intermediate (reduction of the syndrome intensity), and compensated phases (almost complete disappearance of the syndrome); (iii) total duration of the vestibular syndrome is significantly reduced in the rat (2 weeks compared to 40 days in the cat; Tighilet et al., 2006) and 90 days in man (Redon et al., 2011). This temporal gain is advantageous from an applied point of view in the study of antivertigo drugs on the various phases of the syndrome, but also from a fundamental point of view in understanding the neurobiological mechanisms underlying each of the phases of the syndrome.

5. Conclusion on the models of vestibular pathology

It is commonly accepted that the vestibular pathology, or rather the vestibular pathologies, result from various aetiologies taking their sources both at peripheral or central levels. The UVN animal model is one of the only models of controlled vestibular damage that reproduces most of the vestibular syndrome components reported in the Menière patient following curative UVN. Because of the advantages mentioned above, the UVN rat model should naturally become a widely used model for studying the mechanisms of neuroplasticity involved in functional restoration, as well as to check the efficacy of candidate drugs for both the reduction of acute vertigo crisis and the acceleration of vestibular compensation.

Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche and CNRS (UMR 7260 Aix-Marseille Université). We thank Elodie Mansour and Ines Scotto

for taking care of the animals and Philippe Fournier for reading the paper. The authors are grateful to Dr A Deveze and his colleagues of Clairval ENT Institute for the generous gift of the binocular loupe used for the surgical UVN procedure.

References

- Agrawal, Y., Carey, J.P., Della Santina, C., Schubert, M.C., Minor, L.B., 2009. Disorders of balance and vestibular function in US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001–2004. *Arch. Intern. Med.* 169 (10), 938–944.
- Angelaki, D.E., Cullen, K.E., 2008. Vestibular system: the many facets of a multimodal sense. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 125–150.
- Borel, L., Lopez, C., Péruch, P., Lacour, M., 2008. Vestibular syndrome: a change in internal spatial representation. *Neurophysiol. Clin.* 38, 375–389.
- Brugaud, A., Travo, C., Dememes, D., Lenoir, M., Llorens, J., Puel, J.L., Chabbert, C., 2007. Control of hair cell excitability by vestibular primary sensory neurons. *J. Neurosci.* 27, 3503–3511.
- Chabbert, C., 2016. Principles of vestibular pharmacotherapy. *Handb. Clin. Neurol.* 137, 207–218.
- Desmadryl, G., Gaboyard-Niay, S., Brugaud, A., Travo, C., Saleur, A., Dyhrfeld-Johnsen, J., Chabbert, C., 2012. Histamine H4 receptor antagonists as potent modulator of mammal vestibular function. *Br. J. Pharmacol.* 167, 905–916.
- Dutheil, S., Brezun, J.M., Leonard, J., Lacour, M., Tighilet, B., 2009. Neurogenesis and astrogenesis contribution to recovery of vestibular functions in the adult cat following unilateral vestibular neurectomy: cellular and behavioral evidence. *Neuroscience* 164 (4), 1444–1456.
- Dutheil, S., Watabe, I., Escoffier, G., Gharbi, A., Tighilet, B., 2013. GABAA receptors agonist and antagonist alter vestibular compensation and the different steps of reactive neurogenesis in the deafferented vestibular nuclei of adult cats. *J. Neurosci.* 33, 1555–1556.
- Dutheil, S., Watabe, I., Sadlaoud, K., Tonetto, A., Tighilet, B., 2016. BDNF signaling promotes vestibular compensation by increasing neurogenesis and remodeling the expression of potassium-chloride cotransporter KCC2 and GABAA receptor in the vestibular nuclei. *J. Neurosci.* 36, 6199–6212.
- Dyhrfeld-Johnsen, J., Gaboyard-Niay, S., Broussy, A., Saleur, A., Brugaud, A., Chabbert, C., 2013. Ondansetron reduces lasting vestibular deficits in a model of severe peripheral excitotoxic injury. *J. Vestib. Res.* 23 (3), 177–186.
- Foster, C.A., Breeze, R.E., 2013. The Meniere attack: an ischemia/reperfusion disorder of inner ear sensory tissues. *Med. Hypotheses* 81, 1108–1115.
- Fu, Y., Ding, D., Jiang, H., Salvi, R., 2012. Ouabain-induced cochlear degeneration in rat. *Neurotox. Res.* 22 (2), 158–169.
- Gaboyard-Niay, S., Travo, C., Saleur, A., Broussy, A., Brugaud, A., Chabbert, C., 2016. Correlation between afferent rearrangements and behavioral deficits after local excitotoxic insult in the mammal vestibule: an animal model of vertigo symptoms? *Dis. Model. Mech.* 9, 1181–1192.
- Günther, L., Beck, R., Xiong, G., Potschka, H., Jahn, K., Bartenstein, P., et al., 2015. N-acetyl-L-leucine accelerates vestibular compensation after unilateral labyrinthectomy by action in the cerebellum and thalamus. *PLoS ONE* 10 (3), e0120891.
- Halmagyi, G.M., Webera, K.P., Curthoys, I.S., 2010. Vestibular function after acute vestibular neuritis. *Restor. Neurol. Neurosci.* 28, 33–42.
- Hamann, K.F., Reber, A., Hess, B.J., Dieringer, N., 1998. Long-term deficits in otolith, canal and optokinetic ocular reflexes of pigmented rats after unilateral vestibular nerve section. *Exp. Brain Res.* 118, 331–340.
- Hirvonen, T.P., Minor, L.B., Hullar, T.E., Carey, J.P., 2005. Effects of intratympanic gentamicin on vestibular afferents and hair cells in the chinchilla. *J. Neurophysiol.* 93, 643–655.
- Hitier, M., Besnard, S., Vignaux, G., Denise, P., Moreau, S., 2010. The ventrolateral surgical approach to labyrinthectomy in rats: anatomical description and clinical consequences. *Surg. Radiol. Anat.* 32 (9), 835–842.
- Jacob, R.G., Furman, J.M., 2001. Psychiatric consequences of vestibular dysfunction. *Curr. Opin. Neurol.* 14, 41–46.
- Lacour, M., Roll, J.P., 1976. Modifications and development of spinal reflexes in the alert baboon (*Papio papio*) following an unilateral vestibular neurectomy. *Brain Res.* 113 (2), 255–269.
- Lacour, M., Sun, J., Harlay, F., 1997. Kinematic analysis of locomotion in unilateral vestibular neurectomized cats. *J. Vestib. Res.* 7, 101–118.
- Lacour, M., Tighilet, B., 2010. Plastic events in the vestibular nuclei during vestibular compensation: the brain orchestration of a deafferentation code. *Rest. Neurol. Neurosci.* 27, 1–17.
- Li, H., Godfrey, D.A., Rubin, A.M., 1995. Comparison of surgeries for removal of primary vestibular inputs: a combined anatomical and behavioral study in rats. *Laryngoscope* 105, 417–424.
- Liberge, M., Manrique, C., Bernard-Demanze, L., Lacour, M., 2010. Changes in TNF α , NF κ B and MnSOD protein in the vestibular nuclei after unilateral vestibular deafferentation. *J. Neuroinflamm.* 7, 91.
- Lopez, C., 2015. Making sense of the body: the role of vestibular signals. *Multisens. Res.* 28, 525–557.
- Lopez, C., 2016. The vestibular system: balancing more than just the body. *Curr. Opin. Neurol.* 29, 74–83.

- Magnan, J., Bremond, G., Chays, A., Gignac, D., Florence, A., 1991. Vestibular neurectomy by retrosigmoid approach: technique, indications, and results. *Am. J. Otol.* **12**, 101–104.
- O'Neill, A.B., Pan, J.B., Sullivan, J.P., Brioni, J.D., 1999. Pharmacological evaluation of an in vivo model of vestibular dysfunction in the rat. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **21**, 285–289.
- Patkó, T., Vassias, I., Vidal, P.P., De Waele, C., 2003. Modulation of the voltage-gated sodium- and calcium-dependent potassium channels in rat vestibular and facial nuclei after unilateral labyrinthectomy and facial nerve transection: an in situ hybridization study. *Neuroscience* **117** (2), 265–280.
- Pinilla, M., Ramirez-Camacho, R., Jorge, E., Trinidad, A., Vergara, J., 2001. Ventral approach to the rat middle ear for otologic research. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **124**, 515–517.
- Redon, C., Lopez, C., Bernard-Demanze, L., Dumitrescu, M., Magnan, J., Lacour, M., Borel, L., 2011. Betahistine treatment improves the recovery of static symptoms in patients with unilateral vestibular loss. *J. Clin. Pharmacol.* **5**, 538–548.
- Sedó-Cabezón, L., Jedynak, P., Boadas-Vaello, P., Llorens, J., 2015. Transient alteration of the vestibular calyceal junction and synapse in response to chronic ototoxic insult in rats. *Dis. Model. Mech.* **8**, 1323–1337.
- Smith, P.F., Curthoys, I.S., 1989. Mechanisms of recovery following unilateral labyrinthectomy: a review. *Brain Res. Rev.* **14**, 55–180.
- Tabuchi, K., Nishimura, B., Nakamagoe, M., Hayashi, K., Nakayama, M., Hara, A., 2011. Ototoxicity: mechanisms of cochlear impairment and its prevention. *Curr. Med. Chem.* **18**, 1–6.
- Tighilet, B., Leonard, J., Lacour, M., 1995. Betahistine dihydrochloride treatment facilitates vestibular compensation in the cat. *J. Vestib. Res.* **5**, 53–66.
- Tighilet, B., Lacour, M., 1998. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the vestibular nuclei of normal and unilateral vestibular neurectomized cats. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 3115–3126.
- Tighilet, B., Lacour, M., 2001. Gama amino butiric acid (GABA) immunoreactivity changes after unilateral neurectomy in the cat. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 1–15.
- Tighilet, B., Trottier, S., Mourre, C., Lacour, M., 2006. Changes in the histaminergic system during vestibular compensation in the cat. *J. Physiol. Lond.* **573** (3), 723–739.
- Tighilet, B., Brezun, J.M., Gustave Dit Duflo, S., Gaubert, C., Lacour, M., 2007a. New neurons in the vestibular nuclei complex after unilateral vestibular neurectomy in the adult cat. *Eur. J. Neurosci.* **1**, 47–58.
- Tighilet, B., Mourre, C., Trottier, S., Lacour, M., 2007b. Histaminergic ligands improve vestibular compensation in the cat: behavioural, neurochemical and molecular correlates. *Eur. J. Pharmacol.* **446**, 63–73.
- Tighilet, B., Manrique, C., Lacour, M., 2009. Stress axis plasticity during vestibular compensation in the adult cat. *Neuroscience* **160** (4), 716–730. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.02.070>, Epub 2009 Mar 11.
- Tighilet, B., Leonard, J., Bernard-Demanze, L., Lacour, M., 2015. Comparative analysis of pharmacological treatments with N-acetyl-dl-leucine (Tanganil) and its two isomers (N-acetyl-l-leucine and N-acetyl-d-leucine) on vestibular compensation: behavioral investigation in the cat. *Eur. J. Pharmacol.* **769**, 342–349.
- Vignaux, G., Chabbert, C., Gaboyard-Niay, S., Travo, C., Machado, M.L., Denise, P., Comoz, F., Hitier, M., Landemore, G., Philoxène, B., Besnard, S., 2012. Evaluation of the chemical model of vestibular lesions induced by arsenilate in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **258** (1), 61–71.
- Wilson, V.J., Melvill Jones, G., 1979. *Mammalian Vestibular Physiology*. Plenum Press, New York.
- Xia, L., Chen, Z., Yin, S., 2012. Ototoxicity of cisplatin administered to guinea pigs via the round window membrane. *J. Toxicol. Sci.* **37**, 823–830.
- Xerri, C., Lacour, M., 1980. Compensation deficits in posture and kinetics following unilateral vestibular neurectomy in cats: the role of sensorimotor activity. *Acta Otolaryngol.* **90** (5–6), 414–424.
- Yardley, L., Todd, A.M., Lacoutraye-Harter, M.M., Ingham, R., 1992. Psychosocial consequences of recurrent vertigo. *Psychol. Health* **6**, 85–96.
- Zhang, M., Liu, W., Ding, D., Salvi, R., 2003. Pifithrin- α suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience* **120**, 191–205.

RESEARCH ARTICLE

Adjustment of the dynamic weight distribution as a sensitive parameter for diagnosis of postural alteration in a rodent model of vestibular deficit

Brahim Tighilet*, David Péricat, Alais Frelat, Yves Cazals, Guillaume Rastoldo, Florent Boyer, Olivier Dumas, Christian Chabbert*

Aix Marseille Université, CNRS, Integrative and Adaptive Neurosciences UMR 7260, Team Pathophysiology and Therapy of Vestibular Disorders, Marseille, France

* christian.chabbert@univ-amu.fr(CC); brahim.tighilet@univ-amu.fr(BT)



OPEN ACCESS

Citation: Tighilet B, Péricat D, Frelat A, Cazals Y, Rastoldo G, Boyer F, et al. (2017) Adjustment of the dynamic weight distribution as a sensitive parameter for diagnosis of postural alteration in a rodent model of vestibular deficit. PLoS ONE 12 (11): e0187472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187472>

Editor: Izumi Sugihara, Tokyo Medical and Dental University, JAPAN

Received: May 30, 2017

Accepted: October 20, 2017

Published: November 7, 2017

Copyright: © 2017 Tighilet et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are

Abstract

Vestibular disorders, by inducing significant posturo-locomotor and cognitive disorders, can significantly impair the most basic tasks of everyday life. Their precise diagnosis is essential to implement appropriate therapeutic countermeasures. Monitoring their evolution is also very important to validate or, on the contrary, to adapt the undertaken therapeutic actions. To date, the diagnosis methods of posturo-locomotor impairments are restricted to examinations that most often lack sensitivity and precision. In the present work we studied the alterations of the dynamic weight distribution in a rodent model of sudden and complete unilateral vestibular loss. We used a system of force sensors connected to a data analysis system to quantify in real time and in an automated way the weight bearing of the animal on the ground. We show here that sudden, unilateral, complete and permanent loss of the vestibular inputs causes a severe alteration of the dynamic ground weight distribution of vestibulo-lesioned rodents. Characteristics of alterations in the dynamic weight distribution vary over time and follow the sequence of appearance and disappearance of the various symptoms that compose the vestibular syndrome. This study reveals for the first time that dynamic weight bearing is a very sensitive parameter for evaluating posturo-locomotor function impairment. Associated with more classical vestibular examinations, this paradigm can considerably enrich the methods for assessing and monitoring vestibular disorders. Systematic application of this type of evaluation to the dizzy or unstable patient could improve the detection of vestibular deficits and allow predicting better their impact on posture and walk. Thus it could also allow a better follow-up of the therapeutic approaches for rehabilitating gait and balance.

Funding: This research was supported by grants from the "Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche" and "CNRS (UMR7260 Aix

Introduction

Through the operation of its diverse sensory receptors, the vestibule continually provides information about the position of the head in space and on the slightest accelerations to which

it is subjected. Central integration of the vestibular inputs with those of vision and proprioception allows the brain to have in real time, accurate information on the position of our body in space and on our degree of interaction with the environment. In turn this information allows setting appropriate motor responses to maintain static and dynamic balance through coordination of the reflexes of equilibration of the muscles from body, eyes, neck and head [1,2,3].

Sudden alteration of the sensory inputs arising from peripheral vestibular sensory and/or neural elements evokes typical vestibular symptoms characterized by a cascade of functional disorders that includes postural imbalance at rest and during movement, spontaneous nystagmus and oscillopsia, associated to cognitive and neurovegetative disorders. These vestibular disorders occur through alteration of the vestibulo spinal, vestibulo oculomotor, vestibulo cerebellar and cortical reflexes [3,4,5,6] (Fig 1).

Current examination of the dizzy or unstable patient generally involves a combined analysis of alterations affecting these three reflex axes. To date, posturographic tests rely on the calculation of the impact of the three main inputs involved in the equilibrium function (vision, vestibular function and proprioception), on the performance of this static equilibrium in terms of surface area, accelerations and displacement of the pressure centre, and also on the energy spent to maintain a static posture under conditions involving or not, vision and proprioception. To our knowledge, there is no static or dynamic platform system currently dedicated to the clinical posturography allowing analysis of the dynamic posture during displacement. The term "dynamic testing" claimed by some manufacturers relies on the platform movement rather than on the analysis of the posture during a voluntary walking activity. Other systems perform kinematic analysis of the body segments or analysis by Wi-Fi inertial sensors of some body segments, without using pressure sensors.

With the aim to identify new parameters for dynamic and sensitive assessment of the evolution of postural control and balance during movement, we studied the characteristics of alterations of the dynamic weight distribution in a rodent model of vestibular lesion. We quantified in real time and in an automated manner, the distribution of the animal weight on the ground, by means of force sensors connected to a data analysis system. This parameter of weight distribution is important as it provides information on animal postural balance, a function that is altered in the vestibulo-lesioned animal. We quantified for the first time the severe alteration of the dynamic ground weight distribution caused by a sudden, unilateral and complete loss of vestibular input. This parameter, which can be assimilated to a biomarker of postural disorder and balance, could be useful in the diagnosis of the vestibular syndrome in human.

Materials and methods

Ethics statement

All experiments were carried out in strict accordance with the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication n° 80–23 revised 1996 for the UK Animals -Scientific Procedures- Act 1986 and associated guidelines, or the Policy on Ethics approved by the Society for Neuroscience in November 1989, and amended in November 1993) and under the veterinary and National Ethical Committee supervision (French Agriculture Ministry Authorization: B13-055-25). Present study was specifically approved by Neurosciences Ethic Committee N°71 from the French National Committee of animal experimentation.

Animals

Experiments were performed on 11 Long Evans male rats 10–12 weeks old (250/350g) originating from our own breeding from parents arising from Charles River (St Germain sur

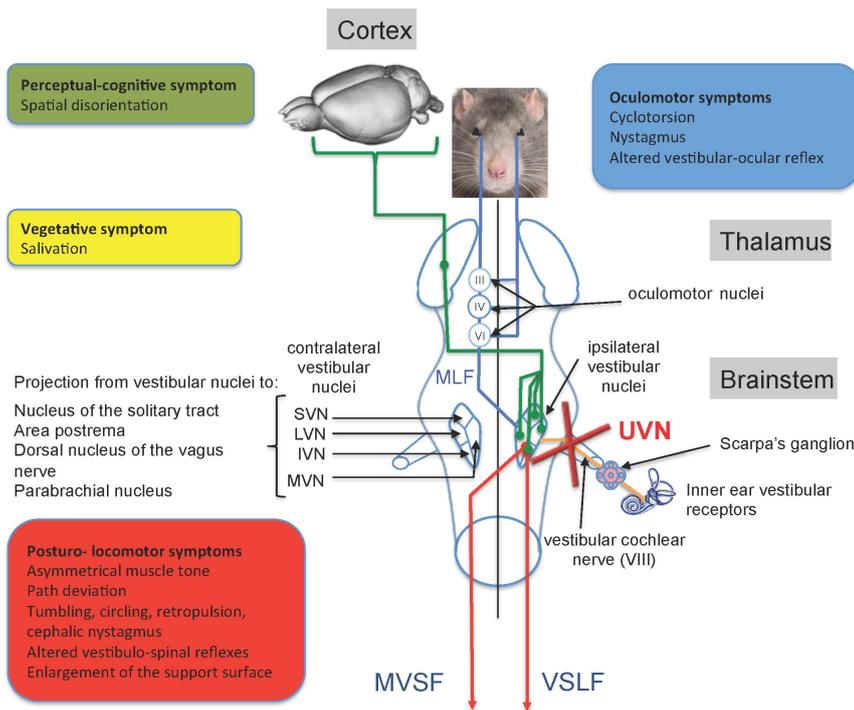


Fig 1. Anato-functional organization of the central vestibular system and functional consequences of the unilateral vestibular neurectomy.

The vestibular nerve contacts the sensory cells within the vestibular endorgans (semicircular canals, utricle and saccule) and projects ipsilaterally on four vestibular nuclei (VN): the medial (MVN), inferior (IVN), lateral (LVN) and superior (SVN) vestibular nuclei. The VNs are located in the dorso-lateral part of the bulbo-protuberantial junction of the brainstem under the floor of the IVth ventricle. They form the first relay of the vestibular-ocular, vestibulospinal and vestibulo-vegetative reflexes and the vestibulo-cortical ascending pathways involved in spatial orientation. VNs are the origin of pre-motor messages (control of the ocular and somatic musculature) involved in the regulation of the posture and the stabilization of the gaze during head movements. They project, through the medial longitudinal fasciculus (MLF) on oculomotor nuclei (oculomotor nucleus III, cochlear nucleus or abducens IV) whose motoneurons control the eye muscles to produce compensatory reactions of the eye for stabilizing the images on the retina during head movements. Vestibulo-spinal projections, originating from the ipsilateral LVN, reach all medullary stages via the lateral vestibulospinal fasciculus (VSLF). Contralateral projections median of the median, inferior and lateral VN constitute the median vestibulospinal fasciculus (MVSF) and control the motoneurons of the neck and the upper part of the body axis. VNs receive cerebellar, medullary (proprioceptive) and visual (optokinetic) afferents from contralateral vestibular nuclei and cortical areas. In Human, several cortical areas are involved in the reception of multisensorial vestibular messages (3a area 2v area, parietal-insular vestibular cortex) running through the thalamo-cortical fasciculus. In rodents, vestibular input to the cortex is widespread, affecting many functionally different areas. Some of these areas are homologous with primate vestibular maps (e.g., cingulate and somatosensory cortex), whereas others seem to be specific to rodents (e.g., medial prefrontal cortex). Given this anatomical-functional organization of the vestibular system and its projection targets, unilateral vestibular nerve section induces a quadruple syndrome: posture-locomotor (blue), oculomotor (green), vegetative (pink) and perceptive-cognitive (red). Adapted from [6].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187472.g001>

l'Arbresle, France). Animals were housed in a large confined space with 12h-12h diurnal light variations with free access to water and food. Animals were housed at the Fédération 3C (Centre Saint-Charles, Aix-Marseille University) animal facility.

Anaesthesia

Animals were anesthetized with a mixture of ketamine 1000 (Virbac; 100 mg/kg, i.p.) / medetomidine (Domitor1 Orion Pharma 0.2 mg/kg, i.p.). In case of awaking signs additional half dose was provided.

Surgical approach

All operations were performed on left ears. Access to the vestibular nerve was achieved through the tympanic bulla approach [6]. After shaving the area of interest, animals were positioned on the back (half the way between lateral and dorsal decubitus). The tympanic bulla was located by groping and incised with a pair of scissors. Dissection was conducted until the muscular planes appear and spreader and paper clips were placed. We then proceeded to the partition of the muscular planes until exposing of the tympanic bulla. The tympanic bulla was widely drilled to expose the stapedian artery and the promontory of the cochlea. The cochlear promontory was perforated at several points using a cutter. Using a 25G bevelled needle inserted into one of the perforations, a leverage movement was performed to detach the promontory and expose the cochlea. After boring the vestiges of the promontory as close as possible to the stapedian artery, the cochlea was removed by pulling with the needle. Remains of the outer bony portion of the cochlea were carefully removed with a fine clip. At this level, the cochlear nerve became apparent. We enlarged the meatus of the cochlear nerve by trimming the bone with a micro needle, then aspirated the 8th cranial nerve with the surgical suction putting the nerve in slight tension in order to cut the entire nerve as close as possible to the brain stem with the needle. The wound was closed using a stapler. Before awakening the animal by intraperitoneal injection of Antisedan1 (Orion-Pharma 1mg/kg), a solution of Ringer Lactate (Virbac, 10 ml/kg) was administered subcutaneously in order to alleviate the dehydration resulting from the inability of the animal to drink normally as a result of the injury. The unilateral vestibular neurectomy (UVN) was attested through appearance of the classical postural, locomotor and oculomotor deficits immediately after surgery [6]. The whole surgical procedure was achieved between 20 and 40 min. Upon waking all animals exhibited a severe vestibular syndrome composed of both a tumbling behaviour and spontaneous nystagmus that confirmed the achievement of the unilateral vestibular neurectomy (UNV). The animals received antibiotics for 6 days and analgesics for 48 hours following the lesion.

Analysis device

In order to quantify the postural syndrome following the UVN we used a device (DWB1 from BIOSEB) measuring the weight distribution at all contact points of the animal body with the ground (Fig 2). This device consists of a Plexiglas cage (25x25 cm) in which the animal can move freely. The floor of this cage is fully covered with a 2000 force sensors plate. Sensors detect vertical pressure at a frequency of 30 Hertz. The sensors are connected to an electronic interface that converts the current flowing through it into a measure of weight, the whole being connected to a computer. The cage is closed by a lid on which is attached a high definition camera, also connected to the computer through a USB cable (Figs 2 and 3).

Acquisition in normal situation

Analysis of the various parameters was carried out at different pre- and post-operative times: a first acquisition was made the day before the lesion, serving as a reference value, and then acquisitions were performed at days (D) 1, 2, 3, 7, 10, 17 and 21 post-lesion. For each acquisition session, the animal was placed in the device and moved freely during 5 minutes of recording (Fig 4).

Data analysis

The analysis consisted in making each group of activated sensors to coincide with the corresponding support paws. The software performed a first automatic analysis of the acquisition

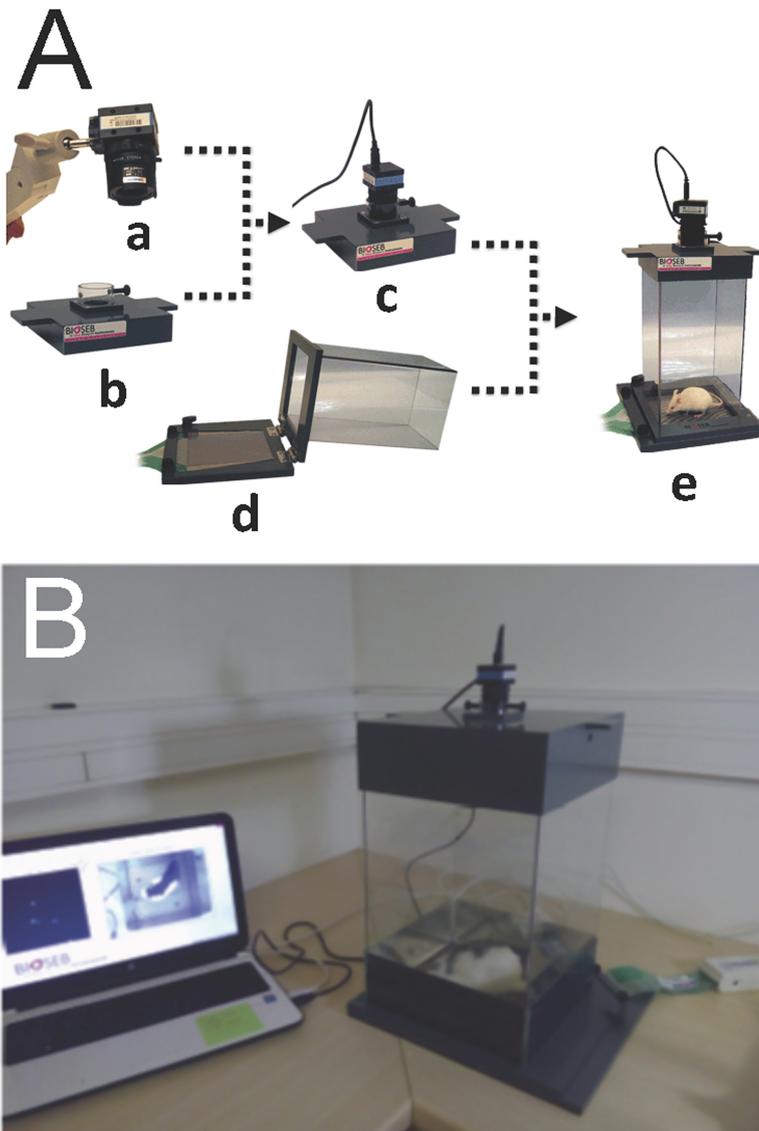


Fig 2. Illustration of the dynamic weigh bearing device used to monitor the dynamic weight distribution in rodents. A: high definition camera (a), coverlid and camera support (b), assembled coverlid (c), force sensors and glass cage (d), assembled system (e). B: Dynamic weigh bearing system in acquisition condition. The rat is free moving in the cage. Its contact points with the captors and the video of its displacement are sent on line to the acquisition software.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187472.g002>

file, and then an experimenter visual analysis completed and corrected the initial analysis. The analysis performance depended on the parameters initially chosen. These parameters were kept constant throughout the study duration. The analysis allowed acquiring many parameters. We were interested in the following: a) the time that the animal spent on four, three or two paws during the 5 minutes recording. After a first analysis of the data, we selected the time spent on four and two paws as being most representative of the animal behaviour; b) the time spent on each paw gave indications on the paws the animal uses most often. Since the time spent on the hind paws was always maximal, we chosen to represent the time spent on each of the front paws (left and right) only; This value represented the time during which the left (or right) front paw touched the floor. c) the weight distributed on each paw allowed knowing

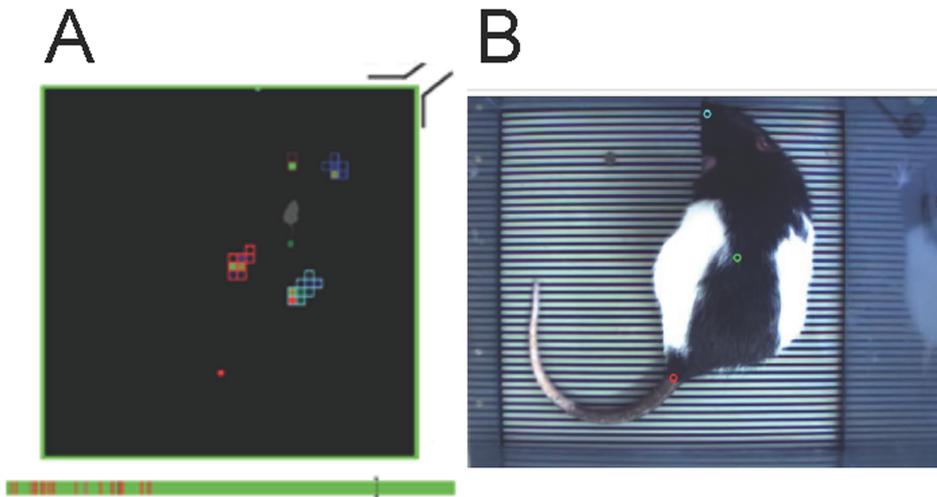


Fig 3. Illustration of the monitoring set up in condition of acquisition. A: a colour is assigned to each area of contact between the animal body and the force sensors. The coloured bar below represents the acquisition time (here 5min). The green corresponds to the time analysed, the red to the non-analysable segments. The grey attachment is a visual marker (representing the electrical connection with the interface) that allows juxtaposition of both the digitized false colour image and the picture of the rat. The grey bar is the cursor of the analysed image. B: Picture taken from the video tracking of the analysed animal.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187472.g003>

how the animal distributes its weight on each paw during the acquisition in order to find its equilibrium. We chose to represent on the one hand the weight distribution on the antero-posterior axis (the two front paws in opposition to the two hind paws) and on the second hand the weight distribution on the lateral axis (the front and hind left paws in opposition to the front and hind right paws). In order to compensate for the weight variability of the animals and the variability of the time analysed over the 5 min acquisition, each of the parameters studied was expressed as a percentage of the animal weight on the day of acquisition and as a percentage of

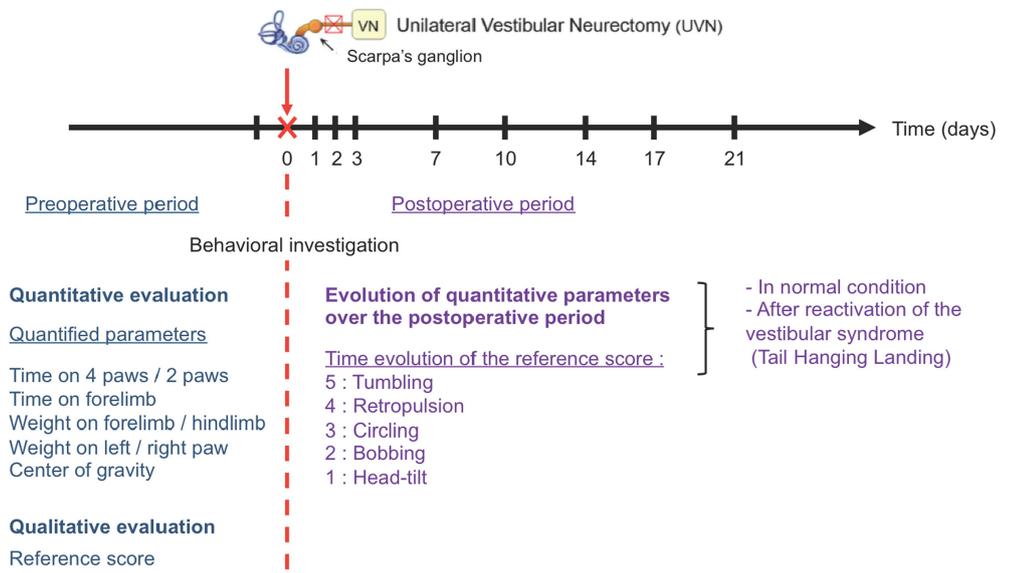


Fig 4. Details of the procedure used to evaluate the alterations of both the posturo locomotor behaviour and the dynamic weight distribution during the pre-operative and postoperative periods.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187472.g004>

the analysed time. Sequences in which the software cannot clearly monitor the paws weight and position were omitted, as well as situation in which the rats put their paw against the wall (Fig 3 bottom red areas). Supporting information is provided at Supplementary information.xls.

Acquisition after reactivation of the vestibular syndrome

From D1, and for each of the post-lesional delays, a second acquisition of 5 minutes was carried out after subjecting the animal to the tail hanging landing test [7]. This test consisted in taking the animal by the tail and lifting it vertically over a height of about 50 cm (lift duration 2 s; position holding at upper position: 1 s). This test reactivated the vestibular syndrome as a result of otolithic system stimulation and withdrawal of proprioceptive and plantar information.

Barycenter

Recorded data were used to model the fine postural disruptions of UVN lesioned rats. A recording was done before the UVN which is considered as D0, and subsequent recordings were performed to model the evolution of the weight repartition on the paws through time (D1, 2, 3, 7, 10, 14, and 21). Taking into account that we only measured the weight on the paws, we defined a barycenter-like computation that models weight repartition on the rat paws. Cumulated weight on front and rear right paws in percent of the cumulated weight on the four paws and cumulated weight on front left and front right paws in percent of the cumulated weight on the four paws are respectively represented by the Eqs 1 and 2 (below), with PRP being the percentage on right paws, WFRP, the weight on the front right paw, WRRP, the weight on the rear right paw, PFP, the percentage on the front paws, WFLP, the weight on the front left paw, and TWP, the total weight repartition on the four paws of the animal.

$$PRP = \frac{WFRP + WRRP}{TWP} \times 100$$

q1b

$$PFP = \frac{WFRP + WFLP}{TWP} \times 100$$

q2b

Present barycenter-like computation as defined previously is not the representation of the animal centre of mass because it does not take into account the true x and y positions of the animal paws and the weight bearing on other body parts (tail, belly) than the paws. Instead it simply models the left/right and front/hind weight repartitions on paws.

Behavioural evaluation of the vestibular syndrome

In parallel with the quantitative analysis indicated above, we evaluated qualitatively the vestibular syndrome following UVN using a method recently validated [6]. The vestibular syndrome evoked in the rat after UVN is composed of typical symptoms previously reported in other vestibular disorder models, such as the cat UVN model [8], the rodent models of unilateral excitotoxically-induced transient vestibular deafferentation [9,10,11] or unilateral chemical labyrinthectomy [12]. These symptoms, which include tumbling, retropulsion, circling, bobbing and head tilt, are together present in the acute phase and sequentially disappear following specific time courses. The *tumbling* behaviour refers to spontaneous or evoked rotations of the animal along its body axis. This specific parameter (rated 5 in our evaluation scale), only evoked upon most severe vestibular impairments appears immediately following UVN and lasts several hours). *Retropulsion* characterizes backwards movements of the animals. This parameter (rated 4) appears as soon as the rat is able to stand on his four paws and move again, and vanishes after few days. *Circling* (rated 3) describes circular movements of the rats

in the horizontal plane that starts with the retropulsion behaviour, but lasts longer, over weeks. *Bobbing* relates to rapid head tilts to the rear and is assimilated to cephalic nystagmus, this behaviour (rated 2) is observed over weeks. *Head tilt* (rated 1) is an inclination to one side of the head relative to the body axis, it lasts the whole duration of the vestibular syndrome and accompanies even slight and reversible vestibular insults [10]. A rating of zero is given when none of these abnormal behaviours is observed. In the present study, we distinguished the five following states: a first state in which all symptoms are expressed (rated 15) followed by a second stage in which the tumbling has gone (rated 10). A third state in which both the tumbling and the retropulsion behaviours were absent was rated 6. A following state in which tumbling, retropulsion and bobbing were gone was rated 3. Then, two states (rated 2 and 1 respectively) relate to states in which both bobbing and head tilt, or head tilt alone remained.

Exclusion criteria

Animals were excluded from the study when they exhibited maximum syndrome (score of 15 on the qualitative scale) 48 hours after the lesion, indicating a very strong lesion and very slow functional recovery. We also removed two rats from the study, for which many of the acquisition files were unusable.

Statistical analysis

For each of the parameters evaluated on the 11 rats sample, the statistical analysis was carried out with the Matlab statistical toolbox software. We performed an analysis of variance (ANOVA with repeated measures with several factors), to test the effect of UVN on the percentage of time spent on two and four paws, the percentage of time spent on the front paws, and the weight distribution (weight percentage on the front and back paws, weight percentage on the left and right paws). Post-hoc analyses were carried out using the Tukey-Kramer multiple comparison test, which is the version of the Tukey correction adapted for comparisons of samples of different sizes. Statistical analysis of the barycenter-like data was performed using repeated measure Anova on each of the two dimensions (weight repartition on the right paws, and weight repartition on the front paws). To this end, we used a Fisher-Snedecor table with

$\alpha = 0.01\%$. Here the null hypothesis H_0 is the rejection of the mean recording for each day being significantly different and H_1 , the acceptance of a significant evolution through time. According to the different degrees of freedom, we found 2,8 for the critical value of both dimensions and F-values of 3,491 and 7,056 for the weight repartition on the right paws, and the weight repartition on the front paws respectively. Both F-values being superior to the critical-value, we accepted the H_1 hypothesis stating the existence of statistical relevance in the postural evolution for both dimensions with a confidence interval superior than 99%. Anova computations were performed with a python implementation.

Results

We analysed in a sample of 11 adult Long Evans male rats the consequences of UVN on different parameters: 1- the percentage of time spent on two or four paws, 2- the percentage of time spent on the front paws, and, 3- the right/left and front/back weight distributions 4- the calculation of the barycenter-like measure.

Comparison of time spent on two and four paws

Before the lesion, the rats spent the same time on four paws (mean \pm SEM = 45.8% \pm 6.5) and on two paws (37.7% \pm 5.6). After the lesion, the time spent on four paws increased significantly

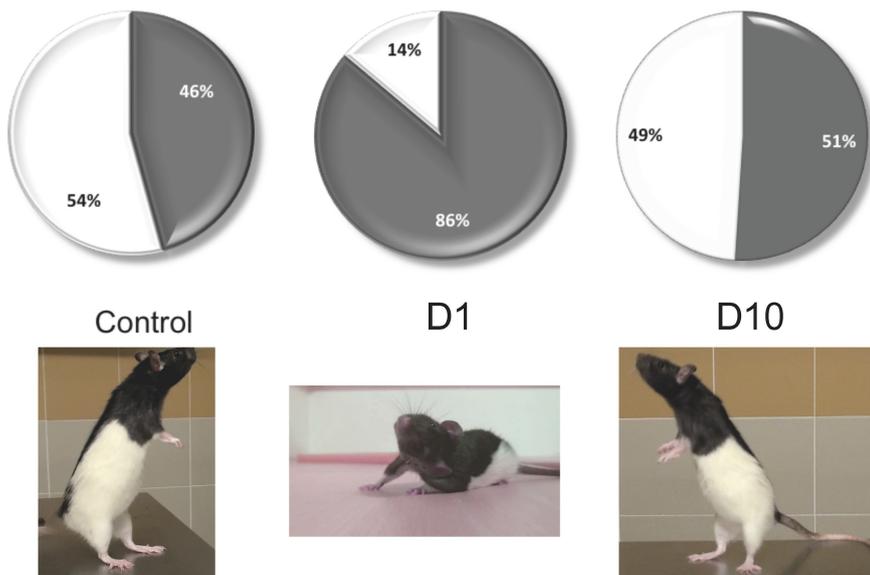


Fig 5. Representation of the time spent on two and four paws in control rats and after 1 and 10 days after UVN. Left: control rats. Middle: 1 day after UVN. This situation corresponds to the acute stage of the vestibular syndrome. Right: 10 days after UVN. This situation corresponds to the compensated stage of the vestibular syndrome. Pictures below illustrate the righting position that characterizes the exploration behaviour (right and left) and the body position characteristic of the acute vestibular syndrome (Middle). At this stage, the rat favours a support surface on the intact side probably due to the increase of the muscular tonus of the paws on the intact side and the simultaneous loss of tonicity on the injured side.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187472.g005>

relative to the pre operative time, at the first ($86.6\% \pm 3.2$; $p < 0.001$), second ($85.5\% \pm 4.1$; $p < 0.001$) and third ($73.3\% \pm 7.5$; $p < 0.03$) days, while the time spent on two paws at the same times decreased significantly ($4.3\% \pm 1.6$ the first day, $p < 0.001$; $5.6\% \pm 2.1$ the second day, $p < 0.001$; $8.25\% \pm 2.8$ the third day, $p < 0.001$). From Day 7 (D7), these two parameters became equal again and reached values similar to those at pre lesion (Figs 5 and 6A). In conditions of reactivation of the vestibular syndrome, the same tendency as previously described was observed over the first three days after the lesion, with: an increase on the time spent on four paws from D1 to D3 (mean: $89.5\% \pm 2.0$; $p < 0.001$) and a decrease of the time spent on two paws at the same times (mean: $3.2\% \pm 1.0$; $p < 0.001$). From D7, the time spent on four paws decreased again, while the time spent on two paws increased again, although without reaching the preoperative values. Especially, the time spent on two paws remained significantly lower than the preoperative values until D21 after the lesion (mean: $18.6\% \pm 2.1$; $p < 0.01$). From D7 to D21, the time spent on four paws after reactivation of the vestibular syndrome ($62.7\% \pm 3.6$) was significantly higher ($p < 0.05$) to the time spent on four paws in normal situation ($40.22\% \pm 3.0$). Similarly, the time spent on two paws in reactivated situation ($18.6\% \pm 2.1$) was significantly lower than the time spent on two paws ($33.5\% \pm 2.2$) in normal situation at the same time points ($p < 0.01$) (Fig 6B).

Comparison of time spent on left and right front paws

Before the vestibular lesion, rats spent as much time on their left front paw ($53.8\% \pm 6.7$) as on their right front paw ($55.0\% \pm 5.7$, $p > 0.05$, NS). In the first three days after the lesion, rats spent significantly more time on their left forepaws (mean: $89.1\% \pm 1.9$, $p < 0.05$) and right ($86.9\% \pm 2.7$, $p < 0.05$), but always in a left/right balanced manner ($p > 0.05$, NS). From D7, the time spent on the front paws decreased, but unevenly: rats spend significantly more time on

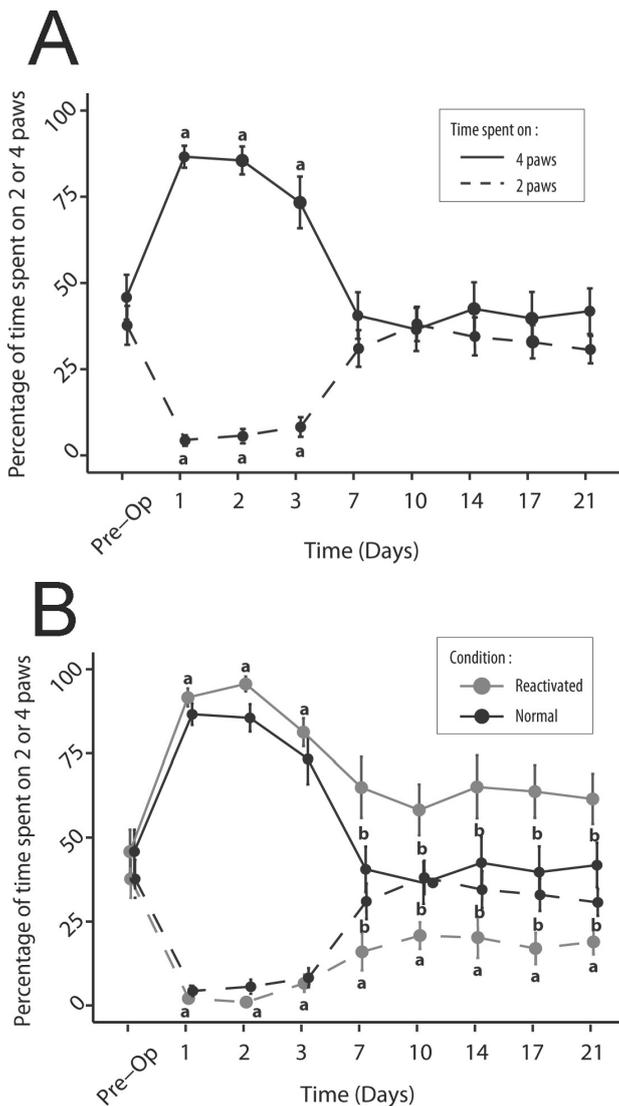


Fig 6. Representation of the time spent on two and four paws for the rats in normal situation and after the UVN. The time spent on two and four paws is represented as a percentage of time compared to the time analysed over the 5 minutes of acquisition. In control situation (A) there is a statistically significant increase in the time spent on four paws and a significant decrease in the time spent on two paws over the first three days after the lesion, relative to the pre-operative condition (a; $p < 0.05$). These changes are followed by a return to preoperative values from D7 in both cases. In reactivated condition (B), there is a statistically significant increase in the time spent on four paws and a significant decrease in the time spent on two paws over the first three days after the lesion, relative to the pre-operative condition (a; $p < 0.05$). Statistically significant change relative to the pre-operative condition is prolonged over the D7-D21 period, only for the time spent on two paws. Over this period, drastic reduction of visual and proprioception inputs induces significant changes (b; $p < 0.05$) in both the time spent on two and four paws relative to the control situation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187472.g006>

the left front paw ipsilateral to the lesion (on average, from D7 to D21: $61.4\% \pm 2, 3$) than on the right front paw ($45.9\% \pm 2.8$, $p < 0.03$) (Fig 7A). After having induced a reactivation of the vestibular syndrome, the time spent on each front leg was again significantly increased during the first three days following the lesion (on average $92.7\% \pm 1.9$ of the time spent on the front left paw, $p < 0.001$, $94.0\% \pm 1.2$ on the right front paw, $p < 0.001$). The time spent on the left front paw remained significantly higher than the preoperative values from D7 to D21 (on

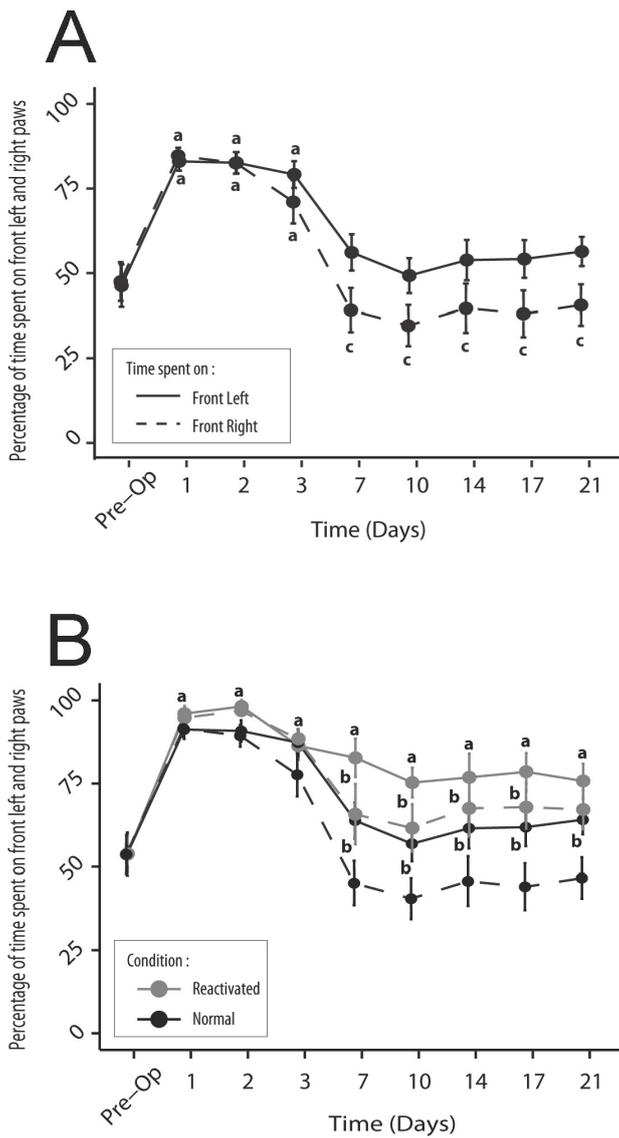


Fig 7. Representation of the time spent on the front right and left paws before and after the UVN. A: In control situation, statistically significant increase in the time spent on the front right and left paws is observed over the first three days after the lesion, relative to the pre-operative condition (a; $p < 0.05$). Over the D7-D21 period, only the time spent on the front left paws remains significantly different relative to the control situation (c; $p < 0.05$). In reactivated condition (B), statistically significant change relative to the pre-operative condition is prolonged over the D7-D21 period, only for the time spent on front left paw. Over this period, statistically significant change (b; $p < 0.05$) in both the time spent on the right and left paws relative to the control situation is observed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187472.g007>

average $77.3\% \pm 2.4$, $p < 0.01$), while the time spent on the front right paw decreased to reach values close to pre-lesion values ($67.1\% \pm 3.2$, $p > 0.05$, NS) (Fig 7B).

Weight distribution along the antero-posterior axis

Control rats have an asymmetric weight distribution on the antero-posterior axis. They distribute their weight at $72.8\% \pm 1.6$ on the hind paws and $25.7\% \pm 1.2$ on their front paws. After UVN, the rats significantly tilted their weight forward. At D1 and D2 the weight applied to the

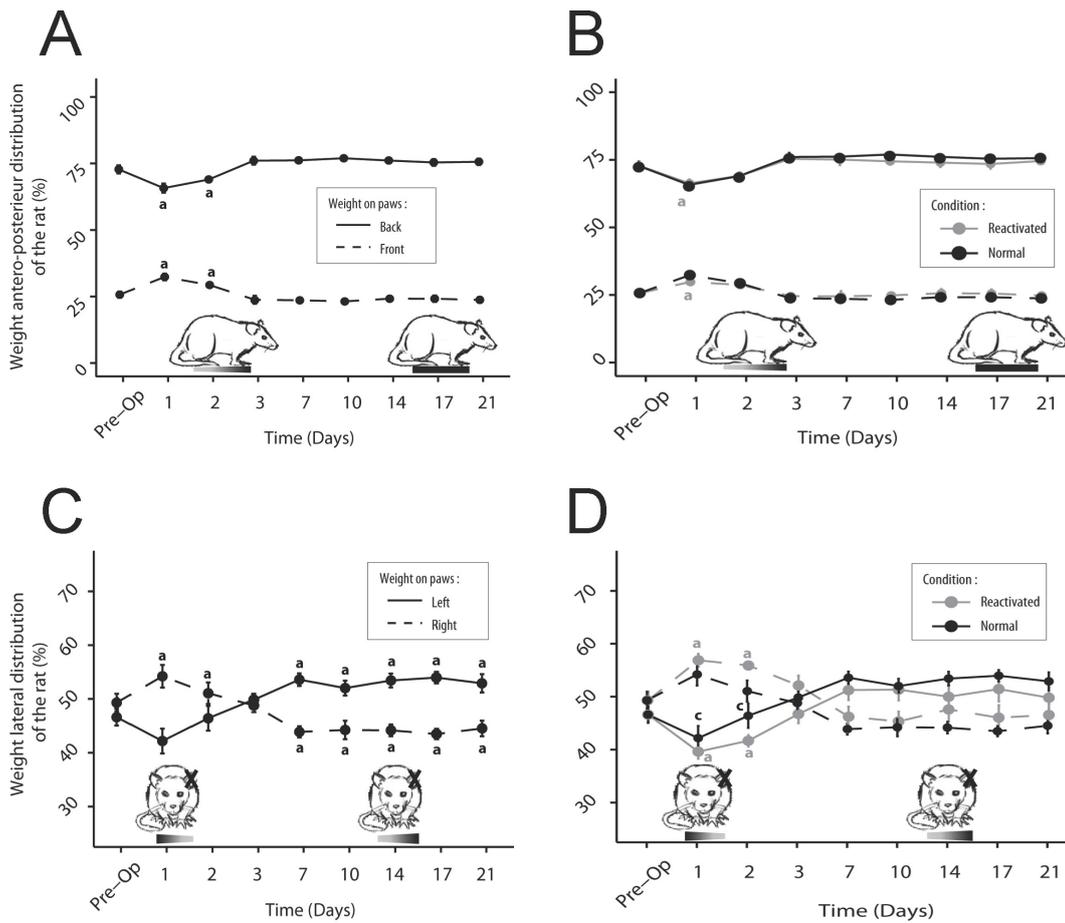


Fig 8. Representation of the weight distribution on each leg before and after UVN. A-B: Antero-posterior axis. Normal situation (A), after reactivation of the vestibular syndrome (B). The rat weight is transferred forward over the first few days, with a statistically significant increase at P1 in the weight applied to the front paws and a simultaneous decrease of the weight on the hind paws relative to pre-operative condition (a; $p < 0.05$). Reactivation of the vestibular syndrome does not significantly affect the antero-posterior weight distribution. C-D: Lateral axis. Normal situation (C), after reactivation (D). The rats apply more weight on the contralateral (right) side to the UVN the first two days, with a tendency for simultaneously reducing the weight on the opposite paw. This trend is reversed from P7 and maintained over the 3 weeks period monitored (in both cases: statistically significant difference relative to the pre-operative condition a; $p < 0.05$). Reactivation of the syndrome affects only the weight distribution until D2 (c, $p < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187472.g008>

front paws increased (on average $30.8\% \pm 0.8$, $p < 0.01$) while the weight applied to the hind paws decreased (mean: $67.4\% \pm 1.0$, $p < 0.01$). From D3, the weight distribution was identical to that observed before UVN with $23.8\% \pm 0.4$ of the weight applied on the front paws ($p > 0.05$, NS), compared with $76.1\% \pm 0.4$ on the hind paws ($p > 0.05$, NS) (Fig 8A). Reactivation of the syndrome had no effect on this antero-posterior weight distribution at any time ($p > 0.05$, NS) (Fig 8B).

Weight distribution along the lateral axis

Healthy rats distribute their weight equally between the left ($46.6\% \pm 1.7$) and the right ($49.3\% \pm 1.6$) part of their body ($p > 0.05$, NS). From D1 after UVN, a slight increase in the weight percentage applied on the right side was observed ($54.2\% \pm 2.1$, $p > 0.05$, NS). This was a loss of applied weight on the injured side ($42.2\% \pm 2.3$; $p > 0.05$, NS). The weight distribution between

the left and right paws at D1 and D2 differed significantly ($p < 0.05$). This tendency was reversed from D7. Rats mostly distributed their weight to the left until D21 ($p < 0.001$) (Fig 8C). After reactivation, the same trend as in the normal situation was observed. There was a weight tilt to the right ($56.40\% \pm 0.7$ of the weight on the right, $40.7\% \pm 0.9$ of the weight on the left, $P < 0.001$) at D1 and D2, followed by a return to equilibrium between left and right at D3 ($p > 0.05$, NS). From D7, the rat weight slightly tilted to the left ($p > 0.05$, NS). Again, for this lateral weight distribution there was no significant difference between normal and reactivation conditions (Fig 8D).

Evolution of barycenter

Measures of the weight distribution over time after UVN were used to estimate the rats barycenter evolution that provides a global representation of the overall postural strategy used at different pre and postlesional delays (Fig 9). For each recording day, we computed the mean weight repartition on the paws for each animal, and then we established the mean between all animals. For the sake of simplicity and statistical relevance, we focused the multiple comparison analysis between the preoperative day (D0), D1 and D21 for the statistical evaluation of early and late postural alterations using a Bonferroni correction. At D1 after UVN, we noticed an acute postural change during which the animals distribute more of their weight on the front paws ($p < 0.05$), and show a tendency to put more of their weights on the right paws (no statistical relevance found), which are on the contra-lateral side of the lesion. Although we did not find statistical differences between the preoperative day and D21 on any dimension, it appears that on the long run, the animals show a tendency to distribute more of their weights

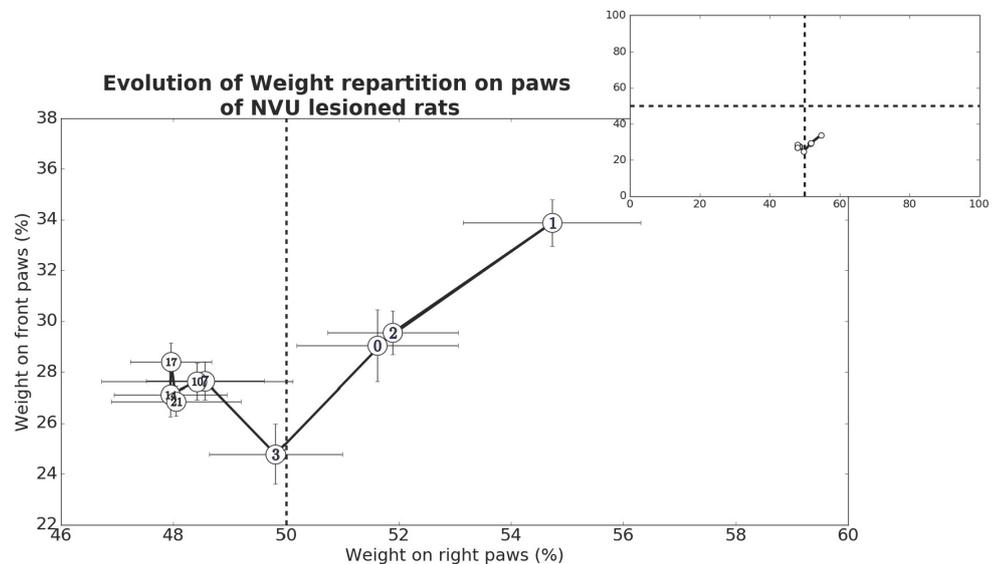


Fig 9. Representation of the barycenter evolution over time following UVN. The abscissa represents the weight percentage on the right paws (cumulated weight on front and rear right paws in percent of the cumulated weight on the four paws), while the ordinate represents the animal weight percentage on the front paws (cumulated weight on front left and front right paws in percent of the cumulated weight on the four paws). The top right panel represents the same dataset than the larger down panel, it only shows the full axis of the figure, and pictures the short range in which our barycentre-like computation varies highlighting the recording of small postural disruptions with the DWB device. At D1, the animal weight shifted on the paws contralateral to the lesion (+3.11% on the right paws of the animal) and on the front paws (+4.83%). Each barycenter-like computation (white numbered dots) are mean barycenter-like calculated from 9 animals and taken from one recording session for each animal.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187472.g009>

on the left paws which is corroborated by the closeness of all means from D7 to D21 on this dimension. Furthermore, we found statistical significant difference for the weight repartition on both dimensions when comparing D1 and D21 with $p < 0.05$ for the weight repartition on the right paws, and $p < 0.01$ for the weight repartition on the front paws. These results indicate that UVN induces both short term and long-term postural changes. Major difference between short and long-term postural modifications is the change in the strategy of weight repartition. With a first tendency to prefer the paws opposite to the lesion (right side), and then a tendency to gradually distribute it more on the paws of the lesioned side (left side). Another difference lies in the animals putting more of their weight on the front paws during short-term postural modifications, which gradually diminish away after few days. Interestingly, the closeness of the means on both dimensions from D7 to D21 is another clue toward long-term postural modifications. Indeed, the stabilization of the animal's posture might be due to a physiological compensation of the sensory deprivation that would take place between D3 and D7. Together these data suggest that compensation of stimuli deprivation occurs in two phases. These results show obvious consistency with the results described above.

Behavioural evaluation of the vestibular syndrome

Before the vestibular lesion, all rats are considered healthy, as they do not display any symptoms characterizing vestibular syndrome. As they awaken after the lesion procedure, most rats displayed maximal syndrome (15 on the qualitative scale = tumbling). This characteristic behaviour allows validating the success of the lesion. From D1, the syndrome considerably declined. The rats displayed on average a score of 6/15 on the qualitative scale, mostly corresponding to a circling behaviour. Over time, the consequences of the vestibular damage decreased, though the rats never fully recovered. On D21 all rats still display significant head tilt and some still show cephalic nystagmus. Significant differences ($p < 0.05$) in the qualitative assessment of the vestibular syndrome between normal and syndrome reactivation situations were only observed at two time points within the acute phase ([Fig 10](#)).

Discussion

Alteration of weight distribution during the vestibular syndrome on the UVN rat model

The present study is the first demonstration that different characteristics of the dynamic weight distribution are significantly modified after unilateral peripheral vestibular impairment. In particular, there is a modification of the time spent and of the weight distribution on the antero-posterior and on the lateral axes. These posturo-locomotor alterations, which significantly impact on the barycenter, match the vestibular syndrome kinetics.

Time spent and weight distribution along the antero-posterior axis

Healthy rats, in a new environment, display highly developed exploratory behaviour, characterized by half of their time spent on two paws. The characteristic righting behaviour reported as soon as the first uses of the open field in the 1930s [[13](#)] allows the rat to explore the environment beyond the confinement zone and potentially anticipate escape behaviour. This original behaviour is accompanied in the healthy rat, by an important exploratory activity. Conversely, the exploratory behaviour is significantly altered in the vestibulo lesioned rat. This is characterized by a significant increase in the time spent on four paws, counterbalanced by a reduction in the time spent on two paws during the first three post-injury days only. These changes are followed by a return to preoperative values from D7. These parameters clearly reflect a strategy

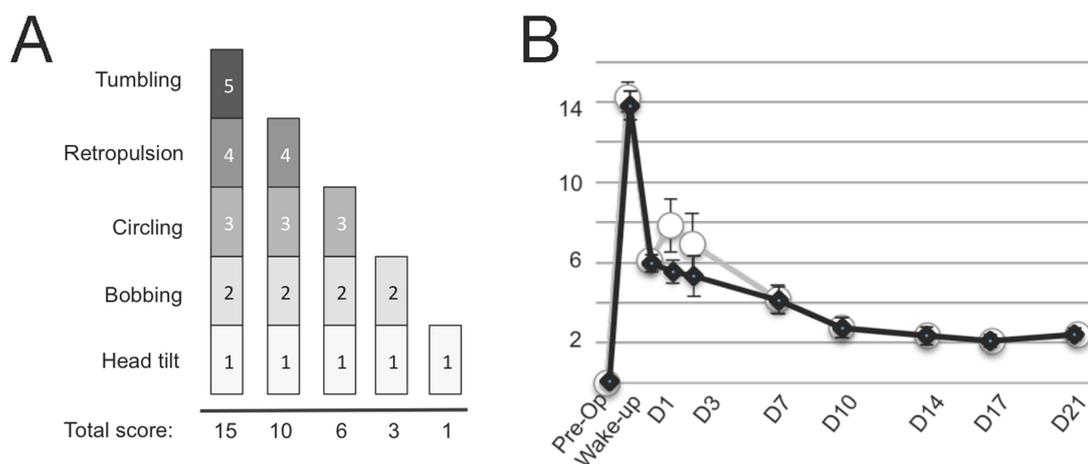


Fig 10. Qualitative assessment of the posturo-locomotor component of the vestibular syndrome. (A) Illustration of the evaluation grid used in present study. A first state in which all symptoms are expressed is rated 15. A second stage in which the tumbling has gone is rated 10. A third state in which both the tumbling and the retropulsion behaviours are absent is rated 6. Then, two states (rated 3 and 1 respectively) related to states in which both bobbing and head tilt, or head tilt alone remained. (B) Illustration of the time course of the behavioural evaluation score involving various posturo-locomotor components of the vestibular syndrome according to the procedure described in Materials and Methods. The expression kinetics of the vestibular syndrome displays different phases: an acute phase of high intensity in the hours following the vestibular lesion (awakening and 4h), an intermediate phase of drastic reduction of the syndrome during the first post-lesion week (D1-D7), and a compensated phase (1–3 weeks), leading to almost complete disappearance of the symptoms. Each data point represents mean vestibular score, with error bars representing sem. Statistically significant difference on the behavioural score is only obtained at D1 and D3. Control (black line and square) and reactivated (white dots and grey line) conditions.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187472.g010>

aimed at stabilizing the postural balance of the animal. Given that the balance is altered the acute phase of the vestibular syndrome, the animal favours a quadruped postural strategy rather than biped, opposite to what is observed under control conditions. During this phase, the vestibule-lesioned animal also displays a posture intended to increase its contact surface with the ground. The large areas covered by the belly and the tail are drastically increased. The support surface (area between the four paws) is also enlarged [8, 14]. It can be assumed that these adaptive attitudes represent strategies to ensure better postural stability of the animal. This behaviour is normalized as soon as neurobiological processes supporting vestibular compensation are implemented in the vestibular nuclei. The postural asymmetry observed in the acute phase is probably due to the imbalance of excitability between the two homologous vestibular nuclei [15]. This electrophysiological asymmetry between homologous vestibular nuclei is expected to be at the origin of the postural imbalance through inducing an asymmetry of the axial muscles tonus. Conversely, it can be assumed that restoration of the postural balance in the compensated phase results from a return to electrophysiological homeostasis between vestibular nuclei [5, 16]. Analysis of the weight distribution between the front and rear paws shows an asymmetry of weight distribution on the antero-posterior axis of the animal. The weight is distributed significantly more on the hind paws under normal conditions. During the acute phase (D1 to D2), the rats tilt their weight forward. Then, a restoration of the weight distribution identical to that observed before the UVN takes place. These observations validate a loss of equilibrium of the animal and are therefore consistent with the increase of the time spent on four paws.

Time spent and weight distribution on the lateral axis

As regards of the time spent on the front paws, it is not observed in the rat a tendency to favour one of the front paws during the acute phase (between D1 and D3). This is due to the fact that

at these times, the rats spend almost 100% of the time on four paws. They lean as much on the left front paw as on the right front paw. Conversely, as soon as the time spent on four paws decreases (from D7), a strategy favouring a support on the paw ipsilateral to the lesion (left paw) is observed. These data on the animal postural strategy are even more visible when looking at the temporal evolution of the barycenter (equilibrium point) of the animal. One can indeed observe in the rat a displacement of the barycenter on the contralateral side in the first days following the UVN. At this stage, the rat favours a support surface on the intact side probably due to the increase of the muscular tonus of the paws on the intact side and the simultaneous loss of tonicity on the injured side. This behaviour is followed by an inverse trend from post-lesional D7. This indicates that the rat favours first a postural support on the valid side, displaying normal muscle tone at the early postlesional stage as observed in man. The switch of the weight distribution towards the injured side especially visible from P7, but that already starts as soon as P3 may result from the progressive recovery of the muscular tonus on the injured side. This is in correlation with the rebalancing of the spontaneous activity within the vestibular nuclei complex [5]. The persistence of the weight asymmetry over the 3 weeks observation window may also be the consequence of a postural imbalance that is especially visible as the rats start to move again. In the cat, a mirroring effect is observed, with a weight distribution mainly taking place towards the ipsilateral side in the first days following the UVN, and reversing from the 7th post-injury day [17]. The difference with the cat behaviour could be explained by the fact that the rodent exhibits a mixed posture composed of a switch between the two or four paws positions, which conditions its ability to interact with the environment.

Reactivation of the vestibular syndrome

The procedure of vestibular syndrome reactivation aims at revealing the part of the different sensory modalities involved in the process of vestibular compensation. Under conditions of syndrome reactivation, plantar tactile information's are totally suppressed while proprioceptive and visual information are significantly diminished. The only system on which the rat can rely to detect information about its position in space is the vestibular system. The vertical lift of the injured animal causes a linear vestibular stimulation in the antigravity direction. This triggers a massive vestibular disorder, probably through restoration and accentuation of the electrophysiological asymmetry between contralateral vestibular nuclei. It can also be assumed that the vestibular disorder induced by this novel dynamic stimulation corresponds to a decompensated situation resulting from the removal of tactilo-plantar, visual and proprioceptive information. Interestingly, especially regarding the time spent on two and four paws, the vestibular compensation is expressed at its peak at D7 and is maintained over the three weeks of our evaluation. It is worthy to note that the decompensating operation does not allow restoring the full syndrome observed on D1-D2. This can be interpreted by the fact that the contribution of the tactile, proprioceptive and visual modalities in the restoration of postural equilibrium is not exclusive, but also depends on remodelling of neuronal networks intrinsically to the vestibular nuclei. During the D1-D3 post-lesional window, a whole battery of markers of neuronal plasticity (cell proliferation, nerve growth factors, factors of inflammation, etc.) is expressed in the deafferented vestibular nuclei. These neuroplasticity mechanisms contribute to remodelling the neuronal networks responsible for the rebalancing excitability between the opposite vestibular nuclei, which is considered in the literature as a key parameter of the vestibular compensation (*vestibulo centric theory*, [5]). We recently demonstrated that during this short and critical time window, major changes take place in the expression of the cation-chloride cotransporter KCC2 (which determine the hyperpolarizing action of GABA) and GABA_A receptors in the deafferented vestibular nuclei [16]. These remarkable changes

within the vestibular nuclei (VN) strongly suggest that GABA acquires a transient depolarizing action in the VN during the recovery period. This novel and original plasticity mechanism could partly explain how the system returns to electrophysiological homeostasis between the deafferented and intact VN that is essential for the restoration of postural equilibration.

Behavioural evaluation of the vestibular syndrome vs dynamic weight bearing

Up to date, quantification of the posturo-locomotor syndrome evoked in different animal models of vestibular disorder was achieved through scoring the variations over time of the different symptoms resulting from alterations of the vestibulo-spinal reflex. In present study, such an approach allowed demonstrating that in rodent as in feline, monkey and human, the syndrome is composed of an acute phase in which the syndrome is maximum, an intermediate phase in which the symptoms intensity progressively diminishes and a compensated phase characterized by the almost complete vanishing of the syndrome. Thus, it is possible to account for the fact that certain symptoms (the head inclination in particular) persist for several weeks after the lesion and tend to never fully disappear, conversely to the changes in weight distribution reported in present study. However, conversely to what was observed by following the dynamic weight distribution, the sole nonparametric “qualitative” analysis of the vestibular syndrome failed to clearly demonstrate an increase in the severity of the vestibular disorder during the syndrome reactivation procedure. Thus, this nonparametric method of evaluation of the vestibular syndrome is not able to account for the contribution of other sensory modalities (vision, tactilo-plantar and proprioceptive information) in the recovery of posturo locomotor function. Vestibular inputs tonically activate the anti-gravity leg muscles during normal posture and locomotion in rodents. Visual, tactilo-plantar and proprioceptive inputs from the paws are very sensitive sensory loops for posturo-locomotor control. The alteration of the dynamic weight distribution in rats that had undergone vestibular neurectomy might reflect a reweighting of the visual, tactile and somatosensory clues controlling balance. Modifying the dynamic weight distribution after vestibular loss may depend on a redistribution of the other sensory inputs. A new sensory selection probably leading to a newly body weight distribution altering the barycenter may be a fast adaptive response to the lesion-induced postural instability. This point is very important because it emphasizes the existence or not of sensory substitutions probably in a differential way as it was observed in humans [18]. This parameter can guide the clinician in the way to re-educate vestibular patients by soliciting one sensory modality rather than another to improve the functional recovery. This observation points out the lack of sensitivity of current evaluation paradigms and the need for more specific evaluation parameters to efficiently monitor and quantify the different aspects of the balance changes that occur during a peripheral vestibular impairment as well as during the vestibular compensation process. The present study reveals for the first time that dynamic weight bearing is a very sensitive parameter for evaluating both posturo-locomotor function impairment and recovery consecutive to UVN. Alteration of the dynamic weight distribution fits with the kinetics of the other components of the vestibular syndrome. Among the undeniable advantages of the automated quantitative analysis vs subjective analysis, is the fact that it minimizes user-dependent errors. It could thus be more adapted to the study of drug effects or the benefits of functional rehabilitation approaches. Together, these observations reveal that variation in dynamic weight distribution is a very sensitive parameter for vestibular lesions and therefore must be considered as a real component of the syndrome. Weight distribution assessment also provides information on the barycentre variations, which is by definition the equilibrium point of the animal. Therefore it brings a more global vision of the animal equilibrium. Combination of qualitative nonparametric and

quantitative parametric methods for the evaluation of the vestibular syndrome thus constitutes a real gain enabling us to identify various aspects of the vestibular syndrome.

Clinical relevance

To our knowledge there is no study comparing the data collected in static or dynamic posturography on the force platform with those collected with devices allowing dynamic analysis during walking. Current explorations of the dizzy or unstable patient allow gathering information to diagnose dysfunction of the vestibulo-ocular pathway (via caloric tests, vestibular head impulse test -VHIT-, kinetic tests on rotating chair), the vestibulo-spinal pathway (with posturography) or to detect any vestibular dysfunction (cortical Vestibular Evoked Myogenic Potential -cVEMP- and ocular VEMP, Echodia¹ for Meniere and imaging). These various tests also allow monitoring the possible recovery of the vestibule function as well as implementation of the compensation and substitution processes. It is worthy to mention that the VHIT allows topographic localization and quantification of the vestibular defect (on semi-circular canals) and to reveal a possible recovery of the function after deficit. It also allows observing and quantifying the implementation of early saccadic strategy that takes the place of the Vestibulo Ocular Reflex. It has not been demonstrated so far, for example, that observation of any abnormality on the VHIT may be a predictor of fall. One can cite in particular the so-called presby-vestibuly (aging of the vestibular function) which can be revealed on the VHIT. Similarly, for unilateral deficits, VHIT does not provide data that can be correlated to any static or dynamic posturographic data. Conversely, posturography allows monitoring the evolution of the vestibulo-spinal performances in patients, but only in static posture as regards the conventional force platforms. Though present data obtained from quadrupedal cannot be fully transferred to humans as postural strategies in man are obviously differs from rodents, one can imagine that the study of the dynamic weight distribution in the dizzy or unstable patient could allow a more documented diagnostic and follow-up, based on paradigms more ecological than those used in existing explorations. It is also to be hoped that strong predictive indicators of the risk of fall could be easily identified through these dynamic measurements, which would also allow widening the indications to the examination of the elderly.

Conclusion

This is the first report of a survey of a vestibular deficit and its compensation through assessment of the dynamic weight distribution. From an evaluation of the vestibular disorder essentially qualitative, based on subjective measures, we bring by this work a new method of quantitative analysis, based on objective measurements. The work carried out during this study allowed validating the interest and sensitivity of this paradigm for the evaluation of the vestibular disorder and its compensation following a peripheral insult. As the parametric approach provides a better sensitivity for evaluation, we can already anticipate that it would become an essential evaluation tool to diagnose the vestibular syndrome, follow its expression kinetic and test in this time window the effectiveness of antivertigo drugs. In addition, information on the postural strategies adopted after vestibular lesions can guide re-educational approaches to optimize functional restoration. The richness of the data collected thanks to the device for measuring alterations in the dynamic weight distribution (time spent on each paw, weight distribution, barycenter) is likely to further improve the analysis of clinical signs of the vestibular syndrome and optimize their management. Moreover, the use of the dynamic weight-bearing device used in this study could allow identifying new markers of the different types and stages of vestibular lesions and thus allow the identification of novel tools for diagnosis and follow-up of vestibular pathologies.

Supporting information

S1 File. Supporting information is provided at S1_File.xls.

(XLS)

Author Contributions

Conceptualization: Brahim Tighilet, Christian Chabbert.

Data curation: Brahim Tighilet, David Péricat, Alais Frelat, Yves Cazals, Guillaume Rastoldo.

Formal analysis: Brahim Tighilet, David Péricat, Alais Frelat, Yves Cazals, Guillaume Rastoldo, Florent Boyer, Christian Chabbert.

Funding acquisition: Brahim Tighilet, Christian Chabbert.

Investigation: Brahim Tighilet, David Péricat, Alais Frelat, Yves Cazals, Guillaume Rastoldo, Florent Boyer, Christian Chabbert.

Methodology: Brahim Tighilet, David Péricat, Alais Frelat, Yves Cazals, Florent Boyer, Christian Chabbert.

Project administration: Brahim Tighilet, Christian Chabbert.

Resources: Christian Chabbert.

Supervision: Brahim Tighilet, Christian Chabbert. **Validation:** Brahim Tighilet, Yves Cazals, Christian Chabbert. **Visualization:** Brahim Tighilet, Christian Chabbert.

Writing – original draft: Brahim Tighilet, Yves Cazals, Olivier Dumas, Christian Chabbert.

Writing – review & editing: Brahim Tighilet, Christian Chabbert.

References

1. Asher DL. Vestibular anatomy and physiology. In: Northern JL, editor. *Hearing Disorders*. Boston, MA: Little, Brown and Company. 1984; 195–204.
2. Luxon LM. The anatomy and physiology of the vestibular system. In: Dix MR, Hood JD, editors. *Vertigo*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 1984; 1–33.
3. Jones SM, Jones TA, Mills KN, Gaines GC. Anatomical and physiological considerations in vestibular dysfunction and compensation. *Semin Hear*. 2009; 30(4): 231–241. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1241124> PMID: [21072129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21072129/)
4. Angelaki DE, Cullen KE. Vestibular system: the many facets of a multimodal sense. *Annu Rev Neurosci*. 2008; 31: 125–150. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125555> PMID: [18338968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18338968/)
5. Lacour M, Tighilet B. Plastic events in the vestibular nuclei during vestibular compensation: the brain orchestration of a deafferentation code. *Rest Neurol Neurosci*. 2010; 27: 1–17.
6. Péricat D, Farina A, Agavnian-Couquiaud E, Chabbert C, Tighilet B. Complete and irreversible unilateral vestibular loss: A novel rat model of vestibular pathology. *J Neurosci Methods*. 2017; May 1; 283: 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.04.001> PMID: [28390798](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28390798/)
7. Boadas-Vaello P, Riera J, Llorens J. Behavioral and pathological effects in the rat define two groups of neurotoxic nitriles. *Toxicol Sci*. 200; 88:456–466. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi314> PMID: [16150883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16150883/)
8. Tighilet B, Leonard J, Bernard-Demanze L, Lacour M. Comparative analysis of pharmacological treatments with N-acetyl-DL-leucine (Tanganil) and its two isomers (N-acetyl-L-leucine and N-acetyl-D-leucine) on vestibular compensation: Behavioral investigation in the cat. *Eur J Pharmacol*. 2015; pii: S0014-2999 (15)30375–7.
9. Desmadryl G, Gaboyard-Niay S, Brugeaud A, Travo C, Saleur A, Dyhrfeld-Johnsen J, et al. Histamine H4 receptor antagonists as potent modulator of mammal vestibular function. *British J Pharmacol*. 2012; 167: 905–916.

10. Dyhrfeld-Johnsen J, Gaboyard-Niay S, Broussy A, Saleur A, Brugeaud A, Chabbert C. Ondansetron reduces lasting vestibular deficits in a model of severe peripheral excitotoxic injury. *J Vest Res*. 2013; Jan 1; 23(3): 177–86.
11. Gaboyard-Niay S, Travo C, Saleur A, Broussy A, Brugeaud A, Chabbert C. Correlation between afferent rearrangements and behavioral deficits after local excitotoxic insult in the mammalian vestibule: an animal model of vertigo symptoms? *Disease Models & Mechanisms*. 2016; 9: 1181–1192.
12. Günther L, Beck R, Xiong G, Potschka H, Jahn K, Bartenstein P, et al. N-Acetyl-L-Leucine Accelerates Vestibular Compensation after Unilateral Labyrinthectomy by Action in the Cerebellum and Thalamus. *PloS One*. 2015; 10(3): e0120891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120891> PMID: [25803613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25803613/)
13. Hall CS, Ballachey EL. "A study of the rat's behaviour in a field: a contribution to method in comparative psychology" University of California Publications in Psychology. 1932; 6: 1–12.
14. Liberge M, Manrique C, Bernard-Demanze L, Lacour M. Changes in TNF α , NF κ B and MnSOD protein in the vestibular nuclei after unilateral vestibular deafferentation. *J Neuroinflamm*. 2010; 7: 91.
15. Xerri C, Gianni S, Manzoni D, Pompeiano O. Compensation of central vestibular deficits. I. Response characteristics of lateral vestibular neurons to roll tilt after ipsilateral labyrinth deafferentation, *J Neurophysiol*. 1983; 50: 428–448. PMID: [6604136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6604136/)
16. Dutheil S, Watabe I, Sadlaoud K, Tonetto A, Tighilet B. BDNF signaling promotes vestibular compensation by increasing neurogenesis and remodeling the expression of potassium-chloride cotransporter KCC2 and GABA α receptor in the vestibular nuclei. *J Neurosci*. 2016; 36(23): 6199–6212. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0945-16.2016> PMID: [27277799](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27277799/)
17. Xerri C, Lacour M. Compensation deficits in posture and kinetics following unilateral vestibular neurectomy in cats. The role of sensorimotor activity. *Acta Otolaryngol*. 1980; 90(5–6): 414–24. PMID: [7211335](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7211335/)
18. Lacour M, Barthelemy J, Borel L, Magnan J, Xerri C, Chays A, et al. Sensory strategies in human postural control before and after unilateral vestibular neurectomy. *Exp Brain Res*. 1997; 115(2): 300–10. PMID: [9224857](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9224857/)

Mise au point d'un nouveau modèle animal de pathologie vestibulaire

Péricat David

Soutenu le 14 décembre 2018

Les pathologies vestibulaires, dont le vertige est le premier symptôme ressenti par le patient, impactent considérablement les activités les plus élémentaires de la vie quotidienne. Le traumatisme psychologique lié à la crise aiguë associée à l'incapacité physique qui accompagne les désordres vestibulaires peuvent avoir des conséquences socioprofessionnelles importantes, accompagnées de troubles cognitifs pouvant conduire à un isolement social. Aujourd'hui, peu de solutions thérapeutiques existent et reposent essentiellement sur deux médicaments : le Tanganil® et la bétahistine.

Afin d'étudier les mécanismes neurobiologiques à la base de l'expression du syndrome vestibulaire et de sa compensation, et de tester de nouvelles solutions thérapeutiques via des approches pharmacologiques ou ré-éducatives, différents modèles animaux ont été développés depuis plusieurs décennies dont le modèle de neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) chez le chat, particulièrement bien adapté car cette approche est précise, contrôlable et reproductible.

Pour des considérations éthiques et financières, il devient de plus en plus difficile d'utiliser le modèle animal Chat pour ces études. Il est donc incontournable de transférer le modèle NVU chez le rongeur et cela constitue le premier objectif de cette étude. De plus, le manque de sensibilité des méthodes d'évaluation du syndrome vestibulaire est une des principales difficultés rencontrées dans le développement de nouveaux médicaments anti vertigineux. A l'heure actuelle, la méthode d'évaluation subjective à l'aide d'échelles comportementales est la plus répandue et manque de sensibilité pour obtenir des effets dose-réponse. Il est donc nécessaire de concevoir de nouveaux paradigmes d'évaluation permettant une quantification objective et sensible du syndrome vertigineux. Le second objectif de notre étude consiste donc à valider un dispositif d'analyse de distribution pondérale comme outil de diagnostic du syndrome vestibulaire.

Enfin, ce dispositif a également été utilisé pour évaluer l'efficacité de médicaments antivertigineux prescrits en clinique : la bétahistine et l'acétyl-DL-Leucine.

A la suite de ces études, il ressort que, malgré quelques améliorations à apporter sur l'appareillage, ce modèle expérimental est particulièrement adapté pour étudier la cinétique de restauration de la fonction vestibulaire. Il est également approprié pour évaluer l'efficacité des médicaments ayant des propriétés antivertigineuses. Le travail réalisé au cours de cette étude a permis de valider l'intérêt et la sensibilité du paramètre posturo-locomoteur chez le rat pour l'évaluation du trouble vestibulaire et sa compensation suite à une lésion périphérique définitive, et pourrait ainsi permettre l'identification de nouveaux outils de diagnostic et de suivi des pathologies vestibulaires chez le patient.