



(43) Date de la publication internationale
4 février 2016 (04.02.2016)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2016/016518 A2

- (51) Classification internationale des brevets :
A61K 31/575 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2015/000164
- (22) Date de dépôt international :
28 juillet 2015 (28.07.2015)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
14 01755 30 juillet 2014 (30.07.2014) FR
- (71) Déposant : AFFICHEM [FR/FR]; 9, rue Saint Joseph, F-31400 Toulouse (FR).
- (72) Inventeurs : DE MEDINA, Philippe; 1, rue de Provence, F-31770 Colomiers (FR). PAILLASSE, Michaël; 3 avenue Pablo Picasso, F-31100 Toulouse (FR). ULFEN-DAHL, Mats; Radmansgatan 19, 11425 Stockholm (SE).
- (74) Mandataire : CABINET HAMMOND; 33 rue Vaneau, F-75007 Paris (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))

(54) Title : USE OF STEROL DERIVATIVES FOR TREATING NEUROSENSORY HEARING LOSS, AND CORRESPONDING COMPOSITION

(54) Titre : UTILISATION DE DÉRIVÉS DE STÉROLS POUR LE TRAITEMENT DE LA PERTE AUDITIVE NEUROSENSO-RIELLE ET COMPOSITION CORRESPONDANTE.

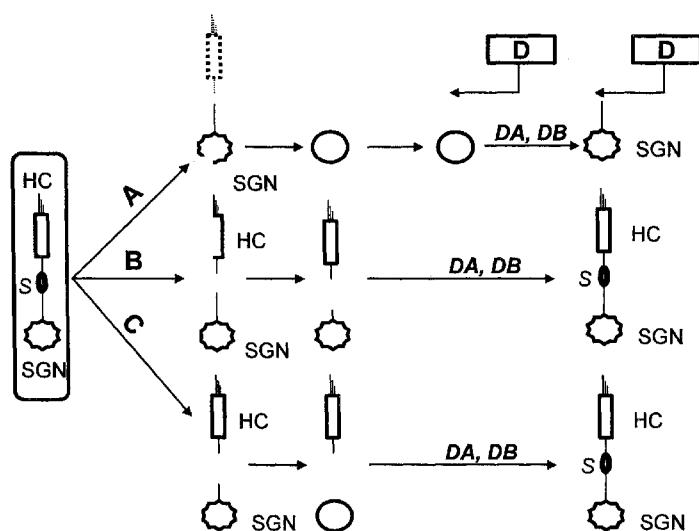


Figure 1

(57) Abstract : The invention relates to a composition for preventing hearing loss in a subject or for at least partially restoring hearing in a subject having a reduced auditory function. The composition comprises at least one sterol compound inducing neuron differentiation. Said composition is placed in contact with at least part of the cochlea.

(57) Abrégé : L' invention concerne une composition pour prévenir une perte d'audition chez un sujet ou pour restaurer au moins partiellement l'audition d'un sujet ayant une fonction auditive réduite. La composition comporte au moins un composé stérol induisant une différenciation neuronale; on met en contact cette composition avec au moins une partie de la cochlée.

Utilisation de dérivés de stérols pour le traitement de la perte auditive neurosensorielle et composition correspondante.

5 La présente invention concerne la prise en charge de la perte auditive. Plus précisément, la présente invention concerne l'utilisation d'une molécule de formule I ou un sel pharmaceutiquement acceptable d'un tel composé ; la composition selon l'invention est
10 administrée à un sujet pour éviter sa perte auditive ou restaurer son audition.

 La perte auditive est une affection commune, qui touche plus de 360 millions de personnes dans le monde pour l'Organisation Mondiale de la Santé (2012). La perte
15 auditive prise en compte par l'Organisation Mondiale de la Santé, est une perte supérieure à 25 dB. Cette pathologie a d'importantes conséquences néfastes, aussi bien économiques qu'émotionnelles pour les personnes atteintes et pour la société (de Graaf et al., Psychosom
20 Med 64, 61-70), (Fellinger et al., Acta Psychiatr Scand 115,243-5), (Fellinger et al., Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol 40, 737-42), (Mohr et al., Policy Anal Brief H Ser 2, 1-4). De nombreux facteurs, tels que l'âge (50% des humains de plus de 65 ans, 80% des plus de 75 ans
25 sont touchés), les traumatismes sonores, physiques ou émotionnels ou encore des facteurs génétiques peuvent être à l'origine de la dysfonction ou la perte des cellules ciliées puis la dégénérescence du nerf auditif menant à la perte auditive.

30 On sait que, dans un organe auditif non lésé, le son est transmis à des cellules spécialisées du cerveau par la vibration du tympan, qui transmet l'information mécaniquement à l'oreille interne. Dans l'oreille interne, on trouve des cellules ciliées (ci-après dites
35 HC), qui transforment lesdits signaux mécaniques en

signaux électriques, lesquels génèrent une information électrique transmise au cerveau par les neurones d'un ganglion spiral (ci-après dits SGN). Les cellules ciliées sont portées par un organe en colimaçon appelé la

5 « cochlée » ; la cochlée comporte deux chambres spiralées disposées côte à côte et remplies de liquides, périlymphe pour l'une et endolymphe pour l'autre ; entre ces deux chambres sont logées les cellules ciliées.

Une perte auditive neurosensorielle moyenne ou

10 sévère peut être due à au moins trois types de dysfonctionnements. D'une part, la dysfonction ou la perte partielle des cellules sensorielles HC, d'autre part, la dégénérescence des axones des neurones du ganglion spiral (dites ci-après en abrégé SGN), qui

15 transmettent au cerveau le signal des cellules HC (neuropathie auditive) et enfin, la déstructuration des connexions synaptiques entre les cellules HC et les neurones SGN (synaptopathie auditive). Ces différents mécanismes menant à la perte auditive, sont schématisés

20 sur la figure 1, qui sera détaillée plus loin dans la présente description.

En cas de perte des cellules ciliées, le signal peut être transduit par un implant cochléaire, dont les électrodes remplacent les cellules HC ; chez l'homme,

25 dans un tel cas, les SGN dégénèrent, perdant notamment leurs axones pointant vers les cellules HC, mais ils ne meurent pas. La clé du maintien ou de la récupération de l'audition, réside donc dans la repousse axonale, qui permet de reconstituer les connexions entre les SGN et

30 les transducteurs récepteurs du signal sonore, qu'il s'agisse de cellules HC ou d'un implant cochléaire.

Pour la surdité liée à la perte des cellules HC, les implants cochléaires seuls améliorent l'audition, mais leur efficacité est directement impactée par l'intégrité

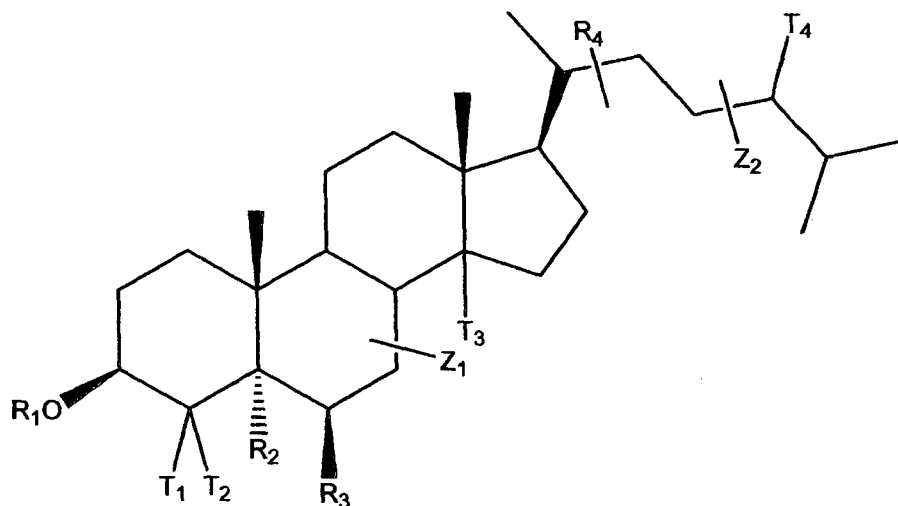
des SGN, dont ils n'empêchent pas la dégénérescence ; ainsi la recroissance axonale permettant de diminuer la distance entre les terminaisons nerveuses et les électrodes, constitue une approche d'intérêt pour
5 améliorer l'efficacité des implants cochléaires (Shibata et al., Hear Res 281, 56-64). Pour toute autre forme, il n'y a pas, à ce jour, de solution palliative ni curative satisfaisante. Les facteurs neurotrophiques, seules molécules ayant montré un effet bénéfique sur la survie
10 neuronale et la recroissance axonale, ne peuvent pas être utilisés pour cause d'effets secondaires tels que la perte de poids (Winkler et al., Ann Neurol 41, 82-93), une migration cellulaire incontrôlée (Williams, Exp Neurol 113, 31-7) et le risque de cancer lié à la
15 prolifération anormale des cellules de Schwann (Eriksdotter Jonhagen et al., Dement Geriatr Cogn Disord 9, 246-57). Malgré des recherches intensives, il n'y a pas, à ce jour, de solution satisfaite pour résoudre les problèmes susmentionnés et une nouvelle approche est donc
20 nécessaire.

On a déjà décrit des nouveaux dérivés de stérols, composés qui induisent la différenciation neuronale de cellules tumorales embryonnaires pluripotentes, la survie de motoneurones en culture et la prolifération et la
25 différenciation de progéniteurs neuronaux adultes (de Medina et al. 2009, J Med Chem 52, 7765-77) et 2003-----
-----)(Khalifa et al., Biochem Biophys Res Commun 446, 681-6). L'homme du métier ne peut évidemment pas en déduire que ces composés ont un intérêt pour des
30 pathologies, qui, comme indiqué ci-dessus, sont liés à un problème de connexion neuronale et non à un problème de nombre de neurones dans la zone traitée. Ainsi, l'homme du métier ne chercherait surement pas à utiliser les dérivés de stérols en cause pour reformer les connexions

entre d'une part, les neurones SGN et d'autre part, un émetteur de signal constitué par des cellules ciliées au moins partiellement fonctionnelles ou des électrodes d'implants cochléaires.

5 Or, on a constaté maintenant, selon l'invention, que si l'on utilise ces composés sur un animal de laboratoire rendu sourd par un stress, on obtient un maintien de la transmission de l'information sonore traduite sous forme d'impulsion électrique (par les électrodes d'un implant
10 cochléaire remplaçant les cellules ciliées), l'information étant transmise au travers des SGN vers le cerveau, et ce, sans augmenter le nombre de SGN dudit animal.

La présente invention a, en conséquence, pour objet
15 une composition pharmaceutique pour prévenir une perte d'audition chez un sujet ou pour obtenir une restauration thérapeutique au moins partielle de l'audition d'un sujet traité ayant, avant traitement, une fonction auditive réduite, par mise en contact de ladite composition avec
20 au moins une partie de la cochlée de l'oreille ayant une fonction auditive réduite, ladite composition étant caractérisée en ce qu'elle contient, dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable, une dose significativement active d'au moins un composé de formule (I) :



formule dans laquelle :

$R_1 = H$ ou $R-CO$, avec $R = H, CH_3$ ou C_2H_5 ;

$R_2 = H$ ou OH ;

$R_3 = -NR_5R_6$, R_5 étant H ou $(CH_2)_3NH_2$ et R_6 étant pris dans le

5 groupe formé par $-(CH_2)_4NH_2$; $-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$;

$-(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$;

$-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$; $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_2-$

imidazol-4-yl et $-(CH_2)_2$ -indol-3-yl ;

$R_4 = H$ ou OH en position 20, 22, 24, 25, 26 ou 27, positionné

10 de façon à obtenir un centre asymétrique de configuration R ou S ;

Z_1 et Z_2 sont les nombres de double liaison (soit 0 soit 1) entre les atomes $C7$ et $C8$ ou $C22$ et $C23$ respectivement ;

15 T_1, T_2 et $T_3 = H$ ou CH_3 , indépendamment les uns des autres ;

$T_4 = H, CH_3$, ou C_2H_5 , positionné de façon à obtenir un centre asymétrique de configuration R ou S en position 24 et/ou d'au moins un sel pharmaceutiquement acceptable d'au moins un composé de formule (I).

20 Parmi les compositions ci-dessus définies, on a constaté que les résultats obtenus étaient particulièrement intéressants pour les composés des sous-groupes dans lesquels :

a) le (ou les) composé(s) de formule (I), qu'elle
25 contient, est (sont) défini(s) par $Z_1 = 0$; $R_1 = H$; $R_2 = OH$;
 $R_3 = -NHR_6$ où R_6 est $-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$ ou $-(CH_2)_2$ -imidazol-4-yl ; $T_1 = T_2 = T_3 = H$;

b) le (ou les) composé(s) de formule (I), qu'elle
contient, est (sont) défini(s) par $Z_1 = 0$ ou 1, $R_1 = H$;
30 $R_2 = OH$; $R_3 = -NHR_6$ où R_6 est $-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$ ou
 $-(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$; $T_1 = T_2 = T_3 = H$; $R_4 = H$ ou OH en
position 22 ou 27 ;

c) le composé de formule (I), qu'elle contient, est défini par $Z_1=0$; $R_1=\text{acétyl}$; $R_2=\text{OH}$; $R_4=\text{H}$; $R_3=\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-imidazol-4-yl}$ et $T_1=T_2=T_3=\text{H}$.

Selon un premier aspect de l'invention, la
5 restauration provoquée par la composition selon l'invention est une amélioration de l'efficacité d'un implant cochléaire préalablement mis en place chez le sujet traité.

Selon un autre aspect de l'invention, la
10 restauration obtenue avec la composition selon l'invention, améliore la fonctionnalité des neurones du ganglion spiral chez le sujet traité, avant que l'on ne pratique, sur ledit sujet, au moins une thérapie destinée à stimuler lesdits neurones ou les cellules ciliées
15 internes et externes.

Selon un autre aspect de l'invention, la restauration provoquée par la composition selon l'invention bénéficie à un sujet, qui requiert la mise en place d'un implant cochléaire en raison d'une perte
20 auditive due à un traumatisme ou à une maladie, ladite restauration maintenant la fonctionnalité des neurones du ganglion spiral avant l'implantation dudit implant cochléaire.

Selon un autre aspect de l'invention, la composition
25 selon l'invention est utilisée pour rendre un sujet plus apte à bénéficier ultérieurement d'une thérapie visant à restaurer tout ou partie de l'oreille interne, ladite thérapie étant choisie dans le groupe formé par la transplantation de cellules souches, la régénération de
30 cellules ciliées par transdifférenciation de cellules supportrices, par la transfection génique ou par le blocage génique dans toute partie de l'oreille interne.

Selon un autre aspect de l'invention, la composition selon l'invention est administrée par voie orale,

intraveineuse, intratympanique, intracochléaire, sur la fenêtre ronde ou ovale de la cochlée intracrâniale, nasale ou sur le tympan.

Selon un autre aspect de l'invention, la composition
5 selon l'invention est mise en place dans l'oreille interne par une électrode imprégnée de ou badigeonnée par ladite composition, ou par une électrode comportant une canule chargée avec ladite composition ou aussi par une électrode composée partiellement d'un ou plusieurs
10 composés de formule (I).

Selon un autre aspect de l'invention, la restauration obtenue par la composition selon l'invention bénéficie à un sujet dont le traumatisme a été généré par un niveau ototoxique de bruit, des agents ototoxiques
15 tels que des radiations, des antibiotiques, des anti-inflammatoires, des agents de chimiothérapie, des métaux lourds ou l'âge du sujet.

Selon un autre aspect de l'invention, la composition selon l'invention permet une restauration qui bénéficie à
20 un sujet dont la perte auditive a été générée par une maladie prise dans le groupe formé par une otite, le syndrome de Pendred, de Niemann-Pick, de Smith-Lemli-Optiz, de Stickler, d'Alport, de Charge, de Jervell et Lange-Nielsen, de Norrie, d'Usher, de Waardenburg et de
25 Perrault, une neurofibromatose de type 2 ou un syndrome bronchiootoréal.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une composition telle que ci-dessus définie pour maintenir et/ou améliorer la qualité des
30 connexions entre les SGN, d'une part, et les cellules ciliées ou les électrodes d'un implant cochléaire, d'autre part.

La mise en œuvre de l'invention est illustrée par trois exemples auxquels correspond un dessin comportant cinq figures.

La figure 1 est un schéma relatif aux différentes affections de l'oreille interne conduisant aux pertes auditives neurosensorielles auxquelles peut remédier la présente invention, et aux effets cellulaires y relatifs.

Cette figure comporte trois cadres : le cadre de gauche présente la liaison synaptique S d'une cellule HC avec un SGN dans le cas d'un sujet sans affection de l'oreille interne. Le cadre du milieu présente l'état des liaisons SGN/HC dans trois cas de dysfonctionnement A, B, C : dans le dysfonctionnement A, le neurone SGN ne reçoit plus d'information de sa synapse S en raison du non fonctionnement de la cellule HC (mise en pointillés) antérieurement reliée à S ; dans le dysfonctionnement B, le SGN ne reçoit plus d'information de sa synapse car cette dernière n'assure plus son rôle de liaison (colonne de gauche) et le SGN dégénère (colonne de droite) ; dans le dysfonctionnement C, le SGN n'a plus de synapse réceptrice opérationnelle (colonne de gauche) et l'émission en provenance de la cellule HC ne peut donc alimenter le SGN qui, dès lors, dégénère (colonne de droite). Le cadre de droite présente le résultat quand on fait agir les produits DA ou DB sur les éléments concernés par les dysfonctionnements A (perte de HC), B (synaptopathie) et C (neuropathies) et les représentations de la colonne de droite montrent les états après traitement et récupération partielle de l'audition (le rectangle D schématise une stimulation électrique du SGN).

La figure 2 est un graphe montrant la courbe d'évolution dans le temps de la réponse auditive électriquement évoquée du tronc cérébral (eABR) lorsque

le traitement avec la composition selon l'invention démarre deux jours après le début de l'induction de l'ototoxicité par la néomycine.

La figure 3 est un graphe montrant la courbe d'évolution dans le temps de la réponse auditive électriquement évoquée du tronc cérébral (eABR) lorsque le traitement avec la composition démarre seize jours après le début de l'induction de l'ototoxicité par la néomycine.

La figure 4 est un diagramme à barres montrant le nombre de neurones du ganglion spiral dans les expériences relatives aux figures 1 et 2 comparativement à ce que l'on obtient avec une oreille n'ayant pas été exposée à la néomycine (première barre à gauche sur la figure 4).

La figure 5 est une série de trois photographies de lamelles de la cochlée prise au niveau du milieu du modiolus illustrant la quantification du nombre de neurones du ganglion spiral rapporté à la figure 4 ainsi que la recroissance axonale occasionnée par les traitements. Sur chaque photographie, on a indiqué la nature du produit utilisé pour le traitement (AP, DB et GDNF).

Sur les figures, les abréviations suivantes ont été utilisées :

AP: périlymphe artificielle (acétate de Ringer)

DA: 6β -[2-(1H-imidazol-4-yl)-éthylamino]-cholestane-
3 β ,5 α -diol

DB: 6β -[3-(4-aminobutylamino)propylamino]-cholestane-
3 β ,5 α -diol

eABR : réponse auditive électriquement évoquée du tronc
cérébral

Neo: Néomycine

GDNF : facteur neurotrophique issu de la glie

SGC : cellule du ganglion spiral

Le tableau 1 résume l'impact des molécules utilisées dans les exemples 1 à 3 sur la densité des SGN et la réponse auditive électriquement évoquée du tronc cérébral (eABR).

Ci-après, les termes "connexion" et « connexion synaptique » font référence à une interaction fonctionnelle entre les neurones du ganglion spiral et les cellules ciliées ou les électrodes d'un implant cochléaire permettant une stimulation appropriée desdits neurones du ganglion spiral.

Le terme « stress » fait référence à une cause de perte de connexion synaptique fonctionnelle et/ou à la perte des projections des neurones du ganglion spiral.

Les études des exemples 1 à 3 ont été réalisées sur des cochons d'Inde (250-500g). Tous les animaux sont équipés d'une électrode platine-iridium insérée dans la cochlée afin de mimer un implant cochléaire. Les expériences ont été menées selon le protocole décrit par Raphael et ses collaborateurs (Shinohara et al., 2002, Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 99, 1657-60).

Exemple 1 : Effet du traitement précoce avec un dérivé de formule (I) sur l'excitabilité des neurones de ganglion spiral SGN

Les animaux sont anesthésiés (10 mg/kg de xylazine et 40 mg/kg de kétamine en intramusculaire) et l'oreille interne est ouverte par voie post-auriculaire. Une canule pré-remplie contenant 24 µl de sulfate de néomycine 10% a été connectée à une mini-pompe osmotique (ALZET 2002, DURECT Corp., CA, USA) ayant un débit de 0.5 µl/heure. La canule pénètre dans la cochlée à proximité de la fenêtre ronde afin d'atteindre la *scala tympani*. Après 48 heures, la canule a été remplie soit avec une solution de 6β-[2-(1*H*-imidazol-4-yl)-éthylamino]-cholestane-3β,5α-diol

(1 μ M), soit avec une solution de 6 β -[3-(4-aminobutylamino)propylamino]-cholestane-3 β ,5 α -diol (1 μ M), soit avec GDNF (1 μ g/ml), soit avec de la périlymphe artificielle qui sert de contrôle. Après deux semaines, la pompe est retirée et remplacée par une nouvelle pompe identique pré-remplie de façon similaire. Après deux nouvelles semaines, la pompe est retirée et la canule scellée pour deux semaines supplémentaires. Cette technique est décrite en détail à la page 1658 de la publication Shinohara ci-dessus identifiée.

Les mesures des seuils de réponse auditive électriquement évoquée du tronc cérébral (eABR) sont réalisées à l'aide d'une électrode iridium-platine (Pt-Ir 90%-10%, 250 μ m de diamètre) insérée de 1,5mm dans la cochlée (scala tympani) via la fenêtre ronde au moment de la mise en place de la pompe, une électrode de retour (Pt-Ir, 125 μ m de diamètre), étant placée contre l'os occipital, sous les muscles de la nuque. La mesure des seuils d'eABR tout au long de l'expérience n'a pas montré de différence significative entre les groupes jusqu'à la deuxième semaine. A partir de là, il y a une diminution significative des seuils d'eABR entre les groupes traités et le groupe contrôle ($p < 0,05$ à deux semaines et $p < 0,001$ au-delà de la quatrième semaine), comme montré sur la figure 2. A partir de la sixième semaine, aucune eABR ne peut être obtenue chez les animaux du groupe contrôle. Il n'y a pas de stimulation possible d'eABR sur des animaux placés dans les mêmes conditions que ci-dessus défini, mais non traités par les produits DA ou DB.

Exemple 2 : Effet d'un traitement retardé réalisé avec les dérivés DA ou DB utilisés dans l'exemple 1 sur l'excitabilité des neurones de ganglion spiral

La procédure utilisée est la même que dans l'exemple 1, à cette différence près que, suite à l'infusion de

sulfate de néomycine, les pompes sont remplies de périlymphe artificielle pendant deux semaines. Lors du remplacement, les pompes sont remplacées par des pompes identiques contenant soit une solution de 6β -[2-(1H-imidazol-4-yl)-éthylamino]-cholestane- 3β , 5α -diol (1 μ M),
5 soit une solution de 6β -[3-(4-aminobutylamino)propylamino]-cholestane- 3β , 5α -diol (1 μ M), soit du GDNF (1 μ g/ml), soit de la périlymphe artificielle, qui sert de contrôle. Ces pompes sont remplacées après deux semaines
10 par des pompes identiques pré-remplies avec les mêmes solutions pour deux semaines supplémentaires.

La mesure des seuils de réponse auditive électriquement évoquée du tronc cérébral (eABR) tout au long de l'expérience a montré des différences
15 significatives entre les groupes traités et le groupe contrôle jusqu'à la quatrième semaine. A partir de la cinquième semaine, il n'y a plus de différence significative entre le groupe traité avec 6β -[2-(1H-imidazol-4-yl)-éthylamino]-cholestane- 3β , 5α -diol et le
20 groupe contrôle, alors qu'il y a une différence significative entre le groupe traité avec le 6β -[3-(4-aminobutylamino)propylamino]-cholestane- 3β , 5α -diol et le groupe contrôle ($p < 0,001$) comme montré sur la figure 3. Il n'y a pas de stimulation possible d'eABR sur des
25 animaux placés dans les mêmes conditions que ci-dessus défini, mais non traités par les produits DA ou DB.

Exemple 3 : Quantification de la densité des SGN dans le canal de Rosenthal

Après la mesure finale du seuil d'eABR, les animaux
30 sont profondément anesthésiés, en intrapéritonal, avec du pentobarbital de sodium (25 mg/kg) et perfusés par voie intracardiaque par une solution saline (37°C), ce qui élimine le sang, puis par une solution de glutaraldéhyde froid (2,5% dans du tampon phosphate 0,1M), ce qui fixe

les tissus. L'os temporal est retiré puis la *bulla* ouverte pour dévoiler la cochlée. Une petite fenêtre est ouverte dans l'apex de la cochlée et la membrane de la fenêtre ronde afin de pouvoir laver délicatement la cochlée avec la solution de glutaraldéhyde. La cochlée est ensuite décalcifiée dans une solution d'EDTA (0,1M dans du tampon phosphate) pour permettre d'effectuer des coupes. Après décalcification, la cochlée est déshydratée et incluse dans du « plastic JB-4 » (Polyscience Inc, Warrington, PA). La cochlée est sectionnée en lamelles de 4µm d'épaisseur. Au milieu du *modiolus*, qui est caractérisé par une lamelle, dans laquelle on peut distinguer six sections du canal de Rosenthal, une lamelle sur trois est conservée pour analyse (ce qui évite de compter plusieurs fois les mêmes neurones du ganglion spiral). Les lamelles sont montées sur lames avec du « Paragon », colorées avec du bleu de toluidine et préparées pour la microscopie. Les six sections du canal de Rosenthal de six lamelles sont analysées pour chaque groupe d'animaux (Sigma Pro Scan) pour dénombrer les neurones du ganglion spiral. Les critères retenus pour un SGN sont un diamètre cellulaire entre 14 et 20 µm avec un noyau d'un diamètre de 7 à 10 µm. La densité moyenne de SGN est ainsi calculée et présentée à la figure 4 ; les coupes du canal de Rosenthal sont montrées à la figure 5.

Pour l'exemple 1, seul le traitement avec le GDNF induit une différence significative du nombre de SGN comparativement au groupe contrôle traité avec la périlymphe artificielle ($P < 0,001$). Pour l'exemple 2, on voit qu'aucun traitement retardé n'induit de différence significative comparativement au groupe contrôle.

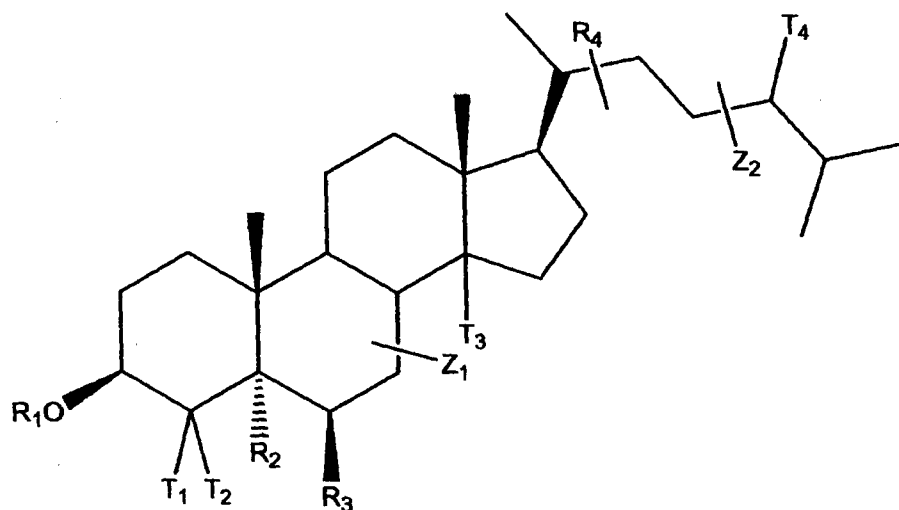
L'analyse histologique révèle cependant (voir figure 5), pour les animaux traités par DB, que les axones des

SGN apparaissent épais et longs alors qu'ils ne sont pas distinguables pour les animaux traités par l'AP. Ceci explique l'efficacité de la DB car la résistance électrique du neurone est d'autant plus faible que la

5 taille de l'axone est grande (réduisant la distance entre le transducteur du signal et le neurone).

REVENDICATIONS

- 1) Composition pour prévenir une perte d'audition chez un sujet ou pour obtenir une restauration au moins partielle de l'audition d'un sujet traité ayant, avant traitement, une fonction auditive réduite, par mise en contact de ladite composition avec au moins une partie de la cochlée de l'oreille ayant une fonction auditive réduite, ladite composition étant caractérisée en ce qu'elle contient, dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable, au moins un composé de formule (I) :



(I)

- formule dans laquelle $R_1 = \text{H}$ ou R-CO avec $\text{R} = \text{H}$, CH_3 ou C_2H_5 ; $\text{R}_2 = \text{H}$ ou OH ; $\text{R}_3 = -\text{NR}_5\text{R}_6$, R_5 étant H ou $-(\text{CH}_2)_3 \text{NH}_2$ et R_6 étant pris dans le groupe formé par $-(\text{CH}_2)_4 \text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3 \text{NH}(\text{CH}_2)_4 \text{NH}_2$; $-(\text{CH}_2)_4 \text{NH}(\text{CH}_2)_3 \text{NH}_2$; $-(\text{CH}_2)_3 \text{NH}(\text{CH}_2)_4 \text{NH}(\text{CH}_2)_3 \text{NH}_2$; $-(\text{CH}_2)_3 \text{NH}_2$; $-(\text{CH}_2)_2$ -imidazol-4-yl et $-(\text{CH}_2)_2$ -indol-3-yl ; $\text{R}_4 = \text{H}$ ou OH en position 20, 22, 24, 25, 26 ou 27, positionné de façon à créer un centre asymétrique de configuration R ou S ; Z_1 et Z_2 représentent chacun le nombre de double liaison entre les atomes de carbone C7 et C8 et C22 et C23 respectivement (soit 0 soit 1) ; T_1 , T_2 et $\text{T}_3 = \text{H}$ ou CH_3 indépendamment les uns des autres ; $\text{T}_4 = \text{H}$, CH_3 , C_2H_5 positionné de façon à obtenir un centre asymétrique de configuration R ou S

en position 24 ; et/ou d'au moins un sel pharmaceutiquement acceptable d'au moins un composé de formule (I).

2) Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que le (ou les) composé(s) de formule (I), qu'elle contient, est (sont) défini(s) par $Z_1=0$, $R_1 = H$; $R_2 = OH$; $R_3 = NHR_6$ où R_6 est $-(CH_2)_3 NH (CH_2)_4 NH (CH_2)_3 NH_2$ ou $-(CH_2)_2$ -imidazol-4yl ; $T_1 = T_2 = T_3 = H$.

3) Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que le (ou les) composé(s) de formule (I), qu'elle contient, est (sont) défini(s) par $Z_1 = 0$ ou 1 ; $R_1 = H$; $R_2 = OH$; $R_3 = -NHR_6$ où R_6 est $-(CH_2)_3 NH (CH_2)_4 NH_2$ ou $-(CH_2)_4 NH (CH_2)_3 NH_2$; $T_1 = T_2 = T_3 = H$; $R_4 = H$ ou OH en position 22 ou 27.

4) Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé de formule (I), est défini par $Z_1=0$; $R_1=acétyl$; $R_2=OH$; $R_4=H$; $R_3=NH-(CH_2)_2$ -imidazol-4-yl et $T_1=T_2=T_3=H$.

5) Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour améliorer la transmission du signal auditif vers le cerveau depuis le transducteur du signal (cellule ciliée ou électrode).

6) Composition selon la revendication 5, pour améliorer l'efficacité d'un implant cochléaire préalablement mis en place chez un sujet traité.

7) Composition selon la revendication 5, pour améliorer la fonctionnalité des neurones du ganglion spiral chez un sujet traité avant que l'on pratique sur ledit sujet au moins une thérapie destinée à stimuler le nombre et/ou la fonctionnalité desdits neurones ou cellules ciliées internes et externes.

8) Composition selon la revendication 5, pour maintenir la fonctionnalité des neurones du ganglion spiral avant l'implantation d'un implant cochléaire chez un sujet qui requiert la mise en place dudit implant cochléaire en

raison d'une perte auditive due à un traumatisme ou une maladie.

9) Composition selon la revendication 5, pour rendre un sujet plus apte à bénéficier ultérieurement d'une thérapie
5 visant à restaurer tout ou partie de son oreille interne, ladite thérapie appartenant au groupe formé par la transplantation de cellules souches, la régénération de cellules ciliées par transdifférenciation de cellules supportrices, la transfection génique et le blocage
10 génique dans tout ou partie de l'oreille interne.

10) Procédé pour mettre en place dans l'oreille interne d'un sujet une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait qu'on administre ladite composition par voie orale,
15 intraveineuse, intratympanique, intracochléaire, intracrâniale ou nasale, sur la fenêtre ronde ou ovale de la cochlée ou sur le tympan.

11) Procédé pour mettre en place sur la fenêtre ronde ou ovale de la cochlée ou sur le tympan d'un sujet une
20 composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait qu'on utilise une électrode imprégnée de ou badigeonnée avec ladite composition, une électrode comportant une canule chargée avec ladite composition, ou une électrode composée partiellement d'un
25 ou plusieurs composés de ladite composition.

12) Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la restauration bénéficie à un sujet, dont le traumatisme a été généré par un niveau ototoxique de bruit, des agents ototoxiques, des
30 radiations, des antibiotiques, des anti-inflammatoires, des agents de chimiothérapie, des métaux lourds, ou le vieillissement du sujet.

13) Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la restauration bénéficie à un
35 sujet, dont la perte auditive a été générée par une

maladie prise dans le groupe formé par une otite, le syndrome de Pendred, de Niemann-Pick, de Smith-Lemli-Opitz, de Stickler, de Charge, de Jervell et Lange-Nielsen, de Norrie, d'Usher, de Waardenburg ou de
5 Perrault, une neurofibromatose de type 2 ou un syndrome bronchio-otoréal.

14) Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour maintenir et/ou améliorer la qualité des connexions entre les SGN, d'une part, et les cellules
10 ciliées ou les électrodes cochléaires, d'autre part.

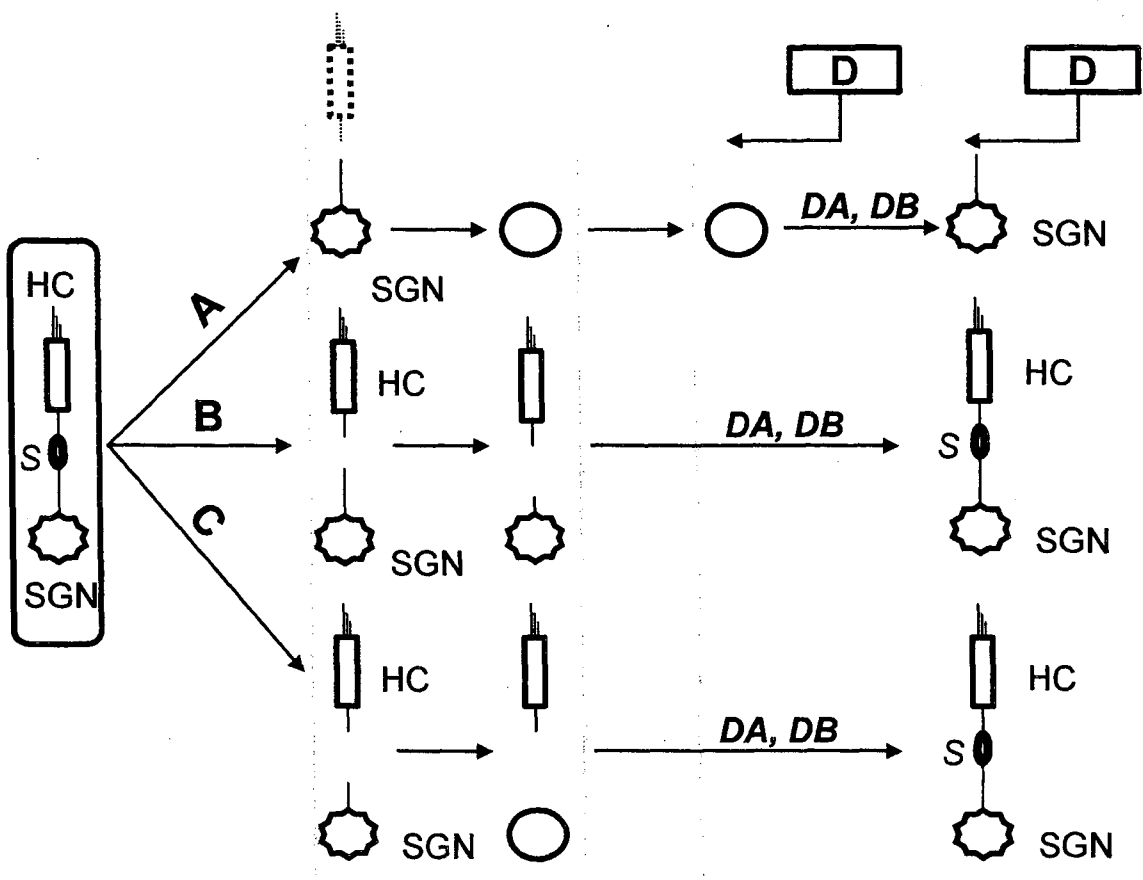


Figure 1

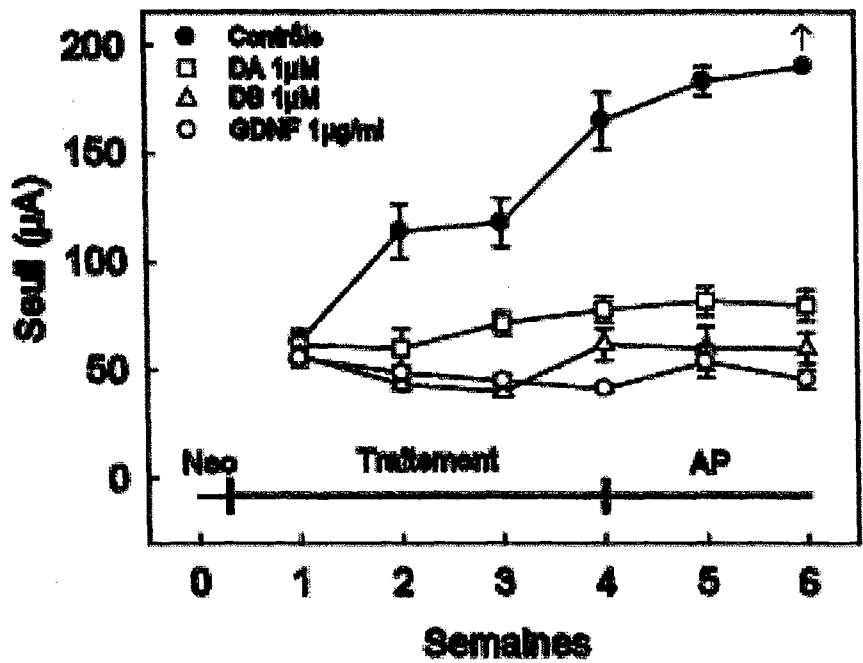


Figure 2

2/3

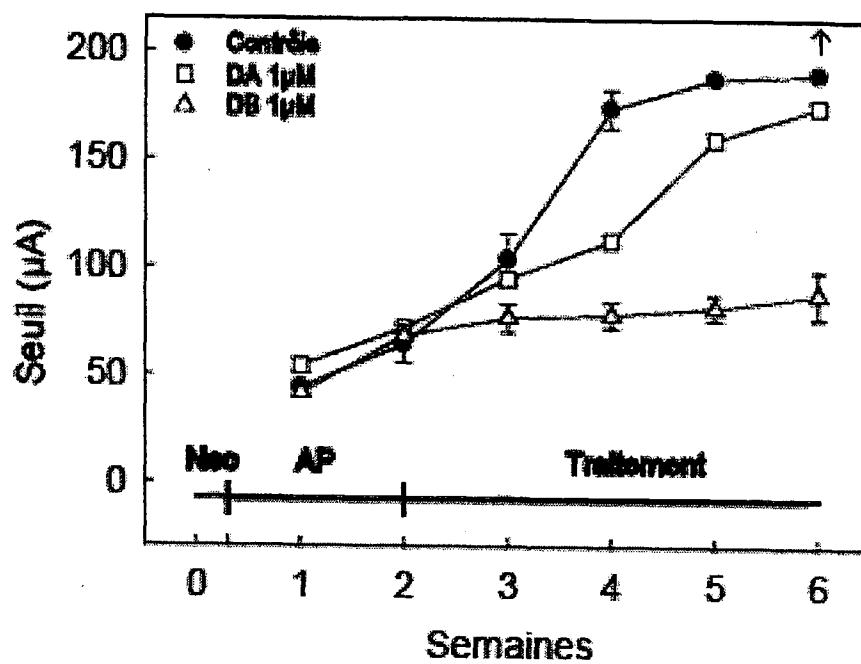


Figure 3

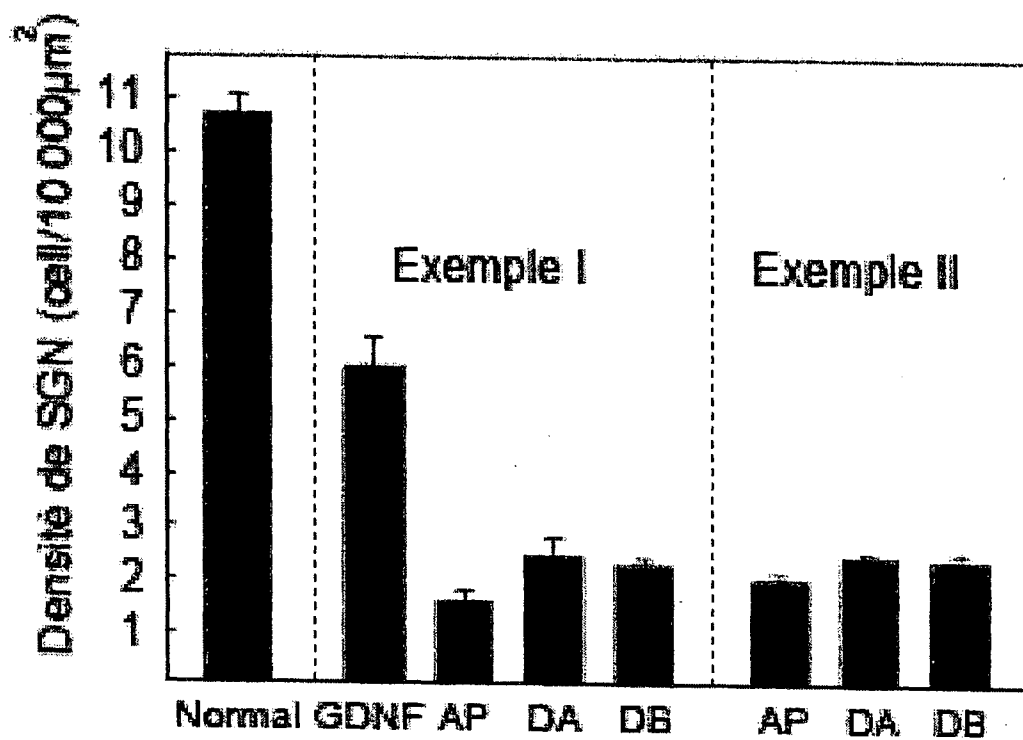


Figure 4

3/3

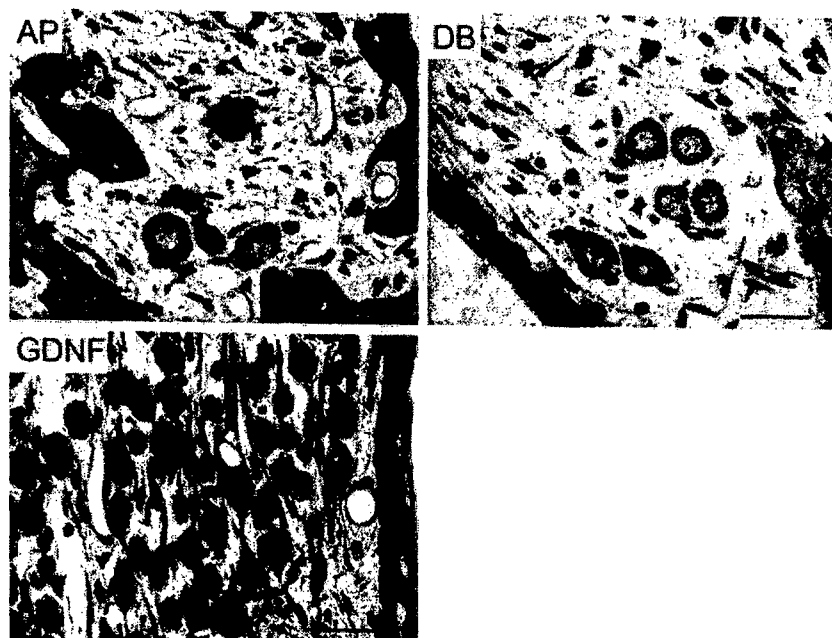


Figure 5

R1	R2	R6	Z1	R4	Protection : 100%-(seuil traité J42 – seuil traité J0)/(seuil contrôle J42 – seuil traité J0)		Densité SGN (/10000µm²) Ex 2
					Ex 1	Ex 2	
H	OH	$-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$	1	H	101 ± 7	79 ± 12	2.6 ± 0.3
H	OH	$-(CH_2)_2$ -imidazol-4-yl	0	H	96 ± 5	16 ± 4	2.6 ± 0.2
Ac	OH	$-(CH_2)_2$ -imidazol-4-yl	0	H	95 ± 6	18 ± 7	2.7 ± 0.4
H	OH	$-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$	0	22-OH	101 ± 4	75 ± 13	2.5 ± 0.6
H	OH	$-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$	0	27-OH	100 ± 8	74 ± 10	2.4 ± 0.7
H	OH	$-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$	0	H	101 ± 6	74 ± 7	2.8 ± 0.4
H	OH	$-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$	0	H	102 ± 9	78 ± 8	2.7 ± 0.5

Tableau 1