

Année 2020/2021

N°

Thèse

Pour le
DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Thuy-Trân TRINH

Née le 1^{er} Avril 1990 à Meaux (77)

TITRE

Analyse métabolomique de la périlymphe sur un modèle ovin de surdité

Présentée et soutenue publiquement le **26 Mars 2021** devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur Emmanuel LESCANNE, ORL, Faculté de Médecine -Tours

Membres du Jury :

Professeur Hélène BLASCO, Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine – Tours

Professeur Sylvain MORINIÈRE, ORL, Faculté de Médecine – Tours

Docteur Charles-Édouard ROUF, ORL, PH, CH – Blois

Directeur de thèse : Professeur David BAKHOS, ORL, Faculté de Médecine - Tours

UNIVERSITE DE TOURS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Pr Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Pr Henri MARRET

ASSESEURS

Pr Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Pr Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Pr Theodora BEJAN-ANGOULVANT, *Moyens – relations avec l'Université*
Pr Clarisse DIBAO-DINA, *Médecine générale*
Pr François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Pr Patrick VOURC'H, *Recherche*

RESPONSABLE ADMINISTRATIVE

Mme Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Pr Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Pr Georges DESBUQUOIS (†) - 1966-1972
Pr André GOUAZE (†) - 1972-1994
Pr Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004
Pr Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Pr Daniel ALISON
Pr Gilles BODY
Pr Jacques CHANDENIER
Pr Alain CHANTEPIE
Pr Philippe COLOMBAT
Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Pr Pascal DUMONT
Pr Dominique GOGA
Pr Gérard LORETTE
Pr Dominique PERROTIN
Pr Roland QUENTIN

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – P. ARBEILLE – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – P. BARDOS – C. BARTHELEMY – J.L. BAULIEU
– C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – C. BONNARD – P. BONNET – P. BOUGNOUX – P. BURDIN – L.
CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – P. COSNAY – C. COUET – L. DE LA LANDE DE CALAN
– J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUDEAU – J.L. GUILMOT – N. HUTEN
– M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – O. LE FLOCH – Y. LEBRANCHU – E. LECA – P. LECOMTE –
AM. LEHR-DRYLEWICZ – E. LEMARIE – G. LEROY – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C.
MORAINE – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – A. ROBIER –
J.C. ROLLAND – D. ROYERE – A. SAINDELLE – E. SALIBA – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ANDRES Christian	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis	Cardiologie
AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique	Cardiologie
BAKHOS David	Oto-rhino-laryngologie
BALLON Nicolas	Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe	Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Théodora	Pharmacologie clinique
BERHOUE Julien	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BERNARD Anne	Cardiologie
BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle.....	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène.....	Biochimie et biologie moléculaire
BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
BOURGUIGNON Thierry	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent	Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck	Urologie
BUCHLER Matthias	Néphrologie
CALAIS Gilles.....	Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
CORCIA Philippe	Neurologie
COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique
DESOUBEAUX Guillaume.....	Parasitologie et mycologie
DESTRIEUX Christophe	Anatomie
DIOT Patrice	Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague.....	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri	Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
EL HAGE Wissam	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan	Médecine intensive - réanimation
FAUCHIER Laurent	Cardiologie
FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
FOUGERE Bertrand	Gériatrie
FOUQUET Bernard	Médecine physique et de réadaptation
FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
FROMONT-HANKARD Gaëlle.....	Anatomie & cytologie pathologiques
GAUDY-GRAFFIN Catherine.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUPILLE Philippe.....	Rhumatologie
GRUEL Yves	Hématologie, transfusion
GUERIF Fabrice.....	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUILLON Antoine	Médecine intensive - réanimation
GUYETANT Serge.....	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
HAILLOT Olivier	Urologie
HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis.....	Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe	Biologie cellulaire
LABARTHE François.....	Pédiatrie
LAFFON Marc	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert.....	Chirurgie infantile
LARIBI Saïd	Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-virologie
LAURE Boris	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry	Gastroentérologie, hépatologie
LESCANNE Emmanuel	Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude	Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent	Dermato-vénéréologie
MAILLOT François	Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie

MARRET Henri	Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel.....	Dermatologie-vénérologie
MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MITANCHEZ Delphine.....	Pédiatrie
MORINIERE Sylvain.....	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis	Rhumatologie
ODENT Thierry.....	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi.....	Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna.....	Gynécologie-obstétrique
PAINTAUD Gilles.....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Franck	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean.....	Ophtalmologie
PLANTIER Laurent	Physiologie
REMERAND Francis	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
ROSSET Philippe.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem.....	Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab	Dermatologie-vénérologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria.....	Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
TOUTAIN Annick.....	Génétique
VAILLANT Loïc.....	Dermato-vénérologie
VELUT Stéphane	Anatomie
VOURC'H Patrick.....	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé	Immunologie
ZEMMOURA Ilyess.....	Neurochirurgie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DIBAO-DINA Clarisse
LEBEAU Jean-Pierre

PROFESSEURS ASSOCIES

MALLET Donatien Soins palliatifs || POTIER Alain | Médecine Générale |
| ROBERT Jean | Médecine Générale |

PROFESSEUR CERTIFIE DU 2ND DEGRE

MC CARTHY Catherine Anglais |

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AUDEMARD-VERGER Alexandra.....	Médecine interne
BARBIER Louise.....	Chirurgie digestive
BINET Aurélien.....	Chirurgie infantile
BRUNAUT Paul	Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès	Biostat., informatique médical et technologies de communication
CLEMENTY Nicolas	Cardiologie
DENIS Frédéric	Odontologie
DOMELIER Anne-Sophie.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane.....	Biophysique et médecine nucléaire
ELKRIEF Laure	Hépatologie - gastroentérologie
FAVRAIS Géraldine.....	Pédiatrie
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et cytologie pathologiques
GATAULT Philippe	Néphrologie
GOUILLEUX Valérie	Immunologie
GUILLOM-GRAMMATICO Leslie.....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention

HOARAU Cyrille	Immunologie
IVANES Fabrice	Physiologie
LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
LEFORT Bruno.....	Pédiatrie
LEGRAS Antoine	Chirurgie thoracique
LEMAIGNEN Adrien.....	Maladies infectieuses
MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MOREL Baptiste.....	Radiologie pédiatrique
PIVER Éric	Biochimie et biologie moléculaire
REROLLE Camille	Médecine légale
ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire
SAUTENET Bénédicte	Thérapeutique
TERNANT David	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
VUILLAUME-WINTER Marie-Laure	Génétique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia	Neurosciences
NICOGLLOU Antonine.....	Philosophie – histoire des sciences et des techniques
PATIENT Romuald	Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile.....	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

BARBEAU Ludivine	Médecine Générale
RUIZ Christophe	Médecine Générale
SAMKO Boris.....	Médecine Générale

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

BOUAKAZ Ayache	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
DEROCQUIGNY Hugues.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
ESCOFFRE Jean-Michel.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
GILOT Philippe	Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GOUILLEUX Fabrice.....	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7001
GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
KORKMAZ Brice	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
LAUMONNIER Frédéric.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
MAZURIER Frédéric	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
MEUNIER Jean-Christophe.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
PAGET Christophe	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
RAOUL William	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
SITAHAR Mustapha	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
WARDAK Claire	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

DELORE Claire	Orthophoniste
GOUIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier

Pour l'Ecole d'Orthoptie

MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier
----------------------	-----------------------

Pour l'Ethique Médicale

BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier
------------------------	-----------------------

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

REMERCIEMENTS

À mon maître et président du Jury, Monsieur le Professeur Lescanne,

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury et de juger ce travail. Votre élégance chirurgicale, votre groove et votre expertise en otologie que vous nous transmettez resteront des objectifs à atteindre.

Recevez ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

À mon maître et juge, Madame le Professeur Blasco,

Merci d'avoir accepté de m'encadrer et de juger ce travail. Merci de m'avoir fait découvrir le monde du laboratoire et de la métabolomique. Merci de votre patience et des multiples explications à ce sujet.

Recevez ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

À mon maître et juge, Monsieur le Professeur Morinière,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour votre pédagogie et votre soutien au cours de ce semestre. Merci de votre calme à toute épreuve, au bloc, dans le service, en consultation. Votre dextérité chirurgicale et votre tact envers votre équipe sont un exemple pour nous. Recevez ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

*À mon maître et juge, **Monsieur le Docteur Rouf,***

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour ce semestre à Clocheville, merci de m'avoir toujours soutenue, donné confiance en moi et de continuer à croire en moi. De chef à ami, une superbe rencontre sur Tours qui rendent tous ces traquenards de drôles d'histoires à raconter ! (Je crois que je n'ai jamais remis les pieds au Jaja...) En espérant en revivre très vite ! Je te souhaite le meilleur avec Célia, Basile et bientôt le deuxième !! Reçois ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

*À mon maître et juge, **Monsieur le Professeur Bakhos,***

Merci d'avoir accepté de diriger, encadrer et juger ce travail.

David, merci de m'avoir aidée et soutenue dès mon premier semestre à Tours. Merci de m'avoir encadrée tout le long de mon internat : pour le mémoire, le M2 et maintenant la thèse. Ton investissement envers nous, tes patients, le service, ainsi que ta rigueur chirurgicale et universitaire sont un modèle pour nous. Tu as rendu tout ce travail plus qu'appréciable ; le bistrot en terrasse post-fraisage de brebis, c'était le must ! Par contre, je crois que tu ne feras jamais 200 à la cible !

Reçois ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Au Docteur Pinlong, Éric, merci d'avoir été là pour mes premiers pas à Tours. Tu es toujours présent pour nous. Merci de ta patience, ta bienveillance et la rigueur chirurgicale que tu nous enseignes.

Au Docteur Pondaven, Soizick, merci de nous enseigner l'ORL pédiatrique. Merci de votre humanité, de votre bon sens, de votre bonne humeur. Votre élégance et la façon dont vous combinez votre vie personnelle et professionnelle sont une inspiration pour nous. J'ai hâte de travailler à vos côtés pour le clinicat.

Au Docteur Marmouset, merci de nous enseigner la phoniatry, la déglutition et le sommeil. Merci de votre modestie et de votre ouverture d'esprit.

À mes anciens chefs,

Clément, merci de ta gentillesse, de tes conseils, tant au niveau chirurgical que pour les choix de stage. J'ai hâte d'aller à Créteil !

Moumainn, merci d'avoir ramené encore un peu de Caen vers ici !

Kévin, Kiki ! Kidoc ! De cointerne à chef, tu as toujours été un exemple pour moi. Ton humilité, ton humanité, ta sympathie, et tes compétences te rendent admirable. Je te souhaite le meilleur à Pau ! Ne change rien (juste, arrête de vomir sur les pistes...) !

Charles, tu n'es pas ancien mais bon, Ta bonne humeur et ta bonté rendent ce semestre plus agréable. En tous cas, tu as un accent viet irréprochable !

Camille, la reine de l'orga ! Une efficacité et un altruisme à toute épreuve ! Tu es une mère pour nous, et encore maintenant, même de loin ! Merci de m'avoir filé tous tes tips ! Je te souhaite le meilleur avec Lolo et ta belette !

À tous les cointernes,

Jerem, merci pour ces petits déj, ces verres après Cloche, de m'avoir fait porter Léandre ! Pierre, mon collègue de M2 ! Merci de m'avoir supportée toutes ces heures au 18. Cloclo, toujours zen, souriante et pimpante. Anne-So, de notre première semaine sans électricité à Djibouti, tu t'en es bien sortie ! Dr BOUSCOURIOU !!! Tu nous fait tant rire, tu détends toujours les troupes ! Tu es le meilleur d'entre nous ! Lucky, belles perfs... Yasmine, ma copiiiiine !!! Belle soirée de fin du monde... Laura, tu restes gavé cool, même quand ça daille ! Justin, promis on te fera visiter Tours un jour ! Marianne, team Colbert, Eliott, notre ORL interniste, Sandoche, double galloche, Jean-Pierre, belles recrues, Léa, Marie, Elie, Fabrice, hâte de vous rencontrer.

À tous les services dans lesquels je suis passée,

À l'équipe de Châteauroux, à M. Bories. À l'équipe de neurochir à Orléans.

À la chirurgie pédiatrique de Clocheville, M. Lardy, Karim, Thierry, Aurélien, Anne, Ibtissam, merci de votre accueil.

À la Chirurgie Maxillo-Faciale, Chrystelle, Benjamin, Claire, Marion, Alice, Dimitri, Cerise, Gauth33, un super semestre, avec des évènements marquants ! Dommage qu'on n'ait pas pu profiter un peu plus de cette fin de semestre !

Au service d'ORL de Bretonneau et Clocheville, aux infirmières, aides-soignantes, secrétaires de l'hospit. Aux filles de la consult. Aux infs du bloc. Vous êtes une super équipe, c'est un plaisir de travailler avec vous tous.

À ma famille,

Mam, Pap, merci de m'avoir soutenue, de m'avoir permis de réaliser tout ce que j'ai souhaité. Merci de faire en sorte que l'on se réunisse toujours et d'être aussi tolérants. Tout est grâce à vous.

À mes sista, Thuy-Tiên, Bébé, même si je suis la chouchoute « I'll be there for youuuuuuu... Cause you're there for me too ! ». À mon ptit Boobooooo !!!

Mathieu, merci de m'encourager à courir ; Prince Philippe, merci pour le GoT en rooftop !

Aux 2 familles Lê, Co Giang, ma colloc ! Co Chu, Chu Thao, Chu Thanh, Ted, Sophie et Gabrielle !! Mike, Dany, Thuy-Anh. Merci de rendre nos retrouvailles aussi funs !

Khanh-Ngoc, ça fait si longtemps...

Di Oanh, Di Bang, à bientôt à Bruxelles !

À mes amis,

Margot, ma plus vieille amie ! Depuis nos 3ans, on se s'est pas quittées. Je suis fière d'avoir été à tes côtés pour tous ces moments, et que tu sois aux miens aujourd'hui ! J'aimerais trop regoûter les macaques grillés !

Aux Bolides. Serge, t'es au top-anh ! Sim et Greta, vous me faites trop wigoler ! Mar, le plus gros requin de Bowdow ! et toi aussi Clem, allez ! Je te mets dans les bolides ! J'adore nos week-ends annuels, à la plage, la plage, la plage !! Nos tites parties et nos grosses bouffes de bolides quand on a la daaaaaaaille !! Je reprendrais bien un ptit drink ! NIN-NIIIIIIIN !!!!

Aux Sauçards, Lalou, Vanvan, Bobonne, Symph, Jaja, Guizmo, Fouet, Jerem, Moenne, Renild, Riton, Giguet, Choleton, Bizut, Picpic, on s'est bien marré !

Choko, merci d'avoir partagé ces années avec moi

Popo, Léa, Flo, Gwen, Perrine, vous êtes complètement folles ! On ne s'ennuie jamais avec vous !

Aux coco Belloys, et autres NBNS, Nico, Koink, Robert

Carpet et Marie, merci d'être venus à Tours ! Félicitations pour tout !

Aux copains de Tours, Jeje, (clin d'œil, bouche en cul de poule et hochement de tête), une très belle année de M2 à la guinguette à jouer au Cambio avec Clem et Cha, on se revoit au poulet dimanche ! Pierrot, t'es sûr que tu veux pas jouer ? Adèle, Nico, si ton T3 de corde vocale ne t'a pas encore emporté d'ici là, PMeign, PH, Victor, champion !

A tous les collocs, Camille, Léa (parce que tu vaux d'être citée 2 fois), Loupi, Marine, Mehdi, mon Valouuuu, continue de nous faire des valous, (alerte spoil, je crois que Mauranne est morte...) Romain, ROMAIN, ROMAIN !! Mathou, le soleil et le moteur de la colloc, c'est la mif ! Et à Churchill, bien sûr !

Veinc, merci d'être là pour moi, de me soutenir, de me nourrir et me faire rire ! En avant Guingamp !

Merci d'être entré dans ma vie.

TABLE DES MATIÈRES

I.	INTRODUCTION.....	16
II.	RAPPELS.....	18
1.	Physiologie de l'audition.....	18
2.	La surdité neurosensorielle.....	18
3.	Les techniques omiques.....	21
4.	Le modèle animal en otologie	23
A.	Etude radiologique comparative de l'oreille interne de brebis versus humain.....	25
1.	Introduction.....	25
2.	Sujets et Méthodes	26
3.	Résultats.....	28
4.	Discussion.....	32
B.	Analyse métabolomique de la périlymphe sur un modèle ovin de surdité.....	34
1.	Introduction.....	34
2.	Sujets et méthodes.....	35
3.	Résultats.....	40
4.	Discussion.....	45
III.	DISCUSSION.....	48
IV.	CONCLUSION.....	50
V.	REFERENCES	51
VI.	ANNEXES.....	58

Abréviations :

SNS : Surdité Neuro-Sensorielle

ROS : dérivés réactifs de l'oxygène

RNS : dérivés réactifs de nitrogène

ADN : Acide Désoxyribonucléique

MAPK : Mitogen-activated Protein Kinase

IL : Interleukine

TNF : Tumor Necrosis Factor

LDH : Lactate Déshydrogénase

HSP : Heat Shock Protein

NE : Normo-Entendant

PEA : Potentiels  voqu s Auditifs

TDM : Tomodensitométrie

FR : Fenêtre ronde

CIRE : Chirurgie et Imagerie pour la Recherche et l'Enseignement

INRA : Institut National de la Recherche Agonomique

NaCl : Chlorure de Sodium

QC : Quality Control

LC/HRMS : Liquid Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry

CV: Coefficient de Variation

PCA: Principal Component Analysis

I. INTRODUCTION

La surdité neurosensorielle (SNS) est le handicap sensoriel le plus fréquent avec une estimation à plus de 5% de la population mondiale¹. Ce chiffre ne cesse d'augmenter, d'une part avec le vieillissement de la population² et d'autre part avec le développement des programmes de dépistage néonatal³. Les SNS peuvent être congénitales ou acquises. Les SNS acquises regroupent la presbycusie⁴, les SNS d'origine ototoxique⁵, traumatique, infectieuse. Les SNS congénitales sont classées en SNS héréditaires ou non héréditaires (ototoxique, environnementale, virale). Les SNS héréditaires représentent 50% des SNS congénitales ; elles peuvent être syndromique ou non syndromique⁶. Bien que les SNS syndromiques à transmission autosomique dominante soient bien connues (syndrome de Pendred, syndrome de Waardenburg, syndrome d'Usher etc ...), les SNS syndromiques à transmission autosomique récessive ou liée à l'X sont peu décrites^{7,8}. Parmi ces dernières, les maladies métaboliques sont de plus en plus étudiées. Les maladies métaboliques sont de rares désordres génétiques entraînant des altérations dans les voies métaboliques.

Néanmoins, dans la plupart des cas, le site lésionnel et la physiopathologie impliquée restent imprécises. Afin d'identifier l'étiologie, une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques de la SNS est nécessaire. Ces SNS ont dans la majorité des cas une origine endocochléaire, les techniques d'investigations modernes comme l'imagerie, ne nous permettant pas actuellement d'étudier les mécanismes physiopathologiques compte tenu des dimensions de la cochlée et de son accessibilité. Cependant, lors d'une implantation cochléaire, il existe un accès aux fluides endocochléaires ; en effet l'ouverture de la fenêtre ronde (FR), donne accès à la périlymphe de la rampe tympanique. L'étude de la périlymphe pourrait nous permettre une meilleure compréhension des voies métaboliques et du site lésionnel impliqués dans les SNS.

En effet, les cellules composant l'organe neurosensoriel de l'audition ont leurs corps cellulaires qui baignent dans la périlymphe⁹⁻¹¹. Ainsi, depuis le début des années 1970, l'étude de la périlymphe est un réel défi et les différentes techniques pour son analyse sont en constante évolution¹²⁻¹⁴. L'analyse métabolomique est une technique émergente permettant l'étude de l'ensemble de tous les métabolites d'un échantillon sans a priori. Il s'agit d'une technique en pleine expansion dans la recherche de biomarqueurs et de voies métaboliques d'une pathologie donnée¹⁵.

Dans une précédente étude analytique, notre équipe a validé la méthode et les performances de l'analyse métabolomique sur un faible volume ($\approx 1\mu\text{L}$) de périlymphe

recueillie lors d'une implantation cochléaire de patients atteints de SNS¹⁶. Par la suite, nous avons montré l'intérêt de l'analyse métabolomique de la périlymphe pour expliquer certains paramètres cliniques, notamment sur la durée de surdité¹⁷. Néanmoins, nous n'avons pas pu étudier l'étiologie des surdités grâce à cette technique d'analyse face à l'hétérogénéité importante des étiologies dans notre population.

Nous souhaitons poursuivre cette stratégie d'exploration des SNS pour identifier des biomarqueurs en lien avec l'étiologie et d'autres critères cliniques.

L'analyse de ce liquide endocochléaire n'étant pas réalisable chez le patient normo-entendant (NE), une étude préclinique chez l'animal est nécessaire afin de comparer la périlymphe d'un sujet normo-entendant à la périlymphe d'un modèle animal de SNS.

Pour cela, il est nécessaire de réaliser un modèle animal de SNS d'étiologie connue. Avant tout, notre choix s'est porté sur un modèle de gros animal. En effet, il semblerait que leur métabolisme soit plus semblable à celui de l'Homme¹⁸ et donc plus représentatif. Du fait de similitudes anatomiques au niveau de l'oreille interne¹⁹ et physiologiques au niveau du spectre auditif²⁰, nous avons fait l'hypothèse que la brebis serait un bon modèle pour l'étude des fluides endocochléaires dans le cadre d'un modèle de SNS induite par une ototoxicité.

L'analyse de la littérature a montré peu de travaux d'anatomie radiologique comparative entre la brebis et l'homme, c'est pourquoi - après un rappel sur la physiologie de l'audition, la surdité neurosensorielle, la métabolomique et les modèles animaux - nous développerons les objectifs de ce travail. Le premier objectif était de comparer l'anatomie radiologique de l'oreille interne de brebis à celle de l'homme. Le second objectif était l'étude des profils métabolomiques de la périlymphe d'oreille normo-entendante (NE) et d'oreille atteinte de SNS sur un modèle ovin de surdité.

II. RAPPELS

1. Physiologie de l'audition

La cochlée, organe neuro-sensoriel de l'audition, fait partie de l'oreille interne avec le vestibule, organe de l'équilibre. La cochlée est un canal osseux entouré sur lui-même autour du modiulus sur 2 tours $\frac{1}{2}$ de spire. Ce canal spiral est cloisonné par la membrane de Reissner et la membrane basilaire donnant 3 cavités : la rampe tympanique (ou scala tympani), se terminant à la fenêtre ronde, la rampe vestibulaire (ou scala vestibuli), se terminant à la fenêtre ovale et le canal cochléaire (ou scala media). L'oreille interne est remplie de liquide endocochléaire : la périlymphe remplit les rampes tympanique et vestibulaire, l'endolymphe remplit le canal cochléaire et le vestibule. La différence de composition des liquides endocochléaires permet des échanges ioniques amenant à une dépolarisation des cellules tapissant la membrane de ces rampes et générant ainsi des potentiels d'action au niveau du nerf cochléaire. (Figure 1)

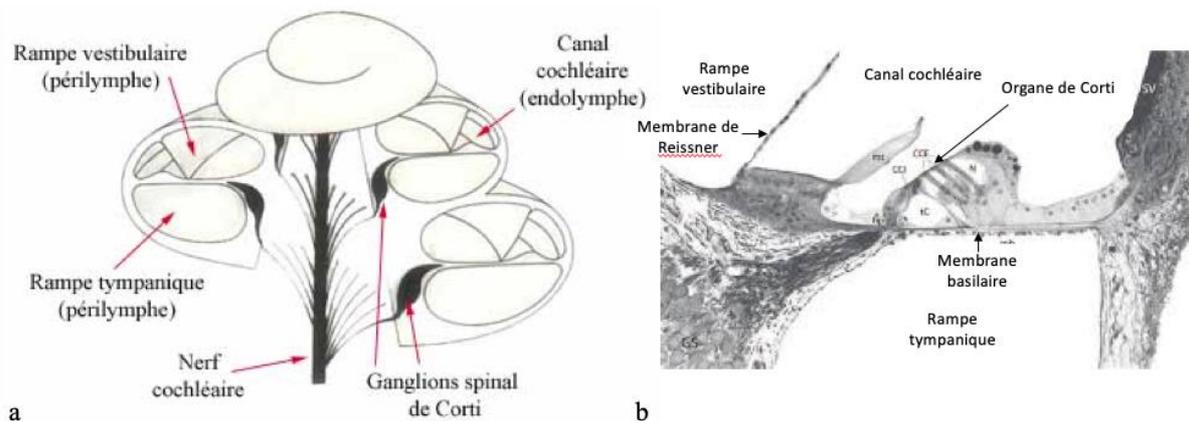


Figure 1 : a) Schéma d'une cochlée sur une coupe passant par le modiulus ²¹.
b) Coupe du canal cochléaire centrée sur l'organe neuro-sensoriel de l'audition (organe de Corti) ²².

2. La surdité neurosensorielle

La SNS est le déficit sensoriel le plus fréquent. Elle altère la qualité de vie, chez l'enfant, en affectant le développement du langage oral, l'éducation et les interactions sociales ⁷; chez l'adulte, elle peut limiter la communication et les relations socio-professionnelles ²³. Dans la majorité des cas, les SNS correspondent à une atteinte endocochléaire. Différentes étiologies ont été décrites, elles peuvent être congénitales ou acquises. Les SNS congénitales peuvent être génétiques ⁶, syndromiques ou isolées⁸. Les SNS acquises regroupent les surdités liées à une infection, une fracture du rocher, une ototoxicité²⁴ ou la presbyacousie ⁴.

Parmi les SNS syndromiques, citons les maladies métaboliques. Il s'agit de maladies liées à des désordres génétiques responsables de dysfonctionnement des voies métaboliques. Les maladies métaboliques sont une catégorie de maladies de plus en plus étudiées grâce à un meilleur diagnostic via les techniques émergentes. Ces maladies métaboliques sont très rares et leur pronostic est parfois sombre. Néanmoins, différentes formes sont compatibles avec une vie adulte grâce à des traitements enzymatiques substitutifs. Dans ces formes, la surdité ne doit pas être méconnue afin d'en améliorer la qualité de vie en proposant de rétablir la fonction auditive. Une revue de la littérature sur les surdités dans les maladies métaboliques a été réalisée (Trinh TT et al. *Metabolism*. Soumis). Un tableau récapitulatif est présenté en *Annexe 1*.

Certaines étiologies sont évidentes mais, malgré les données cliniques, audiométriques, biologiques et d'imagerie dont nous disposons, dans environ 50% des SNS, le site lésionnel demeure inconnu. Pourtant, l'étiologie est un des facteurs prédictifs les plus importants d'une réhabilitation de la fonction auditive²⁵⁻²⁷.

Les performances auditives et langagières suite à une réhabilitation de la fonction auditive dépendent également de la durée de surdité. En cas de retard de prise en charge, les bénéfices sont généralement modestes compte tenu d'un défaut de maturation des voies auditives centrales chez l'enfant ou de difficulté de plasticité corticale. Ces résultats ont été étudiés histologiquement sur des modèles animaux²⁸ et sur des études électrophysiologiques chez l'Homme²⁵.

Les SNS peuvent être liées à l'altération d'une trentaine de types cellulaires différents dans la cochlée (*Figure 2*) et plus rarement par altération des synapses ou du fonctionnement du nerf cochléaire dans les neuropathies auditives²⁹.

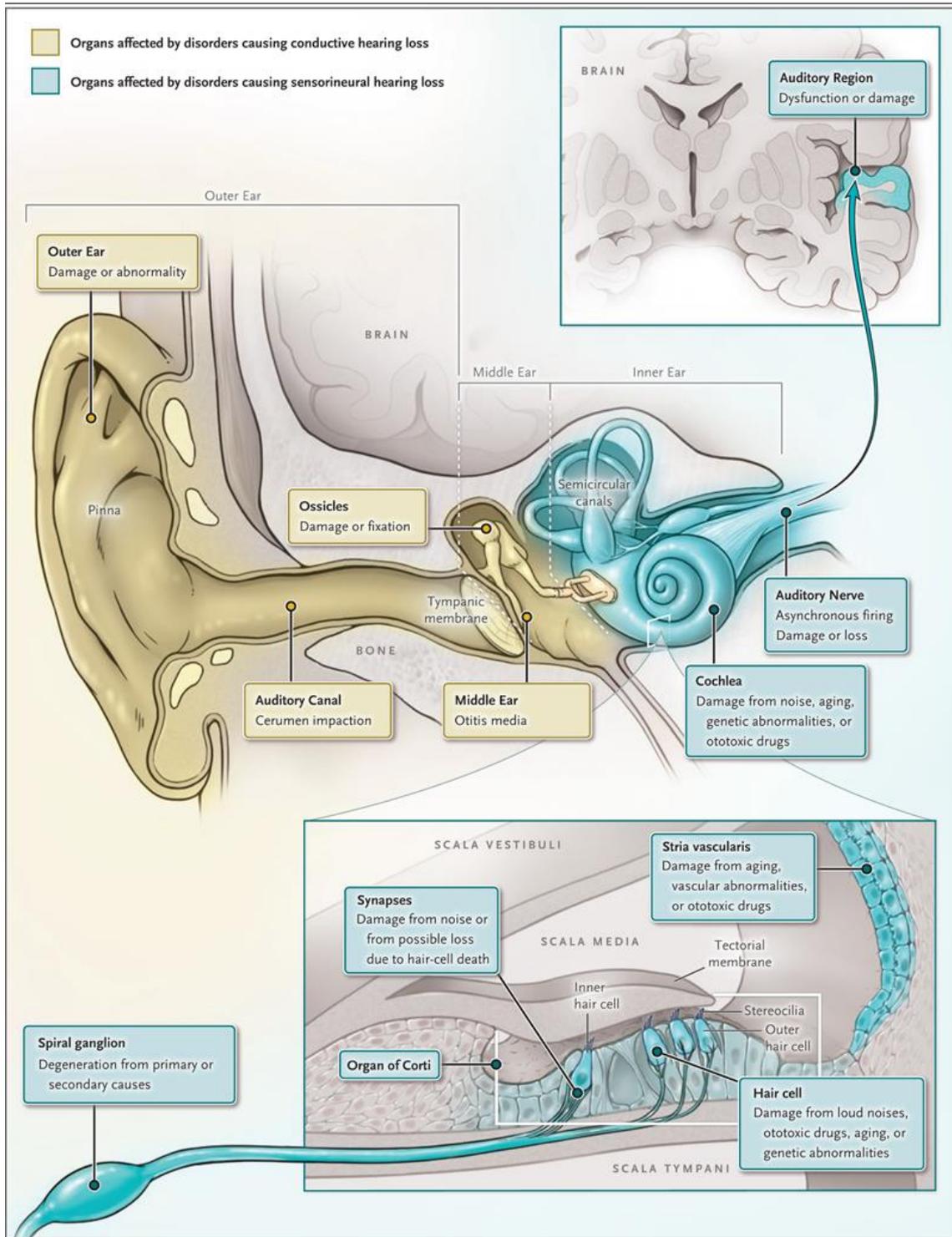


Figure 2 : Affections du système auditif ²⁹

Légende : L'organe de Corti est composé de plusieurs types de cellules : les cellules sensorielles composées de 3 rangées de cellules ciliées externes et 1 rangée de cellules ciliées internes ; les cellules de soutien, dont les piliers internes et externes, les cellules de Hensen ou Claudius. On comprend ici que beaucoup de types cellulaires peuvent être affectés dans les SNS.

Souvent, les mécanismes physiopathologiques amenant à la perte des cellules sont multiples et intriqués. Ainsi, Wong et al.³⁰ a décrit 5 voies cellulaires impliquées dans les SNS : (i) l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et dérivés réactifs du nitrogène (RNS) dans la cochlée est source de stress oxydatif contribuant à l'apoptose à travers une cascade de réactions avec l'ADN, les protéines, les molécules cytosoliques. (ii) Indépendamment, une élévation du calcium intracellulaire est également source de désordres mitochondriaux, amenant à l'apoptose et la mort des cellules ciliées. L'homéostasie du calcium est aussi impliquée dans une autre voie intracellulaire : (iii) MAPKs. Ces protéines de signal contribuent à l'activation des protéines kinases, médiateurs clés du stress oxydatif et de l'inflammation. (iv) L'apoptose peut être induite par l'infection et l'inflammation. Une infection virale ou bactérienne provoque une réponse basée sur l'immunité innée permettant la destruction des pathogènes. Cette réponse immunitaire génère des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1 β et TNF- α . La mort programmée des cellules ciliées peut être médiée par ces voies intracellulaires ou par des voies extracellulaires comme (v) les caspases ou par le TNF- α qui agit à son propre compte. Bien que quelques voies cellulaires aboutissant à l'apoptose des cellules ciliées et des ganglions spiraux aient été décrites, il n'existe pas d'outil permettant de caractériser le site lésionnel dans la cochlée ni les mécanismes intracellulaires des SNS.

3. Les techniques omiques

La recherche de biomarqueurs en santé est en pleine expansion depuis quelques années avec l'attrait des méthodes omiques, à haut débit, sans a priori. L'étude métabolomique est une technique émergente permettant d'identifier des biomarqueurs en analysant tous les métabolites présents dans un échantillon. Les métabolites représentent toutes les molécules de petite taille dont la masse moléculaire est inférieure à 1500 daltons. La métabolomique permet également d'apprécier les voies métaboliques de toute altération intrinsèque ou extrinsèque d'un système vivant. L'étude de l'ensemble des métabolites est la dernière échelle des études dites « omiques » (*Figure 3*).

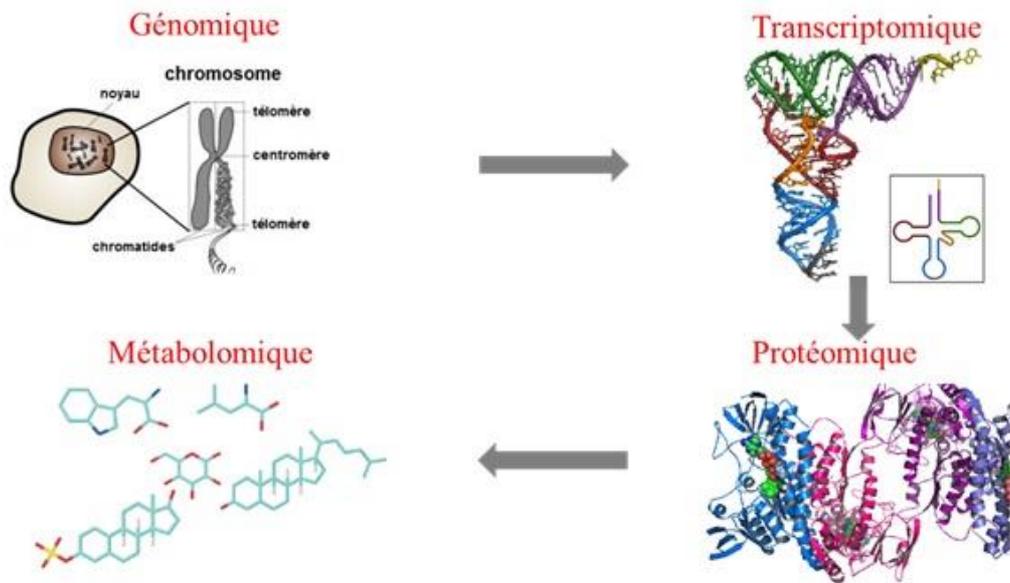


Figure 3 : Méthodes « omiques »

Légende : La génomique étudie l'ADN, soit l'ensemble des gènes ; la transcriptomique, l'ensemble des ARN messagers, la protéomique, l'ensemble des protéines et la métabolomique, l'ensemble des métabolites.

L'analyse métabolomique consiste en l'analyse et l'interprétation de données récoltées par des techniques analytiques, telles que la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse sur un échantillon donné (Figure 4).

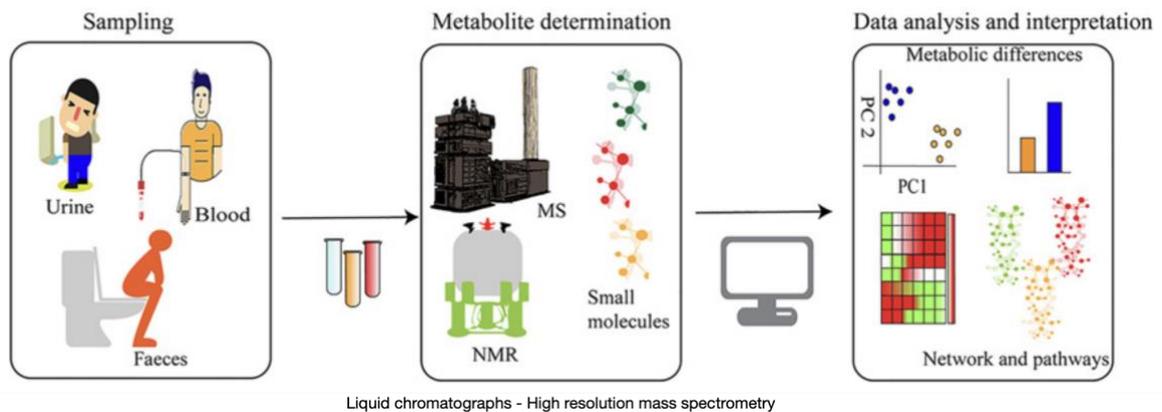


Figure 4 : Analyse métabolomique³¹

Légende : MS : mass spectrometry ; NMR : nuclear magnetic resonance spectroscopy ; PC : principal component

Les métabolites présents dans la périlymphe pourraient refléter une altération des voies métaboliques impliquées dans les SNS, nous permettant d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes physiopathologiques de la surdité et de caractériser certaines étiologies.

L'analyse de la périlymphe est un réel défi. En effet, depuis 1966, certains auteurs ont analysé ce liquide dans le but d'une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la surdité. D'abord chez les animaux, Silverstein ¹² a prélevé la périlymphe de chats pour déterminer les concentrations de protéines, glucose et LDH. Depuis, l'analyse protéomique de la périlymphe chez l'humain a été réalisée avec succès. Thalmann et son équipe étaient les pionniers dans ce domaine grâce à l'électrophorèse 2D ¹³. Dernièrement, Schmitt et al. ³² ont également prélevé de la périlymphe chez les humains lors d'implantation cochléaire ou exérèse de neurinome du VIII et étudié spécifiquement les HSP (Heat Shock Protein) connues pour leur effet anti-apoptotique et anti-nécrotique. Une étude de faisabilité sur l'analyse métabolomique de la périlymphe chez l'humain a aussi été réalisée ¹⁷. Chez 19 patients candidats à l'implant cochléaire, la périlymphe a été prélevée en peropératoire et analysée, permettant d'identifier 106 métabolites et des profils métabolomiques significativement différents en fonction des durées de surdité.

4. Le modèle animal en otologie

Communément, l'espèce murine est celle utilisée en recherche du fait des facilités d'hébergement. Pourtant, cette espèce montre peu de similarités anatomique, biologique, et métabolique avec l'Homme. En otologie, le modèle animal est largement représenté par le cochon d'Inde ³³ et la gerbille de Mongolie ³⁴. En effet, leur cochlée étant anatomiquement similaire à celle de l'humain et l'oreille interne étant facilement accessible chirurgicalement, ils représentent un bon modèle animal de surdité. Bien que, plus facilement manipulables et gérables, leur anatomie et la physiologie différentes découlant de leur petite taille ne font pas de ces espèces les plus adaptées. Ainsi, les gros modèles animaux tels que la brebis semblent plus adaptés pour un modèle animal de surdité et de chirurgie otologique. En effet, la brebis présente une anatomie de l'oreille moyenne et interne similaire à celle de l'humain. On retrouve une cochlée enroulée sur 2 tours $\frac{1}{2}$ de spires comme chez l'Homme, et les différentes structures de l'oreille interne ont été retrouvées, mesurées et sont proportionnelles à celles de l'Homme avec un ratio de $\frac{2}{3}$ ^{19,35,36}. Au niveau physiologique, le spectre auditif de la brebis est également comparable à l'Homme ^{20,37}. Sur des potentiels évoqués auditifs (PEA) du tronc cérébral réalisés sur des brebis, il avait été retrouvé un spectre fréquentiel comparable à celui de

l'Homme, avec néanmoins des latences et des amplitudes variables en fonction des ondes. Griffith et al. ³⁸ avaient enregistré des PEA chez des agneaux et les analysaient en fonction de leur développement. Les intervalles, les amplitudes et les latences d'ondes se modifiaient au cours des 7 premières semaines de vie indiquant une maturation des voies auditives centrales. L'onde V n'avait pas été retrouvée.

A. Etude radiologique comparative de l'oreille interne de brebis versus humain

1. Introduction

Le modèle animal en otologie et pour l'exploration de l'audition est largement dominé par les petits animaux tels que la souris, la gerbille de Mongolie et le cochon d'Inde, compte tenu de leur facilité d'hébergement et d'acquisition. Pourtant, ces petits animaux ne présentent que peu de similarité à l'Homme en termes d'anatomie et de physiologie.

Peu d'études ont été réalisées sur les gros animaux. L'abord mastoïdien a été comparé entre le cochon et la brebis, retenant la brebis comme modèle animal de chirurgie otologique plus adéquat^{39,40}. En effet, l'abord mastoïdien chez le cochon est rendu difficile du fait du tissu graisseux important et de l'absence de pneumatisation de la mastoïde. Chez la brebis, la mastoïde est plus facilement identifiable mais reste également peu pneumatisée rendant l'accès à l'oreille moyenne moins aisé. En revanche, l'oreille moyenne est assez similaire à celle de l'Homme ; la FR a une position et une orientation au sein de la bulle hypotympanique rendant son identification aisée et un prélèvement de périlymphe accessible. L'oreille interne est également similaire à celle de l'homme¹⁹, la cochlée réalisant 2 tours et demi de spires. Ainsi, pour l'analyse de la périlymphe ou l'insertion d'électrodes d'implant cochléaire, la brebis pourrait représenter un bon modèle animal.

Seules 2 équipes ont réalisé une analyse tomodensitométrique de l'oreille interne chez le gros animal, l'équipe de Seibel et al.¹⁹ avait étudié la brebis alors que Marx et al.⁴¹ avait réalisé des implantations cochléaires chez des macaques. Ils trouvaient des mesures plus petites que chez l'homme permettant tout de même une insertion d'électrodes d'implant cochléaire utilisé chez l'homme.

Pour nous aider à élaborer une technique chirurgicale d'accès à la FR, nous avons réalisé des TDM de rochers de brebis pour mieux comprendre l'anatomie et évaluer les éventuelles variantes anatomiques. Nous avons également cherché à relever la morphométrie de l'oreille interne de brebis pour s'assurer de notre choix de modèle animal.

Cette première partie consiste en l'analyse systématique de ces TDM, et d'en réaliser une comparaison avec les dimensions de l'oreille interne de l'Homme.

2. Sujets et Méthodes

Vingt rochers de brebis adultes ont été obtenus par l'Unité Expérimentale de physiologie animale de l'Orfrasière (âge moyen=3.4 ans). Chaque tête a eu une tomодensitométrie (TDM) des rochers, une évaluation neuroradiologique a été réalisée. La méthode est décrite ci-après.

a. *Protocole des TDM des rochers*

Les têtes cadavériques de brebis étaient maintenues sur un plateau en position de décubitus dorsal. Les TDM ont été réalisées sur la plateforme CIRE de l'INRA de Nouzilly, Centre-Val-de-Loire sur un appareil Siemens Somatom®. Le protocole d'acquisition répondait aux critères suivants : tube voltage = 140kV, tube current = 400 mAs/slice, pitch = 0.35, temps de rotation = 1s, champ de vue = 300mm, fenêtre = 24.7x10.7cm, matrice = 512x512, largeur de section = 0.6mm, incrément = 0.1mm.

Les TDM de rochers humains adultes étaient sélectionnées dans notre base de données selon les mêmes paramètres de protocole ; seules des TDM de rochers de femmes ont été sélectionnées dans le cadre d'un bilan pré-opératoire d'implant cochléaire afin d'éviter tout biais lié au sexe ⁴². Aucune malformation cochléaire n'a été détectée.

b. *Évaluation neuroradiologique*

L'évaluation scanographique a été faite par 2 examinateurs expérimentés en aveugle sur le logiciel PACS MIRC Carestream version 11.4.1.0324. Pour chaque oreille interne de brebis ou d'Homme, les dimensions de la cochlée ont été relevées, les critères étudiés étaient les suivants (*Figures 5 et 6*):

- Nombre de tours de spires: évaluation quantitative à partir de la fenêtre ronde jusqu'à l'apex ; compter un tour à chaque fois que l'on repasse par le plan de la fenêtre ronde (FR).
- Hauteur de la cochlée : dans les plans axial et sagittal, nous avons pris la mesure perpendiculaire à la ligne qui affleure le tour basal en passant par la FR. Une moyenne des mesures dans chaque plan a été retenue (a).
- Longueur de cochlée mesurée : après avoir « déroulé » la cochlée avec l'outil « analyse de vaisseaux », nous avons retenu la moyenne des mesures passant par la lumière centrale de la cochlée et passant sur la paroi externe (c).

- Longueur de cochlée calculée selon Jolly ⁴³ = $3,65A-3,63$; A étant la plus grande longueur entre la FR et la paroi latérale de la cochlée, en passant par le modiolus (b).
- Largeur de cochlée : mesure perpendiculaire à A, passant par le modiolus (b).
- Diamètre du tour apical : mesure entre les parois externes passant par le modiolus, sur une coupe passant par l'apex (h).
- Diamètre externe du tour basal : dans les plans frontal et sagittal, nous avons pris la mesure la plus grande entre la FR et la paroi latérale du tour basal (d). Une moyenne des mesures dans chaque plan a été retenue.
- Diamètre interne du tour basal : dans les plans frontal et sagittal, nous avons pris la mesure la plus grande entre les parois médiales du tour basal (e). Une moyenne des mesures dans chaque plan a été retenue.
- Diamètre de la FR : mesure dans le plan strict de la FR décrit par Saylisoy et al.⁴⁴ (g)
- Volume de cochlée : mesuré grâce à l'application 3D Doctor® après segmentation interactive de la cochlée (Figure 6).

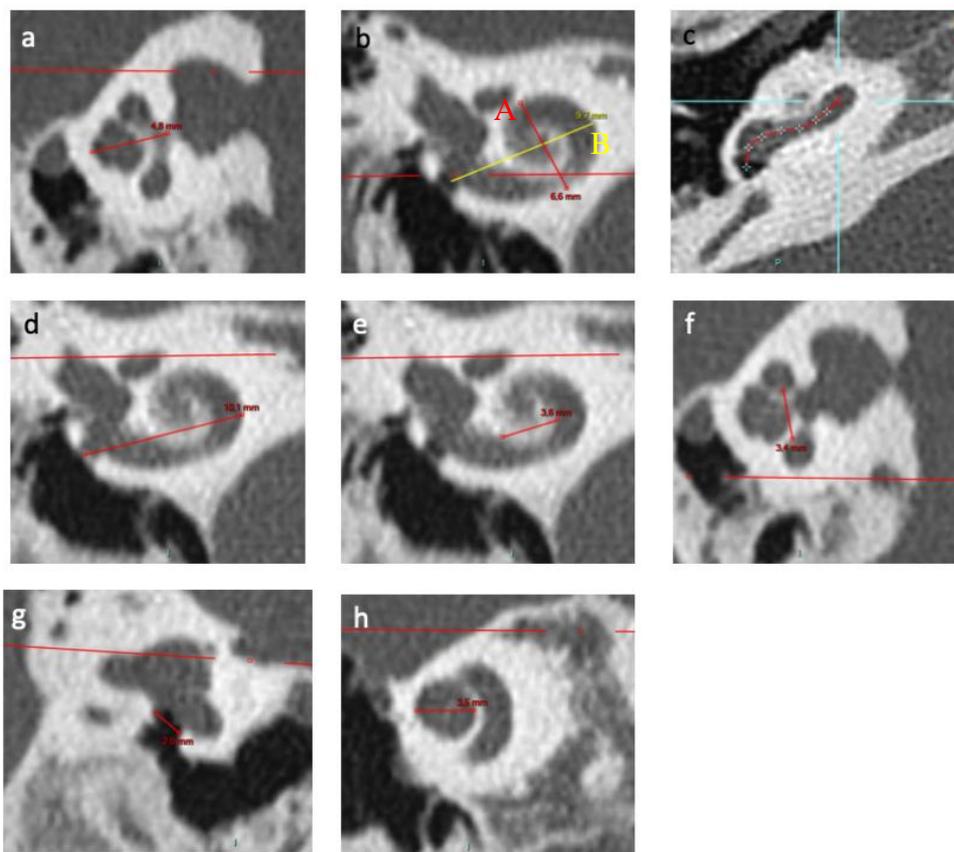


Figure 5 : Mesures réalisées sur une TDM de cochlée droite de femme

Légendes :

a) Hauteur de cochlée sur une coupe axiale

- b) Mesure de la longueur A sur une reconstruction de coupe passant par le modiolus. La mesure B représente la largeur de la cochlée.
- c) Identification de points dans le tour basal de la cochlée via l'application « analyse de vaisseaux » pour mesurer la longueur de cochlée déroulée. En exemple, mesure des points passant par la lumière centrale de la cochlée « déroulée ».
- d) Diamètre externe du tour basal de la cochlée sur une coupe frontale
- e) Diamètre interne du tour basal de la cochlée sur une coupe frontale
- f) Diamètre interne du tour basal de la cochlée sur une coupe sagittale
- g) Diamètre de la FR sur une reconstruction selon Saylisoy
- h) Diamètre du tour apical de la cochlée

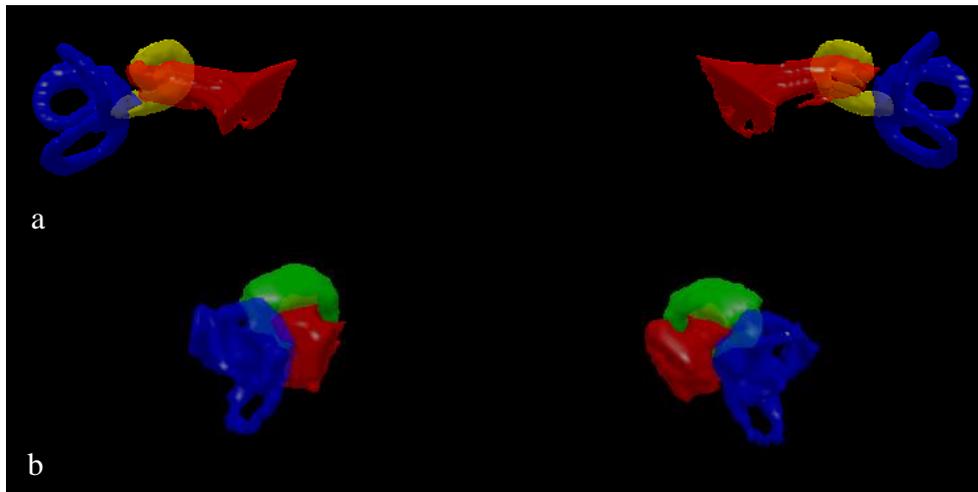


Figure 6 : Mesure des volumes des liquides de l'oreille interne et du méat acoustique interne chez l'Homme (a) et la brebis (b) à l'aide de 3D Doctor ®

c. Analyse statistique

Compte tenu d'une analyse de données quantitatives sur des échantillons indépendants, un test de Student a été utilisé pour comparer les dimensions de la cochlée de brebis versus humain.

3. Résultats

Vingt rochers de brebis et vingt rochers de femmes ont été analysés. L'étude de la morphologie de l'oreille interne a noté la présence des 3 canaux semi-circulaires, du vestibule et de la cochlée avec 2 tours $\frac{1}{2}$ de spires pour chaque rocher. La figure 7 présente une TDM des rochers de brebis (7a) et d'homme (7b) avec les éléments anatomiques principaux.

Une moyenne des valeurs mesurées par chaque examinateur a été retenue. Les moyennes des mesures morphologiques des 2 examinateurs sont regroupées dans les *Tableaux 1 et 2*.

La comparaison des mesures de la brebis et de l'humain a été faite avec un test de Student. Toutes les mesures réalisées - sauf le diamètre de la FR - sont significativement différentes ($p < 0,001$). Les valeurs de p montraient des différences significatives ($p < 0,001$) pour la hauteur de la cochlée, la longueur déroulée de la cochlée, la longueur A, la longueur de cochlée calculée selon la formule de Jolly, la largeur, le diamètre externe du tour basal de cochlée, le diamètre interne du tour basal de cochlée ($p = 0,001$), pour le diamètre du tour apical et pour le volume, $p < 0,001$. Les mesures du diamètre de la FR ne montraient pas de différence significative entre les brebis et l'humain ($p = 0,14$), ce qui est conforté par nos observations peropératoires, où la FR semble amener à un tour basal ampullaire.

Nous avons calculé le ratio $R = \frac{\text{Moyenne mesure X brebis}}{\text{Moyenne mesure X Homme}}$ pour l'ensemble des distances et volumes mesurés. Il été trouvé un ratio de $\frac{1}{2}$ pour les volumes de cochlée, $\frac{2}{3}$ pour la hauteur de cochlée, $\frac{3}{4}$ pour la longueur de cochlée déroulée et les autres mesures se rapprochent de celles de l'Homme avec un ratio à $\frac{4}{5}$.

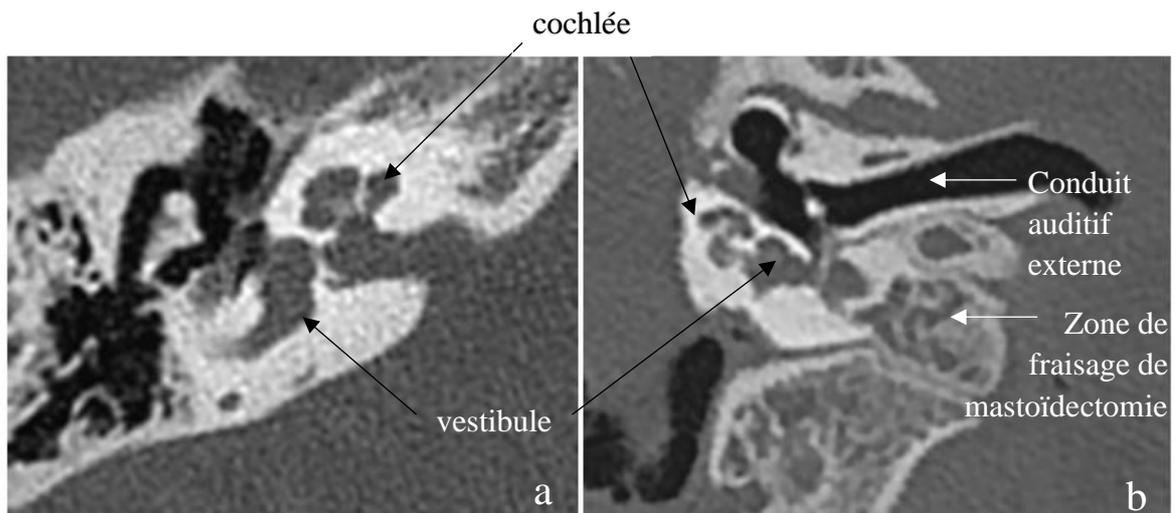


Figure 7 : Exemple de coupes axiales centrées sur la cochlée montre la similitude des cochlées humaines (a) et de brebis (b) et humaine de manière morphologique mais également de par sa position dans l'os temporal, en avant du vestibule. On remarquera l'absence de pneumatisation de la mastoïde de brebis.

Tableau 1 : Dimensions de cochlées sur des rochers de brebis.

Rochers de brebis	Age (ans)	Côté	Nombre de tours de spire	Hauteur (mm)	Longueur mesurée (mm)	Longueur A (mm)	Longueur calculée Formule de Jolly (mm)	Largeur (mm)	Diamètre externe du tour basal (mm)	Diamètre interne du tour basal (mm)	Diamètre du tour apical (mm)	Diamètre FR (mm)	Volume (mm ³)
1	4	D	2,5	2,36	19,01	6,8	21,19	5,02	6,8	2,31	2,61	2,28	47
2	4	G	2,5	2,53	20,92	7,43	23,47	4,83	7,12	2,75	2,91	2,05	45
3	4	D	2,5	2,1	21,4	8,3	26,67	5,14	7,25	2,73	2,92	1,73	46
4	4	G	2,5	2,27	21,58	8,34	26,79	5,13	7,34	2,69	2,9	1,7	44
5	5	D	2,5	2,6	22,37	7,84	24,97	5,01	7,4	2,43	2,75	1,8	37
6	5	G	2,5	2,45	22,46	8,22	26,35	5,5	7,48	2,83	2,83	1,78	38
7	6	D	2,5	2,83	21,09	7,45	23,54	4,89	7,91	2,87	2,89	1,78	43
8	6	G	2,5	2,7	20,76	7,74	24,6	5,69	7,65	2,48	2,83	1,69	40
9	2	D	2,5	2,06	20,42	7,77	24,71	5,08	6,93	2,79	2,78	2,14	63
10	2	G	2,5	2,43	19,37	7,71	24,51	5,04	6,56	2,3	2,97	1,98	62
11	2,75	D	2,5	2,15	21,51	7,83	24,95	5,59	6,48	2,44	2,78	1,89	73
12	2,75	G	2,5	2,65	20,95	7,92	25,28	5,44	6,98	2,41	2,91	1,77	73
13	2,75	D	2,5	2,47	19,92	7,61	24,15	5,24	6,65	2,44	2,75	1,96	44
14	2,75	G	2,5	2,45	20,26	7,78	24,77	5,29	6,86	2,37	2,93	1,97	43
15	2,75	D	2,5	2,52	21,13	7,72	24,55	5,13	7,25	2,38	2,98	1,76	47
16	2,75	G	2,5	2,4	19,66	7,48	23,67	5,53	7,31	2,37	2,92	1,72	54
17	2,75	D	2,5	2,47	21,79	7,22	22,7	5,1	6,68	2,32	2,74	1,77	40
18	2,75	G	2,5	2,49	19,69	7,22	22,7	5,18	6,71	2,58	2,74	1,58	37
19	2,25	D	2,5	2,37	20,99	7,67	24,37	4,78	7,19	2,57	2,78	1,69	44
20	2,25	G	2,5	2,51	19,45	7,4	23,36	4,94	7,26	2,43	2,92	1,55	42
Moyenne	3,425		2,5	2,44	20,74	7,67	24,37	5,18	7,11	2,52	2,84	1,83	48,1
DS	1,26		0	0,19	0,97	0,37	1,34	0,25	0,39	0,18	0,095	0,18	10,8

Légende : D : droit ; G : gauche ; mm : millimètre ; DS : déviation standard ; FR : fenêtre ronde

Tableau 2 : Dimensions de cochlées sur des rochers de femmes.

Rochers humains	Age (ans)	Côté	Nombre de tours de spire	Hauteur (mm)	Longueur mesurée (mm)	Longueur A (mm)	Longueur calculée Formule de Jolly (mm)	Largeur (mm)	Diamètre externe du tour basal (mm)	Diamètre interne du tour basal (mm)	Diamètre du tour apical (mm)	Diamètre FR (mm)	Volume (mm ³)
1	32	D	2,5	3,64	28,48	9,87	32,38	7,28	7,92	3,2	3,5	1,72	74
2	32	G	2,5	3,48	29,79	9,9	32,49	7,22	8,22	3,13	3,58	1,65	95
3	40	D	2,5	3,36	26,67	8,8	28,47	6,54	7,45	2,91	3,54	1,59	78
4	40	G	2,5	3,41	26,81	8,93	28,96	6,68	7,57	2,75	3,55	1,68	71
5	52	D	2,5	3,63	28,33	9,07	29,46	6,56	7,73	2,94	3,62	1,7	57
6	52	G	2,5	3,69	27	8,99	29,17	6,52	7,37	3,08	3,37	1,65	73
7	36	D	2,5	3,57	29,47	9,66	31,63	6,87	7,78	2,61	3,62	1,65	94
8	36	G	2,5	2,84	29,41	9,35	30,48	6,56	7,83	2,58	3,52	1,72	85
9	38	D	2,5	3,28	28,12	9,49	31,01	6,33	7,02	3,12	3,36	1,97	78
10	38	G	2,5	3,11	27,74	9,32	30,39	6,31	7,57	2,94	3,52	1,87	84
11	21	D	2,5	3,46	27,19	9,44	30,81	6,49	7,87	2,64	3,66	1,7	74
12	21	G	2,5	3,39	28,98	8,97	29,11	6,63	7,7	2,57	3,67	1,67	64
13	65	D	2,5	3,79	29,4	9,14	29,73	6,75	7,95	2,64	3,63	2,06	94
14	65	G	2,5	3,7	29,6	9,36	30,52	6,84	7,7	2,57	3,58	2,33	88
15	38	D	2,5	3,39	27,56	9,28	30,22	6,25	7,43	2,54	3,4	1,82	90
16	38	G	2,5	3,65	27,22	9,1	29,57	6,61	7,39	2,61	3,35	1,92	92
17	83	D	2,5	3,39	27,37	9,25	30,13	6,6	7,41	2,59	3,4	1,72	83
18	83	G	2,5	3,36	29,51	9,61	31,45	6,27	7,05	2,53	3,45	1,19	97
19	31	D	2,5	3,71	28,46	9,06	29,42	6,16	6,99	2,64	3,3	1,49	91
20	31	G	2,5	3,53	27,54	8,98	29,15	6,19	7,11	2,55	3,43	1,47	71
Moyenne	43,6		2,5	3,47	28,23	9,28	30,23	6,58	7,55	2,76	3,50	1,73	81,65
DS	17,82		0	0,23	1,05	0,31	1,14	0,31	0,34	0,23	0,11	0,24	11,2

Légende : D : droit ; G : gauche ; mm : millimètre ; DS : déviation standard; FR : fenêtre ronde

4. Discussion

Nous avons mesuré différentes dimensions de cochlées de brebis et d'humains. Nous avons montré la comparabilité morphologique de l'oreille interne de brebis avec celle de l'humain. Il existe néanmoins une différence de taille avec un ratio d'environ 2/3 comme il a été précédemment décrit¹⁹. Nos mesures sont comparables à celles décrites dans d'autres études et confortent la similarité de l'oreille interne de brebis avec celle de l'Homme (*Tableau 3*).

Concernant l'analyse du volume des liquides endocochléaires, on notait un ratio inférieur. La TDM des rochers n'est pas l'examen de référence pour l'étude de ces liquides qui sont normalement explorés par l'IRM avec des séquences hyperpondérées en T2. Il est probable qu'une étude utilisant l'IRM montrerait des mesures de volumes plus comparables à celles de l'homme.

Ainsi, la brebis semble être un bon modèle animal pour l'expérimentation otologique notamment sur l'insertion des électrodes d'implant cochléaire. En effet, la longueur de la cochlée déroulée est plus proche de celle mesurée chez l'Homme par rapport aux petits animaux. Compte tenu d'un spectre auditif comparable, cela suppose que la tonotopie serait comparable entre la brebis et l'Homme. De plus, ces distances de la cochlée se rapprochant de celles de l'Homme, permettraient une insertion de porte-électrodes utilisé en médecine humaine. La longueur de cochlée chez les chats se rapproche encore plus de celle de l'homme mais le nombre de tours de spire augmenté pourrait majorer les insertions traumatiques. De plus, le chat est de moins en moins utilisé, car moins accessible pour des raisons éthiques⁴⁵.

De même, avec des dimensions plus proches de l'Homme, on obtient également des volumes de périlymphe plus importants donc plus facilement analysables. Nous avons trouvé des dimensions de la FR similaires chez l'Homme et la brebis. L'expérimentation chirurgicale sur la FR de brebis pourrait être intéressante avant la pratique sur l'humain.

La brebis serait un bon modèle animal en otologie notamment pour le prélèvement de périlymphe. Nous avons alors posé notre choix sur des modèles ovins afin d'induire une SNS et d'en prélever la périlymphe à des fins d'analyse métabolomique.

Tableau 3 : Dimensions de cochlée chez d'autres espèces mammifères

	Largeur \pm DS (mm)	Hauteur \pm DS (mm)	Longueur \pm DS (mm)	Tours de spire
Cochon d'Inde	#	#	#	3 $\frac{1}{4}$ ⁴⁶ 3 $\frac{1}{2}$ - 3 $\frac{3}{4}$ ⁴⁷
Gerbille de Mongolie	2.6 \pm 0.1 ⁴⁸	3.4 \pm 0.1 ⁴⁸	10.9 \pm 0.43 ⁴⁸ 11.1 \pm 0.54 ⁴⁹	3 $\frac{1}{4}$ ⁴⁸ 2 $\frac{1}{2}$ - 3 ⁵⁰
Chat	#	4.45 \pm 0.24 ⁵¹	23 \pm 2.26 ⁵¹	3 $\frac{1}{2}$ - 3 $\frac{3}{4}$ ⁵¹
Humain	7.0 \pm 0.3 ⁵²	3.8 \pm 0.2 ⁵²	35.6 \pm 1.4 ⁵³	2 $\frac{1}{2}$ - 3 ⁵³
Humain (notre étude)	6.58 \pm 0.31	3.47 \pm 0.23	28.23 \pm 0.25	2 $\frac{1}{2}$
Brebis	#	#	19.9 \pm 1.7 ¹⁹	2 $\frac{1}{2}$ ³⁶
Brebis (notre étude)	5.18 \pm 0.25	2.44 \pm 0.19	20.74 \pm 0.97	2 $\frac{1}{2}$

B. Analyse métabolomique de la périlymphe sur un modèle ovin de surdité

1. Introduction

L'analyse de la périlymphe dans les SNS est motivée par le manque de connaissances sur les mécanismes physiopathologiques amenant à une surdité. Les étiologies des SNS étant nombreuses, il semblerait que la composition de ce liquide endocochléaire participant à la genèse de potentiels d'action au niveau du nerf cochléaire pourrait être différente selon les étiologies ⁵⁴. La métabolomique, reflétant toute altération intrinsèque ou extrinsèque d'un liquide biologique, permettrait de différencier la périlymphe d'un sujet normo-entendant, d'un sujet atteint de SNS. Ainsi, les différences relevées pourraient permettre d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes pathophysiologiques de différentes étiologies de SNS.

Le prélèvement de périlymphe chez un sujet normo-entendant entraînerait une perte auditive irréversible. Cette exploration n'est réalisable chez l'humain qu'en cas d'implantation cochléaire. Pour pouvoir étudier la périlymphe de sujet normo-entendant et la comparer à celle de sujets sourds, il est nécessaire de mettre au point un modèle animal de SNS pour comparer les périlymphe.

La brebis semble être un animal de choix par sa grande taille, sa facilité d'accès, son anatomie, et sa physiologie. En effet, nous avons précédemment montré que l'anatomie de l'oreille interne était suffisamment similaire à celle de l'Homme pour que le volume de périlymphe prélevé et analysé soit pertinent.

Les aminosides sont une famille d'antibiotiques utilisés dans les infections à bacille Gram négatif. Les principaux effets indésirables sont leur ototoxicité et leur néphrotoxicité ²⁴. En fonction des molécules, la toxicité néphrologique, cochléaire ou vestibulaire varie. Notre choix s'est porté sur la kanamycine pour son ototoxicité majoritairement cochléaire ⁵⁵. L'administration d'aminoglycosides entraîne une perte définitive des cellules ciliées externes de la cochlée via les différentes voies métaboliques de l'apoptose décrites dans les rappels ⁵. L'adjonction de furosémide – un diurétique de l'anse – permet une potentialisation de la destruction des cellules ciliées cochléaires grâce à une altération des cellules jonctionnelles entraînant une perméabilité de la strie vasculaire et du canal latéral, aux aminosides ⁵⁶. De plus, le furosémide agit également directement sur les cellules ciliées au niveau de l'apex cochléaire, au contraire des aminosides qui détruisent les cellules ciliées externes de la base ⁵⁷.

Cette deuxième partie consiste à l'induction d'une SNS ototoxique chez un modèle ovin, puis de faire une analyse métabolomique de la périlymphe afin d'en déduire les voies métaboliques impliquées dans la SNS.

2. Sujets et méthodes

a. Déroulement de l'étude

Ce protocole a été validé par le Comité d'éthique (APAFIS #2018112714344369).

Six brebis ont été obtenues par l'Unité Expérimentale de physiologie animale de l'Orfrasière. Chaque animal a passé 2 expérimentations sous anesthésie générale au sein de la plateforme CIRE de l'INRA de Nouzilly. La première expérimentation consistait en la réalisation d'une TDM des rochers, d'un enregistrement de PEA, de l'induction d'une ototoxicité sur une oreille. Le côté du modèle de SNS a été randomisé. La deuxième expérimentation a été réalisée 1 mois plus tard et consistait en l'enregistrement de PEA, de prélèvement de périlymphe sur les 2 oreilles (1 oreille sourde, 1 oreille NE) et prélèvement sanguin. Une fois les prélèvements recueillis, et échantillonnés sur la plateforme de l'INRA, ils étaient analysés au sein du laboratoire INSERM U1253 *iBrain*.

Chaque étape est décrite dans ce paragraphe.

b. Anesthésie générale

L'anesthésie générale a été induite par ventilation par Isoflurane 3% oxygène et injection intra-veineuse de 10mg/kg de kétamine (kétamidor) associée à 0.05mg/kg de xylazine (Rompun 2%), puis une intubation oro-trachéale a été réalisée (*Figure 8*).

c. TDM des rochers

Une TDM des rochers sans injection a été faite chez chaque animal afin d'analyser la morphologie de l'oreille interne, d'en dépister les éventuelles malformations et d'étudier la voie d'abord chirurgicale. Les scanners ont été réalisés selon le protocole qui suit : tube voltage 140kV, tube current 400 mAs/slice, pitch 0.35, temps de rotation 1sec, champs de vue 300mm, fenêtre 24.7x10.7cm, matrice 512x512, largeur de coupe 0.6mm, incrément 0,1mm.

d. PEA du tronc cérébral

Des PEA (*NavPRO ONE* Bio-logic® Otometrics) permettaient de confirmer le statut normo-entendant de la brebis grâce à un transducteur osseux B71W et des électrodes à aiguilles

sous-cutanées (*Figure 8*). Les seuils auditifs étaient recherchés de 50 à 20 dB pour la fréquence 3000Hz. Les stimuli étaient des « clicks » à une fréquence de modulation de 30Hz. Chaque oreille était testée. Les courbes ont été analysées avec le logiciel Biolink® après enregistrement et récupération des données.

Les ondes des PEA des oreilles NE ont été comparées à celles des SNS pour l'analyse des amplitudes, latences et seuils de l'onde IV.

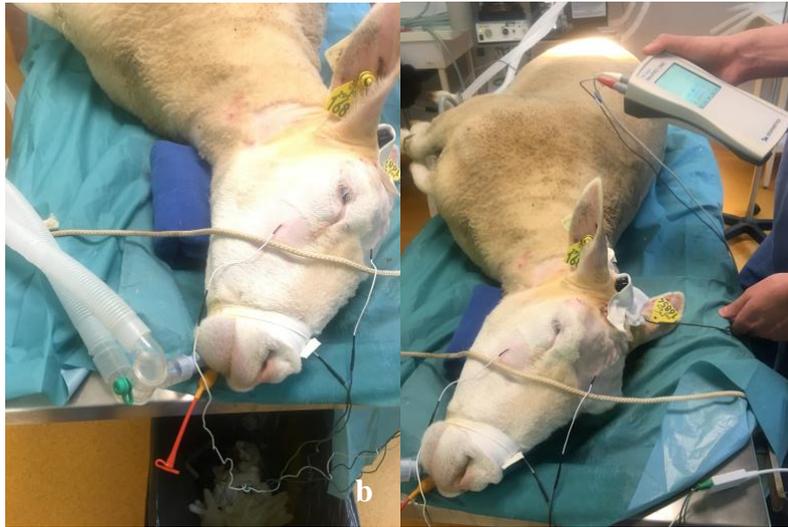


Figure 8 : a) Brebis sous anesthésie générale, intubation oro-trachéale.
b) Enregistrement de PEA par conduction osseuse

e. Procédure chirurgicale

Le statut NE a été défini comme la présence d'onde IV à 30dB. Le statut NE étant confirmé, la première procédure chirurgicale a consisté en l'induction d'une ototoxicité par injection locale au contact de la fenêtre ronde. Le côté du modèle de SNS à induire était randomisé. Après incision auriculaire postérieure, la technique chirurgicale suivait celle de la mastoïdectomie chez l'humain. Le fraisage de la mastoïde suivait le conduit auditif externe jusqu'à découvrir la bulle hypotympanique grâce à une fraise coupante Ø6 mm (Medtronic® Xomed). La chaîne ossiculaire était exposée en fraisant à la fraise ultradiamantée Ø3 mm vers le haut puis la fenêtre ronde pouvait être exposée en fraisant vers l'arrière. La visualisation de la fenêtre ronde était optimisée par l'ablation du nerf facial (*Figure 9*).

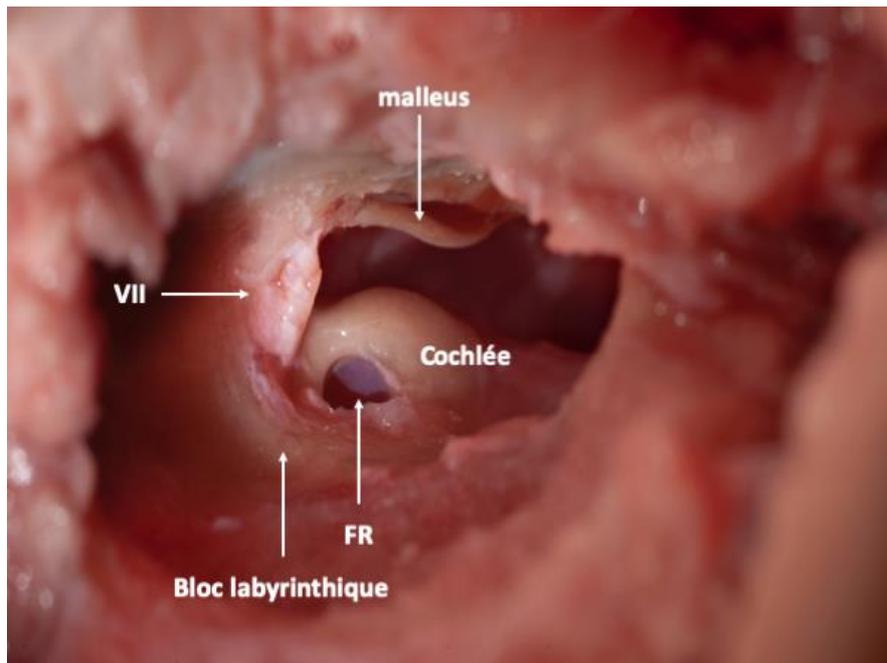


Figure 9 : Image per-opératoire d'une fenêtre ronde sur un rocher de brebis droit cadavérique.

Une fois la fenêtre ronde exposée, l'induction de la surdité était faite par administration de kanamycine 20mg dilué dans 1mL de NaCL et furosémide 1mL (50mg/10mL). L'administration était faite via une éponge résorbable (Gelita®) imbibée, au contact de la fenêtre ronde et la bulle hypotympanique était remplie par le mélange kanamycine/furosémide. Du Pangen® (tissu reconstitué à partir de collagène à résorption lente) comblait la cavité afin de maintenir le Gelita® au contact de la fenêtre ronde. La fermeture de la voie d'abord se faisait plan par plan.

f. Deuxième expérimentation

À un mois de la première expérimentation, les 6 brebis étaient de nouveau anesthésiées de manière générale comme indiqué ci-dessus.

Les PEA étaient réalisés afin de s'assurer du statut de surdité induite sur une oreille par la méthode de recherche de seuil. Le seuil auditif retenu était celui pour lequel l'intensité de stimulation ne provoquait pas d'onde IV.

On prélevait la périlymphe de l'oreille de SNS induite par ototoxicité en reprenant la voie d'abord précédemment réalisée, grâce à une aiguille 22G. De manière controlatérale, sur oreille normo-entendante, la même voie d'abord précédemment décrite était réalisée pour recueillir la périlymphe à travers la fenêtre ronde.

Les prélèvements de périlymphe ont tous été réalisés le matin.

A la suite de cette seconde expérimentation, chaque animal était sacrifié par surdosage de pentobarbital.

g. Extraction des métabolites

La technique de préparation des échantillons est décrite par Mavel et al. (2018) ¹⁶. Les échantillons de périlymphe ont été prélevés dans un tube sec. Tous les prélèvements ont été aliquotés dans des tubes de polypropylène et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse. Les métabolites ont été extraits avec 400 µL de méthanol ajoutés à 50 µL de périlymphe. Les échantillons étaient agités pendant 5 secondes puis incubés à -20°C pendant 30min afin de déprotéiniser le prélèvement. Après centrifugation de 25min à 5000rpm à 4°C, le surnageant (350µL) était récolté puis évaporé avec le SpeedVac concentrator à 40°C. Le résidu sec était re-suspendu dans 100 µL de méthanol/eau (75/25) puis 5 µL d'échantillon ont été injectés pour l'analyse en spectrométrie de masse. Les échantillons de contrôles qualités (QC) étaient préparés par un mélange à volume égal de tous les échantillons analysés (QC pour chaque type de matrice d'échantillons).

h. Analyse par LC/HRMS

La technique d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en haute résolution (LC/HRMS) a été décrite par Diémé et al. (2015) ⁵⁸. Les analyses ont été faites sur un système UPLC Ultimate WPS-3000 (Dionex, Germany) couplé à un spectromètre de masse Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) et l'ionisation a été effectuée selon le mode electrospray positif (ESI+) et négatif (ESI-). La chromatographie liquide a été réalisée avec une colonne HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) (1,6µm 150x2.10mm, 100Å), maintenue à 40°C. Deux phases mobiles ont été utilisées et les gradients chromatographiques se faisaient à un débit de 0,3mL/min. Durant l'acquisition, l'instrument fonctionnait à une résolution de 70000 ($m/z = 200$).

La figure 10 résume le déroulement de l'étude.

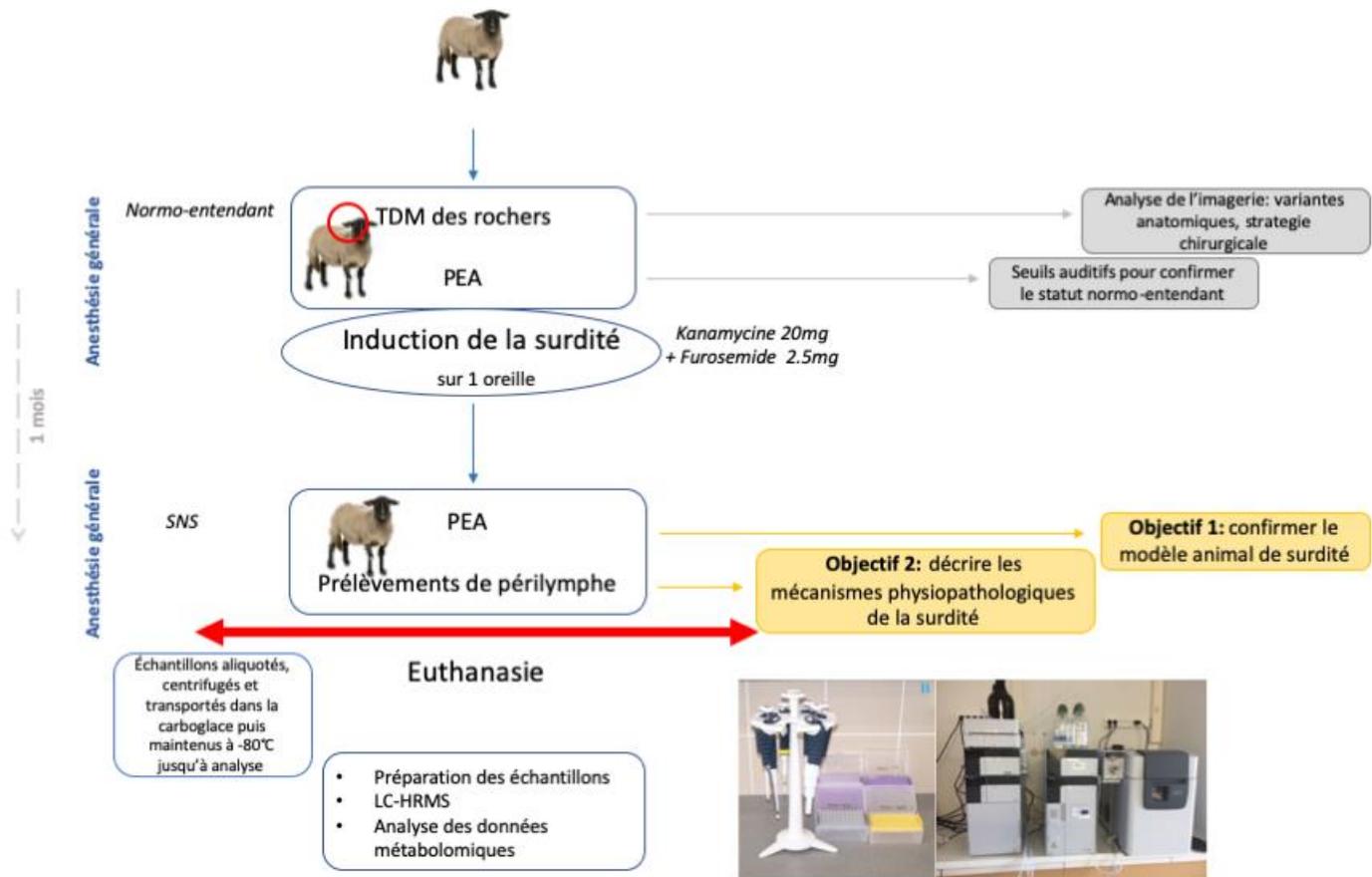


Figure 10 : Déroulement de l'étude. 6 brebis ont été étudiées selon ce protocole.

Légende : TDM: tomodensitométrie; PEA: potentiels évoqués auditifs ; LC-MS: liquid chromatography-high resolution mass spectrometry

i. Traitement des données

L'identification des métabolites a été effectuée à l'aide d'une bibliothèque de composés standard MSML® (Mass Spectrometry Metabolite Library, IROA Technologies™). La valeur des signaux a été calculée avec le logiciel Xcalibur® (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) en intégrant les pics de chromatographie correspondant aux métabolites sélectionnés.

Le coefficient de variation (CV) pour l'aire de chaque métabolite a été calculé pour les échantillons contrôles (QC) [$CV\% = (\text{dévi}ation\ standard / \text{moyenne}) \times 100$]. Les métabolites ayant un CV dans les QC supérieur à celui de l'échantillon et/ou $CV > 30\%$ étaient exclus.

j. Analyses statistiques

En raison du faible effectif des échantillons de brebis sourdes, l'analyse réalisée était surtout descriptive.

Le coefficient de variation (CV) de chaque métabolite a été calculé pour les brebis normo-entendantes et il a été comparé au CV de ces mêmes métabolites dans les QC afin d'évaluer la variabilité interindividuelle des concentrations relatives de métabolites de la périlymphe chez des animaux au départ a priori identiques. De même, le CV de chaque métabolite a été calculé pour les brebis après induction de la SNS et comparé au CV dans les QC pour évaluer la variabilité interindividuelle des concentrations relatives des métabolites du plasma chez des brebis sourdes.

Le pourcentage de variation des concentrations relatives de chaque métabolite dans la périlymphe des brebis entre le coté sourd et NE a été calculé et comparé au CV des QC pour ces mêmes métabolites, afin également d'appréhender la variabilité des concentrations relatives de métabolites de la périlymphe après exposition à une surdité. Les données obtenues ont été aussi analysées par analyse univariée et multivariée sans a priori, à titre descriptif (en raison des faibles effectifs).

L'analyse multivariée non supervisée en composantes principales (PCA, Principal Component Analysis) permet d'évaluer la distribution des échantillons. En représentant les QC et les différents échantillons de brebis, il est ainsi possible d'appréhender la variabilité interindividuelle des brebis par rapport à la variabilité analytique représentée par la distribution des QCs, complétant ainsi l'analyse des CV précédemment exposée.

L'analyse univariée était basée sur les volcano plots et les tests non paramétriques de Wilcoxon grâce à MetaboAnalyst (V 4.0). Les volcano plots ont été utilisés ici pour mettre en évidence les métabolites différents entre les échantillons de QC et les échantillons de brebis, pouvant ainsi refléter les métabolites ayant la plus grande variabilité interindividuelle entre les brebis. En abscisse (x), le fold change entre les 2 groupes est représenté en échelle logarithmique. En ordonnée (y), les valeurs p pour les tests T de Student des différences entre les 2 groupes sont représentées en échelle logarithmique négative.

3. Résultats

Six brebis ont suivi le protocole décrit ci-dessus. Chez 4 brebis, le prélèvement de périlymphe sur oreille de SNS n'a pas pu être réalisé devant les difficultés opératoires liées à la fibrose cicatricielle empêchant la visualisation de la FR.

a. Modèle ovin de surdité

Chez les 6 brebis, les PEA ont pu être recueillis avant et après induction de la SNS (Figure 11). Nous avons recueilli les seuils, amplitudes et latences des ondes IV retrouvées (Tableau 4).

Les 6 brebis étaient NE au début de l'étude. Après l'induction de la SNS, 50% des brebis avaient un seuil auditif supérieur à 50 dB. Sur l'autre moitié, les seuils de détection des PEA s'étaient élevés de 10 à 20 dB, le seuil moyen était de $37 \pm 5,8$ dB pour ces brebis. La comparaison des seuils sur l'oreille de SNS avant et après induction de la surdité pour les ondes IV était significative ($p=0,14$; test de Student).

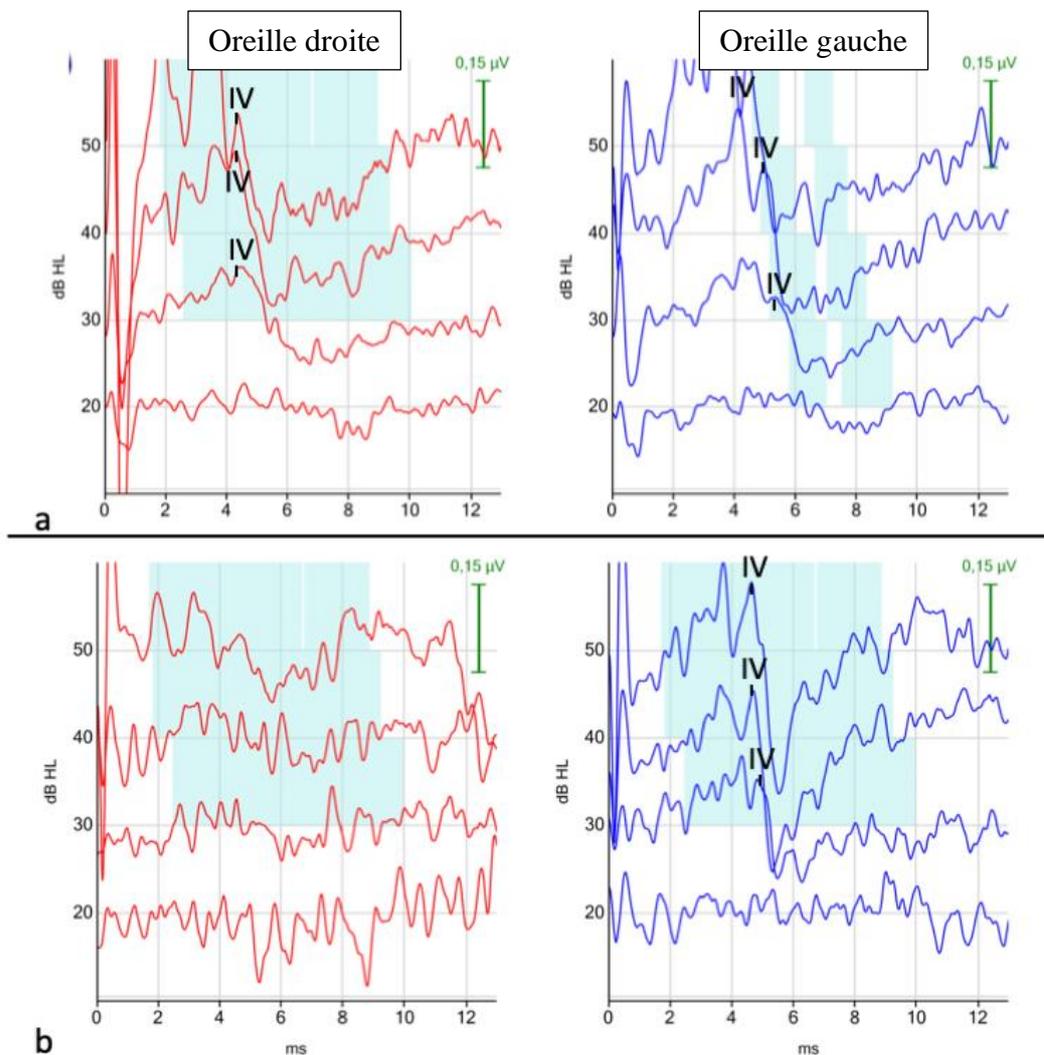


Figure 11 : PEA du tronc cérébral de la brebis 6.

a) PEA avant induction de la surdité : les ondes IV sont identifiées jusqu'à un seuil de 30dB à droite comme à gauche, témoignant du statut NE de manière bilatérale.

b) PEA à M1 après induction de la surdité : absence d'onde IV retrouvée à droite, témoignant de la surdité

Légende : courbes rouges : oreille droite ; courbes bleues : oreille gauche

Tableau 4 : Caractéristiques des ondes IV des PEA avant puis après induction de la surdité.

Brebis	Age (ans)	Poids (kg)	PEA initiaux							
			Oreille de surdité à induire				NE			
			Côté	Seuil (dB)	Amplitude (µV)	Latence (ms)	Côté	Seuil (dB)	Amplitude (µV)	Latence (ms)
1	2,75	58	D	30	0,065	3,8	G	20	0,117	4
2	2,75	61	D	40	0,067	3	G	30	0,045	3,9
3	2,75	67,7	G	30	0,125	4,5	D	30	0,151	4,2
4	2,75	56,3	G	20	0,103	6	D	30	0,133	4,5
5	2,75	58,5	G	20	0,109	5,5	D	20	0,057	5,9
6	2,25	56	D	30	0,121	4,9	G	30	0,214	4,6
Moyenne (DS)	2,7 (0,2)	59,6 (4,4)		28 (7,5)	0,098 (0,026)	4,62 (1,1)		27 (5,1)	0,1195 (0,062)	4,52 (0,73)

Brebis	Age (ans)	Poids (kg)	PEA à M1							
			SNS				NE			
			Côté	Seuil (dB)	Amplitude (µV)	Latence (ms)	Côté	Seuil (dB)	Amplitude (µV)	Latence (ms)
1	2,8	56	D	#	#	#	G	30	0,171	5,4
2	2,8	61	D	#	#	#	G	20	0,117	4
3	2,8	68	G	40	0,17	4,5	D	30	0,131	4,5
4	2,8	54,5	G	40	0,211	4,9	D	30	0,107	5,1
5	2,8	58	G	30	0,2	4,9	D	50	0,111	4,7
6	2,3	56	D	#	#	#	G	30	0,294	5,2
Moyenne (DS)	2,7 (0,2)	59,8 (5)		37 (5,8)	0,194 (0,021)	4,77 (0,23)		32 (9,8)	0,155 (0,072)	4,82 (0,52)

Légende : DS : déviation standard; SNS : surdité neurosensorielle ; NE : normo-entendant ; D : droit ; G : gauche ; M1 : 1 mois de l'induction de SNS

b. Analyse métabolomique de la périlymphe

Huit prélèvements de périlymphe ont été analysés (6 pour le statut NE et 2 pour des SNS induites). Au total, nous avons pu identifier 101 métabolites. Il n'existait pas d'outliner pour les échantillons contrôle (QC).

En comparant les CV des échantillons de périlymphe saine et de SNS induite aux CV des QC, seuls 3 métabolites (2,6-dihydroxypyridine, cortisol 21-acetate, L-lysine) présentaient des CV QC > CV échantillons.

La comparaison des CV des échantillons de périlymphe de brebis NE a permis de retrouver 9 métabolites (2,6-dihydroxypyridine ; cortisol 21-acetate ; 5-valerolactone ; L-asparagine ; L-threonine ; cytosine ; 2-methylglutaric acid ; methyl glutarate ; acide adipic) dont les CV QC étaient supérieurs aux CV échantillons.

Nous avons également comparé le pourcentage de variation des concentrations relatives des métabolites entre les échantillons de périlymphe saine et sourde. Seuls 2 prélèvements de périlymphe sourde ont pu être recueillis, empêchant toute analyse statistique. Ainsi, la comparaison de leur CV avec ceux des QC était purement descriptive. Pour la brebis 1, les CV de 38 métabolites étaient supérieurs aux CV des QC. Pour la brebis 2, les CV de 42 métabolites étaient supérieurs aux CV des QC. Entre les 2 brebis, on observe également que les CV sont très différents avec des valeurs pouvant différer jusqu'à 200%.

L'analyse des PCA des prélèvements de brebis NE confirme une variabilité intra-groupe importante (*Figure 12*). Les points rouges représentant les brebis NE sont dispersés par rapport aux échantillons contrôle (points verts).

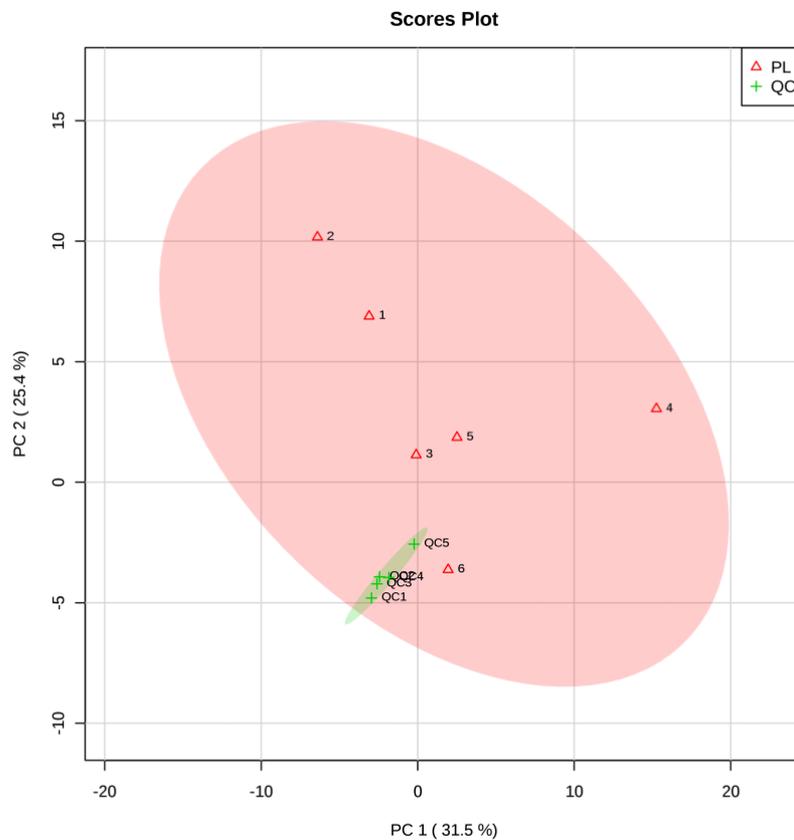


Figure 12 : Analyse multivariée non supervisée en PCA pour la périlymphe de brebis NE (triangle rouge).

Légende : PC : principal component ; PL : périlymphe de brebis NE ; QC : échantillon contrôle

L'analyse univariée basée sur les volcano plots a permis de mettre en évidence 8 métabolites significativement entre la périlymphe d'oreille saine et les QC (*Figure 13*), témoignant ainsi des métabolites ayant une grande variabilité interindividuelle.

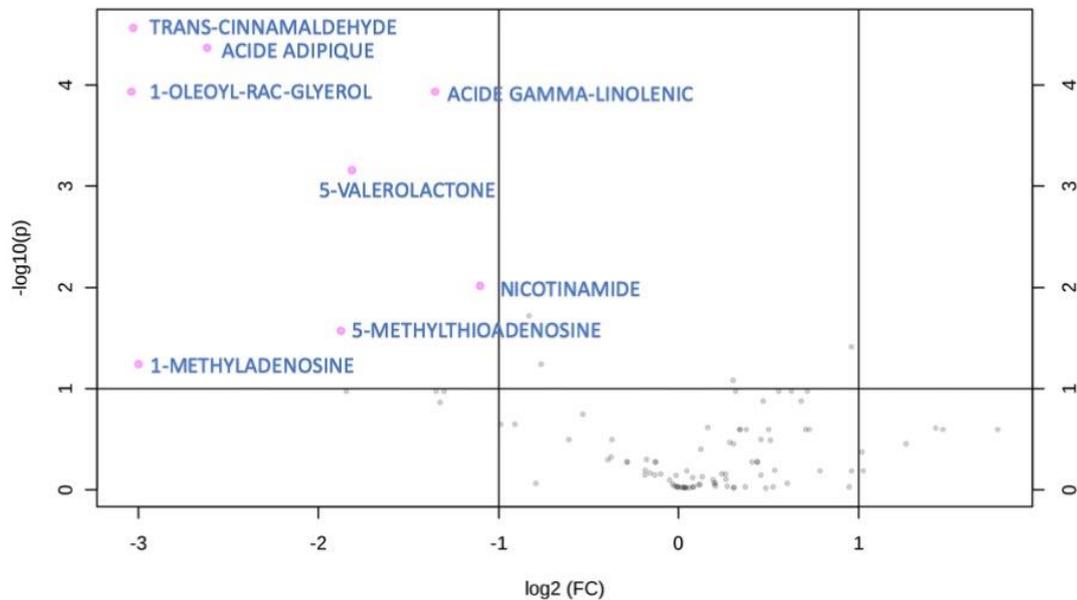


Figure 13 : Analyse univariée basée sur les volcano plots entre échantillons contrôles et échantillons de périlymphe saine.
Légende : p : p-value ; FC : fold-change

4. Discussion

a. Modèle ovin de surdité

Nous n'avons que partiellement confirmé notre modèle ovin de SNS par ototoxicité liée aux aminosides (kanamycine) et aux diurétiques de l'anse (furosémide) par administration locale. La mesure des PEA avant l'induction de la surdité a permis de confirmer le statut NE de la brebis et l'analyse des PEA après ototoxicité a permis de montrer une élévation ou l'absence de seuils, signant la perte auditive. Ainsi, malgré l'absence de différence significative, il existe cependant une tendance permettant de conclure à une SNS acquise par administration locale d'aminosides et furosémide.

Notre méthodologie concernant l'induction de la surdité différait de celles retrouvées dans la littérature. Nous avons effectué une administration locale d'aminoglycosides associés à des diurétiques de l'anse. L'association des diurétiques de l'anse a été motivée par la synergie qu'ils appliquent sur la perte des cellules ciliées internes et externes. En effet, les aminoglycosides n'agissant que sur les fréquences aiguës, l'ajout de diurétiques de l'anse permet l'atteinte des

cellules ciliées à l'apex de la cochlée ⁵⁷. Le mécanisme d'action des aminoglycosides sur la cochlée est bien connu : une perte des cellules ciliées internes et externes à la base de la cochlée est induite par accumulation de ROS entraînant une dégénération des neurones auditifs ^{24,59,60}. Ainsi, on pourrait s'attendre à retrouver dans la périlymphe des marqueurs du stress oxydatif tels que le malondialdéhyde, les F2-isoprostanes, les LDL, les produits d'oxydation des lipides, l'acroléine, le 4-hydroxynonanal, ou encore l'allantoïne, produit non enzymatique d'oxydation de l'acide urique ⁶¹. Ce dernier semble être un biomarqueur prometteur pour le stress oxydatif car il est indépendant de la concentration d'acide urique et est facilement détectable chez l'Homme ⁶².

Ici, l'application locale n'est pas un bon modèle de surdité chez la brebis. D'une part, seules 50% des SNS ont été effectivement induites ; d'autre part, l'administration locale d'ototoxiques a rendu les prélèvements de périlymphe difficiles. De même, pour toute chirurgie liée à l'oreille moyenne ou interne, ce modèle de surdité n'est pas à retenir.

D'autres modèles de surdité ont été décrits en fonction de l'étiologie étudiée. Ainsi, des souris transgéniques ⁶³, des surdités induites par le bruit ⁶⁴ ou les sels de platine ⁶⁵ ont été utilisés afin de mieux comprendre les surdités neurosensorielles. Il serait alors intéressant de poursuivre nos explorations avec cette stratégie afin d'étudier les différentes étiologies grâce aux différents modèles de surdité décrits, pour comprendre les différents mécanismes physiopathologiques et donc, découvrir les différentes voies métaboliques impliquées dans les SNS.

b. Analyse métabolomique de la périlymphe

Tous les prélèvements de périlymphe ont été réalisés le matin afin d'éviter un éventuel biais lié au cycle nyctéméral de la composition de périlymphe.

Seuls 2 prélèvements de périlymphe sur oreille sourde ont pu être réalisés, rendant toute conclusion sur l'analyse métabolomique des échantillons impossible. Nous avons seulement pu faire une analyse descriptive des métabolites identifiés et de leurs coefficients de variabilité. Le faible nombre de métabolites ayant un $CV > CV_{QC}$ montre la grande variabilité interindividuelle qu'il existe dans cette espèce. Sur les échantillons de périlymphe, seuls 9 métabolites sur 101 identifiés étaient dans cette situation. Ainsi, les QC étant un pool de tous les échantillons, on pourrait conclure qu'il existe une grande variabilité entre les brebis NE a priori identiques initialement. De même, les analyses multivariée et univariée confirmaient cette variabilité. Ainsi, les 8 métabolites mis en évidence par les volcano plots sont considérés comme ayant une trop grande variabilité afin de les analyser pour comparer les périlymphe de brebis sourdes ou NE.

Au final, il existe une grande variabilité intra-espèce sur l'analyse métabolomique de la périlymphe chez la brebis, rendant les comparabilités interindividuelles discutables.

Néanmoins, les études métabolomiques de la périlymphe chez d'autres espèces n'ont pas fait de telles comparaisons. Seules deux études existent sur l'analyse métabolomique des liquides endocochléaires ; Fujita et al. (2015) ont analysé le liquide endocochléaire chez 35 cochons d'Inde, mis en évidence 77 métabolites au total et comparé le métabolome avant et après exposition au bruit ⁶⁶. Dix métabolites étaient significativement différents après exposition au bruit, et les concentrations de 15 métabolites différaient entre le liquide endocochléaire et le plasma. Ji et al. (2019) ⁶⁷ ont analysé, non pas les liquides endocochléaires, mais une solution à partir d'échantillon tissulaire d'oreille interne chez des souris. Ainsi, ils ont montré que le métabolome se modifiait avec le temps d'exposition au bruit, et ont pu identifier 220 métabolites.

Bien que nos résultats n'aient été que peu concluants ici, cette technique d'analyse semble pourtant prometteuse et nos techniques de prélèvement et d'induction de la surdité méritent davantage d'explorations.

III. DISCUSSION

L'élaboration du projet a nécessité la collaboration de l'équipe de l'INRA. Plusieurs rencontres ont été nécessaires afin de déterminer la faisabilité de l'étude, le plateau technique et le matériel nécessaire, l'accès aux animaux.

L'absence de protocole de TDM de rocher sur brebis ainsi que le manque d'expérience de telles acquisitions par les techniciens ont été un frein initial. Ainsi, plusieurs acquisitions ont dû être renouvelées, et des rencontres avec des neuroradiologues du CHU de Tours ont permis l'élaboration d'un protocole adéquat pour avoir une image de qualité. Ainsi, grâce à un rétrécissement des fenêtres d'analyse, et un meilleur fenêtrage osseux, les images scanographiques ont pu être analysées.

Le protocole a été modifié à plusieurs reprises. La première modification concernait la voie d'administration des médicaments ototoxiques. La voie d'administration initialement retenue était l'injection parentérale de kanamycine et furosémide ; devant l'impossibilité de se procurer de la kanamycine injectable, notre choix s'est porté sur une administration locale. La kanamycine par voie IV n'étant plus commercialisée depuis fin 2018, nous nous sommes procuré de la kanamycine en poudre à usage de laboratoire pour la recherche. Ce choix a eu plusieurs conséquences : l'administration locale a nécessité une voie d'abord chirurgicale, impliquant des temps opératoires rallongés. Le protocole initial comportait un prélèvement de périlymphe à 1 mois d'intervalle (M0 : prélèvement sur oreille NE ; M1 : prélèvement sur oreille sourde controlatérale), mais les durées opératoires ne permettant pas de réaliser 2 mastoïdectomies en une intervention (prélèvement sur oreille saine + administration locale sur l'oreille controlatérale), nous avons modifié le protocole pour ne faire qu'une mastoïdectomie par intervention. Ainsi, la première intervention (à M0) consistait en l'induction de la surdité et la seconde permettait le prélèvement de périlymphe sur les 2 oreilles (à M1), la mastoïdectomie du côté de l'induction de la surdité étant déjà réalisée. Ce changement de protocole nous a permis d'une part, de diminuer les risques de néphrotoxicité liés à l'injection parentérale d'aminosides et diurétiques de l'anse en grande concentration ; et, d'autre part, de prélever la périlymphe au même moment et ainsi éviter tout biais d'analyse lié au facteur temps.

Les différences anatomiques avec l'Homme, notamment de la position de la fenêtre ronde et du nerf facial, ont nécessité des entraînements sur tête cadavérique afin de mettre au point une technique chirurgicale fiable et reproductible. Malgré plusieurs séances d'entraînement, les prélèvements de périlymphe n'ont pas pu être tous réalisés. Sur les oreilles de SNS induite, le tissu inflammatoire responsable de saignements importants, la régénération osseuse et compte

tenu de la difficulté à repérer les balises anatomiques suite à la précédente chirurgie ont rendu impossible la visualisation de la FR chez 4 brebis.

Le nombre de prélèvement de périlymphe de SNS induite étant $n=2$, aucune analyse statistique n'a pu être réalisée. Ainsi, l'analyse métabolomique initialement prévue n'a pas été faite. Pour contourner les limites statistiques, une étude observationnelle des différents métabolites retrouvés a été faite afin de les comparer aux échantillons contrôle.

Bien que nos résultats ne soient pas très concluants, nous poursuivrons notre étude afin d'améliorer nos techniques de prélèvement et l'induction de la surdité.

Ainsi, les prochaines expérimentations consisteront en l'induction d'une surdité par exposition au bruit. Après prélèvement de périlymphe sur une oreille de brebis NE (comme précédemment décrit), sous anesthésie générale, 6 brebis seront exposées à un bruit de 160dB pendant 1h. Le prélèvement de périlymphe de SNS induite sera réalisé dans le même temps anesthésique. Les difficultés au prélèvement inhérentes aux conditions post-opératoires seront donc évitées. Les prélèvements se feront dans un même temps, limitant tout biais éventuel lié à ce facteur.

Nous préleverons également le plasma chez chaque brebis ; un prélèvement sera réalisé avant puis après induction de la surdité, ce qui nous permettra également d'en faire une comparaison du métabolome.

D'autres modèles de SNS seront ensuite nécessaires pour pouvoir comparer les métabolomes des périlymphe d'étiologies différentes. Une fois les statuts NE et sourd confirmés comme significativement différents, l'analyse métabolomique de la périlymphe chez l'Homme pourra être réalisée.

Nous avons déjà montré la faisabilité de l'analyse métabolomique de la périlymphe chez l'Homme et montré que le métabolome différait en fonction de la durée de surdité ¹⁷ ; mais, étant donné l'hétérogénéité du groupe concernant les étiologies, ce paramètre n'était pas analysable. Par la suite, grâce à de plus grandes cohortes, nous chercherons à attribuer un métabolome pour chaque étiologie et en décrire les voies métaboliques impliquées.

IV. CONCLUSION

Grâce à l'étude radio-anatomique de l'oreille interne de brebis, nous avons montré la comparabilité anatomique avec celle de l'humain. La brebis semble être un modèle animal convenable pour les expérimentations liées à la cochlée, telles que le prélèvement de périlymphe ou l'implantation cochléaire.

L'administration locale d'aminosides et de diurétiques de l'anse utilisée comme modèle d'induction de la SNS ne peut pas être considéré comme un modèle de choix compte tenu des difficultés opératoires engendrées par la suite et des résultats incertains sur la perte d'audition.

Nous avons tout de même montré que le prélèvement de périlymphe était réalisable chez la brebis via la FR. Avec la périlymphe de brebis normo-entendante, nous avons également pu étudier le métabolome de ce liquide endocochléaire et montré qu'il existait une grande variabilité intra-espèce.

V. REFERENCES

1. WHO | Estimates. *WHO* <http://www.who.int/deafness/estimates/en/>.
2. Population par âge – Tableaux de l'économie française | Insee. <https://www.insee.fr/fr/statistiques/4277619?sommaire=4318291>.
3. Schmidt, P., Leveque, M., Danvin, J.-B., Leroux, B. & Chays, A. [Systematic hearing screening for newborns in the Champagne-Ardennes region: 32,500 births in 2 years of experience]. *Ann. Oto-Laryngol. Chir. Cervico Faciale Bull. Soc. Oto-Laryngol. Hopitaux Paris* **124**, 157–165 (2007).
4. Gates, G. A. *et al.* Presbycusis. *Otolaryngol.-Head Neck Surg. Off. J. Am. Acad. Otolaryngol.-Head Neck Surg.* **100**, 266–271 (1989).
5. Huth, M. E., Ricci, A. J. & Cheng, A. G. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. *Int. J. Otolaryngol.* **2011**, 937861 (2011).
6. Petit, C., Levilliers, J. & Hardelin, J. P. Molecular genetics of hearing loss. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 589–646 (2001).
7. Kral, A. & O'Donoghue, G. M. Profound deafness in childhood. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1438–1450 (2010).
8. Smith, R. J. H., Bale, J. F. & White, K. R. Sensorineural hearing loss in children. *Lancet Lond. Engl.* **365**, 879–890 (2005).
9. Anniko, M. & Wróblewski, R. Ionic environment of cochlear hair cells. *Hear. Res.* **22**, 279–293 (1986).
10. Morizono, T. & Ikeda, K. The effects of cetrimide and potassium bromate on the potassium ion concentration in the inner ear fluid of the guinea-pig. *Physiol. Bohemoslov.* **37**, 241–247 (1988).
11. Dallos, P. & Evans, B. N. High-frequency motility of outer hair cells and the cochlear amplifier. *Science* **267**, 2006–2009 (1995).

12. Silverstein, H. Biochemical studies of the inner ear fluids in the cat. Preliminary report. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **75**, 48–63 (1966).
13. Thalmann, I. *et al.* Protein profile of human perilymph: in search of markers for the diagnosis of perilymph fistula and other inner ear disease. *Otolaryngol.--Head Neck Surg. Off. J. Am. Acad. Otolaryngol.-Head Neck Surg.* **111**, 273–280 (1994).
14. Lysaght, A. C. *et al.* Proteome of human perilymph. *J. Proteome Res.* **10**, 3845–3851 (2011).
15. Hollywood, K., Brison, D. R. & Goodacre, R. Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics* **6**, 4716–4723 (2006).
16. Mavel, S. *et al.* Validation of metabolomics analysis of human perilymph fluid using liquid chromatography-mass spectroscopy. *Hear. Res.* **367**, 129–136 (2018).
17. Trinh, T.-T. *et al.* Relationship between Metabolomics Profile of Perilymph in Cochlear-Implanted Patients and Duration of Hearing Loss. *Metabolites* **9**, (2019).
18. Rogers, C. S. Engineering Large Animal Species to Model Human Diseases. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **90**, 15.9.1-15.9.14 (2016).
19. Seibel, V. A., Lavinsky, L. & Irion, K. CT-Scan sheep and human inner ear morphometric comparison. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **72**, 370–376 (2006).
20. Hill, M. W., Heavens, R. P. & Baldwin, B. A. Auditory evoked potentials recorded from conscious sheep. *Brain Res. Bull.* **15**, 453–458 (1985).
21. ORL Audition : L'oreille, un organe pour entendre. http://www.orl-info.com/audition/l_oreille.shtml.
22. Histologie des organes. <https://doc-pedagogie.umontpellier.fr/medecine/histologieLV/index.php?module=detail&subaction=desc&vue=4&itm=182&g=1&d=1>.
23. Davis, A. C. The prevalence of hearing impairment and reported hearing disability

- among adults in Great Britain. *Int. J. Epidemiol.* **18**, 911–917 (1989).
24. Jiang, M., Karasawa, T. & Steyger, P. S. Aminoglycoside-Induced Cochleotoxicity: A Review. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 308 (2017).
 25. Campbell, J. & Sharma, A. Visual Cross-Modal Re-Organization in Children with Cochlear Implants. *PloS One* **11**, e0147793 (2016).
 26. Bakhos, D., Galvin, J., Roux, S., Lescanne, E. & Bruneau, N. Cortical Processing of Vocal and Nonvocal Sounds in Cochlear-Implanted Children: An Electrophysiological Study. *Ear Hear.* **39**, 150–160 (2018).
 27. Legris, E. *et al.* Cortical reorganization after cochlear implantation for adults with single-sided deafness. *PloS One* **13**, e0204402 (2018).
 28. Tirko, N. N. & Ryugo, D. K. Synaptic plasticity in the medial superior olive of hearing, deaf, and cochlear-implanted cats. *J. Comp. Neurol.* **520**, 2202–2217 (2012).
 29. Cunningham, L. L. & Tucci, D. L. Hearing Loss in Adults. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2465–2473 (2017).
 30. Wong, A. C. Y. & Ryan, A. F. Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea. *Front. Aging Neurosci.* **7**, 58 (2015).
 31. Lamichhane, S., Sen, P., Dickens, A. M., Orešič, M. & Bertram, H. C. Gut metabolome meets microbiome: A methodological perspective to understand the relationship between host and microbe. *Methods San Diego Calif* **149**, 3–12 (2018).
 32. Schmitt, H. *et al.* Heat Shock Proteins in Human Perilymph: Implications for Cochlear Implantation. *Otol. Neurotol. Off. Publ. Am. Otol. Soc. Am. Neurotol. Soc. Eur. Acad. Otol. Neurotol.* **39**, 37–44 (2018).
 33. Honeder, C. *et al.* Cochlear Implantation in the Guinea Pig. *J. Vis. Exp. JoVE* (2018) doi:10.3791/56829.
 34. Wiegner, A., Wright, C. G. & Vollmer, M. Multichannel cochlear implant for selective

neuronal activation and chronic use in the free-moving Mongolian gerbil. *J. Neurosci. Methods* **273**, 40–54 (2016).

35. Seibel, V. A. A., Lavinsky, L. & De Oliveira, J. A. P. Morphometric study of the external and middle ear anatomy in sheep: a possible model for ear experiments. *Clin. Anat. N. Y. N* **19**, 503–509 (2006).

36. Soares, H. B. & Lavinsky, L. Histology of sheep temporal bone. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **77**, 285–292 (2011).

37. Ames, D. R. & Arehart, L. A. Physiological response of lambs to auditory stimuli. *J. Anim. Sci.* **34**, 994–998 (1972).

38. Griffiths, S. K., Pierson, L. L., Gerhardt, K. J., Abrams, R. M. & Peters, A. J. Auditory brainstem response in sheep. Part II: Postnatal development. *Dev. Psychobiol.* **29**, 53–68 (1996).

39. Gurr, A., Kevenhörster, K., Stark, T., Pearson, M. & Dazert, S. The common pig: a possible model for teaching ear surgery. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* **267**, 213–217 (2010).

40. Gurr, A., Pearson, M. D. & S, D. [Lambs' temporal bone anatomy under didactic aspects]. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **77**, 51–57 (2011).

41. Marx, M. *et al.* Cochlear implantation feasibility in rhesus macaque monkey: anatomic and radiologic results. *Otol. Neurotol. Off. Publ. Am. Otol. Soc. Am. Neurotol. Soc. Eur. Acad. Otol. Neurotol.* **34**, e76-81 (2013).

42. Miller, J. D. Sex differences in the length of the organ of Corti in humans. *J. Acoust. Soc. Am.* **121**, EL151-155 (2007).

43. Mistrík, P. & Jolly, C. Optimal electrode length to match patient specific cochlear anatomy. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* **133**, S68–S71 (2016).

44. Saylisoy, S., Incesulu, A., Kaya, E., Pinarbasli, O. & Adapinar, B. The round window diameter in congenital aural atresia and comparison with sensorineural hearing loss and control group. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **38**, 461–463 (2014).
45. Andersen, M. L. & Winter, L. M. F. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *An. Acad. Bras. Cienc.* **91**, e20170238 (2019).
46. Goksu, N. *et al.* Anatomy of the guinea pig temporal bone. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **101**, 699–704 (1992).
47. Wysocki, J. Topographical anatomy of the guinea pig temporal bone. *Hear. Res.* **199**, 103–110 (2005).
48. Plassmann, W., Peetz, W. & Schmidt, M. The cochlea in gerbilline rodents. *Brain. Behav. Evol.* **30**, 82–101 (1987).
49. Müller, M. The cochlear place-frequency map of the adult and developing mongolian gerbil. *Hear. Res.* **94**, 148–156 (1996).
50. Lay, D. M. The anatomy, physiology, functional significance and evolution of specialized hearing organs of gerbilline rodents. *J. Morphol.* **138**, 41–120 (1972).
51. Wysocki, J. Dimensions of the vestibular and tympanic scalae of the cochlea in selected mammals. *Hear. Res.* **161**, 1–9 (2001).
52. Shin, K.-J. *et al.* Quantitative analysis of the cochlea using three-dimensional reconstruction based on microcomputed tomographic images. *Anat. Rec. Hoboken NJ 2007* **296**, 1083–1088 (2013).
53. Kawano, A., Seldon, H. L. & Clark, G. M. Computer-aided three-dimensional reconstruction in human cochlear maps: measurement of the lengths of organ of Corti, outer wall, inner wall, and Rosenthal's canal. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **105**, 701–709 (1996).
54. Silverstein, H. A rapid protein test for acoustic neurinoma. *Arch. Otolaryngol. Chic. Ill 1960* **95**, 202–204 (1972).

55. Bremer, H. G., de Groot, J. C. M. J., Versnel, H. & Klis, S. F. L. Combined administration of kanamycin and furosemide does not result in loss of vestibular function in Guinea pigs. *Audiol. Neurootol.* **17**, 25–38 (2012).
56. Ding, D. *et al.* Ototoxic effects and mechanisms of loop diuretics. *J. Otol.* **11**, 145–156 (2016).
57. Hirose, K. & Sato, E. Comparative analysis of combination kanamycin-furosemide versus kanamycin alone in the mouse cochlea. *Hear. Res.* **272**, 108–116 (2011).
58. Diémé, B. *et al.* Metabolomics Study of Urine in Autism Spectrum Disorders Using a Multiplatform Analytical Methodology. *J. Proteome Res.* **14**, 5273–5282 (2015).
59. Jiang, M., Taghizadeh, F. & Steyger, P. S. Potential Mechanisms Underlying Inflammation-Enhanced Aminoglycoside-Induced Cochleotoxicity. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, (2017).
60. Morrill, S. & He, D. Z. Z. Apoptosis in inner ear sensory hair cells. *J. Otol.* **12**, 151–164 (2017).
61. Czerska, M., Mikołajewska, K., Zieliński, M., Gromadzińska, J. & Wąsowicz, W. Today's oxidative stress markers. *Med. Pr.* **66**, 393–405 (2015).
62. Kand'ár, R. & Záková, P. Allantoin as a marker of oxidative stress in human erythrocytes. *Clin. Chem. Lab. Med.* **46**, 1270–1274 (2008).
63. Fetoni, A. R. *et al.* Cx26 partial loss causes accelerated presbycusis by redox imbalance and dysregulation of Nfr2 pathway. *Redox Biol.* **19**, 301–317 (2018).
64. Fetoni, A. R. *et al.* The Antioxidant Effect of Rosmarinic Acid by Different Delivery Routes in the Animal Model of Noise-Induced Hearing Loss. *Otol. Neurotol. Off. Publ. Am. Otol. Soc. Am. Neurotol. Soc. Eur. Acad. Otol. Neurotol.* **39**, 378–386 (2018).
65. Devarajan, P. *et al.* Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. *Hear. Res.* **174**, 45–54 (2002).

66. Fujita, T. *et al.* Metabolomic profiling in inner ear fluid by gas chromatography/mass spectrometry in guinea pig cochlea. *Neurosci. Lett.* **606**, 188–193 (2015).
67. Ji, L. *et al.* Auditory metabolomics, an approach to identify acute molecular effects of noise trauma. *Sci. Rep.* **9**, 9273 (2019).

VI. ANNEXES

IMD	Prevalence	Prognosis	Incidence of HL	Reference
<i>HL in early childhood</i>				
Biotinidase deficiency	1:50,000	Good, with supplementation	76%	8-11
MEGDEL	118 cases	Death in 1st year of life	79%	12-20
Niemann Pick disease type C	1-9:100,000	Survival in adult	33%	21-23
Pompe's disease	1:138,000	Compatible with adult form	Some cases	24-27
α -mannosidosis	1:500,000	Compatible with adult form	97%	28-36
β -mannosidosis	22 cases	Survival in adult	100%	37-46
Congenital cataracts, HL and neurodegeneration	6 cases	Premature death	100%	47-49
SUCLA2 deficiency	63 cases	Premature death	75%	50-61
D-bifunctional protein deficiency	1:100,000	Premature death	77%	63-69
Acyl-CoA oxidase deficiency	40 cases	Premature death	77%	70-78
Zellweger spectrum disorder	1:20,000,000	Survival in adult	90%	79-88
Brown-Vialetto-Van-Laere syndrome	150 cases	Survival in adult	81%	89-113
RFT1-CDG	15 cases	Premature death	73%	115-127
MOGS-CDG	4 cases	n/a	50%	128-131
ALG11-CDG	12 cases	Premature death	33%	132-137
PGM3-CDG	33 cases	Premature death	24%	138-147
PIGL-CDG	9 cases	n/a	78%	148-159
XYLT2-CDG	21 cases	n/a	50%	160-166
<i>HL in late childhood</i>				
MPS I	1:100,000	Good, with ERT	33%	171-173
MPS II	1-9:1,000,000	Death in 2 nd decade	80%	171-173
MPS III	1-9:1,000,000	Death in 2 nd decade	50%	171-173
MPS IV	1-5:10,000	Good, with ERT	77%	173-174
MPS VI	1-9:1,000,000	Good, with ERT	25%	175-176
Krabbe disease	1-9:100,000	Compatible with adult form	77%	178-179
Chanarin-Dorfman syndrome	~ 100 cases	Survival in adult	60%	180-186
Hypophosphatasia	1:100,000	Compatible with adult form	33%	187
Neuraminidase deficiency type II	26 cases	Death in 2 nd decade of life	54%	188-190
Galactosialosidosis	~ 100 cases	Compatible with adult form	15%	191-193
Phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity	33 cases	Compatible with adult form	27%	194-202
Thiamine responsive megaloblastic anemia	~ 80 cases	Good, with supplementation	100%	203-206

MERFF syndrome	~ 100 cases	Compatible with adult form	91%	207-213
SMAPME	25 cases	Premature death	16%	214-225
Propionic acidemia	1:100,000	Premature death	13%	226-227

HL in adulthood

Refsum disease	1-9:1,000,000	Compatible with adult form	33%	62; 228-236
PHARC	30 cases	Survival in adult	90%	237-244
Fabry disease	1:117,000	Survival in adult	78%	245-258
Kanzaki disease	9 cases	Good	33%	259-265
MIDD	1-9:1,000,000	Good, with treatment	75%	266-270
MELAS	1-9:1,000,000	Severe	75%	271-281
X-linked hypophosphatemia	3-9:100,000	Good, with supplementation	52%	282-290

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des surdités dans les maladies métaboliques. Trinh TT et al. *Metabolism*. Soumis.

Légendes : IMD : inherited metabolic disease; HL: hearing loss; MPS: mucopolysaccharidosis.

Sheep as a large animal model for cochlear implantation

TT. Trinh¹, C. Cohen², L. Boullaud¹, JP. Cottier^{2,3,4}, D. Bakhos^{1,3,4}

1. CHRU de Tours, Service d'ORL et Chirurgie Cervico-Faciale, France
2. CHRU de Tours, Service de Neuroradiologie, France
3. Université François Rabelais de Tours, France
4. Inserm U1253, Tours, France

Corresponding Author:

Thuy-Tran Trinh (MD)

Service ORL et Chirurgie cervico-faciale

2 Boulevard Tonnellé, 37000 Tours

France

E-mail: thuytran.trinh@gmail.com (TT Trinh)

Tel : +33 247474747

Fax : +22 247473600

ORCID 0000-0002-3034-7908

Acknowledgments: We thank Daniel Bourry for the intraoperative view. We thank Gilles Gomot, Frederic Sylvain, François Lecomte for their help with sheep heads and radiological support. We thank John J. Galvin III for editorial assistance.

This research was supported by the **French ENT Society**.

Conflict of interest: None

Keywords: Cochlear implant, surgical training, sheep, animal model

Abstract

Introduction: In surgical training, large animal models are more suitable as their anatomy is more similar to humans. In otology, there have been relatively few studies in terms of large animal model for surgical training.

Objectives: In this study, we aimed to do a neuroradiologic evaluation and surgical insertion of a cochlear implant electrode array on a sheep model.

Methods: Twenty cadaveric sheep heads were studied. A computed tomography (CT) scan and neuroradiologic evaluation was performed on each head, obtaining measurements of inner ear for each sheep. Sheep measurements were compared to those from temporal bone CT scans from 20 female humans. Surgical procedures were first trained with 13 of the sheep temporal bones, after which cochlear implantation was performed on the remaining 7 temporal bones. The position of the inserted electrode array insertion was confirmed by CT scan after the procedure.

Results: Neuroradiologic evaluation showed that, relative to the 20 female humans, the mean ratio for sheep was 0.60 for volume of cochlea, 0.70 for height of cochlea, 0.73 for length of cochlea; ratios for other metrics were >0.80 . For the surgical training, the round window was found in all 20 sheep temporal bones. CT scans confirmed that electrode insertions were fully complete; the mean value of electrode array insertion was 18.3 mm.

Conclusion: The neuroradiologic and surgical training data suggest that sheep is a realistic animal model to train cochlear implant surgery and collection of perilymph samples, but less so for surgical training of mastoidectomy due to pneumatization of mastoid.

Introduction

Sheep is already known worldwide as an animal model for research studies, such as the famous cloned sheep “Dolly”¹. While sheep is used in many studies, murine species is the more common animal model in laboratory studies. However, murine species exhibit only a few anatomical, biological and metabolic similarities with humans. In otology, the most common animal models are guinea pig and Mongolian gerbil^{2,3}. The easy access to the inner ear make them suitable animal models despite their higher frequency hearing range⁴. However, the dimensions of their inner ear are smaller than in humans, making more difficult to conduct with biomedical devices such as the cochlear implant (CI). While large animals can be disadvantageous in terms of housing or managing, they are more similar to humans in terms of anatomic dimensions and physiology⁵. Large animals as sheep may also be appropriate to model of hearing loss given the anatomical and physiological similarities to the human cochlea. Cordero et al.⁶ described sheep ears as a potentially good animal model for stapedectomy training due to relatively low overall costs, easy access to the stapes, and anatomic similarities to human. Indeed, sheep presents similar inner and middle ear anatomy as found in humans, with all inner ear structures identified⁷⁻⁹. Physiologically, the hearing frequency spectrum is also comparable between sheep and humans¹⁰. The frequency spectrum for auditory brainstem responses (ABRs) have also been shown to be similar between sheep and humans (11); however, wave peak latencies and amplitudes varied between sheep and humans. Griffith et al.¹¹ recorded ABRs in developing sheep. During the first seven weeks of life, wave peak amplitudes increased and latencies decreased, indicating a maturation of the central auditory pathways. However, unlike in humans, wave V was absent in sheep.

In otology, relatively few surgical and/or research studies have been conducted with large animal models. Mastoid approach has been compared between pig and sheep, with sheep favored as a model for otologic surgery^{12,13}. Mastoid approach is more difficult in pig due to

the abundance of fat tissue and the lack of mastoid pneumatization. In sheep, mastoid is also poorly pneumatized, making middle ear access more difficult. However, the middle ear is quite similar to that of humans; the ossicular chain is well defined and the round window (RW) can be accessed via the middle ear. The RW is easily identified once in the hypotympanum, allowing for sampling of perilymph fluid. The sheep inner ear is also similar to humans ⁷. As such, sheep would seem to be a good model for extraction of perilymph fluid (for metabolic analysis) and/or training for cochlear implantation and insertion of the electrode array.

Only two previous studies have performed inner ear computed-tomography (CT) scan analysis in large animals: sheep in Seibel et al. ⁷, and macaque monkeys in Marx et al. ¹⁴. Inner ear anatomical dimensions were smaller than in humans, but sufficient to allow for electrode insertion of a cochlear implant (CI), as in humans. In this study, we propose sheep as a large animal model for cochlear implantation and electrode insertion. We performed neuroradiological analysis using CT scans of temporal bones (TBs) to better understand inner ear anatomy of sheep, relative to humans. We successfully performed cochlear implantation and electrode insertion in a subset of the sheep TBs.

Materials and methods

Ten sheep cadaveric heads (20 TBs in total) were obtained from the Experimental Unity of animal physiology of Orfrasière. A CT-scan was performed on each head, then TB drilling was performed on the first 13 TBs and the last 7 TBs were surgically implanted, a post-operative CT-scan was then performed on those 7 implanted TBs.

Each procedure is described below.

Computed Tomography (CT) scan procedure

Cadaveric sheep heads were maintained on a tray as in a dorsal decubitus position. CT scans were performed on CIRE platform in INRA center of Nouzilly using a Siemens Somatom® CT. The acquisition protocol was as follows: tube voltage = 140 kV, tube current = 400 mAs/slice, pitch = 0.35, rotation time = 1s, field of view = 300 mm, window = 24.7x10.7 cm, matrix = 512x512, section thickness = 0.6 mm, increment = 0.1 mm. CT scans were performed before (*Figure 1*) and after cochlear implantation.

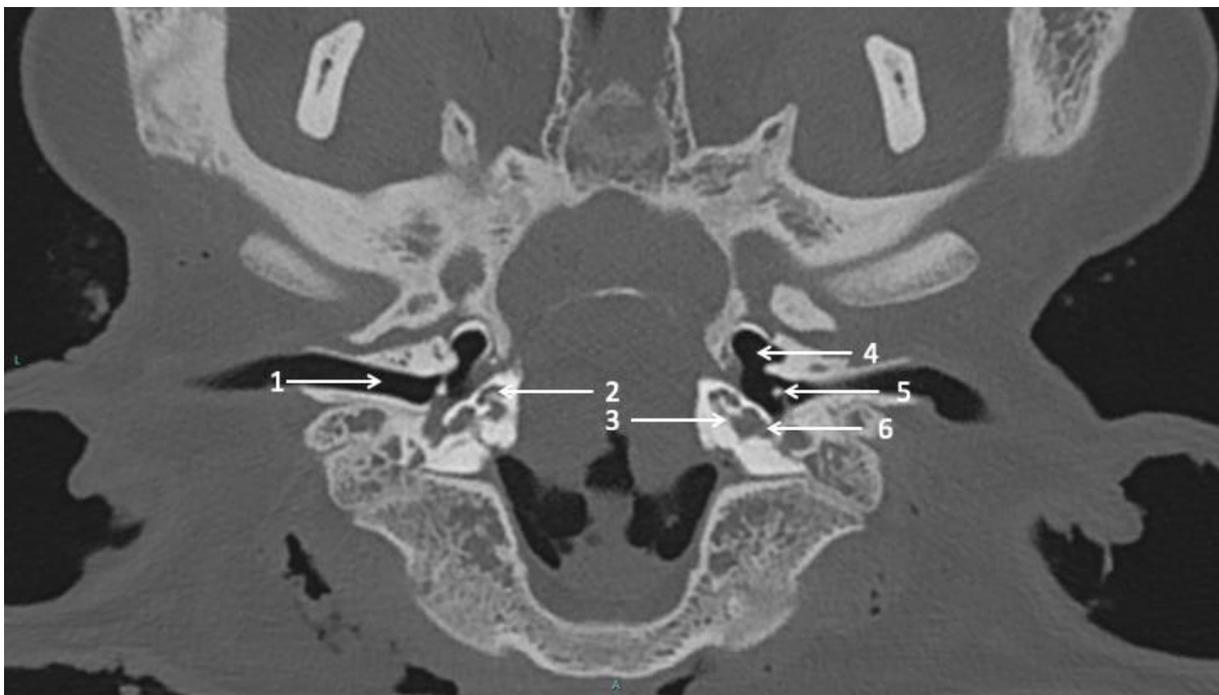


Figure 1: Cadaveric head axial sheep CT scan centered on cochleae. 1=external ear canal; 2= right cochlea; 3=basal turn of left cochlea; 4=hypotympanum; 5=malleus on tympanic membrane; 6=round window membrane.

The sheep radiological inner ear anatomy was compared to human. Existing TB CT scans were selected from our database of CI patients with the same acquisition protocol as above; the CT scans were performed as part of pre-implant assessment. Only female CT scans were selected to control for anatomic differences across human males and females sex, and to be consistent with the female sheep.

Neuroradiologic evaluation

CT scans were evaluated by two experienced examiners using PACS MIRC Carestream (version 11.4.1.0324). For each sheep or human TB, several dimensions of the cochlea were quantified as follows:

- 1) The height of cochlea (*Fig. 2a*) was quantified as the mean distance between the axial and sagittal planes of the measurement perpendicular to the line outcropping the basal turn.
- 2) The width of cochlea (*Fig 2b*) was quantified perpendicular to “A”, defined as the longest measurement between the round window (RW) and the lateral wall of cochlea through the modiolus.
- 3) The length of cochlea (*Fig. 2c*) was quantified by “unrolling” the cochlea using the “vessels analysis” tool in the PACS MIRC Carestream software and measuring the mean value between the central and external lumen. The length of cochlea on 720° was calculated according to previous studies ¹⁵ (length = 3.65*A - 3.63).
- 4) The diameter of external basal turn (*Fig. 2d*) was quantified in terms of the mean value between the axial and sagittal plane of the longest measurement between the RW and the lateral wall of basal turn.
- 5) The diameter of the internal basal turn was quantified in terms of the mean value between the frontal (*Fig. 2e*) and sagittal planes (*Fig. 2f*) of the longest measurement between medial wall of basal turn.
- 6) The diameter of the RW (*Fig 2g*) was quantified according to the strict plane described by Saylisoy et al. ¹⁶
- 7) The diameter of apical turn (*Fig 2h*) was quantified in terms of the distance between the lateral walls through the modiolus, on a plane through the apex.

- 8) The number of spiral turns was calculated from the RW to apex, with one turn counted each time the spiral passed through the RW plane.
- 9) The volume of cochlea was quantified using 3D-Doctor (version 3.5; Able Software Corp., Lexington, MA, USA) after interactive segmentation of cochlea.

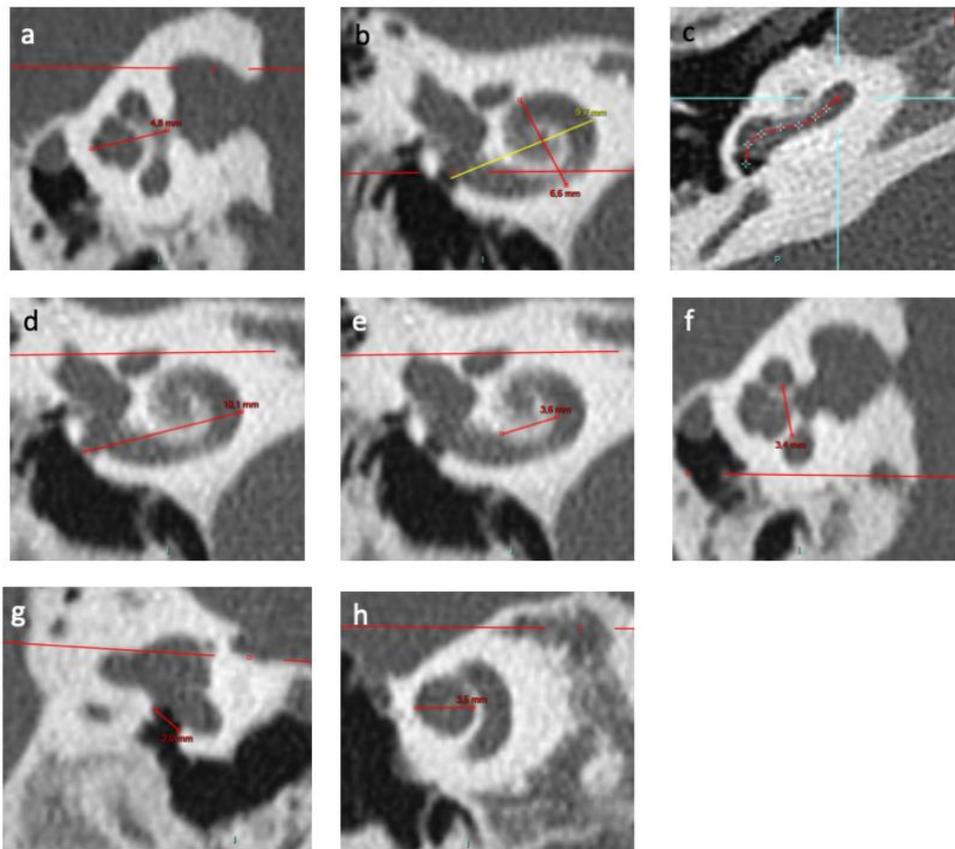


Figure 2: Inner ear CT scan measurements. a) Height of cochlea on an axial view; b) Measurements of length A on a reconstruction through modiolus. B measurement corresponds to width of cochlea; c) Identification of points in basal turn of cochlea via the application “vessel analysis” to measure length of unrolled cochlea; d) External diameter of basal turn of cochlea on a frontal view; e) Internal diameter of basal turn of cochlea on a frontal view; f) Internal diameter of basal turn of cochlea on a sagittal view; g) RW diameter on a reconstruction from Saylisoy et al. (2014); h) Diameter of apical turn of cochlea.

Electrode insertion was reviewed using post-operative CT scans (*Fig. 3*) and insertion depth was estimated using the “vessels analysis” tool in the PACS MIRC Carestream software.



Figure 3: Sheep temporal bone CT scan with electrode arrays inserted in cochleae.

Student's t-tests was used to compare cochlea dimensions between sheep and humans. For each dimension, a ratio was calculated between the mean sheep and mean human values.

Temporal bone drilling procedure

Following a posterior auricular incision, surgical procedure was performed similarly to human approach. The mastoidectomy was performed using an otologic hand drill (Medtronic® Xomed) with a 6-mm cutting burr, following the external ear canal to discover hypotympanum bulla. The ossicular chain was exposed by drilling towards the top using a 3-mm ultra-diamond burr, and the RW was exposed by drilling backward. The RW visualization was optimized by removal of the facial nerve (FN) and labyrinth block (*Figure 4A*).

The RW membrane was incised and the electrode array was inserted (AB HF MS Demo Electrode Assembly, manufactured by Advanced Bionics, California, USA) (*Figure 4B*). The electrode array was a human demo device composed of 16 electrodes; the total length was 23.7 mm, and the active length was approximately 15 mm. We noted mastoid pneumatization, the

ossicular chain, FN canal and RW were visible. We also noted if electrode insertion was complete.

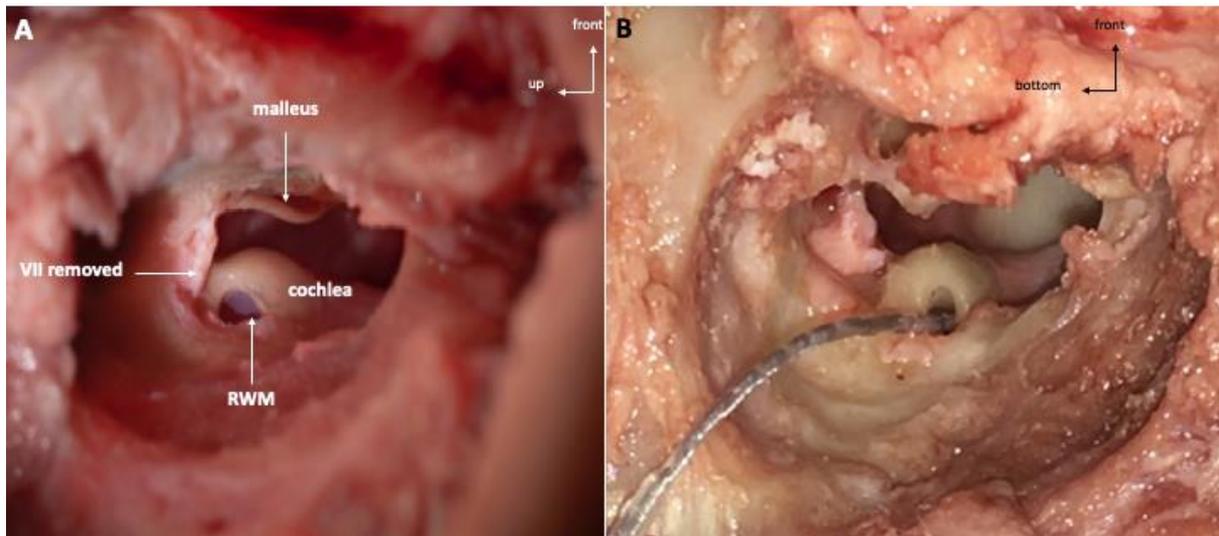


Figure 4: A: Intraoperative view of the RWM on a left sheep temporal bone. B: Electrode array completely inserted in the RWM on a left sheep cochlea. RWM=round window membrane

Results

CT scans

CT-scans from 20 sheep and 20 female TBs were analyzed; of the 20 sheep TBs, 7 were implanted. Inner ear morphologic study showed the presence of the 3 semi-circular canals, the vestibula, and the cochlea with 2.5 turns for all TBs. Measurement values were averaged across the two examiners, and are shown for sheep in *Table 1* and for human in *Table 2*. Student's t-tests were used to compare measurements between human and sheep. All measurements were significantly larger for human TBs ($p < 0.001$), except for RW diameter ($dF=38$, $t=1.51$, $p=0.14$). Mean data from sheep and human TBs were compared in terms of ratios. For sheep, the mean cochlea volume was 0.59, the mean height was 0.69, and the mean length was 0.73, relative to human; for the remaining dimensions, sheep ratios ranged from 0.81 to 1.1, relative to human.

Sheep cadaveric temporal bone drilling

Drilling was performed in 20 sheep TBs (10 right, 10 left), and electrode arrays were inserted in 7 of the 20 sheep TBs; the first 13 TBs were used to train surgical procedures. In the first surgical procedure, the external ear canal posterior wall was drilled, leading to difficulty in finding the RW; to find the RW membrane, all structures were then drilled. In the second procedure, the external ear canal was identified and the ossicular chain was revealed. For the 7 TBs that were implanted, electrode insertion was visually complete. The length of the inserted electrode array was measured; the mean value was 18.3 ± 1.5 mm. No mastoid pneumatization was observed in any of the drilled sheep TBs. The RW was found in all procedures and the FN canal was found in 80% of procedures. All electrodes (16/16) were successfully inserted in the 7 cochlear implantations. The characteristics of the surgical procedures are shown in *Table 3*.

Sheep TB	Age (year)	Side	Mastoid pneumatisation	Ossicular chain	FN canal	RW visibility	Easyness of electrode insertion	Electrode insertion (N=electrode inserted)	Length of electrode array inserted (mm)
1	2	R	-	-	-	++	/	/	/
2	2	L	-	-	+	++	/	/	/
3	2,75	R	-	-	+	++	/	/	/
4	2,75	L	-	-	+	++	/	/	/
5	2,75	R	-	-	++	++	/	/	/
6	2,75	L	-	-	++	+	/	/	/
7	2,75	R	-	-	+	++	/	/	/
8	2,75	L	-	-	-	+	/	/	/
9	2,75	R	-	-	++	++	/	/	/
10	2,75	L	-	-	++	+	/	/	/
11	2,25	R	-	-	++	+	/	/	/
12	2,25	L	-	-	++	++	/	/	/
13	4	R	-	++	++	++	/	/	/
14	4	L	-	+	++	++	Y	Complete (N=16)	19,6
15	4	R	-	++	++	++	Y	Complete (N=16)	18,6
16	4	L	-	++	-	++	Y	Complete (N=16)	19
17	5	R	-	++	++	++	Y	Complete (N=16)	18,8
18	5	L	-	-	-	+	Y	Complete (N=16)	19,3
19	6	R	-	++	++	++	Y	Complete (N=16)	17
20	6	L	-	-	+	++	Y	Complete (N=16)	15,5

Table 3: Anatomical structures identified during the temporal bone drilling

Legend: TB: temporal bone; R: right; L: left; - : not seen; + : partial visibility; ++ : complete visibility; mm: millimeter; Y: yes). Grey underlying: sheep TBs with cochlear implantation

Discussion

Cochlea dimensions were consistently smaller in sheep than in human, but generally comparable. Other dimensions were comparable to those described in previous studies, as shown in *Table 4*.

The surgical procedure progressively improved with successive drilling. The ossicular chain was not visible during drilling, as the RW was in a posterior orientation in the hypotympanum. The ossicular chain, particularly the malleus, is more visible when the RW orientation is more anterior, because of anatomical variations. The RW was well observed, suggesting that surgical training for electrode array insertion or extraction of perilymph samples

could be performed in sheep. However, sheep appears to be an unsuitable animal model for mastoidectomy as the mastoid is poorly pneumatized ¹³.

The mean ratio between sheep and human cochlea volume was 0.59, consistent with previous research (7). This relatively small ratio (compared to the other dimensions) may be because CT scan is not the gold standard for evaluating inner ear fluid. MRI using hyper-weighted T2 sequences would be more appropriate and may reveal more similar endocochlear fluid volumes between sheep and human.

Sheep appears to be a good animal model for inner ear experimentation and surgical training, especially for CI electrode insertion. Indeed, length the “unrolled” cochlea for sheep is closer to that in human than in other small animals (*Table 4*). Given the comparable hearing spectrum between sheep and human, tonotopy should also be comparable. Moreover, because the cochlea dimensions approach those of human, the same implant device used in human can be used in sheep, which is useful for training CI electrode insertion. In cat, the length of the cochlea is closer to that of human, but the number of spiral turns is higher, which could lead to more traumatic in electrode insertion. In addition, cat models are generally less accessible due to ethical reasons.

Given the comparable cochlear dimensions between sheep and human, sheep are useful for obtaining a sufficient volume of perilymph fluid for analysis. Moreover, there was no significant difference in RW dimension between sheep and human ($p=0.14$). and the RW was found in each drilling procedure, making sheep a good model for any surgery involving the RW (e.g., cochlear implantation, sampling of perilymph fluid, etc.).

Using a human cochlear implant device, all 16 electrodes were visually inserted in sheep TBs, with an average insertion depth of 18.3 mm. In guinea pig, cochlear implantation has performed with a device that included only 2 active electrodes, for an electrode array length of 4 mm ². DeMason et al. ³ implanted gerbils with 1 to 2 platinum iridium contacts in order to

observe cochlear trauma during insertion and to evaluate the functional status of the electrodes; the deepest insertions electrodes were approximately 4.1 mm. Insertion depth and cochlea trauma are particularly interesting in the context of preservation of residual acoustic hearing. With the sheep model, a human device can be used, allowing for insights regarding insertion depth and trauma relevant to human CI recipients.

The effects of hearing loss have been studied in many animal models. To better understand the physiopathology, hearing loss has been induced by aminoglycosides in guinea pig ¹⁷ or noise-induced in mice ¹⁸, or vice versa. Using sheep as an animal model of hearing loss would be interesting. Indeed, as sheep appear to have comparable inner ear anatomy and auditory physiology to humans, sheep may be a valuable animal model to study sensorineural hearing loss, particularly the injury site, which is difficult to measure in post-lingual adults. The next step would be to introduce a CI for in vivo model of hearing loss using sheep ¹⁹. Developing a sheep model may be also useful for pharmacometabolomics studies of hearing loss. Information from such studies could be useful in develop therapeutic drug delivery in situ using, according to etiology of deafness; corticosteroids could be delivered via the implanted electrodes to reduce cochlear trauma when there is residual acoustic hearing ²⁰.

While sheep may be a promising animal model, their size can be challenging in terms of maintenance. Sheep require a fold for housing and an experienced staff. Moreover, using sheep in research is more restricted than using mice because of the cost and ethical considerations. Large animals have been previously studied in otology. Although using sheep for *in vivo* experiences is a real challenge, some authors studied utriculostomy on sheep and kept sheep alive 3 months after surgical procedure in order to evaluate nystagmus, general state and balance²¹. Angeli et al. ²² studied electrocochleography while Maia & Lavinsky studies distortion product otoacoustic emissions ^{23,24} during induced hyperinsulinism on anesthetized sheep and concluded that hyperinsulinism suppressed cochlear function. Gurr et al. ¹² studied

the anatomy of pig TBs in a surgical context. The middle ear is very similar to human, especially the ossicular chain, where the malleus, incus and stapes have the same morphology as in humans. The FN canal can be observed in front of the RW, as in human. However, similar to our finding in sheep, the pig mastoid is even less pneumatized, the classical landmarks could not be found, and it was necessary to remove the atlanto-occipital joint. The present data suggest that sheep may be a better large animal model than pig. Further studies are needed to further validate sheep as a realistic animal model.

Conclusion

Sheep appear to be a good animal model for training cochlear implantation. The visibility and accessibility of the RW are easy and could permit sampling of perilymph fluid. The similarity to human inner ear anatomy and physiology suggest that sheep could also be a good model and deliver therapeutic drugs to the inner ear via CI.

References

- (1) Campbell, K. H.; McWhir, J.; Ritchie, W. A.; Wilmut, I. Sheep Cloned by Nuclear Transfer from a Cultured Cell Line. *Nature* **1996**, *380* (6569), 64–66. <https://doi.org/10.1038/380064a0>.
- (2) Honeder, C.; Ahmadi, N.; Kramer, A.-M.; Zhu, C.; Saidov, N.; Arnoldner, C. Cochlear Implantation in the Guinea Pig. *J. Vis. Exp. JoVE* **2018**, No. 136. <https://doi.org/10.3791/56829>.
- (3) DeMason, C.; Choudhury, B.; Ahmad, F.; Fitzpatrick, D. C.; Wang, J.; Buchman, C. A.; Adunka, O. F. Electrophysiological Properties of Cochlear Implantation in the Gerbil Using a Flexible Array. *Ear Hear.* **2012**, *33* (4), 534–542. <https://doi.org/10.1097/AUD.0b013e3182498c28>.
- (4) Müller, M. The Cochlear Place-Frequency Map of the Adult and Developing Mongolian Gerbil. *Hear. Res.* **1996**, *94* (1), 148–156. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(95\)00230-8](https://doi.org/10.1016/0378-5955(95)00230-8).
- (5) Rogers, C. S. Engineering Large Animal Species to Model Human Diseases. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **2016**, *90*, 15.9.1-15.9.14. <https://doi.org/10.1002/cphg.18>.
- (6) Cordero, A.; del mar Medina, M.; Alonso, A.; Labatut, T. Stapedectomy in Sheep: An Animal Model for Surgical Training. *Otol. Neurotol. Off. Publ. Am. Otol. Soc. Am. Neurotol. Soc. Eur. Acad. Otol. Neurotol.* **2011**, *32* (5), 742–747. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e31821ddbc2>.
- (7) Seibel, V. A.; Lavinsky, L.; Irion, K. CT-Scan Sheep and Human Inner Ear Morphometric Comparison. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **2006**, *72* (3), 370–376.
- (8) Seibel, V. A. A.; Lavinsky, L.; De Oliveira, J. A. P. Morphometric Study of the External and Middle Ear Anatomy in Sheep: A Possible Model for Ear Experiments. *Clin. Anat. N. Y. N* **2006**, *19* (6), 503–509. <https://doi.org/10.1002/ca.20218>.
- (9) Soares, H. B.; Lavinsky, L. Histology of Sheep Temporal Bone. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **2011**, *77* (3), 285–292.
- (10) Hill, M. W.; Heavens, R. P.; Baldwin, B. A. Auditory Evoked Potentials Recorded from Conscious Sheep. *Brain Res. Bull.* **1985**, *15* (5), 453–458.
- (11) Griffiths, S. K.; Pierson, L. L.; Gerhardt, K. J.; Abrams, R. M.; Peters, A. J. Auditory Brainstem Response in Sheep. Part II: Postnatal Development. *Dev. Psychobiol.* **1996**, *29* (1), 53–68. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199601\)29:1<53::AID-DEV3>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199601)29:1<53::AID-DEV3>3.0.CO;2-L).
- (12) Gurr, A.; Kevenhörster, K.; Stark, T.; Pearson, M.; Dazert, S. The Common Pig: A Possible Model for Teaching Ear Surgery. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.*

2010, 267 (2), 213–217. <https://doi.org/10.1007/s00405-009-1040-6>.

(13) Gurr, A.; Pearson, M. D.; S, D. [Lambs' temporal bone anatomy under didactic aspects]. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **2011**, 77 (1), 51–57.

(14) Marx, M.; Girard, P.; Escudé, B.; Barone, P.; Fraysse, B.; Deguine, O. Cochlear Implantation Feasibility in Rhesus Macaque Monkey: Anatomic and Radiologic Results. *Otol. Neurotol. Off. Publ. Am. Otol. Soc. Am. Neurotol. Soc. Eur. Acad. Otol. Neurotol.* **2013**, 34 (7), e76-81. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e31829411b4>.

(15) Mistrík, P.; Jolly, C. Optimal Electrode Length to Match Patient Specific Cochlear Anatomy. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* **2016**, 133, S68–S71. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2016.05.001>.

(16) Saylisoy, S.; Incesulu, A.; Kaya, E.; Pinarbasli, O.; Adapinar, B. The Round Window Diameter in Congenital Aural Atresia and Comparison with Sensorineural Hearing Loss and Control Group. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **2014**, 38 (3), 461–463. <https://doi.org/10.1097/RCT.0000000000000060>.

(17) Chung, M.; Parravicini, L.; Assael, B. M.; Cavanna, G.; Radwanski, E.; Symchowicz, S. Comparative Pharmacokinetics of Aminoglycoside Antibiotics in Guinea Pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, 22 (6), 1017–1021. <https://doi.org/10.1128/aac.22.6.1017>.

(18) Ohlemiller, K. K.; Jones, S. M.; Johnson, K. R. Application of Mouse Models to Research in Hearing and Balance. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* **2016**, 17 (6), 493–523. <https://doi.org/10.1007/s10162-016-0589-1>.

(19) Kaufmann, C. R.; Tejani, V. D.; Fredericks, D. C.; Henslee, A. M.; Sun, D. Q.; Abbas, P. J.; Hansen, M. R. Pilot Evaluation of Sheep as In Vivo Model for Cochlear Implantation. *Otol. Neurotol. Off. Publ. Am. Otol. Soc. Am. Neurotol. Soc. Eur. Acad. Otol. Neurotol.* **2020**. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000002587>.

(20) Liu, Y.; Jolly, C.; Braun, S.; Janssen, T.; Scherer, E.; Steinhoff, J.; Ebenhoch, H.; Lohner, A.; Stark, T.; Kiefer, J. Effects of a Dexamethasone-Releasing Implant on Cochleae: A Functional, Morphological and Pharmacokinetic Study. *Hear. Res.* **2015**, 327, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2015.04.019>.

(21) Lavinsky, L.; Goycoolea, M.; Gananca, M. M.; Zwetsch, Y. Surgical Treatment of Vertigo by Utriculostomy: An Experimental Study in Sheep. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* **1999**, 119 (5), 522–527. <https://doi.org/10.1080/00016489950180739>.

(22) Angeli, R. D.; Lavinsky, L.; Dolganov, A. Alterations in Cochlear Function during Induced Acute Hyperinsulinemia in an Animal Model. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **2009**, 75 (5), 760–764. [https://doi.org/10.1016/s1808-8694\(15\)30530-9](https://doi.org/10.1016/s1808-8694(15)30530-9).

- (23) Maia, F. C. Z. e; Lavinsky, L.; Möllerke, R. O.; Duarte, M. E. S.; Pereira, D. P.; Maia, J. E. Distortion Product Otoacoustic Emissions in Sheep before and after Hyperinsulinemia Induction. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **2008**, *74* (2), 181–187. [https://doi.org/10.1016/s1808-8694\(15\)31086-7](https://doi.org/10.1016/s1808-8694(15)31086-7).
- (24) Zuma e Maia, F. C.; Lavinsky, L. Distortion Product Otoacoustic Emissions in an Animal Model of Induced Hyperinsulinemia. *Int. Tinnitus J.* **2006**, *12* (2), 133–139.

View Letter

Close

Date: Feb 28, 2021
To: "Thuy-Tran TRINH" thuytran.trinh@gmail.com
cc: marianacleal@hotmail.com
From: "BJORL" revista@aborlccf.org.br
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: BJORL-D-20-00876R1
Title: Sheep as a large animal model for cochlear implantation
Brazilian Journal of Otorhinolaryngology

Dear Mrs. TRINH,

I am pleased to inform you that your paper "Sheep as a large animal model for cochlear implantation" has been accepted for publication in Brazilian Journal of Otorhinolaryngology.

Below are comments from the editor and reviewers.

Thank you for submitting your work to Brazilian Journal of Otorhinolaryngology.

Yours sincerely,

Carlos Takahiro Chone
Editor-in-Chief
Brazilian Journal of Otorhinolaryngology

Comments from the editors and reviewers:

The author(s) enriched the discussion as suggested and added to the merits already mentioned; we propose that it be accepted for publication.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EM via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/bjorl/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Vu, le Directeur de Thèse

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, sweeping loop followed by a vertical stroke.

**Vu, le Doyen
De la Faculté de Médecine de Tours
Tours, le**

TRINH Thuy-Trân

80 pages – 4 tableaux – 13 figures

Résumé :

Introduction L'analyse métabolomique de la périlymphe est une technique innovante permettant d'étudier ce liquide endocochléaire et permettrait d'approfondir nos connaissances physiopathologiques sur les surdités neurosensorielles. Afin de comparer les différences de profils métabolomiques entre la périlymphe d'une oreille normo-entendante et atteinte de surdité, il est nécessaire de réaliser un modèle animal de surdité. L'objectif de ce travail est de valider un modèle ovin de surdité et de comparer la périlymphe sur une oreille atteinte de surdité et normo-entendante. Une étude préliminaire sur l'anatomie radiologique de la brebis a été réalisée. **Matériels et Méthodes** Six brebis ont été incluses. Chaque brebis passait une tomodensitométrie des rochers pour évaluation neuroradiologique. Différentes mesures de l'oreille interne étaient notées. Après vérification du statut normo-entendant par réalisation de potentiels évoqués auditifs, l'induction de la surdité était réalisée par administration locale de kanamycine et de furosémide. Le statut de surdité neurosensorielle confirmé, un prélèvement de périlymphe devait être fait sur chaque oreille. Les prélèvements de périlymphe ont été analysés par chromatographie liquide et spectrométrie de masse à haute résolution. Les analyses multi- et univariées ont été faites via MetaboAnalyst. **Résultats** L'évaluation neuroradiologique des rochers de brebis comparée aux humains retrouve des différences significatives pour la plupart des mesures de cochlée avec un ratio variant de 2/3 à 1/1. Huit prélèvements de périlymphe ont été analysés. 101 métabolites ont pu être identifiés. La comparaison des coefficients de variabilité de chaque métabolite avec les échantillons contrôles retrouvait une grande variabilité entre les échantillons. **Conclusion** Le métabolome de la périlymphe de brebis semble présenter une grande variabilité interindividuelle sur des sujets a priori identiques initialement, incitant à des analyses intra-individuelles.

Mots clés : Surdité neurosensorielle, périlymphe, métabolomique

Jury :

Président du Jury :	Professeur Emmanuel LESCANNE
<u>Directeur de thèse :</u>	<u>Professeur David BAKHOS</u>
Membres du Jury :	Professeur Hélène BLASCO
	Professeur Sylvain MORINIERE
	Docteur Charles-Edouard ROUF

Date de soutenance : 26 Mars 2021