

Année 2021/2022

N°

## Thèse

Pour le

### DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

**Luc Boullaud**

Né 08/07/1992 à Limoges (87)

---

#### TITRE

**Modifications du profil métabolomique de la périlymphe après un traumatisme  
acoustique**

---

Présentée et soutenue publiquement le **15 Avril 2022** devant un jury composé de : `

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

Membres du Jury :

Professeur David BAKHOS, ORL, Faculté de Médecine -Tours

Professeur Hélène BLASCO, Biochimie et biologie moléculaire, Faculté de Médecine –Tours

Docteur Soizick PONDAVEN-LETOURMY, ORL, PH, CHU-Tours

Docteur Jean-Claude DESFOUGERES, ORL et CCF, Limoges

**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 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 – A. CHANTEPIE – 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 – O. HAILLOT – 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. MORAIN – 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
APETOH Lionel .....	Immunologie
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
BERHOUEZ 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
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
GATAULT Philippe.....	Néphrologie
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
GUILLOIN Antoine.....	Médecine intensive – réanimation
GUYETANT Serge .....	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel.....	Hématologie, transfusion
HALIMI Jean-Michel.....	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier .....	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis .....	Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe.....	Biologie cellulaire
IVANES Fabrice .....	Physiologie
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 2<sup>ND</sup> 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
BISSON Arnaud .....	Cardiologie (CHRO)
BRUNAUT Paul .....	Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès .....	Biostat., informatique médical et technologies de communication
CARVAJAL-ALLEGRIA Guillermo.....	Rhumatologie (au 01/10/2021)
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
GOUILLEUX Valérie.....	Immunologie
GUILLOM-GRAMMATICO Leslie.....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention

HOARAU Cyrille.....	Immunologie
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
PARE Arnaud.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
PIVER Éric.....	Biochimie et biologie moléculaire
REROLLE Camille.....	Médecine légale
ROUMY Jérôme.....	Biophysique et médecine nucléaire
SAUTENET Bénédicte.....	Thérapeutique
STANDLEY-MIQUELESTORENA Elodie.....	Anatomie et cytologie pathologiques
STEFIC Karl.....	Bactériologie
TERNANT David.....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
VUILLAUME-WINTER Marie-Laure.....	Génétique

## **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES**

---

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia.....	Neurosciences
NICOGLU 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
ETTORI-AJASSE Isabelle.....	Médecine Générale
PAUTRAT Maxime.....	Médecine Générale
RUIZ Christophe.....	Médecine Générale
SAMKO Boris.....	Médecine Générale

## **CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRAE**

---

BECKER Jérôme.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
BOUAKAZ Ayache.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
BRIARD Benoit.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
CHALON Sylvie.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
DE ROCQUIGNY Hugues.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259
ESCOFFRE Jean-Michel.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
GILLOT Philippe.....	Chargé de Recherche Inrae – UMR Inrae 1282
GOUILLEUX Fabrice.....	Directeur de Recherche CNRS – EA 7501 - ERL CNRS 7001
GOMOT Marie.....	Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
HEUZE-VOURCH Nathalie.....	Directrice de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
KORKMAZ Brice.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
LATINUS Marianne.....	Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
LAUMONNIER Frédéric.....	Chargé de Recherche Inserm - UMR Inserm 1253
LE MERREUR Julie.....	Directrice de Recherche CNRS – UMR Inserm 1253
MAMMANO Fabrizio.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259
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 1069
SI TAHAR Mustapha.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
SUREAU Camille.....	Directrice de Recherche émérite CNRS – UMR Inserm 1259
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***

BOULNOIS Sandrine.....	Orthoptiste
SALAME Najwa.....	Orthoptiste

### ***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.

## Table des matières

<b>1. Contexte.....</b>	<b>17</b>
<b>2. Rappels.....</b>	<b>19</b>
2.1. Système auditif.....	19
2.1.1. Anatomie de l'oreille interne.....	19
2.1.2. Les liquides cochléaires.....	21
2.2. Mécanismes physiopathologiques des surdités neuro-sensorielles.....	22
2.3. SNS dues au bruit.....	24
2.4. La métabolomique.....	26
2.5. Modèle animal et surdité.....	28
<b>3. Objectifs.....</b>	<b>31</b>
<b>4. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>32</b>
4.1. Groupes expérimentaux et exposition au bruit.....	32
4.2. Mesure auditive.....	33
4.3. Préparation des échantillons.....	34
4.4. Analyse métabolomique.....	35
4.5. Analyse statistique.....	36
4.6. Analyse des voies métaboliques.....	37
<b>5. Résultats.....</b>	<b>38</b>
5.1. Animal et modèle de choc acoustique.....	38
5.2. Conséquences du traumatisme acoustique sur le métabolome de la périlymphe.....	39
5.3. Analyse des voies métaboliques.....	41
<b>6. Discussion.....</b>	<b>43</b>
6.1. L'approche métabolomique comme stratégie puissante pour explorer la périlymphe.....	43
6.2. Le traumatisme sonore peut être associé à des modifications métaboliques qui peuvent être liées à plusieurs mécanismes.....	44
6.2.1. Neurotransmission.....	44
6.2.2. Stress oxydatif.....	45
6.2.3. Destruction mécanique.....	46
6.2.4. Lésion nerveuse.....	47
<b>7. Conclusion.....</b>	<b>48</b>
<b>8. Références.....</b>	<b>49</b>
<b>9. Annexe.....</b>	<b>54</b>

## **1. Contexte**

La surdité neurosensorielle (SNS) est le déficit sensoriel le plus fréquent et constitue un problème majeur de santé publique [1]. On estime à environ 466 millions de personnes dans le monde (5% de la population mondiale) touchés par ce handicap invisible dont 34 millions d'enfants [1]. D'ici 2050, les prévisions prévoient 900 millions de personnes atteintes d'une surdité invalidante, soit 1/10e de la population mondiale [1]. La SNS est une maladie chronique qui est susceptible d'affecter le développement du langage oral, l'éducation et les interactions sociales [2]. Elle altère aussi la qualité de vie en réduisant les relations sociales et professionnelles.

Les SNS peuvent être congénitale ou acquise. Les principales causes des SNS acquises sont le vieillissement, les médicaments ototoxiques, les mutations génétiques, la surdité brusque et les facteurs exogènes (comme le tabagisme, le bruit) [2, 3]. Cependant, dans environ 50 % des cas des SNS post-linguales, l'étiologie reste inconnue malgré les résultats cliniques, audiométriques, radiologiques ou génétiques [4]. Pour ces patients, le site lésionnel et les mécanismes moléculaires impliqués restent non élucidés. Bien que de nombreuses voies menant à la perte de cellules ciliées et des cellules nerveuses aient été décrites, il n'existe actuellement aucun outil de diagnostic permettant pour un patient donné de caractériser le site lésionnel touché au niveau du système auditif (qui peut être au niveau cochléaire, synaptique, neuronal ou central) ou d'identifier les mécanismes intracellulaires en cause. De plus, le site lésionnel et les mécanismes sous-jacents des SNS peuvent être intriqués. L'analyse des modifications métaboliques et des voies impliquées peuvent être étudiées à l'aide de l'analyse métabolomique, qui est une technique émergente utilisée aussi pour identifier des biomarqueurs par l'analyse de métabolites individuels présents dans un échantillon donné. L'analyse métabolomique peut fournir des données complémentaires concernant les étiologies connues de la surdité et aider à mieux catégoriser les SNS lorsque l'étiologie reste inconnue.

Dans ce travail, nous ferons un rappel de l'organisation anatomo-fonctionnelle de l'oreille interne, des mécanismes physio-pathologiques des SNS et de l'intérêt de l'analyse métabolomique. Nous présentons une revue de la littérature sur l'analyse métabolomique dans le cadre des SNS avant de justifier du modèle animal utilisé. Ensuite, nous présentons notre étude sur l'analyse de la périlymphe suite à un traumatisme acoustique chez un modèle animal.

## **2. Rappels**

### **2.1. Système auditif**

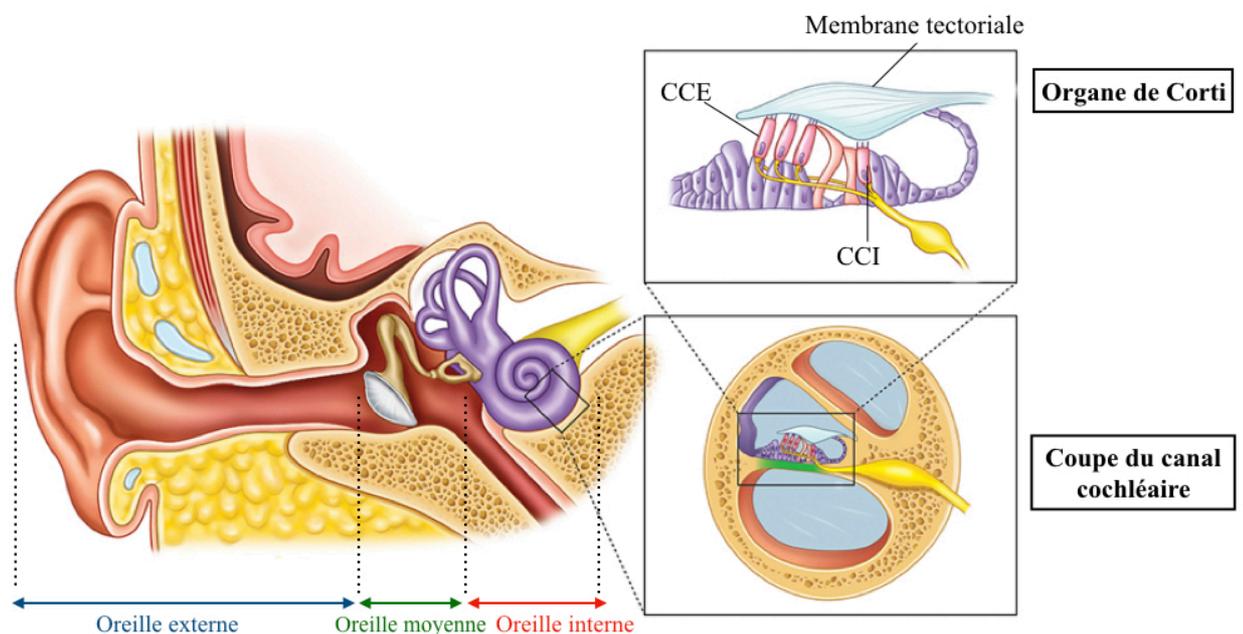
Le système auditif possède deux fonctions. La première est la transmission du son qui est assurée par l'oreille externe (pavillon de l'oreille et méat auditif externe) et moyenne via le système tympano-ossiculaire. La seconde est la transduction mécano-électrique réalisée au niveau de l'oreille interne (cochlée) pour aboutir à un potentiel d'action au niveau du nerf cochléaire afin que l'information auditive soit transmise aux voies auditives centrales puis au cortex auditif au niveau du lobe temporal.

#### *2.1.1. Anatomie de l'oreille interne (Figure 1)*

L'organe de l'audition est situé dans l'os temporal, et se nomme le labyrinthe antérieur. Il est constitué d'un labyrinthe osseux et d'un labyrinthe membraneux. La partie osseuse ou cochlée est constituée d'une première partie enroulée autour d'un axe central, nommée le modiulus. La seconde partie, postéro-inférieure, non enroulée, est appelée le canal infra-vestibulaire. Le modiulus est constitué de deux tours et demi de spire. La partie externe du canal spiral de la cochlée est nommée la lame des contours ou capsule otique et présente deux ouvertures : la fenêtre ronde et la fenêtre ovale. Ce tube creux est divisé par la lame spirale osseuse, qui contient les neurones auditifs dont le ganglion spiral. Le bord latéral de la lame spirale est prolongé par la membrane basilaire, elle cloisonne le canal spiral en une rampe vestibulaire (ou scala vestibuli) et une tympanique (ou scala tympani). La rampe vestibulaire se termine par la fenêtre ovale, et la rampe tympanique se termine par la fenêtre ronde. Ce labyrinthe osseux communique par l'intermédiaire de l'aqueduc de la cochlée avec les espaces sous-arachnoïdiens.

Le labyrinthe membraneux antérieur est la structure conjonctivo-épithéliale située à l'intérieur de la partie osseuse. Entre les rampes tympanique et vestibulaire est situé le canal cochléaire. Il est séparé de la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner, au niveau du

mur latéral se trouve la strie vasculaire et la lame réticulaire. L'organe de Corti est l'organe neuro-sensoriel de la cochlée. Il repose sur la membrane basilaire. Il est composé de cellules sensorielles (les cellules ciliées), de fibres nerveuses, et de cellules et structures de support. Les stéréocils des cellules ciliées sont en contact avec l'endolymphe alors que le reste cellulaire est situé dans le compartiment périlymphatique. Les cellules sensorielles sont composées de cellules ciliées externes (CCE) disposées en 3 rangées et internes (CCI) disposées en une rangée. Elles sont différentes par la forme de leur corps cellulaire, par leur connexion au système nerveux et par la disposition des stéréocils. En effet, pour les CCI, le corps cellulaire est en forme de poire avec des stéréocils en palissades alors que les CCE présentent un corps cellulaire cylindrique avec une disposition en W des stéréocils. L'être humain possède environ 3.500 CCI et 12.500 CCE.



**Figure 1** : Organisation anatomo-fonctionnelle du système auditif (Service ORL, CHU de Tours)

### *2.1.2. Les liquides cochléaires*

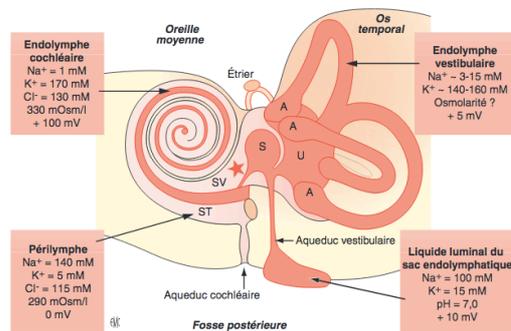
Dans l'oreille interne, le labyrinthe membraneux (épithélium neurosensoriel) sépare deux compartiments remplis de liquides extracellulaires de compositions chimiques très différentes. L'endolymphe est située dans le canal cochléaire. La périlymphe est située dans les rampes vestibulaire et tympanique.

L'endolymphe est un liquide riche en potassium et en chlore et pauvre en sodium. Les concentrations de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$  : 0,02 mM dans la cochlée, 0,20 mM dans le vestibule), de magnésium (Mg : 0,01 mM), de protéines (0,6 g/L) et de glucose sont plus faibles que dans la périlymphe et que dans le plasma. En revanche le pH est proche dans ces deux liquides. L'endolymphe est hyperosmotique (330 mOsm/L) secondairement à une concentration élevée de KCl. L'endolymphe produite par la cochlée circule dans le labyrinthe membraneux et dans le vestibule jusqu'au sac endolymphatique qui résorbe le liquide. Le liquide précurseur de l'endolymphe est la périlymphe et non le plasma. Les électrolytes sont transportés entre les deux liquides par des mécanismes actifs. La sécrétion de  $\text{K}^+$  est réalisée par différentes structures qui forment l'épithélium labyrinthique. La membrane de Reissner présente des canaux non sélectifs activés par l'étirement, et favorise la sortie de  $\text{K}^+$  de l'endolymphe vers la périlymphe. La strie vasculaire est responsable de la sécrétion de  $\text{K}^+$  dans l'endolymphe.

La périlymphe a une composition très proche du liquide cérébrospinal et des liquides extra-cellulaires, c'est-à-dire riche en ions sodiums et en chlore, et pauvre en ions potassiums, ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$  : 1,2 mM), et en protéines (2 g/L). La périlymphe a une double origine, par filtration du plasma à travers la barrière hémato-périlymphatique, et par sécrétion au niveau de la zone du limbe spiral [5].

Compte tenu de l'accessibilité de la rampe tympanique au travers de la fenêtre ronde, et de sa situation au plus proche des phénomènes physiopathologiques survenant suite à une surdité, l'étude de ce liquide est primordiale.

La *figure 2* représente les liquides endocochléaires et la composition ionique de chaque compartiment.



**Figure 2** : Représentation schématique du labyrinthe membraneux. L'endolymphe cochléaire est représentée en orange foncé, et la pérylympe cochléaire en orange clair [6]

## 2.2. Mécanismes physiopathologiques des surdités neuro-sensorielles

La SNS peut être congénitale ou acquise. Dans le cas de facteurs congénitaux, la SNS peut être le résultat d'une surdité syndromique (par exemple, le syndrome d'Usher, le syndrome de Pendred) ou d'une surdité non syndromique classée selon le mode de transmission (par exemple, autosomique dominant, autosomique récessif, lié au chromosome X, mitochondrial). Grâce au développement de l'analyse moléculaire, certaines mutations ont été découvertes (par exemple, la connexine), ce qui permet de mieux caractériser les SNS en permettant l'identification du site lésionnel et une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques (par exemple, homéostasie de l'oreille interne, transduction mécano-électrique). Parmi les autres facteurs congénitaux figurent l'infection pré et péri-natale (par exemple, l'infection à cytomégalovirus), la prématurité, l'anoxie, la pré-éclampsie, le diabète maternel, la consommation de drogues ou d'alcool pendant la grossesse et les neuropathies auditives.

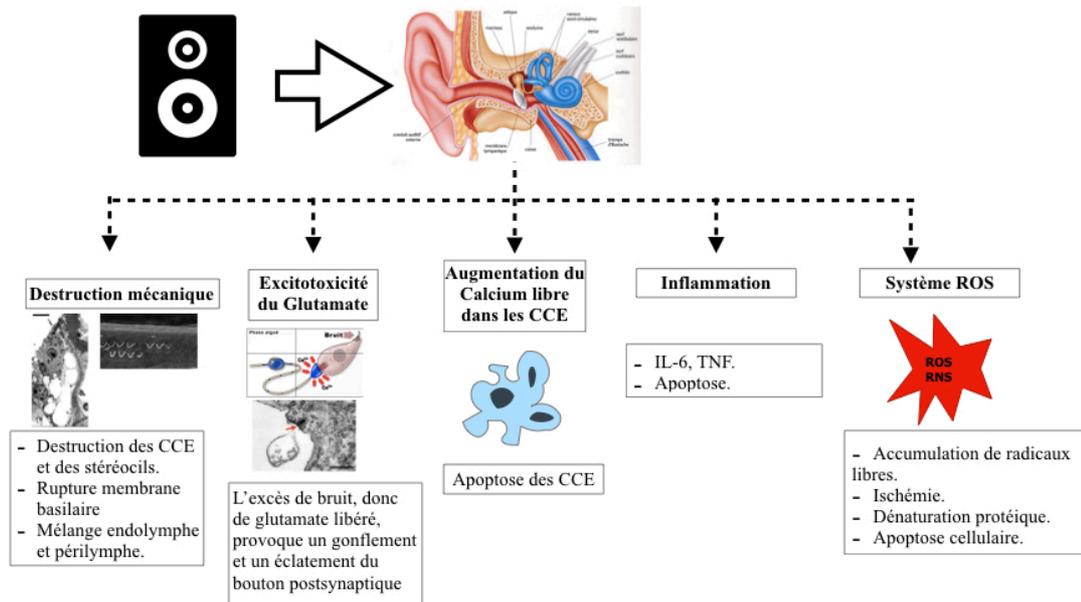
Les principales causes des SNS acquises sont le vieillissement, les médicaments ototoxiques, les mutations génétiques, la perte auditive soudaine et les facteurs externes (par exemple, le tabagisme, le bruit) [2, 3]. Cependant, dans environ 50 % des cas de SNS post-

linguales, l'étiologie reste inconnue [4]. La SNS peut être liée à l'implication d'environ 30 types cellulaires différents dans la cochlée ainsi qu'à une altération au niveau de la synapse, du nerf auditif ou au niveau central. Les lésions peuvent être intriquées et plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer la physiopathologie des SNS.

Cinq voies principales ont été décrites pour les mécanismes cellulaires impliqués dans les SNS [2, 3] :

- 1) Accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'espèces réactives de l'azote (RNS) dans la cochlée qui contribuent au stress oxydatif, entraînant l'apoptose via une cascade de réactions.
- 2) Augmentation du  $Ca^{2+}$  libre dans les cellules ciliées, entraînant une perturbation mitochondriale, l'apoptose et la mort des cellules ciliées.
- 3) Implication de la protéine kinase activée par des agents mitogènes (MAPK) qui correspondent à des protéines de signalisation qui aident à activer la protéine kinase activée par le stress, un médiateur clé du stress oxydatif et de l'inflammation liés à la mort cellulaire.
- 4) Mort programmée des cellules ciliées dans la voie intracellulaire ou extracellulaire (caspase).
- 5) Infection et/ou inflammation qui induit l'apoptose via une réponse basée sur l'immunité innée, favorisant la mort de l'agent pathogène [7].

La *figure 3* récapitule les différentes voies qui peuvent être en cause lors d'une SNS.



**Figure 3:** Représentation des différentes voies des lésions de la cochlée suite à une exposition sonore.

Les mécanismes cellulaires impliqués dans la perte auditive peuvent être intimement liés. Actuellement, il n'existe pas d'outil permettant de caractériser les mécanismes physiopathologiques de la surdité d'étiologie indéterminée, ou d'identifier les sites lésionnels impliqués. Cela rend difficile un diagnostic étiologique précis, car aucun biomarqueur spécifique n'a été identifié pour caractériser les SNS en termes d'origine, de sévérité et d'évolution. L'identification de biomarqueurs liés aux mécanismes métaboliques impliqués pourrait permettre une meilleure caractérisation, prédiction de l'évolution et une gestion personnalisée des SNS.

### 2.3. SNS dues au bruit

Cette étiologie est une des plus fréquentes des SNS acquises. La perte auditive induite par le bruit peut être causée par une exposition à un son impulsif intense ou par des expositions à long terme avec une pression sonore supérieure à 75-85 dB [8]. La caractéristique pathologique induite par le bruit est la perte de cellules sensorielles qui ne peuvent pas se régénérer chez les mammifères [9]. De plus, la surdité induite par le bruit est

une maladie complexe qui résulte de l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux entraînant des dommages biologiques, et métaboliques.

Récemment, deux types d'exposition sonore ont été mis en évidence, les bruits impulsionnels ou continus, et surtout des conséquences différentes [8, 10] comme une perte auditive permanente et une perte auditive temporaire. Ils se différencient par leurs caractéristiques acoustiques [10]. Le bruit impulsionnel est défini comme le résultat de la libération brusque d'un son dans l'atmosphère, comme un coup de feu. Il forme une onde avec un temps de montée nul, de sorte qu'il atteint instantanément la pression maximale [8]. Les bruits continus et impulsionnels entraînent principalement des lésions des CCE de l'oreille interne, mais de manière potentiellement différente et à des degrés différents. Le bruit impulsionnel entraîne des lésions immédiates, avec une perte auditive permanente et un décalage des seuils transitoires. Alors que les bruits continus entraînent des lésions sur le long terme avec une cicatrisation inflammatoire des lésions cochléaires [10]. En plus de la destruction mécanique déjà connue, l'altération de la neurotransmission avec la perte de la connexion synaptique entre les CCI et les fibres des neurones du ganglion spiral, ainsi que le déséquilibre métabolique sont responsables d'une diminution des seuils auditifs, et méritent un intérêt pour l'élucidation des mécanismes de la perte auditive [11].

Sur la base des études sur le sujet, des hypothèses ont été émises sur les mécanismes physiopathologiques. La surdité induite par le bruit semble être le résultat d'une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cochlée due à un stress oxydatif, à une destruction mécanique des cellules de l'organe du nerf auditif et à une atteinte du nerf auditif [12]. Ainsi, les phénomènes physiopathologiques conduisant à la perte d'intelligibilité restent à élucider ce qui permettrait d'envisager des thérapeutiques pour les patients atteints de la SNS due au bruit.

Ainsi, pour mieux comprendre les effets des traumatismes acoustiques sur l'oreille interne, nous avons réalisé une analyse métabolomique afin de fournir un aperçu complet du métabolome du liquide périlymphatique après un traumatisme sonore. L'objectif ultime serait de concevoir un traitement spécifique et personnalisé pour le SNS.

## **2.4. La métabolomique**

La recherche de biomarqueurs en santé est en pleine expansion depuis quelques années avec l'attrait des méthodes dites omiques. Elles sont composées par la génomique qui va étudier l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) (ensemble des gènes), de la transcriptomique qui va s'intéresser à l'ensemble des Acides RiboNucléique (ARN), la protéomique à l'ensemble des protéines et la métabolomique à l'ensemble des métabolites.

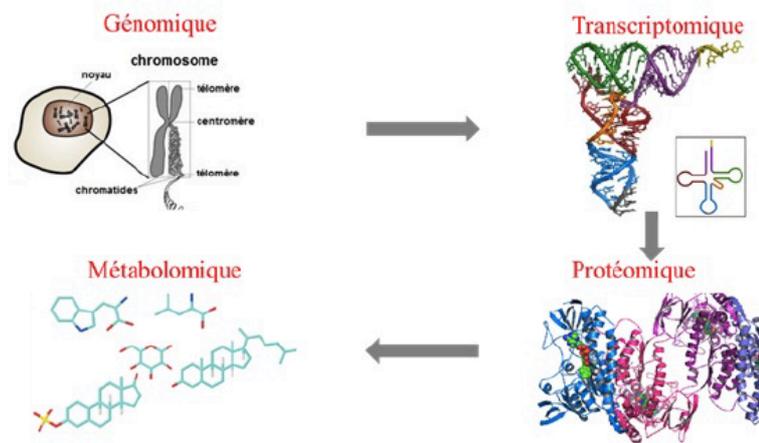
La métabolomique est une technique émergente permettant d'identifier des biomarqueurs en analysant les différents métabolites présents dans un échantillon. Le métabolome fait référence à tous les métabolites inférieurs à 1500 Daltons (de bas poids moléculaire d'origine biologique) qui fournit un aperçu des états physiologiques ou pathologiques à un moment donné [13]. Le métabolome est le reflet du génome, du transcriptome et du protéome soumis aux facteurs environnementaux comme le régime alimentaire, les toxines et les maladies [13]. Il s'agit d'une technique nouvelle qui s'est développée avec les progrès technologiques sur les techniques à haut débit. Il existe des possibilités multiples en termes de découverte au niveau des différents mécanismes physiopathologiques, pouvant permettre la mise en évidence de biomarqueurs pour le diagnostic étiologique et pour aboutir à des thérapeutiques ciblées. Ce que l'on appelle aujourd'hui la médecine personnalisée, de précision ou encore les 5 P (personnalisée, préventive, prédictive, participative et la médecine des preuves) [14]. Elle peut s'appliquer à différentes matrices comme sérum, urine, fèces et la périlymphe. Les

limites technologiques en termes de volume d'échantillon et de sensibilité notamment, étant peu à peu résolues par les innovations méthodologiques.

Les analyses métabolomiques font appel à plusieurs techniques analytiques, notamment la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS) et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LCMS) [15, 16]. Une revue systématique de la littérature a été réalisée sur les études qui se sont intéressées à SNS et l'analyse métabolomique (*annexe 1*), mettant en lumière les premiers résultats et surtout les possibilités prometteuses pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques.

Dans le contexte d'étude de SNS, la périlymphe est le fluide biologique le plus intéressant car il baigne les corps des cellules ciliées et se situe au plus proche des événements physiologiques et pathologiques. Le prélèvement de périlymphe chez l'homme normo-entendant présente un risque important de baisse des seuils auditifs rendant sa réalisation chez les sujets normo-entendants non éthique à ce jour. Il est en de même sur l'induction d'une surdité par le bruit chez l'homme. Pour contourner ces problèmes et essayer d'élucider la physiopathologie des surdités à l'aide de l'étude métabolomique, il est nécessaire d'utiliser des modèles animaux. Ces modèles permettent aussi de contrôler différents paramètres comme la nourriture, l'âge, le poids afin d'avoir une population homogène.

La *figure 4* expose les différentes techniques omiques dont la métabolomique.

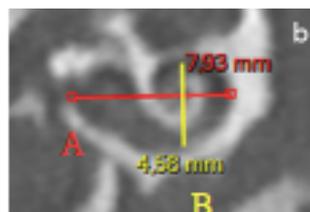


**Figure 4** : Le monde de l'« omique » (thèse du Dr Trinh, université de Tours)

## 2.5. Modèle animal et surdité

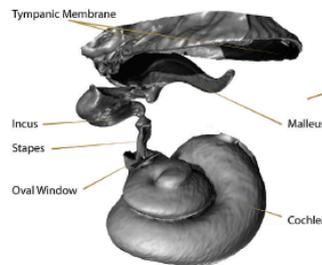
Dans la recherche en otologie, les rongeurs ont été les animaux le plus souvent utilisés [9]. Ils sont très largement associés aux modèles d'études animales de laboratoire du fait de leur disponibilité et des facilités d'hébergement. Pourtant, cette espèce ne montre que peu de similarités anatomiques, biologiques et métaboliques avec l'homme en ce qui concerne le système auditif.

Les brebis sont reconnues pour être un bon modèle animal proche de l'homme en otologie. La cochlée de brebis possède 2 tours et demi comme chez l'homme. Elle a été étudiée par une comparaison tomодensitométrique qui montre cette similitude anatomique (Figure 5) [17]. L'anatomie de la membrane de la fenêtre ronde de la brebis montre de multiples similitudes avec l'homme, contrairement au cochon d'inde [18, 19].



**Figure 5** : Coupe tomодensitométrique d'une cochlée de brebis représentant les 2 tours et demi de spire ainsi que la longueur et la largeur de celle-ci [17].

Au niveau de la chaîne ossiculaire, la vitesse du malleus, de l'incus et du stapès chez la brebis sont similaires à l'homme bien que les vitesses maximales se produisent pour des fréquences différentes. L'étude retrouve un meilleur rendement de transmission énergétique pour des fréquences de 4800 Hz (*Figure 6*) [20].

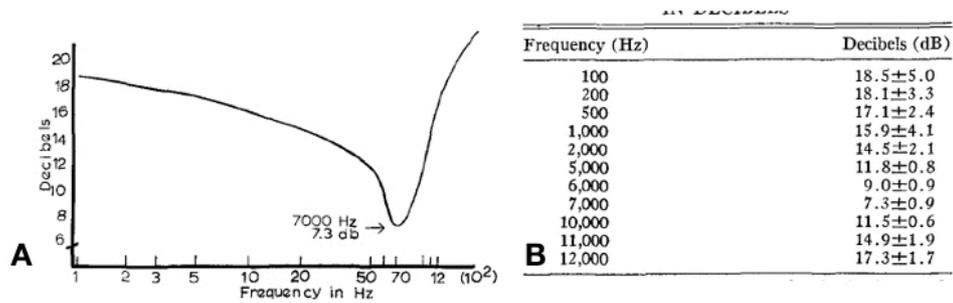


**Figure 6:** Reconstruction 3D de la chaîne ossiculaire d'une brebis avec la membrane tympanique (Tympanic membran), le malleus, l'incus et le stapès jusqu'à la cochlée (Cochlea) via la fenêtre ovale (Oval window) [20].

Au niveau des liquides cochléaires, chez les rongeurs et les petits animaux, le volume va être faible et difficile à prélever, alors que chez les gros animaux, le volume sera plus important et prélevé de manière plus aisée par la fenêtre ronde.

La brebis possède des seuils et des fréquences auditives similaires à l'homme [21-24]. En 1963, une étude portant sur quatre brebis de race Hampshire, avait par méthode comportementale trouvée pour des seuils de 30 dB un spectre auditif compris entre 1000 et 10 000 Hz [25]. Par la suite en 1972, une étude sur 10 brebis de race Suffolk, à l'aide d'un électroencéphalogramme, avait retrouvé une gamme de fréquence de 100 à 12 000 Hz. La sensibilité augmentait de 1000 Hz pour un maximum à 7000 Hz [26]. En 1990, une autre étude a montré que les seuils auditifs des brebis ne différaient pas des autres animaux à sabots, et possédaient une audition bien développée sur les basses fréquences, ce qui concorde avec l'homme contrairement à de nombreux rongeurs [27]. Le spectre auditif de la brebis est comparable à l'homme [28], en effet, l'homme possède un spectre auditif de 20 à 20 000 Hz et la brebis de 100 à 30000 Hz (*Figure 7*) [28]. Sur l'étude histologique, la cochlée des brebis est proche de celle de l'homme [19].

Pour ces multiples raisons, à savoir, une similarité anatomique et physiologique, une bonne accessibilité chirurgicale, un volume de périlymphe satisfaisant, et une possibilité d'accès à cet animal, nous avons choisi le modèle ovin et plus particulièrement la brebis pour notre étude.



**Figure 7:** Seuils PEA des brebis. A: Audiogramme de brebis et B: Seuils auditifs en décibel en fonction de la fréquence testée en hertz [28].

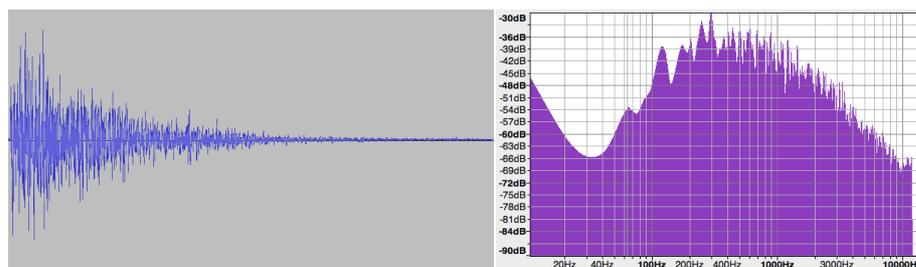
### **3. Objectifs**

Suite à ce rappel, la mise en évidence des mécanismes physiopathologiques des SNS induite par le bruit est nécessaire, pour améliorer nos connaissances. L'analyse métabolomique semble particulièrement intéressante, novatrice et adaptée à notre problématique. Le liquide périlymphatique situé au plus proche des évènements physiopathologiques s'impose comme le plus pertinent. Du fait du risque de cophose, au cours du prélèvement de celui-ci ainsi que l'induction d'une surdité par le bruit, l'utilisation d'un modèle animal est primordiale. Comme présenté précédemment, la brebis semble un modèle puissant pour s'approcher du modèle humain. L'objectif de notre étude est d'étudier les mécanismes physio-pathologiques des SNS induites suite à un traumatisme sonore.

## **4. Matériel et méthodes**

### **4.1. Groupes expérimentaux et exposition au bruit**

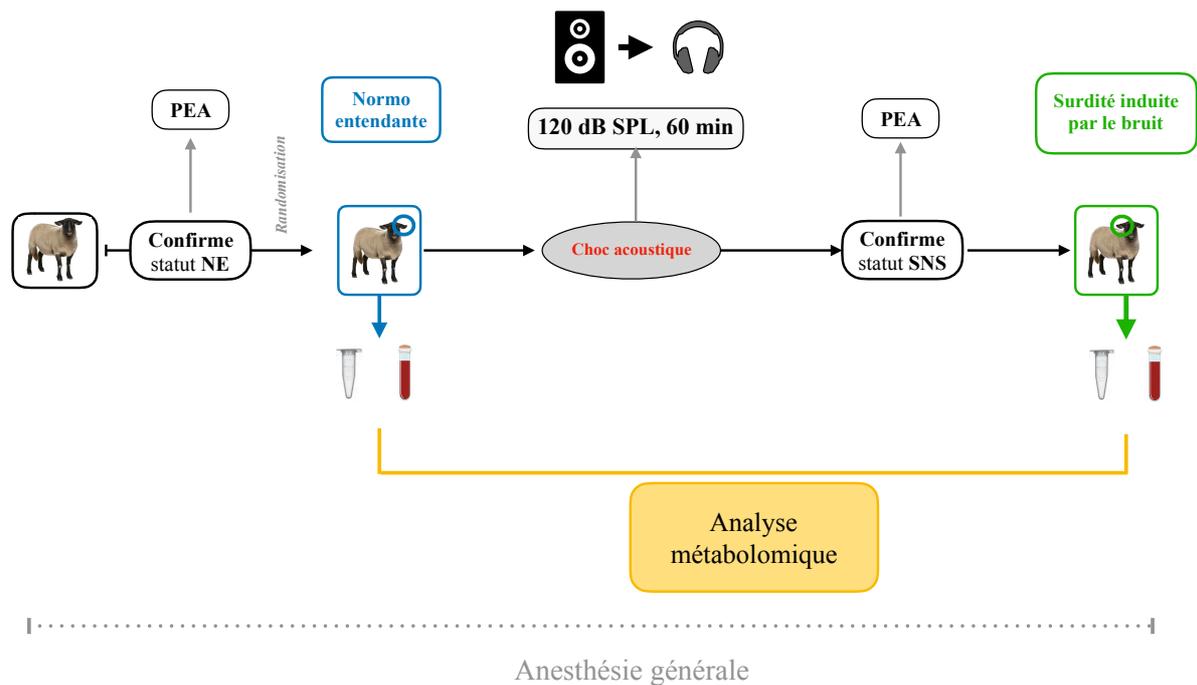
Toutes les procédures animales ont été approuvées par un comité d'éthique (APAFIS #2018112714344369) et toutes les expériences ont été réalisées conformément aux directives et réglementations en vigueur. Six brebis ont été incluses ; une oreille a servi de modèle normo-entendant (oreille témoin) et l'oreille controlatérale a été soumise à un traumatisme acoustique constituant le modèle de surdité induite par le bruit. Chaque brebis était son propre témoin, et le choix de l'oreille pour l'exposition au bruit était randomisé. Le stimulus sonore était un bruit pulsé (*Figure 8*) de 40 ms de 1 à 10 kHz répété en boucle à une intensité de 120 dB SPL pendant 1 heure.



*Figure 8: Représentation du stimulus sonore en spectre des séquences*

Le choc acoustique a été généré par ordinateur à l'aide du logiciel Adobe Audition®. Il était connecté à un audiomètre (Otométries® Aurical Plus) qui envoyait le bruit dans un casque (Peltor® H7A, EN352-1:1993). Le son a été mesuré par un sonomètre (Classe 1 Type 2250, Bruel & Kjaer®) et l'audiomètre a été calibré avec un bruit blanc.

La *figure 9* présente le déroulement de l'étude.

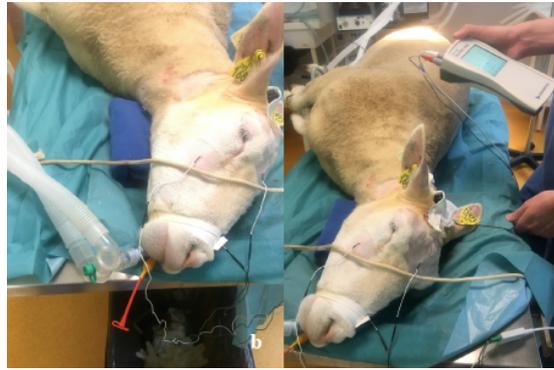


**Figure 9:** Déroulement de l'étude: brebis sous anesthésie générale, réalisation de PEA pour les statut NE, NE: Normo-Entendant, PEA: Potentiels  voqu s Auditifs, SNS: Surdité NeuroSensorielle. Le tube de polyéthylène représente le prélèvement de périlymphe, le tube sanguin le représente le sérum, min: minutes.

#### 4.2. Mesure du seuil auditif

Les potentiels évoqués auditifs à conduction osseuse (PEA) ont été utilisés pour l'estimation du seuil auditif (Figure 10). Des mesures de seuils (NavPRO ONE bio-logic® Otometrics) ont été réalisés pour confirmer le statut normo-entendant au début de l'expérience, puis pour quantifier la perte auditive induite par le choc acoustique. Les seuils auditifs ont été testés de 50 à 20 dB nHL par paliers de 10 dB. Les stimuli étaient des "clics"   une fréquence de modulation de 3000 Hz. Chaque oreille a été testée avec un masquage de l'oreille controlatérale par un bruit blanc. Ils ont été réalisés par conduction osseuse grâce à un transducteur osseux B71W et des électrodes aiguilles transcutanées. Le logiciel Biolink® a été utilisé pour analyser les courbes. Il a porté sur les latences et les amplitudes des ondes I   IV. Le statut normo-entendant a été affirmé par la présence de l'onde IV à 30 dB nHL. Les PEA ont été réalisés par conduction osseuse, et cette mesure ne peut être effectuée pour des intensités supérieures à 50 dB nHL. Pour éviter un biais trop important, nous avons considéré

les brebis ayant un seuil d'audition de 60 dB nHL, lorsqu'aucune onde IV n'était identifiée à 50 dB nHL.



*Figure 10: Réalisation de l'enregistrement des PEA. Brebis sous anesthésie générale avec une intubation orotrachéale.*

#### **4.3. Préparation des échantillons de périlymphe**

La périlymphe a été prélevée préalablement sur l'oreille saine et après l'exposition sonore sur l'oreille controlatérale. La fenêtre ronde a été ouverte à l'aide d'une aiguille de ponction lombaire (22G3 1/2 90mm 7/10) et la périlymphe a été recueillie par capillarité à l'aide d'une micropipette (Microcap 15  $\mu$ L, longueur 54mm, Drummond®). Tous les échantillons ont été aliquotés dans des tubes en polypropylène et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur analyse. L'extraction des métabolites a été réalisée avec 400  $\mu$ L de méthanol ajouté à 50  $\mu$ L de périlymphe. Puis les échantillons ont été agités pendant 5 secondes et incubés à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes pour déprotéiniser l'échantillon. Après une centrifugation qui a duré 25 minutes à 5000 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ , le surnageant (350  $\mu$ L) a été récolté et évaporé avec le concentrateur SpeedVac à  $40^{\circ}\text{C}$ . Le résidu sec a été remis en suspension dans 100  $\mu$ L d'un mélange méthanol/eau (75/25), puis 5  $\mu$ L d'échantillon ont été injectés pour une analyse par chromatographie liquide-spectrométrie de masse. Les échantillons de contrôle de qualité (QC) ont été préparés par mélange à volume égal de tous les échantillons analysés (QC pour chaque type de matrice d'échantillon).

#### 4.4. Analyse métabolomique

L'analyse métabolomique a été réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (LC/HRMS) comme décrit précédemment par notre équipe [15]. Les analyses ont été réalisées sur un système UPLC Ultimate WPS-300 (Dionex, Allemagne) couplé à un spectromètre de masse Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Allemagne) et l'ionisation a été réalisée selon le mode électrospray positif (ESI+) et négatif (ESI-). La chromatographie liquide a été réalisée avec une colonne HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) (1,6  $\mu$ L 150x2,10mm, 100 Å), maintenue à 40°C. Deux phases mobiles ont été utilisées et les gradients chromatographiques étaient à un débit de 0,3mL/min. Pendant l'acquisition, l'instrument a fonctionné à une résolution de 70000 ( $m/z=200$ ).

L'identification des métabolites a été réalisée en utilisant une bibliothèque de composés standard MSML® (Mass Spectrometry Metabolite Library, IROA Technologies™). Les valeurs de signal ont été calculées avec le logiciel Xcalibur® (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) en intégrant les pics chromatographiques correspondant aux métabolites sélectionnés. Le coefficient de variation (CV) associé à la surface de chaque métabolite a été calculé pour les échantillons de contrôle (QC) [ $CV\%=(\text{écart-type}/\text{moyenne})\times 100$ ]. Les métabolites dont le CV dans les QC était supérieur à celui de l'échantillon et/ou le  $CV>30\%$  ont été exclus.

#### 4.5. Analyse statistique

Pour analyser les seuils notés aux PEA du tronc cérébral, nous avons utilisé un test en rangs signés de Wilcoxon pour étudier cette valeur quantitative dans une série appariées.

Dans un premier temps, nous avons évalué la variabilité interindividuelle des métabolites dans la périlymphe dans des conditions physiologiques. Le coefficient de variation (CV) de chaque métabolite a été calculé pour les brebis normo-entendantes (par rapport aux animaux identiques de base) et comparé au CV des mêmes métabolites.

Ensuite, nous avons évalué la périlymphe, les changements métaboliques induits par le bruit. Le pourcentage de changement des concentrations relatives de chaque métabolite dans la périlymphe des brebis entre le côté exposé au bruit et le côté normo-entendant a été calculé et comparé au CV des mêmes métabolites dans le QC. Ces données ont été analysées par une analyse univariée et multivariée, en tenant compte des analyses par paires. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel gratuit Metaboanalyst, version 5.0 ([www.metaboanalyst.ca/](http://www.metaboanalyst.ca/)). L'analyse univariée des niveaux de métabolites entre les groupes était basée sur le diagramme de volcano plot qui représente les valeurs de changement de plis (FC) et le seuil de signification après le test non paramétrique de Wilcoxon. Les métabolites significatifs ont été sélectionnés par le graphique volcano plot sur la base d'un seuil de fold-change  $> 1,2$  ou  $< 0,8$  et d'un seuil de valeur p de test  $t < 0,1$ . La classification a été effectuée par une analyse en composantes principales (PCA) non supervisée pour visualiser la distribution des échantillons et mettre en évidence les outsiders putatifs. La représentation des QCs et des différents échantillons de brebis permet de comprendre la variabilité interindividuelle des brebis en relation avec la variabilité analytique représentée par la distribution des QCs. L'analyse discriminante partielle des moindres carrés (PLS-DA, représentant une analyse multivariée supervisée) a également été réalisée. Les graphiques de scores donnent un aperçu des échantillons classés. Les valeurs de l'influence de la variable sur

la projection (VIP) permettent d'identifier les métabolites les plus importants impliqués dans la discrimination dans le modèle multivarié supervisé. La performance du modèle a été évaluée par le test de permutation. Les tests multiples ont été pris en compte par le taux de fausse découverte (FDR).

#### **4.6. Analyse des voies métaboliques**

Des analyses de voies ont été réalisées à partir des métabolites les plus significatifs mis en évidence dans l'analyse PLS-DA et dans l'analyse univariée. L'analyse de l'enrichissement des voies métaboliques et l'analyse de la topologie des voies ont été réalisées par la plateforme de calcul MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Cette stratégie présente une seule valeur p pour chaque voie métabolique. L'analyse des voies calcule l'impact des voies qui représente une combinaison des résultats de centralité et d'enrichissement des voies ; les valeurs d'impact représentent l'importance relative de la voie par rapport aux autres voies incluses dans l'analyse. Le calcul de la valeur d'impact de la voie est le suivant: somme des mesures d'importance des métabolites normalisée par la somme des mesures d'importance de tous les métabolites dans chaque voie.

Un système de visualisation interactif de type Google-Map a également été utilisé pour présenter les résultats de l'analyse de manière intuitive.

## 5. Résultats

### 5.1. Animal et modèle de choc acoustique

Six brebis ont été incluses. Les caractéristiques de la population sont présentées dans le *tableau 1*. L'âge moyen était de  $29,9 \pm 3$  mois. Le poids moyen était de  $68 \pm 11$  kg.

**Tableau 1:** Caractéristiques des 6 brebis incluses

Brebis N°	Date de l'intervention	Race	Age (mois)	Poids (kg)	Durée de l'intervention (minutes)
1	14/12/2020	IDF	27,5	64	240
2	04/01/2021	IDF	27,8	52	240
3	24/01/2021	IDF	28,4	72	180
4	08/02/2021	IDF	30	82	180
5	22/02/2021	IDF	35,5	63	210
6	15/03/2021	IDF	29,9	72	180
<b>Moyenne <math>\pm</math>DS</b>			<b>29,9<math>\pm</math>3</b>	<b>68<math>\pm</math>11</b>	<b>205<math>\pm</math>29,5</b>

Légende: DS: Déviation Standard, IDF: Ile-De-France

Pour explorer les effets du bruit sur le métabolome de la périlymphe des brebis, les brebis ont été exposé à un bruit impulsionnel de 40 ms de 1 à 10 kHz à 120 dB SPL pendant 1 heure. L'audition des deux oreilles de 6 brebis ont été mesuré avant toutes les expériences. Les seuils auditifs moyens étaient de  $27 \text{ dB} \pm 5 \text{ dB nHL}$  mesurés par potentiels évoqués auditifs (PEA) avant le traumatisme sonore. Chaque brebis était son propre comparatif pour l'analyse métabolomique. Une oreille constituait le modèle normo-entendant et l'oreille controlatérale était ensuite soumise au traumatisme acoustique et devenait le modèle de surdité induite par le bruit. Les PEA effectués après le traumatisme acoustique ont montré une perte auditive significative des seuils mesurés entre avant et après le traumatisme acoustique ( $p < 0,00001$ ) (*Tableau 2*). Pour 5 enregistrements, aucune réponse était notée à une intensité de 50 dB, le seuil de 60 dB a été retenu.

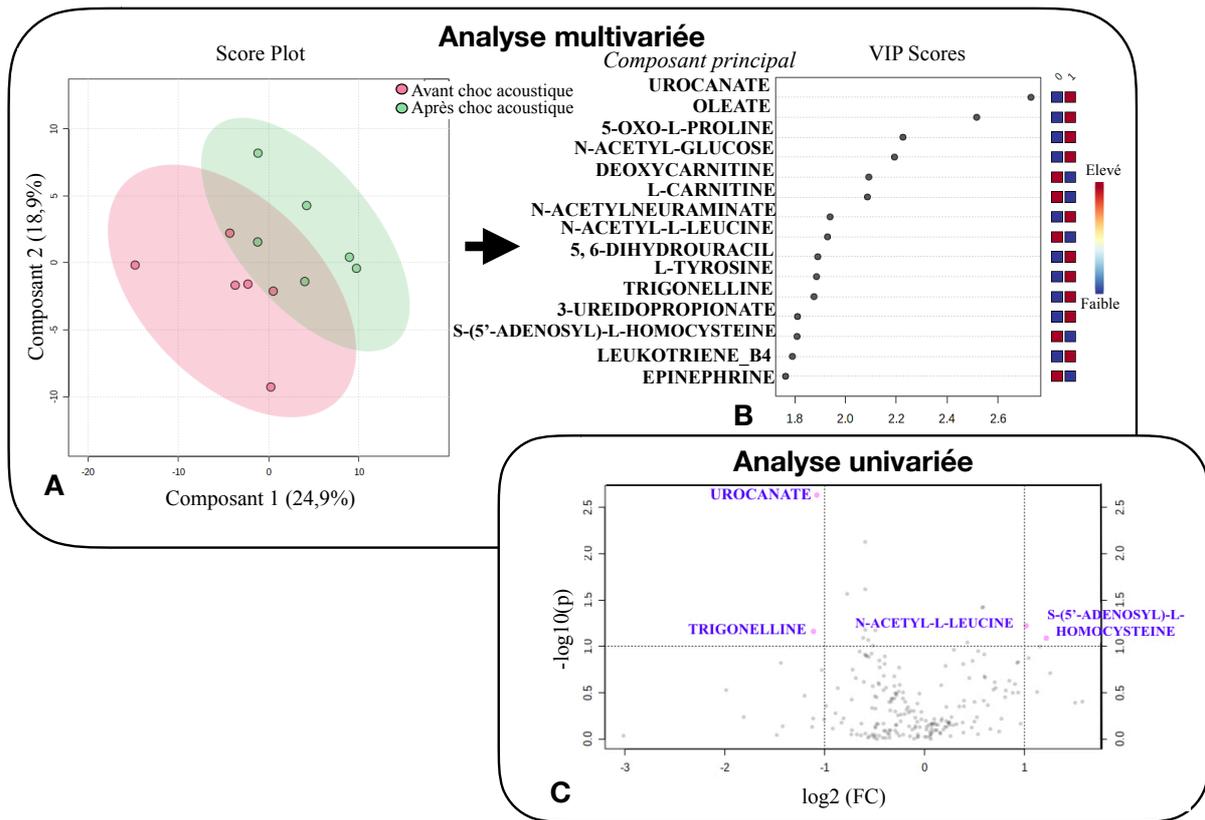
**Tableau 2:** Potentiels évoqués auditif recueillis, avant le prélèvement pour le coté normo entendant et après le choc acoustique pour le coté considéré comme modèle de la surdité induite. Seuls les seuils de l'onde IV sont représentés. Suite au traumatisme sonore, aucune réponse était notée à une intensité de 50 dB dans 5 cas, le seuil de 60 dB a été retenu. Suite au prélèvement de périlymphe sur oreille normo-entendante, aucune réponse n'était notée à une intensité de 50 dB dans 6 cas, le seuil de 60 dB a été retenu..

		PEA en conduction osseuse				
		Seuil d'apparition de l'onde IV				
		Modèle normo-entendant		Modèle de surdité induite par le bruit		
Brebis N°	Coté	Seuils avant prélèvement (dB)	Seuils après prélèvement (dB)	Coté	Seuils avant choc acoustique (dB)	Seuils après choc acoustique (dB)
1	G	30	60 (#)	D	30	60 (#)
2	G	30	60 (#)	D	30	50
3	D	30	60 (#)	G	30	60 (#)
4	D	30	60 (#)	G	30	60 (#)
5	D	30	60 (#)	G	20	60 (#)
6	G	20	60 (#)	D	20	60 (#)
<b>Moyenne ± DS</b>		<b>28 ± 4</b>	<b>60 ± 0</b>		<b>27 ± 5</b>	<b>58 ± 4</b>

Légendes: PEA: Potentiels évoqués auditifs, DS : Déviation Standard, # : Absence d'onde IV à 50 dB.

## 5.2. Conséquences du traumatisme acoustique sur le métabolome de la périlymphe

Douze échantillons de périlymphe ont été prélevés sur 6 brebis, une oreille étant considérée comme témoin (oreille normo-entendante) et l'oreille controlatérale comme le modèle exposé au traumatisme acoustique. Le volume moyen de périlymphe prélevé était de  $89 \pm 11 \mu\text{L}$ . La périlymphe de l'oreille témoin a été prélevée au début de l'étude et la périlymphe de l'oreille soumise au traumatisme acoustique a été prélevée après l'exposition sonore. Les échantillons ont été analysés par chromatographie liquide avec spectrométrie de masse (LCMS/MS). Deux cents treize métabolites ont été identifiés. Le tracé du score de l'analyse en composantes principales (PCA) entre les profils des contrôles de qualité des échantillons et ceux des brebis n'a révélé aucune valeur aberrante (*Figure 11*).



**Figure 11** : Analyse statistique pour comparer le profil métabolomique du liquide périlymphatique des brebis avant et après l'exposition sonore. A : Analyse multivariée par analyse discriminante partielle des moindres carrés (PLSDA) permettant de distinguer les brebis avant ou après l'exposition sonore. Les **cercles rouges** montrent les données des brebis avant le choc acoustique, et les **cercles verts** après le choc acoustique. Les composantes 1 et 2 représentent une combinaison linéaire des métabolites pertinents exprimant une variance maximale. B : Le rang des différentes métabolites (les 15 premiers) identifiés par le PLS-DA selon le score VIP (Influence variable de la projection) à gauche. Les cases colorées à droite indiquent les concentrations relatives de concentrations relatives du métabolite correspondant dans chaque groupe étudié. C : Analyse univariée via un diagramme basé sur le changement de fold et la valeur p, mettant en évidence 4 métabolites. Le volcano plot basé sur la comparaison des échantillons de périlymphe NE et SNS induite par le bruit, mettant en évidence les métabolites caractérisés par un rapport de concentrations  $FC > 1,2$  et un t-test ( $y < 0,1$ ) (points roses). Notez que les changements de fold et les valeurs p sont transformées en logarithme. Plus sa position est éloignée de (0,0), plus la caractéristique est importante.

Une analyse univariée appariée entre les témoins (statut NE) et les échantillons de périlymphe de surdité induite par le bruit avec un  $p < 0,1$  et un rapport de concentration, fold change (FC)  $> 1,2$  ou  $< 0,8$  a montré 4 métabolites significativement différents : Urocanate ( $p = 0,004$ ,  $FC = 0,48$ ), S-(5'-Adenosyl)-L-Homocysteine ( $p = 0,06$ ,  $FC = 2,32$ ), Trigonelline ( $p = 0,06$ ,  $FC = 0,46$ ) et N-Acetyl-L-Leucine ( $p = 0,09$ ,  $FC = 2,02$ ),.

L'analyse multivariée supervisée par paires a révélé un modèle correct mais non significatif pour la discrimination des groupes (précision de 50%, test de permutation NS

p=0,75). Ce modèle a permis d'identifier les métabolites impliqués dans les mécanismes physiopathologiques associés à l'exposition au bruit. En effet, plusieurs métabolites ont eu tendance à être augmentés dans la périlymphe des brebis après une exposition au bruit : Urocanate, Oléate, 5-Oxo-L-Proline, N-Acétyl-Glucose, N-Acétylneuraminate, L-Tyrosine, Trigonelline, Leukotriène-B4, 5,6-Dihydrouracil, 3-Ureidopropionate et plusieurs autres métabolites avaient une tendance à être diminués : Déoxycarnitine, L-Carnitine, N-Acétyl-L-Leucine, S-(5'-Adenosyl)-L-Homocystéine, Epinéphrine.

### 5.3. Analyse des voies métaboliques

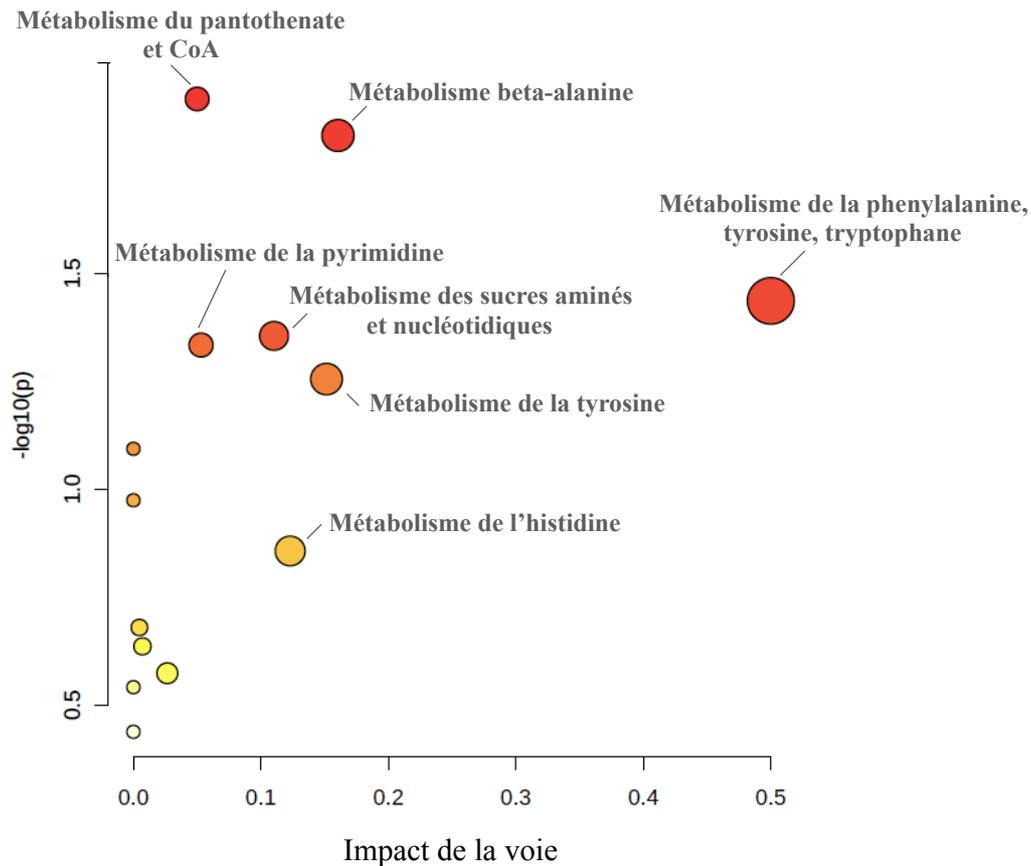
Selon tous les métabolites considérés comme pertinents après analyse univariée et multivariée, l'analyse des voies métaboliques a révélé l'implication de 5 voies principales : métabolisme de la phénylalanine/tyrosine/tryptophane (p=0,037 ; Impact=0. 5), métabolisme de la  $\beta$ -alanine (p=0,015 ; Impact=0,16), biosynthèse du pantothénate et du CoA (p=0,0124 ; Impact=0,05), métabolisme de la pyrimidine (p=0,046 ; Impact=0,11) et métabolisme des sucres aminés et nucléotidiques (p=0,044 ; Impact=0,05) (*Tableau 3*).

**Tableau 3** : Analyse des voies métaboliques impliquées dans la surdité induite par le bruit retrouvées au cours de l'analyse de la périlymphe.

Voies métaboliques	P-value	FDR	Impact
<b>Biosynthèse pantothénate et CoA</b>	0,012	0,64	0,05
<b>Métabolisme de la Beta-alanine</b>	0,015	0,64	0,16
<b>Biosynthèse phénylalanine, tyrosine, tryptophane</b>	0,037	0,78	0,5
<b>Métabolisme des sucres aminés et nucléotidique</b>	0,044	0,78	0,11
<b>Métabolisme de la pyrimidine</b>	0,046	0,78	0,05

Légendes : Le FDR p est la valeur p ajustée en utilisant le taux de découverte erronée ; l'Impact est la valeur d'impact de la voie calculée à partir de l'analyse de la topologie de la voie.

Un système de visualisation interactif Google-map a été mis en place pour faciliter l'exploration des données. L'identification des voies et des composés est générée dynamiquement en fonction des interactions avec le système de visualisation (*figure 12*). La principale voie métabolique identifiée était la biosynthèse de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane.



**Figure 12 :** Visualisation interactive de type Google-map des voies métaboliques retrouvées dans la périlymphe et impliquées dans la surdité induite par un choc acoustique

## **6. Discussion**

Par cette analyse métabolomique, il a été identifié 213 métabolites dans la périlymphe de brebis. Les résultats de cette étude fournissent de nouvelles hypothèses sur la perte auditive induite par un traumatisme acoustique. Les 4 principaux métabolites identifiés pour séparer l'oreille normo-entendante de celle exposée au bruit sont l'urocanate, le S-(5'-Adenosyl)-L-Homocysteine, la trigonelline et la N-Acetyl-L-Leucine. L'étude des voies métaboliques a noté que les principales voies en cause dans ce modèle de SNS sont le métabolisme de la phénylalanine/tyrosine/tryptophane, métabolisme de la  $\beta$ -alanine, biosynthèse du pantothénate et du CoA, métabolisme de la pyrimidine et métabolisme des sucres aminés et nucléotidiques.

De plus, il est important de noter que l'analyse a identifié plusieurs voies, non décrites dans la littérature, modifiées par le bruit. Cela justifie l'intérêt de cette technique omique pour fournir de nouvelles informations sur les changements du métabolome de la périlymphe suite à une SNS.

### **6.1. L'approche métabolomique comme stratégie puissante pour explorer la périlymphe**

Notre méthodologie a permis l'identification de 213 métabolites en rapport avec 5 voies métaboliques principales. Six études précédentes sur la métabolomique de l'oreille interne ont été publiées [11, 15, 29-32]. Deux articles portaient sur l'analyse métabolomique de la périlymphe au cours d'une implantation cochléaire chez l'homme [15, 29]. Une étude analysait le liquide périlymphatique après une ototoxicité induite par le cisplatine chez le cochon d'inde [31]. Trois études ont effectué, comme nous, la métabolomique de la périlymphe suite à une perte auditive induite par le bruit [11, 30, 32]. Il s'agit d'études animales, avec 2 études sur des cochon d'inde [30, 32] et l'autre sur des souris [11]. Il faut noter que les études ont généralement observé une centaine de métabolites, nous avons trouvé

dans notre étude une quantité abondante de 213 métabolites. Une autre étude avait observé 220 métabolites chez la souris en étudiant l'ensemble de l'os temporal (structures cellulaires, tissulaires et liquidiennes) et pas seulement le liquide périlymphatique [11]. Cette quantité abondante de métabolites que nous avons observée peut s'expliquer par la technique d'analyse métabolomique utilisée par notre équipe, le plus grand volume prélevé et la technique de prélèvement par capillarité.

La métabolomique a déjà été utilisée pour étudier les effets de l'exposition au bruit (110 dB pendant 1 heure) au niveau de l'ensemble de l'encéphale chez le rat [33]. Ils ont pu identifier 88 métabolites, dont 17 étaient impliqués dans le traumatisme sonore. Les 4 voies métaboliques déduites des métabolites identifiés étaient la voie du glutathion, la voie de l'aspartate/alanine/glutathion, la voie de l'arginine/proline/glycine, et la voie de la sérine/thréonine. Ils ont conclu que le glutathion jouait un rôle antioxydant important, et l'urée un rôle dans le maintien de la fonction neuronale.

## **6.2. Le traumatisme sonore peut être associé à des modifications métaboliques qui peuvent être liées à plusieurs mécanismes.**

### *6.2.1. Neurotransmission*

Dans notre étude, le traumatisme a eu un impact sur la biosynthèse de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane qui sont des acides aminés aromatiques, précurseurs des neurotransmetteurs monoamines, la sérotonine et les catécholamines (dopamine, norépinéphrine et épinéphrine) [34]. Ce point a été soulevé dans une autre étude où les auteurs se sont demandés si des altérations de ces acides aminés étaient également observées dans la cochlée des mammifères [11]. Nos résultats tendent à aller dans ce sens. Il a été montré que les acides aminés aromatiques suppriment la décharge des fibres afférentes

innervant les cellules ciliées, leur rôle dans la perte auditive induite par le bruit reste à élucider [35].

### *6.2.2. Stress oxydatif*

Les principaux mécanismes physiopathologiques suggérés, à partir des métabolites observés et des voies métaboliques identifiés dans notre étude, responsables de la perte auditive après un traumatisme acoustique semblent être les voies du stress oxydatif.

La voie de biosynthèse du pantothénate et du CoA a été mise en évidence après une exposition sonore, cette voie a été suggérée dans des études précédentes avec une augmentation du pantothénate dans la périlymphe après un traumatisme acoustique chez le cochon d'inde [30]. Le pantothénate est une vitamine essentielle pour la biosynthèse du coenzyme A (CoA). Le CoA est un cofacteur pour une multitude de réactions enzymatiques, notamment l'oxydation des acides gras, des glucides, du pyruvate, du lactate, des corps cétoniques et des acides aminés. Il est impliqué dans le catabolisme des acides gras [36]. Le pantothénate permet de réguler la synthèse du CoA dans les membranes cellulaires et de protéger contre un stress oxydatif accru en réduisant le niveau de malondialdéhyde qui est le principal produit de la peroxydation lipidique. Il peut inhiber le processus inflammatoire en réduisant le niveau des protéines réactives inflammatoires et en favorisant les niveaux de CoA et de glutathion [37]. Le 5,6-dihydrouracil appartient à cette voie métabolique. Il a été augmenté suite à une exposition sonore, ceci s'explique par le fait qu'il est susceptible d'entraîner une augmentation des ROS, et de maintenir une concentration élevée de calcium intracellulaire [38].

La voie du stress oxydatif et sa contrebalance, par l'action des systèmes antioxydants, bien documentées dans les traumatismes acoustiques, se reflètent dans nos résultats. Tout d'abord, l'urocanate était significativement augmenté après un traumatisme acoustique. Il est

susceptible de conduire à la production de ROS responsables d'une augmentation de la mort cellulaire [39]. Il a été observé dans le cerveau, où il était associé à une augmentation de la synthèse du glutamate [40]. Le glutamate est le principal neurotransmetteur du système auditif. Il assure la transmission synaptique entre les cellules ciliées internes et les neurones du ganglion spiral et du ganglion afférent. Une libération excessive de glutamate et/ou une hyper activation des récepteurs du glutamate dans la cochlée entraîne une excitotoxicité responsable de lésions des synapses des cellules ciliées [41].

Une augmentation de la 5-Oxo-L-Proline a été observée. Il s'agit d'un produit de dégradation du glutathion [42]. Le glutathion est connu pour être un antioxydant ; il est distribué dans la strie vasculaire et le ligament spiral. Il a un effet protecteur contre l'ototoxicité par son rôle antioxydant au niveau cochléaire [43]. Une augmentation du glutathion après une exposition sonore dans la cochlée s'est avérée être un phénomène protecteur [44].

### *6.2.3. Destruction mécanique*

La destruction mécanique des cellules suite à un traumatisme acoustique a été suggérée dans nos résultats par la présence de plusieurs métabolites ( $\beta$ -alanine, N-acétylneuraminatate). La  $\beta$ -alanine est présente dans les cellules ciliées, son augmentation dans la périlymphe suggère la destruction cellulaire suite à une exposition sonore [45]. Le N-acétylneuraminatate, un dérivé de l'acide sialique, est généralement situé sur la partie terminale des glycoprotéines et des glycolipides situés à la surface de la membrane cellulaire [29]. Les concentrations élevées de ce métabolite s'expliquent par la rupture de la membrane cellulaire et se retrouvent lors de la mort cellulaire et au début de l'apoptose. Une corrélation a été trouvée entre la durée de la surdité et le taux de N-acétylneuraminatate dans des échantillons de périlymphe humaine prélevés lors d'une implantation cochléaire [29].

#### 6.2.4. Lésion nerveuse

La voie de l'atteinte nerveuse a été suspectée dans nos résultats par l'identification de plusieurs métabolites (N-Acétyl-L-Leucine, trigonelline). Une diminution de la N-Acétyl-L-Leucine a été observée. Elle est impliquée au niveau du labyrinthe postérieur en rééquilibrant le potentiel de membrane au niveau des noyaux vestibulaires pour permettre une compensation vestibulaire. Elle a aussi un effet sur la repousse des neurones. Notre hypothèse pour expliquer sa diminution dans la périlymphe suite à un traumatisme acoustique est son effet sur la cicatrisation nerveuse [46]. A ce jour, il n'existe pas d'étude sur la surdité induite par le bruit et la N-acétyl-L-leucine.

En plus de ces trois mécanismes physiopathologiques à l'origine des surdités induites par le bruit, la trigonelline est significativement modifiée suite à un traumatisme acoustique. Elle est augmentée dans la périlymphe après une exposition au bruit. C'est un alcaloïde, et un produit du métabolisme de la niacine (vitamine B3). Il appartient au métabolisme du nicotinate et du nicotinamide. Son rôle est démontré dans la réduction des dommages auditifs, et dans la perte d'audition chez la souris [47, 48]. Il réduit les effets neurodégénératifs avec l'utilisation du facteur de croissance nerveuse. Il réduit le stress oxydatif et provoque des effets neuroprotecteurs en interagissant avec les voies de signalisation ototoxiques [47, 48]. A l'heure actuelle, la trigonelline a un effet neuroprotecteur et de régénération nerveuse démontré [47, 48]. Par contre, aucun effet, n'a été démontré au niveau de la régénération des cellules ciliées. Dans notre étude, nous observons une augmentation de la périlymphe suite à un traumatisme acoustique, ce qui pourrait être lié à un effet neuroprotecteur de ce métabolite. Une augmentation a été observée chez des cochon d'Inde suite à une exposition sonore et chez des patients sourds lors d'une implantation cochléaire [15, 32]. Ces résultats sont particulièrement intéressants dans la recherche de l'association entre la trigonelline et les SNS, suggérant que son augmentation pourrait être due à la régénération nerveuse dans ces cas.

## **7. Conclusion**

Nos résultats suggèrent que la métabolomique est un outil intéressant pour élucider les mécanismes physiopathologiques d'une surdité induite par le bruit pour étudier les principaux métabolites et les voies métaboliques mises en jeu dans cette SNS.

Cette étude apporte un éclairage sur les mécanismes physiopathologiques du choc acoustique d'un point de vue métabolique et offre de nouvelles opportunités pour étudier les mécanismes physiopathologiques, pour la découverte de biomarqueurs et pour proposer des stratégies thérapeutiques contre la perte auditive. L'analyse métabolomique permettrait de mettre en lien le profil métabolomique de la périlymphe avec l'étiologie de SNS que le patient présente et ainsi de développer des thérapeutiques adaptées. Cela nécessite des études complémentaires avec des cohortes de patients dont l'étiologie de SNS est connue ou des modèles animaux de SNS.

## **8. Références**

- 1- World Health Organisation. Deafness and hearing impairment. Available at : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/index/html>.
- 2- Kral A, O'Donoghue GM. Profound deafness in childhood. *N Engl J Med.* 2010;363(15):1438-50.
- 3- Cunningham LL, Tucci DL. Hearing Loss in Adults. *N Engl J Med.* 2017;21;377(25):2465-73.
- 4- Blamey P. et al. Factors affecting auditory performance of postlinguistically deaf adults using cochlear implants. *Audiol Neurootol* 1996; 1(5):293-306.
- 5- Anniko M, Wróblewski R. Ionic environment of cochlear hair cells. *Hear Res.* 1986;22:279-93.
- 6- Ferrary E, Couloignier V, Sterkers O. Physiologies des liquides labyrinthites. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Oto-Rhino-laryngologie, 20-030-B-10, 2007.
- 7- Wong ACY, Ryan AF. Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea. *Front. Aging Neurosci.* 2015;7:58.
- 8- Hamernik RP, Hsueh KD. Impulse noise: some definitions, physical acoustics and other considerations. *J Acoust Soc Am.* 1991;90(1):189-96.
- 9- Reis A, Dalmolin SP, Dallegrove E. Animal models for hearing evaluations: a literature review. *Revista CEFAC.* 2017;19, 417-28.
- 10- Le Prell CG, Hammill TL, Murphy WJ. Noise-induced hearing loss and its prevention: Integration of data from animal models and human clinical trials. *J Acoust Soc Am.* 2019;146(5):4051.
- 11-Ji L, Lee HJ, Wan G, et al. Auditory metabolomics, an approach to identify acute molecular effects of noise trauma. *Sci Rep.* 2019;9(1):9273.

- 12- Le TN, Straatman LV, Lea J. Current insights in noise-induced hearing loss: A literature review of the underlying mechanism, pathophysiology, asymmetry, and management options. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2017;23;46(1):41.
- 13- Carta F et al. Metabolomic analysis of urine with Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy in patients with idiopathic sudden sensorineural hearing loss: A preliminary study. *Auris Nasus Larynx.* 2017;44(4):381-9.
- 14- Gardes J, Maldivi C, Boisset D, et al. Maxwell®: An Unsupervised Learning Approach for 5P Medicine. *Stud. Health Technol. Inform.* 2019;264:1464–15.
- 15- Mavel S, et al. Validation of metabolomics analysis of human perilymph fluid using liquid chromatography-mass spectroscopy. *Hear Res.* 2018;367:129-136.
- 16- Diémé B, and al. Workflow methodology for rat brain metabolome exploration using NMR, LC-MS and GC-MS analytical platforms. *J Pharm Biomed Anal.* 2017;5;142:270-278.
- 17- Trinh TT, Cohen C, Boullaud L, et al. Sheep as a large animal model for cochlear implantation. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2021;26:S1808-8694(21)00059-8.
- 18- Han S, Suzuki-Kerr H, Suwantika M, et al. Characterization of the Sheep Round Window Membrane. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2021;22(1):1-17.
- 19- Soares HB, Lavinsky L. Histology of sheep temporal bone. *Braz J Otolhinolaryngol.* 2011;77:285–92.
- 20- Péus D et al. Sheep as a large animal ear model: Middle-ear ossicular velocities and intracochlear sound pressure. *Hear Res.* 2017;351:88-97.
- 21- Dawes GS. Fetal and neonatal physiology. A comparative study of changes at birth. Year book Medical Publishers, 1968 (247 pages). Chicago.
- 22- Jones CT, Nathanielsz PW. The physiological development of the fetus and newborn. Academic Press, 1985 (837 pages). New York.

- 23- Wolfson MR, Durrant JD, Tran NN, et al. Emergence of the brain-stem auditory evoked potential in the premature lamb. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1990;75(3):242-50
- 24- Griffiths SK, Pierson LL, Gerhardt KJ, et al. Noise induced hearing loss in fetal sheep. *Hear Res.* 1994;74(1-2):221-30.
- 25- Wollack CH. The auditory acuity of the sheep (*Ovis aries*). *J. Aud. Res.* 1963, 3, 121-32.
- 26- Ames DR, Arehart LA. Physiological response of lambs to auditory stimuli. *J Anim Sci.* 1972;34(6):994-8.
- 27- Heffner RS, Heffner HE. Hearing in domestic pigs (*Sus scrofa*) and goats (*Capra hircus*). *Hear Res.* 1990;48(3):231-40.
- 28- Hill MW, Heavens RP, Baldwin BA. Auditory evoked potentials recorded from conscious sheep. *Brain Res Bull.* 1985;15(5):453-8.
- 29- Trinh TT, Blasco H, Emond P, et al. Relationship between metabolomics profile of perilymph in Cochlear-Implanted patients and duration of hearing loss. *Metabolites.* 2019;1;9(11):262.
- 30- Pirttilä K, Videhult Pierre P, Haglöf J, et al. An LCMS-based Untargeted Metabolomics Protocol for Cochlear Perilymph: Highlighting Metabolic Effects of Hydrogen Gas on the Inner Ear of Noise Exposed Guinea Pigs. *Metabolomics* 2019;15(10):138.
- 31- Fransson AE et al. Hydrogen Inhalation Protects against Ototoxicity Induced by Intravenous Cisplatin in the Guinea Pig. *Front Cell Neurosci*, 2017;13;11:280.
- 32- Fujita T, Yamashita D, Irino Y, et al. Metabolomic profiling in inner ear fluid by gas chromatography/mass spectrometry in guinea pig cochlea. *Neurosci Lett*, 2015;606:188-93
- 33- He J et al. Brain Metabolic Changes in Rats following Acoustic Trauma. *Front Neurosci.* 2017;24;11:148.
- 34- Fernstrom JD, Fernstrom MH. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr.* 2007;137(6 Suppl 1):1539S-1547S; discussion 1548S

- 35- Mroz EA, Sewell WF. Pharmacological alterations of the activity of afferent fibers innervating hair cells. *Hear Res.* 1989;38(1-2):141-62.
- 36- Tahiliani AG, Beinlich CJ. Pantothenic acid in health and disease. *Vitam Horm.* 1991;46:165-228.
- 37- Ma T, et al. UPLC-MS-based urine nontargeted metabolic profiling identifies dysregulation of pantothenate and CoA biosynthesis pathway in diabetic kidney disease. *Life Sci.* 2020;1;258:118160.
- 38- Kölker S, et al. 3-Ureidopropionate contributes to the neuropathology of 3-ureidopropionase deficiency and severe propionic aciduria: a hypothesis. *J Neurosci Res.* 2001;15;66(4):666-73.
- 39- Brosnan ME, Brosnan JT. Histidine Metabolism and Function. *J Nutr.* 2020;1;150(Suppl 1):2570S-2575S.
- 40- Hart PH, Norval M. The Multiple Roles of Urocanic Acid in Health and Disease. *J Invest Dermatol.* 2021;141(3):496-502.
- 41- Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. *J Neurosci.* 2009;29:14077–85.
- 42- van der Werf P, Meister A. The metabolic formation and utilization of 5-oxo-L-proline (L-pyroglutamate, L-pyrrolidone carboxylate). *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1975;43:519-56.
- 43- Kurabi A, Keithley EM, Housley GD, et al. Cellular mechanisms of noise-induced hearing loss. *Hear Res.* 2017;349:129-37.
- 44- Yamasoba T, Nuttall AL, Harris C, et al. Role of glutathione in protection against noise induced hearing loss. *Brain Res* 1998;784:82-90.
- 45- Drescher MJ, Drescher DG. N-acetylhistidine, glutamate, and beta-alanine are concentrated in a receptor cell layer of the trout inner ear. *J Neurochem.* 1991;56(2):658-64.

- 46- Günther L, Beck R, Xiong G, et al. N-acetyl-L-leucine accelerates vestibular compensation after unilateral labyrinthectomy by action in the cerebellum and thalamus. *PLoS One*. 2015;24;10(3):e0120891.
- 47- Castañeda R, Rodriguez I, Nam YH, et al. Trigonelline promotes auditory function through nerve growth factor signaling on diabetic animal models. *Phytomedicine*. 2017; 1;36:128-36.
- 48- Yoshinari O, Takenake A, Igarashi K. Trigonelline ameliorates oxidative stress in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Med Food*. 2013;16(1):34-41.

## **9. Annexe**

Ce travail a été nommé pour le prix du Chirurgien de l'avenir 2021.



MASTER 2 DE SCIENCES CHIRURGICALES PARIS SUD UNIVERSITE – FONDATION DE L'AVENIR

<p><b>PRIX DES CHIRURGIENS DE L'AVENIR 2021</b> REGLEMENT</p>
---

Article accepté et publié dans « *metabolites journal* », IF : 4,932

Systematic Review

# Metabolomic Studies in Inner Ear Pathologies

Luc Boullaud <sup>1,2,\*</sup>, H el ene Blasco <sup>2,3,4</sup>, Thuy-Tr an Trinh <sup>1,3</sup> and David Bakhos <sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup> ENT Department and Cervico-Facial Surgery, University Center Hospital of Tours, 2 Boulevard Tonnell e, 37044 Tours, France; thuytran.trinh@gmail.com (T.-T.T.); david.bakhos@univ-tours.fr (D.B.)

<sup>2</sup> INSERM U1253, iBrain, University of Tours, 10 Boulevard Tonnell e, 37000 Tours, France; helene.blasco@univ-tours.fr

<sup>3</sup> Faculty of Medicine, University of Tours, 10 Boulevard Tonnell e, 37000 Tours, France

<sup>4</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, University Center Hospital of Tours, 2 Boulevard Tonnell e, 37044 Tours, France

<sup>5</sup> House Institute Foundation, Los Angeles, CA 90057, USA

\* Correspondence: luc.boullaud@gmail.com; Tel.: +33-247-474-785; Fax: +33-247-473-600

**Abstract:** Sensorineural hearing loss is the most common sensory deficit. The etiologies of sensorineural hearing loss have been described and can be congenital or acquired. For congenital non-syndromic hearing loss, mutations that are related to sites of cochlear damage have been discovered (e.g., connexin proteins, mitochondrial genes, etc.). For cytomegalovirus infection or auditory neuropathies, mechanisms are also well known and well researched. Although the etiologies of sensorineural hearing loss may be evident for some patients, the damaged sites and pathological mechanisms remain unclear for patients with progressive post-lingual hearing loss. Metabolomics is an emerging technique in which all metabolites present in a sample at a given time are analyzed, reflecting a physiological state. The objective of this study was to review the literature on the use of metabolomics in hearing loss. The findings of this review suggest that metabolomic studies may help to develop objective tests for diagnosis and personalized treatment.

**Keywords:** metabolomic; sensorineural hearing loss; perilymph



**Citation:** Boullaud, L.; Blasco, H.; Trinh, T.-T.; Bakhos, D. Metabolomic Studies in Inner Ear Pathologies. *Metabolites* **2022**, *12*, 214. <https://doi.org/10.3390/metabo12030214>

Academic Editor: Anna Floegel

Received: 20 December 2021

Accepted: 23 February 2022

Published: 26 February 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:**   2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Sensorineural hearing loss (SNHL) is the most common sensory deficit and a major public health problem [1]. It is estimated that hearing loss affects approximately 466 million people worldwide, or 5% of the world's population, and 34 million of these are children. Estimates show that by 2050, 900 million people will have disabling hearing loss, representing one-tenth of the world's population (<https://www.who.int/>, accessed on 8 July 2021). SNHL is a chronic disease that can affect oral language development [2], education, and social interaction. It impairs one's quality of life by reducing social and professional relationships and communication.

SNHL may result from damage between the cochlea and the auditory cortex. It can be attributed to endocochlear lesions, neural impairment (e.g., neuropathy or vestibular schwannoma), or central hearing loss. Endocochlear damage is thought to be the leading cause of SNHL.

SNHL can be congenital (present at birth) or acquired. Congenital SNHL may be due to hereditary or non-hereditary causes. Genetic SNHL (approximately 33% of cases) is classically divided into syndromic forms, such as Waardenburg's syndrome and Jervell and Lange-Nielsen syndrome, and non-syndromic forms, e.g., autosomal dominant, autosomal recessive, X-linked, and mitochondrial. Genetic analysis has allowed for a better understanding of the pathophysiological mechanisms of SNHL. For example, some genes can affect inner ear homeostasis (e.g., mutation in GJB2 coding for connexin 26) or mechano-electrical transduction (e.g., mutation in potassium voltage-gated channel subfamily Q

member 4 (KCNQ4) coding for potassium channels). Non-hereditary causes include prenatal infections (e.g., cytomegalovirus infection), prematurity, anoxia, preeclampsia, maternal diabetes, and drug or alcohol use during pregnancy.

The major causes of acquired SNHL are aging, ototoxic drugs, genetic mutations, sudden hearing loss, and external factors (e.g., smoking) [2,3]. However, in approximately 50% of post-lingual cases of SNHL, the etiology remains unknown despite clinical, audiometric, radiological, or genetic findings [4]. For these patients, the site of the lesion and the molecular mechanisms involved remain unclear. SNHL may be related to the involvement of approximately 30 different cell types in the cochlea and to the alteration of the auditory nerve.

Five main pathways have been described for the cellular mechanisms involved in SNHL [2,3]: (1) The accumulation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in the cochlea that contribute to oxidative stress, resulting in apoptosis via a cascade of reactions. (2) An increase in free  $\text{Ca}^{2+}$  in hair cells, resulting in mitochondrial perturbation, apoptosis, and hair cell death. (3) The involvement of mitogen-activated protein kinase (MAPK), which is associated with signaling proteins that help to activate stress-activated protein kinase, a key mediator of oxidative stress and inflammation related to cell death. (4) Programmed hair cell death via the intracellular or extracellular pathway (caspase). (5) Infection and/or inflammation that induces apoptosis via an innate immunity-based response, promoting pathogen death. While many pathways leading to ciliated cell loss and nerve cell loss have been described and appear to be interrelated, there are currently no available diagnostic tools with which to characterize the site of injury in the cochlea and the intracellular mechanisms of SNHL [5].

The cellular mechanisms involved in hearing loss can be intricately linked. Currently, there is no tool available with which to characterize the pathophysiological mechanisms in SNHL of an undetermined etiology, or to identify the lesion sites involved. This makes an accurate etiological diagnosis challenging, as no specific biomarker has been identified with which to characterize SNHL in terms of its origin, severity, and evolution. Identifying biomarkers linked to the metabolic mechanisms involved could allow for better characterization of SNHL, better prediction of the evolution of SNHL, and the personalized management of SNHL. Modifications to metabolic pathways can be investigated using metabolomic analysis, an emerging technique that can be used to identify metabolic biomarkers via the analysis of individual metabolites present in an organic sample. The “metabolome” refers to all metabolites of biological origin below 1500 daltons (i.e., a low molecular weight) [6], and provides insight into physiological or pathological mechanisms at a given time. A specific feature of the metabolome is that it is dynamic and subject to the influence of environmental factors, such as diet, toxins, and disease [7]. Metabolomic studies use several analytical techniques, including nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) [8,9]. Such research will help in the development of therapeutics according to identified biomarkers. For example, metabolomic analysis has been used to identify some mutations and to better understand the pathophysiological aspects of hearing, balance, and vision loss for patients with Usher syndrome [10,11]. This research has allowed for the investigation of gene therapy to restore auditory, balance, and vision functions.

Metabolomic research appears to be a promising tool with which to study SNHL. Metabolomic analysis may provide additional data regarding the known etiologies of deafness and help to better categorize SNHL when etiology remains unknown. The objectives of this review are to alert readers to the growing interest in metabolomic approaches for the study of inner ear pathologies, to provide innovative scientific findings from metabolomics studies, and to discuss new experimental designs with which to better understand progressive hearing loss.

## 2. Methods

This systematic review was written in accordance with the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.2.0 (June 2017) and followed the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis recommendations) method [12]. The PROSPERO database was searched and no completed or ongoing studies on this topic were identified.

### 2.1. Research Strategy

This systematic literature review was conducted by searching medical literature analysis and retrieval system online (MEDLINE; PubMed interface), Excerpta Medical dataBASE (EMBASE; Elsevier interface), Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL; Wiley interface), International Standard Randomised Controlled Trial Number (ISRCTN) registry (<http://www.isrctn.com>; accessed on 12 September 2021), <https://www.clinicaltrials.gov/> (accessed on 12 September 2021), and Scientific Electronic Library Online (SciELO). The search began in November 2020 and was completed in August 2021.

The medical subject headings (MeSH) thesaurus was used to search the MEDLINE database. The search terms used were “Hearing loss” and “Metabolomic”, “Deafness” and “Metabolomic”, and “Metabolomic” and “Inner Ear”. The Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL) was searched for “Hearing loss” and “Metabolomic”, “Deafness” and “Metabolomic”, and “Metabolomic” and “Inner Ear”.

### 2.2. Selection Criteria

The study selection was carried out according to the “Participants, Interventions, Comparisons, Outcomes” (PICO) characteristics. Biomarker studies in patients with SNHL or animal models of deafness based on a metabolomic approach were included. The eligibility criteria were English language studies dealing with metabolomic analysis related to hearing loss, regardless of the fluid that was analyzed. All articles without metabolomic analysis or without the analysis of hearing loss were excluded.

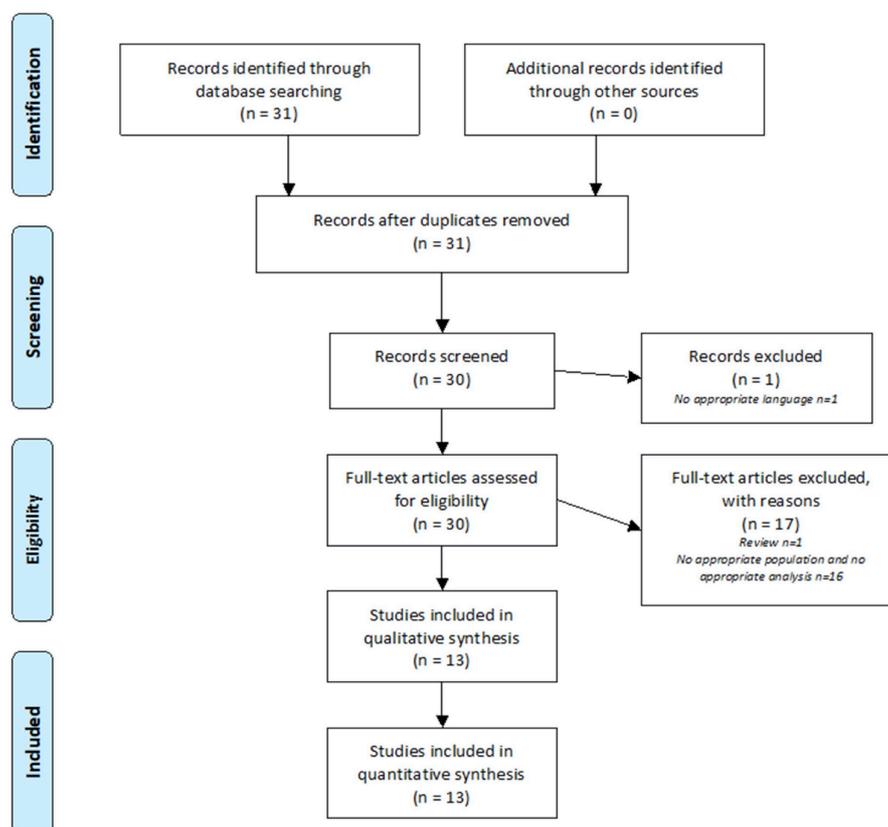
### 2.3. Data Extraction

Two authors independently collected papers based on titles, abstracts, and keywords. The research was conducted according to the exclusion and eligibility criteria defined above. The data extraction method was blinded and double-reviewed. In the case of disagreement, the two authors met to reach a consensus, and the final adjudication was based on the expert opinion of the senior author.

Here, the methodologies of the studies are described, focusing on the analytical technique used, the types of samples studied, and the types of experiments performed. The main results concerning the metabolites found and the metabolic pathways are also presented.

## 3. Results

Figure 1 summarizes the analysis of the 31 articles identified using the PRISMA method. One article was excluded because it was written in Chinese. Thirty articles were analyzed. After review, 17 articles were excluded because they did not address SNHL and/or metabolomic analysis. A total of 13 articles were included in this review.



**Figure 1.** PRISMA Flow Diagram. The PRISMA diagram details the search and selection process applied during the review.

### 3.1. Types of Samples

In the included studies, different types of samples were subjected to metabolomic analysis. Perilymph was used in six of thirteen studies; perilymph has the advantage of being closer to metabolic mechanisms because hair cell bodies are immersed in this fluid [13,14]. The volumes obtained for analysis were small, ranging from  $<1 \mu\text{L}$  in humans [8,15] to  $5 \mu\text{L}$  in guinea pigs [16,17]. Two studies collected human perilymph during cochlear implantation [8,15]. Three studies involved the metabolomic analysis of guinea pig perilymph [16–18]. One study [19] analyzed mouse temporal bone containing endocochlear fluids and bone constituents.

Blood plasma was collected in three studies to investigate cisplatin-induced changes at the systemic level [20], the metabolomic blood profile in a patient with hearing loss due to mitochondrial mutation [21], and changes in the metabolomic analysis of plasma following noise exposure in humans [22]. The volumes used for analysis were larger but required collection in a heparinized tube followed by centrifugation before freezing [20–22].

Urine, composed of the final products from metabolic breakdown, was analyzed in two studies [7,23]. The volume used was 1 mL, collected from first morning urine [7,23].

In another study, rat brain tissue was subjected to metabolomic analysis to better understand metabolic changes at the cortical level in the genesis of tinnitus induced by acoustic trauma [24].

One study investigated dexamethasone-induced changes in a ciliated cell-like HEI-OC1 cell line [25]. This was a model for an in vitro analysis of drug metabolic phenomena in cells.

Different types of samples are associated with different functions and purposes. Perilymph was the most commonly used fluid in the studies presented, given the hypothesis that some metabolomic changes could be observed in perilymph following induced SNHL. Perilymph is located in the inner ear, close to pathophysiological events; however, its volume is small, and collection requires invasive sampling. Perilymph samples may be contaminated, and volumes may be insufficient [18]. For these reasons, analytical techniques must be validated. In addition, routine collection from a patient may result in deafness and significant surgery-related morbidity. Urine and blood are more readily available with less morbidity. If a specific biomarker of an etiology is found, it may allow us to make an etiological diagnosis and to propose personalized treatment in routine clinical practice.

### 3.2. Analytical Techniques

The analytical methods used to perform the metabolomic analyses were NMR spectrometry in one study [7], GCMS in four studies [16,23–25], and LCMS in eight studies [15,17–22]. Mass spectrometry (GCMS and LCMS) has a greater sensitivity than NMR spectrometry; however, this technique suffers from limited reproducibility [26]. LCMS seems to be more appropriate to explore low volumes of samples [8] and allows for the detection of thermally labile and highly polar compounds [17]. Table 1 shows the selected metabolomics studies of SHNL.

**Table 1.** Studies according to publication journal, animal type, subject, pathology type, sample type, and metabolomic analysis technique.

Authors, Year	Participants	Pathology	Sample	Metabolomic Technique	Main Findings
Gaboon NEA et al., 2020 [17]	Hu	Mitochondrial disease	Blood	LCMS	Metabolomic analysis of renal disease with HL induced by a RMND1 mutation revealed ceramide accumulation
Trinh TT et al., 2019 [11]	Hu	SNHL	Perilymph	LCMS	Relationship between metabolomics profile and duration of HL
Mavel S et al., 2018 [6]	Hu	SNHL	Perilymph	LCMS	Feasibility of metabolomic analysis of human perilymph
Carta F et al., 2017 [5]	Hu	Metabolomic study of urine in sudden HL	Urine	NMR spectrometry	Metabolomic profiles differ depending on auditory recovery following dexamethasone treatment
Dong Y et al., 2013 [19]	Hu	Presbycusis and renal dysfunction	Urine	GCMS	Difference in metabolomic profile for patients with renal failure, with and without hearing impairment
Miao L et al., 2021 [18]	Hu	NIHL	Blood	LCMS	NIHL-induced changes in the plasma profile
Pirttilä K et al., 2019 [13]	GP	NIHL	Perilymph	LCMS	Difference in terms of metabolomic profiles between NIHL and NH
Fransson A et al., 2017 [14]	GP	Ototoxicity to cisplatin	Perilymph	LCMS	Cisplatin-induced changes in the perilymph metabolomic profile
Videhult Pierre et al., 2017 [16]	GP	Ototoxicity to cisplatin	Blood	LCMS	Cisplatin-induced changes in the serum metabolome
Fujita T et al., 2015 [12]	GP	NIHL	Perilymph	GCMS	NIHL-induced changes in the perilymph metabolomic profile
Ji L et al., 2019 [15]	Mouse	NIHL	Perilymph Temporal bone	LCMS	NIHL-induced changes in the temporal bone metabolomic profile
He J et al., 2017 [20]	Rat	NIHL	Cerebral tissue	GCMS	Cerebral metabolic changes in rats after exposure to acoustic trauma
Kather M et al., 2021 [21]	Cells (in vitro model)	Research	Cell line HEI-OC1	GCMS	Dexamethasone-induced metabolic changes in a ciliated cell line under both growth conditions

Hu—human; GP—guinea pig; HL—hearing loss; NH—normal hearing; NIHL—noise-induced hearing loss; SNHL—sensorineural hearing loss; NMR—nuclear magnetic resonance; GCMS—gas chromatography mass spectrometry; LCMS—liquid chromatography mass spectrometry.

LCMS is the most commonly used approach in different studies. No consensus exists on the analytical method that is most appropriate in this context; the choice depends on the volume of the sample inherent to its nature and the targeted metabolic pattern. Consequently, the exploration of the perilymph by LCMS seems to be the most informative strategy with which to analyze the pathophysiology of hearing loss

### 3.3. Animal Studies

Four studies investigated metabolomic changes in animals following noise exposure.

#### 3.3.1. Mice

One study performed a metabolomic analysis of the entire cochlea located in the temporal bone of mice after noise-induced trauma [23]. The aim was to examine the metabolic changes in the inner ear after noise exposure. A noise level (8–16 kHz) of 100 dB for 2 h was used. The authors identified 220 metabolites, 40 of which appeared to be involved in the pathophysiological mechanisms of noise-induced SNHL. Twenty-five of these genes were increased, belonging to the nucleotide family, cofactors, carbohydrates, alanine, aspartate, purine, glutamine, and glutamate. Fifteen metabolites were decreased (amino acids, such as arginine, methionine, phenylalanine, tyrosine, and tryptophan). The metabolic pathways involved were alanine/aspartate/tryptophan, purine metabolism, and phenylalanine/tyrosine/tryptophan biosynthesis. This study showed a reliable methodology with promising results. The results contribute to knowledge regarding the pathophysiological mechanisms of noise-induced trauma, showing the involvement of oxidative stress, which contributes to the understanding of the complex neurotransmission and modulation pathways. The results also suggest an important role for glutamate in the pathophysiology of SNHL due to synaptopathy following acoustic trauma.

#### 3.3.2. Rats

In one study, metabolic brain changes were investigated in rats following sound exposure with a sound level of 110 dB at 16 kHz for 1 h [24]. Auditory thresholds were measured after acoustic shock using auditory brain responses, and the presence of tinnitus was observed using behavioral studies. Eighty-eight metabolites were identified, 17 of which were involved in sound trauma. The four associated metabolic pathways were the glutathione pathway, the aspartate/alanine/glutathione pathway, the arginine/proline/glycine pathway, and the serine/threonine pathway [24]. The authors suggested that glutathione and urea metabolism appeared to play a role in sound trauma-induced hearing loss. Glutathione is an antioxidant in cells, and urea metabolism may play an important role in the maintenance of neuronal function.

#### 3.3.3. Guinea Pigs

Two studies focused on noise-induced changes in the metabolomic analysis of perilymph [16,17]. One study performed a metabolomic analysis of guinea pig perilymph after noise exposure (126 dB at 4 kHz for 2 h) [16]. Seventy-seven metabolites were identified in the perilymph fluid. The levels of 10 metabolites (3-hydroxy-butyrate, glycerol, fumaric acid, galactosamine, pyruvate, oxaloacetic acid, phosphate, meso-erythritol, citric acid, isocitric acid, mannose, and inositol) were altered following noise exposure. Another study investigated the metabolomic profile of perilymph after noise-induced hearing loss using an impulse noise (400 pulses at 156 dB for 4 min) with or without H<sub>2</sub> gas [17]. Ten guinea pigs were exposed to noise alone, 10 to noise and H<sub>2</sub> gas, four to H<sub>2</sub> gas alone, and two were not exposed. The results showed an increase in eight metabolites (including pantothenic acid, creatine, butyrylcarnitine, and short-chain acyl-carnitine) and a decrease in stachydrine and homostachydrine in the noise-exposed group, compared to the H<sub>2</sub>-exposed group. Stachydrine and homostachydrine decreased in the noise-exposed group alone, with similar levels observed in the noise-exposed with H<sub>2</sub> gas, H<sub>2</sub> gas alone, and unexposed groups. Acyl-carnitines were increased in the noise-exposed group compared to the noise-exposed

group with H<sub>2</sub> gas, and were involved in oxidative stress. Audiometric results were significantly improved in guinea pigs exposed to noise combined with H<sub>2</sub> gas compared to noise alone. These two articles showed metabolic differences following noise exposure in guinea pig perilymph; however, the differences did not allow for any conclusions.

Metabolomic analysis following cisplatin-induced ototoxicity has been the subject of two studies [18,20]. One article investigated the protective effect of H<sub>2</sub> gas inhalation on cisplatin-induced ototoxicity in 34 guinea pigs via a morphological, immunohistochemical, and metabolomic analysis of the perilymph [18]. The authors identified 50 metabolites. Exposure to cisplatin resulted in changes in 11 metabolites, including choline, creatine, methylguanidine, carnitine, proline, cytosine, ecgonine, hydroxystrachydine, homostrachydine, creatinine, and dimethylarginine. H<sub>2</sub> gas inhalation showed an otoprotective effect against cisplatin-induced toxicity at the auditory level, as well as immunohistochemically. Subsequently, another study examined metabolomic changes in guinea pig blood serum after an intravenous injection of cisplatin or NaCl [20]. Four significant metabolite changes were found for N-acetylneuraminic acid, L-acetylcarnitine, ceramide, and cysteinylserine.

### 3.4. Human Biomarker Research

The literature review found five out of thirteen articles on metabolomic analysis and SNHL in humans.

#### 3.4.1. Urine Sample

One study performed a metabolomic analysis of urine to look for a correlation between presbycusis and renal dysfunction as defined by traditional Chinese medicine. The authors found differences in 23 metabolites between subjects with presbycusis and those with normal hearing. After analysis by the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) software, these metabolites were found to be involved in the metabolism of glutathione, amino acids, glucose, N-methyl-D-aspartate (NMDA), and gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors [19]. Another study performed a metabolomic analysis of urine from patients with sudden hearing loss [7] and included 26 subjects (21 patients with sudden hearing loss and five normal-hearing controls). Of the 21 patients with sudden hearing loss, eight recovered their hearing thresholds after dexamethasone treatment, while 13 had no improvement in hearing performance. Metabolic analysis showed an increase in β-alanine, 3-hydroxybutyrate, and trimethylamine N-oxide (TMAO) in the non-responders. Responders to the treatment showed an increase in citrate and creatine.

The identification of specific biomarkers of hearing impairment in urine may help to better understand the pathophysiological mechanisms and to classify the etiologies of sudden or mitochondrial deafness.

#### 3.4.2. Perilymph Sample

One article performed a feasibility study for the metabolomic analysis of a small amount of human perilymph (<1 μL) collected during cochlear implantation using LCMS [8]. Ninety-eight metabolites were identified in the perilymph of subjects with SNHL. The most frequent metabolites were asparagine and lactate [8]. An analysis between the metabolomic profile of the perilymph and the duration of hearing loss was performed [15]. A total of 106 different metabolites were found using the LCMS technique in the 19 included patients [8]. A significant correlation was observed between N-acetylneuraminic acid and the duration of hearing loss. This metabolite is derived from sialic acid, which is usually located on the terminal part of glycoproteins and glycolipids on the cell membrane surface. N-acetylneuraminic acid is also a degradation product of glucose.

#### 3.4.3. Plasma Sample

One study performed an exome and plasma metabolome analysis of a child with mitochondrial kidney disease (RMND1 mutation) and deafness. Ceramide accumulation was observed, which provided a better understanding of the pathophysiological mechanism

involved [21]. Another study analyzed the metabolomic profile of plasma in noise-exposed patients [22]. The analysis was performed by LCMS in 62 patients and 62 controls. The analysis identified 207 metabolites. Twenty significantly different metabolites were found: 12 metabolites were increased and eight were decreased. They were involved in seven different metabolic pathways (glycerophospholipids, glycerophosphatidylinositol, choline, autophagy, alpha-linoleic acid, linoleic acid, and endocannabinoids).

#### 3.4.4. In Vitro Cells

One study investigated dexamethasone-induced changes in a ciliated cell-like cell line at the metabolic level under two growth conditions [25]. They were compared in four groups using GCMS. The cells were House Ear Institute-Organ of Corti 1 (HEI-OC1) cells, which have the ability to differentiate into hair cells under certain conditions. Two groups were composed of differentiating cells: one group was exposed to dexamethasone, and the other was a control group. The other two groups consisted of differentiated cells: one exposed to dexamethasone and the other being the control group. Seventy metabolites were identified. There was little variation in the metabolic profile of the differentiating cells, whereas the profile was variable for the differentiated cells. Dexamethasone increased the abundance of energy metabolites, leading to the increased availability of glucose and substrates for glycolysis, increased production of ATP by beta-oxidation, and decreased consumption of amino acids. A role of the pantothenate and CoA pathways at the metabolic level induced by dexamethasone was suggested.

Of the seven papers, two investigated perilymph, two urine, two serum, and one HEI-OC1 cells in vitro. With the exception of two papers [21,22], the etiologies were unknown. This allowed for the observation of the impairment of certain metabolic pathways and correlations, such as with N-acetylneuraminate and the duration of hearing loss [15] or ceramide accumulation [21]. Metabolomic analysis using in vitro models may allow for preliminary discovery of the pathophysiology of hearing loss and may be an initial step towards using drug therapeutics in animals. Given the easy access, using blood serum or urine may allow for the easy clinical diagnosis of etiology. It is necessary to define beforehand the metabolomic profiles of each etiology of deafness via the identification of specific biomarkers. The results are encouraging, but the disparity between the fluids and the etiologies studied does not allow conclusions to be drawn, due to the limited number of studies regarding metabolomics and hearing loss. It is important to continue this research to expand our current knowledge of the pathophysiological mechanisms involved in SNHL. Metabolomics opens many doors to improve pathophysiological knowledge, as a diagnostic tool available to clinicians or to achieve personalized and curative treatment of hearing loss.

## 4. Discussion

### 4.1. Slow Progression of SNHL-Related Metabolomics Studies

Most of the included metabolomic studies investigated noise-induced hearing loss [16,17,19,22,24]. Metabolic changes were observed for pathways involving glutathione, arginine/proline/glycine, alanine/aspartate/glutathione, purine, and phenylalanine/tyrosine/tryptophan, as well as the modification of some metabolites (increase in 3-hydroxybutyrate). The fluids investigated in these studies were the perilymph [16,17] plasma [22], temporal bone [19], and brain tissue [24]. The patterns of noise-induced hearing loss varied between studies. It is difficult to draw conclusions given the small number of studies and differences in study designs; however, the results are encouraging.

Metabolomic changes following cisplatin-induced ototoxicity were investigated in two studies on guinea pigs using perilymph analyzed by LCMS with the addition of H<sub>2</sub> gas [18] and blood analyzed by LCMS [20]. Changes were observed for N-acetylneuraminic acid, L-acetylcarnitine, ceramide, cysteinylserine, choline, creatine, methylguanidine, carnitine, proline, cytosine, ecgonine, creatinine, and dimethylarginine. The fluids analyzed were dif-

ferent between the two studies, as well as the objective; this does not allow any conclusions regarding the involvement of a metabolic pathway following cisplatin exposure.

In another study, sudden hearing loss was explored by the metabolomic analysis of urine using NMR spectrometry [7]. The results showed some differences in metabolites between good and poor responders following corticosteroid treatment ( $\beta$ -alanine, 3-hydroxybutyrate, and trimethyl N-oxide (TMAO)). While these initial results are interesting, further studies are needed of urinary metabolites as biomarkers of treatment response in patients with sudden hearing loss.

In two studies with humans, the metabolomic analysis of perilymph was performed by LCMS for cochlear implant candidates and the perilymph was sampled during surgery [8,15]. Too few studies have been conducted thus far in humans. Systematic sampling for various known etiologies would allow for the identification of different metabolomic profiles related to these etiologies. Such sampling is only possible in patients with hearing impairment during cochlear implantation.

Another research axis using metabolomic analysis could be Ménière's disease. Previous studies have identified endolymphatic hydrops in these patients. However, the pathophysiological mechanisms are not yet fully understood, although genetic, vascular, immunological origin, the aberrant expression of aquaporins, or a combination of causes have been proposed [27]. Several research teams have been interested in identifying biomarkers and mechanisms in this pathology. Using miRNA profiles, some authors found altered perilymph linked with Ménière's disease, which could serve as a potential biomarker [27]. Proteomic analysis has allowed for the identification of protein short-chain dehydrogenase/reductase family 9C member 7 in perilymph from patients with Ménière's disease [28]. Metabolomic analysis may also aid in the identification of biomarkers in these patients.

Metabolomic analysis is an innovative and recent technique. The analysis approach depends on the type and volume of the sample, and the type of metabolites sought. Due to inter-individual variability and the role of environmental conditions [29], it is necessary to control these parameters and repeat measurements to investigate the most promising metabolic pathways. Metabolomic analysis is positioned to elucidate the pathophysiology of SNHL and may allow for better diagnosis and personalized curative treatment.

#### 4.2. What Is the Most Promising Biological Fluid for Studies of SNHL?

Among the different types of samples analyzed in the included studies, perilymph is likely to be in the closest proximity to pathophysiological events; hair cell bodies are bathed in perilymph. Metabolomic analysis has shown a difference in metabolites between blood and perilymph in the baseline state [16]. There is a difference in membrane components, which results in a physiological difference in metabolomic analysis between the different body fluids. Urine and plasma are attractive types of samples because they are easily collected [30]. The possibility of studying hair cells *in vitro* is also very desirable [25], allowing for the observation of metabolic relationships for a drug or for an etiology. Furthermore, *in vitro* hair cell studies could be used as a prerequisite before animal experimentation.

Currently, there are no comparative metabolomic studies on the different fluids that can be sampled to determine which fluid is most promising. In the future, it would be interesting to define the best sample to use in terms of ease of collection, sensitivity, and specificity in the context of SNHL.

#### 4.3. Progress in Metabolomic Analysis Methods on Constrained Biological Fluids

The evolution of analytical techniques has allowed for the characterization of a larger number of metabolites. In 2015, 77 metabolites were found in perilymph with GCMS [16]; in 2019, 220 metabolites were characterized using LCMS [19]. LCMS has been validated, allowing mass spectrometry and liquid chromatography to be performed on very small samples (<1  $\mu$ L) [8]. LCMS for perilymph analysis is based on two complementary chromatographic media: reversed-phase (RP C18) and hydraulic interaction liquid chromatography (HILIC).

For polar/ionic molecules that are not well retained with RP C18 (e.g., amino acids and sugars), separation using HILIC is a complementary option that allows for improved results. By combining these two types of columns, 98 metabolites were detected, 25 of which were found in both RP C18 and HILIC media [8]. These results show the advantage of using several types of chromatographic columns, allowing for a wider detection of metabolites, as 43 metabolites were detected using RP C18 and 30 metabolites using HILIC [8].

#### 4.4. Next Steps Needed in the Field of Metabolomic Studies

In the future, it will be necessary to conduct complementary studies in animal models to discover metabolic profiles linked with hearing loss phenotypes. For example, noise-induced hearing loss can be explored by comparing normal perilymph to perilymph following noise-induced hearing loss; differences in metabolic profiles may explain the pathophysiology.

Sampling the perilymph from a large cohort of patients might allow for the identification of biomarkers that could explain the pathophysiological mechanisms associated with SNHL or be related to the duration and etiology of SNHL. For example, studies of perilymph during cochlear implantation have provided interesting information on the etiologies of SNHL and on the duration of hearing loss, allowing for improved management of SNHL [15,28]. Further development of metabolomic analysis techniques will likely increase the currently fragmented knowledge of SNHL etiologies and allow for personalized treatment for patients with SNHL [31].

#### 5. Limits

To date, there are few studies regarding metabolomic analysis and hearing loss, and even fewer on the metabolomic analysis of perilymph. Furthermore, the metabolomic analysis of perilymph in normal hearing humans is not ethically feasible due to the induction of cophosis during sampling. This could be overcome by proposing a metabolomic study of perilymph in organ donors. The studies conducted to date in humans have all been carried out on patients receiving cochlear implantation for profound deafness; however, the etiology and duration of the deafness are not always easy to define. In addition, most of the experimental studies have been performed on small animals (mice, rats, guinea pigs). It would be interesting to study the perilymph in larger mammals, such as sheep or dogs, which are physiologically and anatomically similar to humans [32,33]. For example, 72 metabolites were found in guinea pig perilymph [16], and 98–106 were found in humans [8,15], but only 15 metabolites were common to both species. A species-related metabolic difference may explain these divergent results between guinea pig and human perilymph.

#### 6. Conclusions

The current methods for the exploration of deafness with subjective and objective audiometry do not allow for the precise identification of damaged sites within the cochlea for patients where the etiology of SNHL is unknown. The purpose of this review was to assist investigators and Ear, Nose and Throat (ENT) surgeons to better understand the value of metabolomic analysis for patients with SNHL. Further research is needed to define normal and pathological states using metabolomic analysis. This will help to define biomarkers linked with etiology, which has great clinical relevance. Metabolomic analysis will also increase our understanding of the pathways involved and foster the development of new therapies. One of the challenges faced in these future studies will be to sample the perilymph without adverse effects.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.B. and H.B.; methodology, D.B. and H.B.; validation, D.B., H.B., T.-T.T. and L.B.; formal analysis, L.B. and T.-T.T.; resources, L.B.; data curation, L.B.; writing—original draft preparation, L.B.; writing—review and editing, D.B. and H.B.; visualization, D.B. and L.B.; supervision, D.B. and H.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** Thank you to John Galvin for editorial assistance. This research is supported in part by Fondation Pour l’Audition (FPA RD 2020-4).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Stevens, G.; Flaxman, S.; Brunskill, E.; Mascarenhas, M.; Mathers, C.D.; Finucane, M. Global Burden of Disease Hearing Loss Expert Group. Global and regional hearing impairment prevalence: An analysis of 42 studies in 29 countries. *Eur. J. Public Health* **2013**, *23*, 146–152. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kral, A.; O’Donoghue, G.M. Profound deafness in childhood. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 1438–1450. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cunningham, L.L.; Tucci, D.L. Hearing Loss in Adults. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 2465–2473. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Blarney, P.; Arndt, P.; Bergeron, F.; Bredberg, G.; Brimacombe, J.; Facer, G.; Larky, J.; Lindström, B.; Nedzelski, J.; Peterson, A.; et al. Factors affecting auditory performance of postlinguistically deaf adults using cochlear implants. *Audiol. Neurootol.* **1996**, *1*, 293–306. [\[CrossRef\]](#)
- Wong, A.C.; Ryan, A.F. Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea. *Front. Aging Neurosci.* **2015**, *7*, 58. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Goodacre, R. Metabolomics shows the way to new discoveries. *Genome Biol.* **2005**, *6*, 354. [\[CrossRef\]](#)
- Carta, F.; Lussu, M.; Bandino, F.; Noto, A.; Peppi, M.; Chuchueva, N.; Atzori, L.; Fanos, V.; Puxeddu, R.; Antonio, N.; et al. Metabolomic analysis of urine with Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy in patients with idiopathic sudden sensorineural hearing loss: A preliminary study. *Auris Nasus Larynx.* **2017**, *44*, 381–389. [\[CrossRef\]](#)
- Mavel, S.; Lefèvre, A.; Bakhos, D.; Dufour-Rainfray, D.; Blasco, H.; Emond, P. Validation of metabolomics analysis of human perilymph fluid using liquid chromatography-mass spectrometry. *Hear. Res.* **2018**, *367*, 129–136. [\[CrossRef\]](#)
- Diémé, B.; Lefèvre, A.; Nadal-Desbarats, L.; Galineau, L.; Hounoum, B.M.; Montigny, F.; Blasco, H.; Andres, C.; Emond, P.; Mavel, S. Workflow methodology for rat brain metabolome exploration using NMR, LC-MS and GC-MS analytical platforms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *142*, 270–278. [\[CrossRef\]](#)
- Fuster-García, C.; García-Bohórquez, B.; Rodríguez-Muñoz, A.; Aller, E.; Jaijo, T.; Millán, J.; García-García, G. Usher Syndrome: Genetics of a Human Ciliopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6723. [\[CrossRef\]](#)
- Bonnet, C.; Riahi, Z.; Chantot-Bastarud, S.; Smaghe, L.; Letexier, M.; Marcaillou, C.; Lefèvre, G.M.; Hardelin, J.-P.; El-Amraoui, A.; Singh-Estivalet, A.; et al. An innovative strategy for the molecular diagnosis of Usher syndrome identifies causal biallelic mutations in 93% of European patients. *Eur. J. Hum. Genet.* **2016**, *24*, 1730–1738. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D.G.; PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Med.* **2009**, *6*, e1000097. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Schmitt, H.A.; Pich, A.; Schröder, A.; Scheper, V.; Lilli, G.; Reuter, G.; Lenarz, T. Proteome Analysis of Human Perilymph Using an Intraoperative Sampling Method. *J. Proteome Res.* **2017**, *16*, 1911–1923. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lysaght, A.C.; Kao, S.-Y.; Paulo, J.A.; Merchant, S.N.; Steen, H.; Stankovic, K.M. Proteome of human perilymph. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 3845–3851. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Trinh, T.-T.; Blasco, H.; Emond, P.; Andres, C.; Lefevre, A.; Lescanne, E.; Bakhos, D. Relationship between Metabolomics Profile of Perilymph in Cochlear-Implanted Patients and Duration of Hearing Loss. *Metabolites* **2019**, *9*, 262. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Fujita, T.; Yamashita, D.; Irino, Y.; Kitamoto, J.; Fukuda, Y.; Inokuchi, G.; Hasegawa, S.; Otsuki, N.; Yoshida, M.; Nibu, K.-I. Metabolomic profiling in inner ear fluid by gas chromatography/mass spectrometry in guinea pig cochlea. *Neurosci. Lett.* **2015**, *606*, 188–193. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pirttilä, K.; Pierre, P.V.; Haglöf, J.; Engskog, M.; Hedeland, M.; Laurell, G.; Arvidsson, T.; Pettersson, C. An LCMS-based untargeted metabolomics protocol for cochlear perilymph: Highlighting metabolic effects of hydrogen gas on the inner ear of noise exposed Guinea pigs. *Metabolomics* **2019**, *15*, 138. [\[CrossRef\]](#)
- Fransson, A.E.; Kisiel, M.; Pirttilä, K.; Pettersson, C.; Pierre, P.V.; Laurell, G.F.E. Hydrogen Inhalation Protects against Ototoxicity Induced by Intravenous Cisplatin in the Guinea Pig. *Front. Cell. Neurosci.* **2017**, *11*, 280. [\[CrossRef\]](#)
- Ji, L.; Lee, H.-J.; Wan, G.; Wang, G.-P.; Zhang, L.; Sajjakulnukit, P.; Schacht, J.; Lyssiotis, C.A.; Corfas, G. Auditory metabolomics, an approach to identify acute molecular effects of noise trauma. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9273. [\[CrossRef\]](#)
- Pierre, P.V.; Haglöf, J.; Linder, B.; Engskog, M.K.R.; Arvidsson, T.; Pettersson, C.; Fransson, A.; Laurell, G. Cisplatin-induced metabolome changes in serum: An experimental approach to identify markers for ototoxicity. *Acta Otolaryngol.* **2017**, *137*, 1024–1030. [\[CrossRef\]](#)
- Gaboon, N.E.; Banaganapalli, B.; Nasser, K.; Razeeth, M.; Alsaedi, M.S.; Rashidi, O.M.; Abdelwehab, L.S.; Alahmadi, T.S.; Safdar, O.Y.; Shaik, J.; et al. Exome sequencing and metabolomic analysis of a chronic kidney disease and hearing loss patient family revealed RMND1 mutation induced sphingolipid metabolism defects. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 324–334. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

22. Miao, L.; Wang, B.; Zhang, J.; Yin, L.; Pu, Y. Plasma metabolomic profiling in workers with noise-induced hearing loss: A pilot study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 68539–68550. [[CrossRef](#)]
23. Dong, Y.; Ding, Y.; Liu, P.-Z.; Song, H.-Y.; Zhao, Y.-P.; Li, M.; Shi, J.-R. Investigation of the Material Basis Underlying the Correlation between Presbycusis and Kidney Deficiency in Traditional Chinese Medicine via GC/MS Metabolomics. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 762092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. He, J.; Zhu, Y.; Aa, J.; Smith, P.F.; De Ridder, D.; Wang, G.; Zheng, Y. Brain Metabolic Changes in Rats following Acoustic Trauma. *Front. Neurosci.* **2017**, *11*, 148. [[CrossRef](#)]
25. Kather, M.; Koitzsch, S.; Breit, B.; Plontke, S.; Kammerer, B.; Liebau, A. Metabolic reprogramming of inner ear cell line HEI-OC1 after dexamethasone application. *Metabolomics* **2021**, *17*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Theodoridis, G.A.; Gika, H.G.; Want, E.J.; Wilson, I. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *711*, 7–16. [[CrossRef](#)]
27. Shew, M.; Wichova, H.; Peter, M.S.; Warnecke, A.; Staecker, H. Distinct MicroRNA Profiles in the Perilymph and Serum of Patients With Menière's Disease. *Front. Neurol.* **2021**, *12*, 646928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Schmitt, H.A.; Pich, A.; Prenzler, N.K.; Lenarz, T.; Harre, J.; Staecker, H.; Durisin, M.; Warnecke, A. Personalized Proteomics for Precision Diagnostics in Hearing Loss: Disease-Specific Analysis of Human Perilymph by Mass Spectrometry. *ACS Omega* **2021**, *6*, 21241–21254. [[CrossRef](#)]
29. Bollard, M.E.; Stanley, E.G.; Lindon, J.C.; Nicholson, J.; Holmes, E. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed.* **2005**, *18*, 143–162. [[CrossRef](#)]
30. Zhang, A.; Sun, H.; Wang, P.; Han, Y.; Wang, X. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J. Proteom.* **2012**, *75*, 1079–1088. [[CrossRef](#)]
31. Wang, J.; Puel, J.L. Toward Cochlear Therapies. *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 2477–2522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Hill, M.W.; Heavens, R.P.; Baldwin, B.A. Auditory evoked potentials recorded from conscious sheep. *Brain Res. Bull.* **1985**, *15*, 453–458. [[CrossRef](#)]
33. Seibel, V.A.; Lavinsky, L.; De Oliveira, J.A. Morphometric study of the external and middle ear anatomy in sheep: A possible model for ear experiments. *Clin. Anat.* **2006**, *19*, 503–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## BOULLAUD Luc

69 pages – 3 tableaux – 12 figures

### **Résumé :**

**Introduction :** La surdité induite par le bruit fait partie des étiologies les plus fréquentes des surdités neurosensorielles (SNS) acquises. Les mécanismes physiopathologiques de cette surdité restent peu connus. L'objectif de cette étude était d'étudier les modifications du métabolome de la périlymphe après un traumatisme acoustique chez un modèle ovin de surdité. **Matériel et méthodes :** Six brebis ont été incluses. Après vérification du statut normo-entendant, la périlymphe de l'oreille normo-entendante était prélevée. L'induction de la surdité sur l'oreille controlatérale était effectuée par un traumatisme acoustique. Le statut de SNS était vérifié, puis un prélèvement de périlymphe de l'oreille ayant subi le traumatisme était effectué. Les échantillons de périlymphe ont été analysés par chromatographie liquide et spectrométrie de masses de haute résolution. Des analyses multi et uni-variées ont été faites. **Résultats :** L'analyse métabolomique a identifié 213 métabolites. Quatre métabolites ont permis de différencier la périlymphe du modèle normo-entendant (NE) de celle atteinte d'une SNS de manière significative (Urocanate ( $p=0,004$ ,  $FC=0,48$ ), S-(5'-Adenosyl)-L-Homocysteine ( $p=0,06$ ,  $FC=2,32$ ), Trigonelline ( $p=0,06$ ,  $FC=0,46$ ) et N-Acetyl-L-Leucine ( $p=0,09$ ,  $FC=2,02$ ). Les voies métaboliques impliquées étaient celles du métabolisme de la phénylalanine/tyrosine/Tryptophane, la  $\beta$ -alanine, de la biosynthèse de pantothenate et CoA, de la pyrimidine, et des sucres aminés et nucléotidiques. **Conclusion :** Cette étude a validé un modèle de surdité induite par un traumatisme acoustique chez la brebis. Nos résultats montrent une différence de profil métabolomique entre la périlymphe NE et celle atteinte d'une SNS due au bruit, et suggèrent une implication du stress oxydatif, de la destruction mécanique et de l'atteinte nerveuse. Ce travail montre l'intérêt de mettre en lien un profil métabolomique avec une étiologie. Bien qu'il s'agisse d'un travail préliminaire, il reste indispensable à la compréhension de la physiopathologie des surdités pour pouvoir proposer une prise en charge personnalisée.

**Mots clés :** Métabolomique, périlymphe, traumatisme acoustique, surdité neurosensorielle

### **Jury :**

Président du Jury : Professeur Emmanuel LESCANNE  
 Directeur de thèse : Professeur David BAKHOS  
 Membres du Jury : Professeur Helene BLASCO  
 Docteur Soizik PONDAVEN-LETOURMY  
 Docteur Jean-Claude DESFOUGERES

Date de soutenance : 15 Avril 2022