

Mesures longitudinales des variables ventilatoires d'une souris par Flexivent®.

Céline-Hivda Yegen, Mélissa Bourenane, Chaymae Boucheniata, Richard Souktani, Sophie Lanone.

Université Paris-Est Créteil UPEC, INSERM IMRB U955 GEIC₂O.

Correspondance : celine-hivda.yegen@inserm.fr

RESUME

Notre équipe s'intéresse à l'impact des éléments de l'exposome dans différentes pathologies pulmonaires (<https://imrb.inserm.fr/equipes/s-lanone/>). Dans ces projets, nous nous intéressons particulièrement à l'impact des différents éléments environnementaux sur l'évolution de la fonction pulmonaire dans différents modèles murins de pathologie pulmonaire. L'analyse de la fonction pulmonaire *in vivo* est rendue possible grâce à de nombreux outils présents sur le marché. Les analyses fines des variables ventilatoires résultent d'une intubation orotrachéale de l'animal nécessitant une anesthésie profonde de celui-ci. Cette composante technique limite la collecte de ces informations uniquement en phase terminale, de ce fait, un suivi longitudinal des variables ventilatoires n'est pas réalisé dans de nombreux travaux.

Une étude montre que l'intubation orotrachéale donne des résultats très semblables à ceux obtenus par intubation intra-trachéale (Bonnardel, E et al., 2019). De ce fait, les mesures longitudinales de la fonction pulmonaire pourraient-être réalisées par intubation orotrachéale (Bonnardel, E et al., 2019).

Dans ce cadre, nous avons détaillé un protocole technique nous permettant de réaliser des mesures longitudinales de la fonction pulmonaire par intubation orotrachéale avec le Flexivent®.

MOTS CLES

Souris, Flexivent®, Mesures répétées, Mécanique ventilatoire, Intubation orotrachéale

INTRODUCTION

La caractérisation fine des propriétés ventilatoires des poumons chez les petits animaux est essentielle depuis l'essor des modèles murins en science respiratoire.

Ces mesures des paramètres ventilatoires, lorsqu'elles sont basées sur une technique d'oscillation forcée (FOT), donnent des informations puissantes pour caractériser de manière précise la mécanique ventilatoire (McGovern, T. K., 2013, Kopf, K. W., 2020, Ahookhosh, K., 2023). Cette technique consiste à analyser des signaux de pression et de volume acquis sous forme d'onde de flux d'air oscillatoire prédéfinie de faible amplitude appliquée à l'ouverture des voies respiratoires du sujet.

Parmi les différents outils disponibles sur le marché, le Flexivent® est le premier instrument de mesure de la mécanique ventilatoire à utiliser la technique du FOT chez l'animal et notamment les modèles murins. La FOT à fréquence unique permet de mesurer la résistance (Rrs), l'Elastance (Ers) et la compliance (Cr) du système respiratoire (McGovern, T. K., 2013, Kopf, K. W., 2020, Ahookhosh, K., 2023). De plus, ce système permet également de générer des manœuvres expiratoires forcées afin de mesurer la

FEV_{0.1} (volume expiratoire forcé dans les premières 0.1s), la CVF (capacité vitale forcée), et en déduire le rapport FEV_{0.1}/CVF. Ceci est réalisé par la connexion des voies respiratoires de l'animal à une colonne à pression négative tout en gonflant les poumons de la souris jusqu'à atteindre une pression donnée (Shalaby, K. H., et al 2010, Ahookhosh, K., 2023).

Le Flexivent® est utilisé dans de nombreux travaux afin d'évaluer et d'élucider de manière précise l'évolution de la fonction pulmonaire. Ces mesures réalisées par cet instrument nécessitent une intubation orotrachéale, et de ce fait une anesthésie profonde suivie d'une étape de trachéotomie de l'animal. De ce fait, le suivi de l'évolution de la mécanique ventilatoire par des mesures répétées dans le temps reste limitée.

Dans ces travaux, nous avons réalisé sur une même souris deux mesures répétées de la fonction pulmonaire par une intubation oropharyngée espacée de deux semaines.

MATERIEL ET REACTIFS

Flexivent® (<https://www.scireq.com/flexivent/>)

Sonde d'intubation souris (HUGO SACHS ELETRONIK, OD 1.2mm, L 30mm).
Tapis chauffant.
Respirateur.
1 aiguilles de 26G.
Planche inclinée d'instillation
NaCl® 0.9% injectable.

Microscope de chirurgie.
Lampe froide.
2 micro-pinces plates incurvées à extrémités émoussées de chirurgie.
Kétamine® 80mg/kg.
Xylazine® 10mg/kg.

PROCEDURE

- Peser l'animal.
- Injecter par voie intrapéritonéale le volume du mélange d'anesthésique de kétamine à 80mg/kg et de Xylazine à 10mg/kg nécessaire en fonction du poids de la souris (10µl/g).
- Vérifiez le niveau d'anesthésie à l'aide d'un stimulus de pincement de patte quelques minutes après l'administration de l'anesthésique.
NB : Les mesures répétées nécessitent un réveil de l'animal, de ce fait, aucune étape de curarisation n'est envisageable dans ce protocole. Pour ce faire, nous utilisons un mélange de Kétamine (80mg/kg) et de Xylazine (10mg/kg) afin de conduire à un sommeil profond de l'animal et un relâchement des muscles respiratoires.
- Suspendre la souris à la planche par ses incisives.
- À l'aide d'une pince, saisir soigneusement la langue de la souris et la positionnez jusqu'à visualiser les cordes vocales (Fig 1.a).
- Intuber par voie orotrachéale l'animal à l'aide de la sonde et vérifier qu'elle est bien placée (Fig 1.b).
NB : La sonde d'intubation décrite dans la partie « Matériel et Réactifs » est adapté pour des souris ayant un poids corporel compris de 20 à 35g.
- Connecter rapidement l'animal au Flexivent® et réaliser les mesures des variables ventilatoires.
- Débrancher la souris du Flexivent®.
NB : Bien vérifier que toutes les perturbations réalisées au Flexivent sont acceptées. Le cas échéant, vérifier que la sonde épouse bien toute la paroi interne de la trachée et que l'animal est bien anesthésié.
- Placer la souris en décubitus dorsal sur le tapis chauffant et la brancher au respirateur Minivent® (débit de 150µl/min ; volume courant de 100µl) (Vidéo en annexe).
- Surveiller la souris connectée au respirateur et la stimuler par pincement des pattes.
- Débrancher la souris du respirateur lorsqu'elle réagit à un stimulus.
- Retirer doucement la sonde d'intubation lorsque des mouvements des vibrisses sont observés.
- Placer la souris sur le flanc gauche dans une chambre de réveil à 27°C et 100% de dioxygène (O₂).
- Une fois la souris réveillée, la replacez dans une cage avec des croquettes humides placées au fond de la cage.

RESULTATS

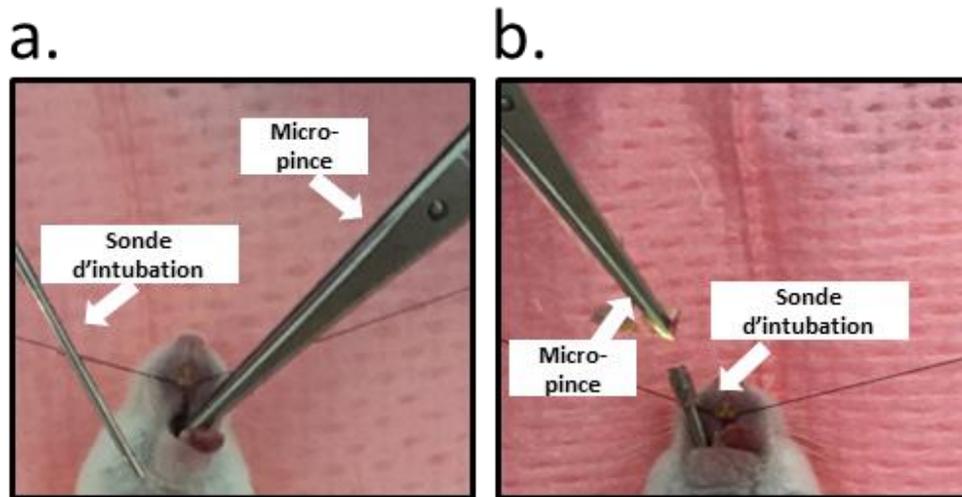


Figure 1 : Mise en évidence des cordes vocales et intubation orotrachéale. Mise en évidence des cordes vocales à l'aide de micro-pinces plates (a.). Intubation orotrachéale (b.).

Le suivi du poids corporel de nos souris ne montre aucune différence entre les souris ayant été soumises au Flexivent® comparé aux souris non soumises au Flexivent® (Fig2).

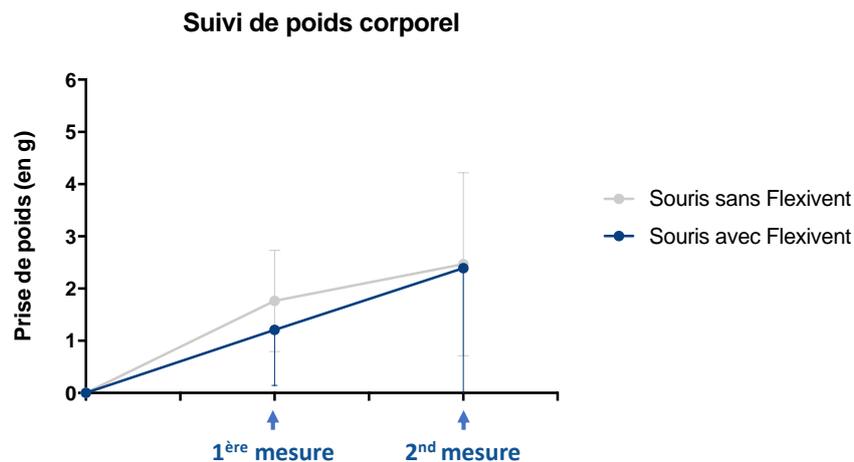


Figure 2 : Suivi du poids corporel des souris. Le suivi du poids corporel pour le groupe de souris non soumis au Flexivent® (Courbe grise, n=4) et soumis au Flexivent® (Courbe bleue) a été réalisé tout au long de la procédure expérimentale. Le poids de l'ensemble des souris de ce projet a été mesuré une semaine avant le début de l'expérimentation (point à l'origine). Le poids des souris soumises au Flexivent® a été évalué avant la première mesure (1^{ère} mesure) et avant la seconde mesure (2nd mesure). La prise de poids (en gramme, g) a été déterminé par la différence du poids mesuré à un temps donné et le poids mesuré avant la première semaine de l'expérimentation. Un test de Friedman suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn a été réalisé pour estimer la différence de poids des souris par rapport au poids initial.

L'analyse de la fonction pulmonaire nous montre aucunes différences significatives pour les différents paramètres ventilatoires suivants : la Rrs (Fig.3a), la Crs (Fig.3b), la FEV_{0.15}(Fig.3c), la FVC (Fig.3.d) et le rapport FEV_{0.15}/FVC entre les souris ayant été connectées deux fois au Flexivent® comparées à celles dont la fonction pulmonaire n'a été mesurée qu'une seule fois (Fig3).

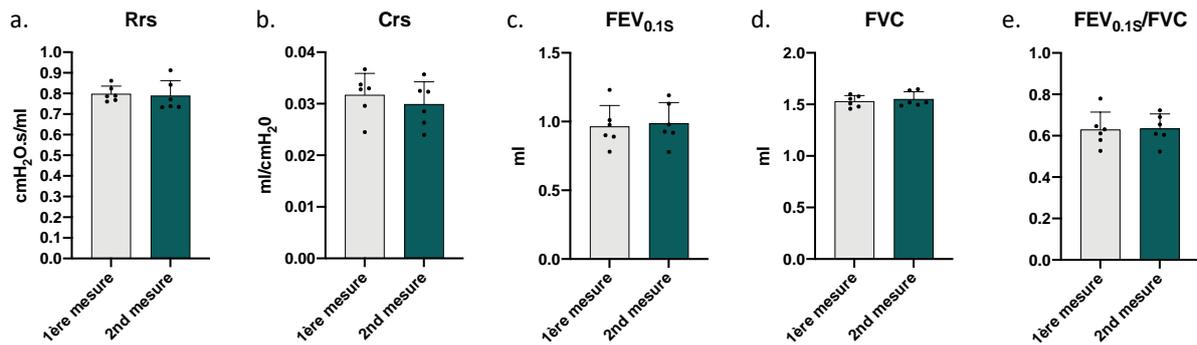


Figure 3 : Mesure de la fonction pulmonaire. Représentation de la résistance du système respiratoire (Rrs en cmH₂O.s/ml), la compliance du système respiratoire (ml/cmH₂O), du volume expiré forcé à 0.1 seconde (Forced Expiratory Volume en anglais, FEV 0.1s en ml), la capacité vitale forcé (Forced Vital Capacity en anglais, FVC en ml) ainsi que le ratio FEV0.1s/FVC obtenus suite à la première (1^{ère} mesure, n=6) et seconde (2nd mesure, n=6) mesure par le Flexivent[®] sur souris anesthésiées et intubées. Toutes les valeurs sont représentées en moyenne \pm SD, des test Mann Whitney ont été réalisés.

L'analyse de la morphologie pulmonaire par coloration à l'Hématoxyline-Eosine ne montre pas de différence entre les souris passées au Flexivent[®] (Fig 4b et c.) comparées aux souris sans Flexivent (Fig4.a). Aucune modification des dépôts de collagène de la matrice-extracellulaire n'est observée par coloration au Rouge Sirius (Fig 4) chez les souris dont la fonction pulmonaire a été évalué par Flexivent[®] (Fig 4.e et f) comparé aux souris sans Flexivent[®] (Fig4.d).

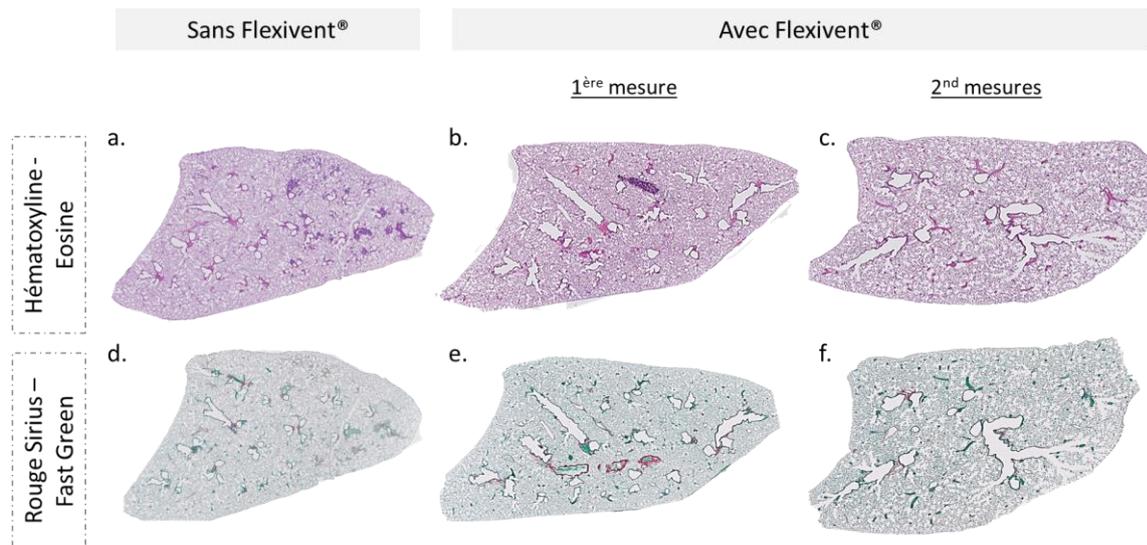


Figure 4 : Cartographies des biopsies pulmonaires des lobes gauches des souris. Représentation des cartographies du lobe pulmonaire gauche colorées à l'Hématoxyline-Eosine (a., b., c.) et au Rouge Sirius-Fast Green (d., e., f.) des souris non soumises au Flexivent[®] (n=4), souris prélevées suite à la 1ere mesure au Flexivent[®] (n=6), souris prélevées suite à la 2nd mesure au Flexivent[®](n=6).

REMERCIEMENTS

Ce travail a été supporté par l'équipe GEIC₂O de l'INSERM IMRB U955.

Ce travail a été financé en partie par l'UPEC – Pré-maturation 2023.

Nous remercions toute l'équipe de la zootechnie de l'EP3 pour leur gestion et prise en charge de nos animaux.

Nous remercions l'UPEC pour son soutien à l'édition de ce premier numéro de *Tr@nsmettreRIF*.

CONFLITS D'INTERET

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

ETHIQUE

Ce projet a été autorisé par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche numéro d'agrément A94028379 - APAFIS#27046-2020090317505897 5v.

NOMENCLATURE

FEV_{0.1s} : Volume expiratoire forcé dans les premières 0.1s

Crs : Compliance du système respiratoire

FVC : Capacité vitale forcée

Ers : Elastance du système respiratoire

O₂ : Dioxygène

Rrs : Résistance du système respiratoire

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Ahookhosh, K., Vanoirbeek, J., & Vande Velde, G. (2023). Lung function measurements in preclinical research: What has been done and where is it headed? *Frontiers in physiology*, 14, 1130096. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1130096>

Bonnardel, E., Prevel, R., Campagnac, M., Dubreuil, M., Marthan, R., Berger, P., & Dupin, I. (2019). Determination of reliable lung function parameters in intubated mice. *Respiratory research*, 20(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1177-9>

Kopf, K. W., Harral, J. W., Staker, E. A., Summers, M. E., Petrache, I., Kheyfets, V., Irwin, D. C., & Majka, S. M. (2020). Optimization of combined measures of airway physiology and cardiovascular hemodynamics in mice. *Pulmonary circulation*, 10(1), 2045894020912937. <https://doi.org/10.1177/2045894020912937>

McGovern, T. K., Robichaud, A., Fereydoonzad, L., Schuessler, T. F., & Martin, J. G. (2013). Evaluation of respiratory system mechanics in mice using the forced oscillation technique. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (75), e50172. <https://doi.org/10.3791/50172>

Shalaby, K. H., Gold, L. G., Schuessler, T. F., Martin, J. G., & Robichaud, A. (2010). Combined forced oscillation and forced expiration measurements in mice for the assessment of airway hyperresponsiveness. *Respiratory research*, 11(1), 82. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-8>