

Université de Montréal

**LES EFFETS DU VIEILLISSEMENT SUR LA PHARMACODYNAMIE ET LA
PHARMACOCINÉTIQUE DE LA KÉTAMINE ET DE LA XYLAZINE CHEZ LE RAT
SPRAGUE-DAWLEY**

par MARIE-CHANTAL GIROUX

Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de
l'obtention du grade de maître ès Sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires option médecine des animaux de laboratoire

Septembre 2015

© Marie-Chantal Giroux, 2015

RÉSUMÉ

Chez les animaux de laboratoire, même si les anesthésiques par inhalation sont généralement plus sécuritaires que les injectables, leur utilité est souvent restreinte lorsqu'un protocole expérimental exige une autre approche. Des combinaisons d'anesthésiques contenant de la kétamine sont considérées comme l'option de choix pour les anesthésies injectables chez les rats. Le vieillissement entraîne des changements dégénératifs au niveau de la structure et la fonction des organes, modifiant souvent à la pharmacocinétique des drogues. Ce projet porte sur l'évaluation des changements pharmacodynamiques (physiologiques, biochimiques et histologiques) et pharmacocinétiques, lors d'une combinaison anesthésique de kétamine-xylazine chez le rat Sprague-Dawley vieillissant.

Une anesthésie à la kétamine-xylazine fut induite chez des rats Sprague-Dawley de différents âges. Afin d'évaluer l'effet du vieillissement sur le métabolisme des deux drogues, des prélèvements sanguins périodiques pour l'analyse de la pharmacocinétique ainsi que des mesures des paramètres physiologiques, biochimiques et une histopathologie furent effectués. Le vieillissement a causé certaines modifications notamment en produisant une diminution de la saturation d'oxygène, une baisse marquée de la fréquence cardiaque et respiratoire, une hypoalbuminémie ainsi qu'une augmentation de la durée d'anesthésie.

Les paramètres pharmacocinétiques de la kétamine et de la xylazine furent grandement affectés par le vieillissement causant une augmentation progressive significative de l'aire sous la courbe (AUC) et du temps de demi-vie, ainsi qu'une diminution de la clairance. À la lumière de ces résultats, les doses de kétamine et de xylazine doivent être adaptées chez les rats vieillissants pour permettre une anesthésie de durée raisonnable et un réveil sans complications.

Mots clés : rat Sprague-Dawley, anesthésie, kétamine, xylazine, vieillissement, pharmacocinétique.

ABSTRACT

In laboratory animals, even if inhalation anesthetics are generally safer than injecting, their usefulness is often restrained when an experimental design does not allow it. For this reason, ketamine combinations are considered the option of choice for injecting anesthesia in rats. Aging brings degenerative changes in the structure and function of the organs, often affecting the pharmacokinetics of drugs. This project focuses on the evaluation of physiological, pharmacokinetic, biochemical and histological changes during a ketamine-xylazine anesthetic combination in aging Sprague-Dawley rats.

Anesthesia with ketamine-xylazine was induced in Sprague-Dawley rats of different ages. To assess the effect of aging on the metabolism of both drugs, periodic blood samples for pharmacokinetic analysis and measurements of physiological, biochemical and histological parameters were performed. Aging have made some changes for example a decrease in oxygen saturation, a sharp drop in heart and respiratory rate, hypoalbuminemia and an increase in the duration of anesthesia.

The pharmacokinetic parameters of ketamine and xylazine were greatly affected in older animals, causing a significant increase in the area under the curve (AUC) and the half-life time, and a decrease in clearance. In the light of these results, dosage of ketamine and xylazine must be adapted in aging rats to allow a short anesthesia and an awakening without complications.

Keys words : Sprague-Dawley rat, anesthesia, ketamine, xylazine, aging, pharmacokinetic.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiii
INTRODUCTION.....	16
L'ANESTHÉSIE	19
Principes et utilisation chez les rongeurs	19
La douleur	19
La nociception.....	21
Anesthésie par inhalation	24
Anesthésie par injection	25
Dépression des systèmes de l'organisme induit par l'anesthésie.....	27
Surveillance et évaluation de la profondeur de l'anesthésie	28
KÉTAMINE	31
Mécanismes d'action	31
Effets au niveau des différents systèmes de l'organisme.....	33
Système nerveux central.....	33
Système cardiovasculaire	34
Système respiratoire	34
Contre-indications	35

XYLAZINE.....	35
Mécanismes d'action.....	35
Effets au niveau des différents systèmes de l'organisme.....	37
Contre-indications.....	37
COMBINAISON KÉTAMINE-XYLAZINE.....	38
BIOCHIMIE SANGUINE MODIFIÉE PAR L'ADMINISTRATION KÉTAMINE-XYLAZINE....	38
PHARMACOCINÉTIQUE DE LA KÉTAMINE ET LA XYLAZINE.....	39
Paramètres pharmacocinétiques.....	39
La pharmacocinétique de la kétamine et de la xylazine.....	44
Implications cliniques.....	49
LE MÉTABOLISME ET LE VIEILLISSEMENT.....	49
Modèles utilisés pour la recherche.....	49
Particularités physiologiques et anatomiques du rat reliées au métabolisme du médicament.....	50
Changements gériatriques et pathologies rencontrées chez le rat.....	51
Paramètres biochimiques et hématologiques.....	57
PHARMACOCINÉTIQUE DES DROGUES LORS DU VIEILLISSEMENT.....	59
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....	61
ARTICLE.....	63
Introduction.....	65
Materials and methods.....	66
Subjects.....	66
Treatments.....	67

Evaluation of reflexes and physiological changes	67
Blood sampling for biochemistry and pharmacokinetics.....	68
Histological preparations	69
Bioanalytical methods, pharmacokinetics and statistical analyses	69
Drug metabolism in liver S9 fractions	69
Statistics	71
Results	72
Reflexes and physiological changes	72
Pharmacokinetics	77
Histopathology	80
Blood biochemistry	80
Drug metabolism in liver S9 fractions	81
Discussion	83
Conclusion.....	89
Acknowledgements	89
References	90
DISCUSSION GLOBALE.....	97
CONCLUSION	106
RÉFÉRENCES	107

LISTE DES FIGURES

- Littérature -

Figure 1, p.21. *L'échelle des expressions faciales chez le rat pour quantifier la douleur, zéro étant l'absence de douleur.* Sotocinal, SG., Sorge, RE., Zaloum, A., Tuttle, AH., Martin, LJ., Wieskopf, JS., Mapplebeck, JC., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, JJ., King, OD. et Mogil, JS. (2011). The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*, 7, 55.

Figure 2, p.24. *Les voies de la douleur et divers sites d'action des analgésiques. COX (Cyclo-oxygénase), AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens) et médicaments.* Ghosh, S. (2012). Introduction to Pain, religion and Analgesia. Dans: Ghosh, S. Repéré à <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/pain-in-perspective/introduction-to-pain-religion-and-analgesia>.

Figure 3, p.32. *Interactions entre différentes classes de récepteurs du glutamate tel que les métabotropiques, AMPA et NMDA. La kétamine vient se fixer aux récepteurs NMDA, bloquant ainsi sa liaison avec le glutamate, ce qui empêche la transmission du potentiel d'action.* Golan, D.E., Tashjian, A.H., Armstrong, E.J. et Armstrong, A.W. (2010). *Principles of pharmacology* (3e éd., p. 180). Philadelphie, USA : Lippincott Williams & Wilkins.

Figure 4, p.35. *La xylazine vient se fixer aux récepteurs α 2-adrénergiques, bloquant ainsi la relâche de norépinéphrine.* Université de Kentucky (2015). Adrenergic Pharmacology. Repéré à <http://www.uky.edu/~mtp/pha824ar/PHA824ar.html>.

Figure 5, p.40. *Relation concentration-effet.* Collège National de Pharmacologie Médicale (2015). Repéré à <http://pharmacomedicale.org/pharmacologie/cible-des-medicaments/34-relations-concentration-effets>.

Figure 6, p.44. *Structure chimique de la kétamine.* Adamowicz, P. et Kala, M. (2005). Urinary excretion rates of ketamine and norketamine following therapeutic ketamine

administration: method and detection window considerations. *J Anal Toxicol*, 29(5), 376-382.

Figure 7, p.45. *Structure chimique de la xylazine.* St-Germain Lavoie, D., Pailleux, F., Vachon, P. et Beaudry, F. (2013). Characterization of xylazine metabolism in rat liver microsomes using liquid chromatography–hybrid triple quadrupole– linear ion trap–mass spectrometry. *Biomed Chromatograph*, 27, 882–888.

Figure 8, p.46. *La N-déméthylation de la kétamine par les cytochromes P450 du foie. La kétamine est N-déméthylée en norkétamine.* Hijazi, Y. et Boulieu, R. (2002). Contribution of CYP3A4, CYP2C9 and CYP2B6 in N-demethylation of ketamine in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 30, 853-858.

Figure 9, p.46. *Les différents métabolites de la kétamine produits par les cytochromes P450 du foie.* Bluelight (2000). Neuroscience and Pharmacology Discussion. Repéré à <http://www.bluelight.org/vb/threads/550612-Oral-metabolism-of-methoxetamine/page2>.

Figure 10, p.47. *Voies métaboliques de la xylazine observées dans les microsomes hépatiques de rats.* St-Germain Lavoie, D., Pailleux, F., Vachon, P. et Beaudry, F. (2013). Characterization of xylazine metabolism in rat liver microsomes using liquid chromatography–hybrid triple quadrupole– linear ion trap–mass spectrometry. *Biomed Chromatograph*, 27, 882–888.

- Article -

Figure 1. Percent of Sprague Dawley rats (n = 6/group; 3, 6, 12 and 18 months old) showing a positive withdrawal reflex when evaluated at selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min) following the intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine.

Figure 2. Percent of Sprague Dawley rats (n = 6/age group; 3, 6, 12 and 18 months old) showing a positive corneal reflex evaluated at tentatively selected time points (5, 15, 30,

45, 60, 90 and 120 min) ending evaluations when all animals had a positive corneal reflex following the intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine.

Figure 3. Mean (\pm SE) cardiac frequency (beats/min) in Sprague Dawley rats (n = 6/age group; 3, 6, 12 and 18 months old) following an intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine. The heart rate was evaluated with a pulse oximeter tentatively at selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min) ending evaluations when all animals had a positive withdrawal reflex. A significant difference between the 3 month-old group and the older groups was seen only at the 30 min time point. Post hoc Dunnett * $P < 0.01$.

Figure 4. Mean (\pm SE) respiratory frequency (breaths/min) in Sprague Dawley rats (n = 6/age group; 3, 6, 12 and 18 months old) following an intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine. The respiratory frequency measured by direct observation at 5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min ended when all animals had a positive withdrawal reflex. No significant difference between groups.

Figure 5. Mean (\pm SE) blood oxygen saturation (%) in Sprague Dawley rats (n = 6/age group; 3, 6, 12 and 18 months old) following an intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine. The SaO₂ was evaluated with a pulse oximeter at tentatively selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min) ending evaluations when all animals had a positive withdrawal reflex. A significant difference (Post hoc Dunnett*) between groups was seen only at 5 min between 3-($P < 0.002$) and 6-($P < 0.02$) month old animals compared to 12-month-old animals.

Figure 6. Mean (\pm SE) rectal temperature ($^{\circ}$ C) in Sprague Dawley rats (n = 6/age group; 3, 6, 12 and 18 months old) following an intraperitoneal administration of 80mg/kg of ketamine and 10mg/kg xylazine. The rectal temperature was evaluated at tentatively selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min) ending evaluations when all animals had a positive withdrawal reflex. A significant difference between 6-month-old

animals and other age groups was seen at 30 and 45 min (Post hoc Dunnett* $P < 0.01$ and * $P < 0.01$, respectively).

Figure 7. Mean (\pm SD) concentration-time profiles of ketamine (top) and xylazine (bottom) in male Sprague Dawley rats ($n=3$ /group; 3, 6, 12 and 18 months old) following a single intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg).

Figure 8. Determination of Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) using non-linear regression fitting in S9 liver fractions from 3-, 6-, 12- and 18-month-old rats. Each point represents the mean (\pm SD) of experiments in triplicate. Significant differences of the initial rate of formation (V_i) were observed starting at $5\mu\text{M}$ substrate concentration for liver S9 fractions of 18-month-old rats.

LISTE DES TABLEAUX

- Littérature -

Tableau I, p.39. *Tableau sommaire illustrant les doses utilisées de la kétamine et de la xylazine et leurs effets chez les rats.* Carpentier, JW. (2013). *Exotic Animal Formulary* (4e Éd., p.488-491). Missouri, USA : Elsevier Saunders.

Tableau II, p.59. *Paramètres biochimiques normaux pour les rats Sprague-Dawley mâles âgés de 8 à 12 semaines.* Charles River [Internet] : Clinical Laboratory parameters for CRL: CD(SD) rats. 2006, Repéré à http://www.criver.com/files/pdfs/rm/cd/rm_rm_rc_clinical_parameters_cd_rat_06.aspx.

- Article -

Table I. Mean (SD) plasmatic pharmacokinetic parameters following a single intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) administered to male Sprague Dawley rats (n=3/group) of different ages.

Table II. Mean (SD) biochemistry parameters following a single intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) male Sprague Dawley rats (n=3/group) of different ages.

Table III. Kinetic parameters associated with the formation α -hydroxymidazolam and norketamine in liver S9 fractions from aging rats.

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

A δ : A delta

ad libitum: à volonté

ACTH: hormone adrénocorticotropique

ADME: absorption-distribution-métabolisme-élimination

ALB: albumine

ALP[`]: phosphatase alcaline

ALT : alanine amino transférase

AUC: aire sous la courbe

AUC_{0-inf}, aire sous la courbe extrapolée à l'infini

AUC_{0-t}: aire sous la courbe du temps zéro à la dernière concentration mesurée

AV: atrioventriculaire

BPC: biphényl polychlorés

BUN: blood urea nitrogen (azote uréique sanguin)

Ca²⁺: ion calcium

CL : clairance

CL/F: clairance relative

C_{last} : dernière concentration calculée

CO₂: dioxyde de carbone

CYP: cytochrome P450

CYP3A: cytochrome P450, famille 3, sous-famille A

CYP3A1/2: cytochrome P450, famille 3, sous-famille A, polypeptide 1 et 2

E_{max} : effet maximal

F: biodisponibilité

GABA: acide γ -aminobutyrique

HAP: hydrocarbure aromatique polycyclique

IL-6: interleukine 6

IM: intramusculaire

IP: intrapéritonéal

IV: intravasculaire

K⁺: ion potassium

K_{el}: constante d'élimination terminale

KX: combinaison kétamine-xylazine

L/Kg: litre par kilogramme

L/min: litre par minute

mm: millimètre

m/s: mètre par seconde

NMDA: N-méthyl-D-aspartate

SNC: système nerveux central

SQ : sous-cutané

SRA : système rénine-angiotensine

T_{1/2}: temps de demi-vie

TNF: facteur de nécrose tissulaire

V_d: volume de distribution

REMERCIEMENTS

Mon amour pour les animaux de laboratoire n'est pas inné, au contraire, c'est une personne pour qui j'ai amplement de respect qui me l'a transmis. Cet homme à la fois généreux et aimable, d'un sens de l'humour unique, fut sur mon chemin pour une raison : pour me transmettre toutes ses connaissances pour que je puisse en tirer le maximum dans l'épanouissement de ma carrière. Merci Dr Vachon pour votre dynamisme, votre disponibilité et pour toutes ces découvertes qui m'ont tant intéressée! Ma passion grandissante pour les animaux de laboratoire n'est que le fruit provenant du semeur.

Je remercie tous les collaborateurs qui ont participé et réalisé ce projet : Dr Beaudry et son équipe pour avoir raffiné notre démarche scientifique. Merci au Dr Pierre Hélie pour la lecture des lames histologiques et Guy Beauchamp pour toutes les statistiques. Sans tout ce monde, je n'aurais pas eu ce beau parcours et toute cette expérience! Sans oublier tous les fonds de recherche qui nous ont été attribués pour financer notre projet (Fonds de Recherche ACMAL, fonds de recherche de la faculté de médecine vétérinaire).

Je ne peux pas passer à côté de ces trois personnes qui valent de l'or à mes yeux et qui ont été présentes tout au long de mon parcours. À mes parents, Lise et André, ainsi que ma grande sœur Émilie qui m'ont énormément soutenue durant cette dure épreuve. Je sais que je ne vous ai pas toujours fait la vie facile, mais vous pouvez être fière de tous mes accomplissements, c'est grâce à vous que je suis rendue là! Vous êtes mes modèles et je vous aime!

Naïma et Lyana, les deux amours de ma vie...C'est pour vous que j'ai fait ce long processus: je veux vous montrer que la détermination, la persévérance et la ténacité vous mènent loin dans la vie. Concilier étude-famille n'est pas chose facile, mais maintenant, j'ai tout le temps devant moi pour vous apprendre les beautés de la vie! Je vous aime de tout mon cœur et j'espère que toutes ces belles valeurs que je vous transmets resteront avec vous.

INTRODUCTION

L'expérimentation animale utilise les animaux de laboratoire comme modèle de maladies humaines afin de mieux comprendre la physiopathologie et les traitements de maladies. Ces modèles permettent entre autres, de développer des traitements sécuritaires et efficaces, mais aussi de comprendre et prévenir certaines maladies et la toxicité des médicaments. Pour des raisons principalement financières et scientifiques, la grande majorité des expérimentations animales se font sur des rongeurs. Notamment, le rat (*Rattus norvegicus*) et la souris (*Mus musculus*) sont des animaux de choix en recherche en raison de leur petite taille, d'un court temps de gestation, de portées nombreuses, d'une courte longévité et d'une génétique connue facilitent leur utilisation en recherche (Kohn & Clifford, 2002). En ce qui concerne le rat, il est relativement résistant au stress, tolère bien les procédures chirurgicales et résiste à plusieurs infections (Karwacki et al., 2001). L'utilisation des animaux en recherche a permis d'améliorer la santé et la longévité humaine. Plusieurs normes et réglementations sont instaurées auprès des centres de recherches et des compagnies pharmaceutiques afin d'assurer l'utilisation éthique des animaux (Hedenqvist, 2008).

De ce fait, lorsque des procédures expérimentales sont utilisées sur les animaux, certaines mesures doivent être prises pour minimiser le stress, l'inconfort et la douleur. Il est donc approprié de fournir des soins pré-opératoires pour pallier ces effets néfastes, dont l'administration d'agents anesthésiques et analgésiques (Stokes et al., 2009). L'anesthésie par inhalation ou l'anesthésie injectable sont deux types d'anesthésies couramment utilisés. L'isoflurane constitue un exemple d'anesthésique par inhalation. Elle s'administre simultanément avec l'oxygène et permet une induction ainsi qu'un réveil plus rapide (Longley, 2008). Même si les anesthésiques par inhalation sont généralement plus sécuritaires que les injectables, leur utilité est souvent limitée dû à un manque d'équipement, aux risques potentiels pour le personnel ou aux protocoles expérimentaux qui ne permettent pas leur utilisation. Les anesthésiques injectables sont donc utilisés de façon extensive en recherche (Hajighahramani & Vesal, 2007). Une simple dose

administrée permet d'atteindre tous les objectifs requis pour une anesthésie générale réussie, c'est-à-dire une perte de conscience, l'analgésie, une dépression des réflexes et une relaxation des muscles (Karwacki et al., 2001).

L'anesthésie produit une variété d'effets indésirables non-spécifiques comme l'hypoxie, hypercapnie et l'hypothermie. Des effets secondaires additionnels sont aussi associés à certains agents comme la xylazine, un agoniste adrénergique alpha-2, causant de l'hyperglycémie. Si aucune intervention ou précaution ne sont mis en place, ces effets peuvent être d'une haute importance causant des interférences ou la perte d'animaux à certains projets de recherches. Du même fait, les procédures chirurgicales produisent une réponse au stress entraînant une réduction du métabolisme et des effets au niveau du système endocrinien (Richardson & Flecknell, 2005). Pour ajouter un autre niveau de difficulté, l'évaluation de la douleur chez les rongeurs utilisés en recherche peut parfois être difficile puisque les changements comportementaux associés à la douleur peuvent être subtils (Sotocinal et al., 2011).

Le vieillissement est un phénomène physiologique irréversible et progressif, caractérisé par des changements dégénératifs dans la structure et la fonction de différents organes et tissus. Le progrès socio-économique et l'avancement des sciences médicales ont augmenté l'espérance de vie, et ainsi la chirurgie et l'anesthésie chez les patients âgés sont devenues un enjeu extrêmement important. L'acquisition dans les connaissances du vieillissement chez les humains a naturellement augmenté les demandes de modèles animaux appropriés. Bien que les grands mammifères, comme le chien, ont été utilisés avec succès dans les études sur le vieillissement cardiovasculaire, les rats sont le modèle le plus couramment utilisé, et ce, pour plusieurs raisons: les connaissances anatomiques et physiologiques de cette espèce sont particulièrement vastes et les rats, comme les humains, sont omnivores et ont donc beaucoup en commun concernant le métabolisme intermédiaire et la fonction gastro-intestinale. Leur durée de vie normale est relativement courte, environ 2,5-3 ans, ce qui les rend relativement faciles à suivre de leur naissance au décès. Les caractéristiques génétiques des différentes lignées peuvent être maintenues relativement constantes. L'environnement, la nutrition et l'apport d'eau peuvent être

facilement contrôlés (Folkow & Svanborg, 1993). L'évaluation de protocoles anesthésiques spécifiques pour la population vieillissante de rongeurs ainsi que leurs changements physiologiques concomitants est donc essentielle.

L'ANESTHÉSIE

Principes et utilisation chez les rongeurs

L'anesthésie générale se décrit comme un état de narcose transitoire accompagné d'une diminution des fonctions neurovégétatives et d'une altération des systèmes respiratoires et cardiovasculaires. Ses objectifs sont la perte de conscience, l'absence de douleur et le relâchement musculaire. L'anesthésie peut être réalisée avec l'injection ou l'inhalation de substances qui induisent un état d'inconscience réversible. Pour assurer la qualité de la recherche scientifique, les techniques d'anesthésie doivent être fiables et sécuritaires, et les effets des composés anesthésiques et analgésiques sur les animaux de laboratoire doivent être bien documentés. En outre, même si les animaux subissent une chirurgie de routine, ils ont besoin de récupérer rapidement, afin de ne pas souffrir inutilement de la douleur. Un moyen important de réduire la souffrance des animaux est l'utilisation parallèle d'une anesthésie et de traitements analgésiques lors d'une chirurgie ou autre procédure douloureuse (Hedenqvist, 2008). De plus, du fait de leur petite taille, certaines manipulations de rongeurs peuvent s'avérer difficiles. L'anesthésie permet une immobilisation complète et ainsi une réduction des risques de blessures autant pour l'utilisateur que pour l'animal (Longley, 2008).

La douleur

La douleur animale est définie comme une expérience émotionnelle et sensorielle aversive représentant un avertissement pour l'animal de dommage tissulaire ou de menace à l'intégrité fonctionnelle des tissus (Molony & Kent, 1997). Toutefois, la douleur ne doit pas être confondue avec la nociception, puisque la douleur s'avère une expérience subjective et comportementale en réponse à un stimulus nociceptif physique ou psychologique. Trois composantes distinctes de la douleur sont définies (*Citation tirée de Sauleau & Dragomir consulté le 1^{er} juillet 2013*) :

- **La composante sensori-discriminative**, liée à la capacité d'analyser la nature, la

localisation, la durée, l'intensité de la stimulation douloureuse. Cet aspect met en jeu des voies sensibles spécifiques.

- **La composante affectivo-émotionnelle et comportementale**, qui confère à cette sensibilité son caractère désagréable. Toute douleur s'accompagne d'un retentissement touchant l'affectivité et l'émotion (anxiété, dépression) et provoque des modifications comportementales (réactions d'attention, d'anticipation, de fuite...). La diffusion de l'information douloureuse dans des régions corticales, notamment préfrontales et limbiques, en est responsable.
- **La composante cognitive** qui regroupe les processus mentaux participant au traitement des nombreuses informations de l'expérience algique: signification de la douleur perçue, contexte situationnel, référence aux expériences passées...

De nombreuses procédures expérimentales peuvent provoquer de la douleur, rendant nécessaire l'utilisation de l'analgésie et de l'anesthésie. Si la douleur n'est pas palliée, elle peut grandement interférer avec les résultats de recherche expérimentale, à moins que l'évaluation de la douleur ne soit l'objectif de l'étude. En effet, la douleur tend à faire augmenter la pression sanguine, à compromettre la fonction respiratoire et à augmenter le taux de mortalité (DeMarco & Pascoe, 2008). Elle peut également créer un état de stress, modifiant les concentrations circulantes de plusieurs hormones et diminuant la motilité intestinale ainsi que la rétention urinaire et à long terme créer une altération au niveau du système nerveux central (SNC). Chez les animaux expérimentaux, la douleur peut réduire la consommation alimentaire et d'eau ainsi que minimiser leur activité quotidienne (Richardson & Flecknell, 2005). Pour répondre aux souffrances animales, une compréhension des mécanismes de la douleur ainsi que de ses effets néfastes est indispensable. Bien sûr, toutes affectations douloureuses chez les animaux de laboratoire se retrouvent indéniablement aussi chez l'homme.

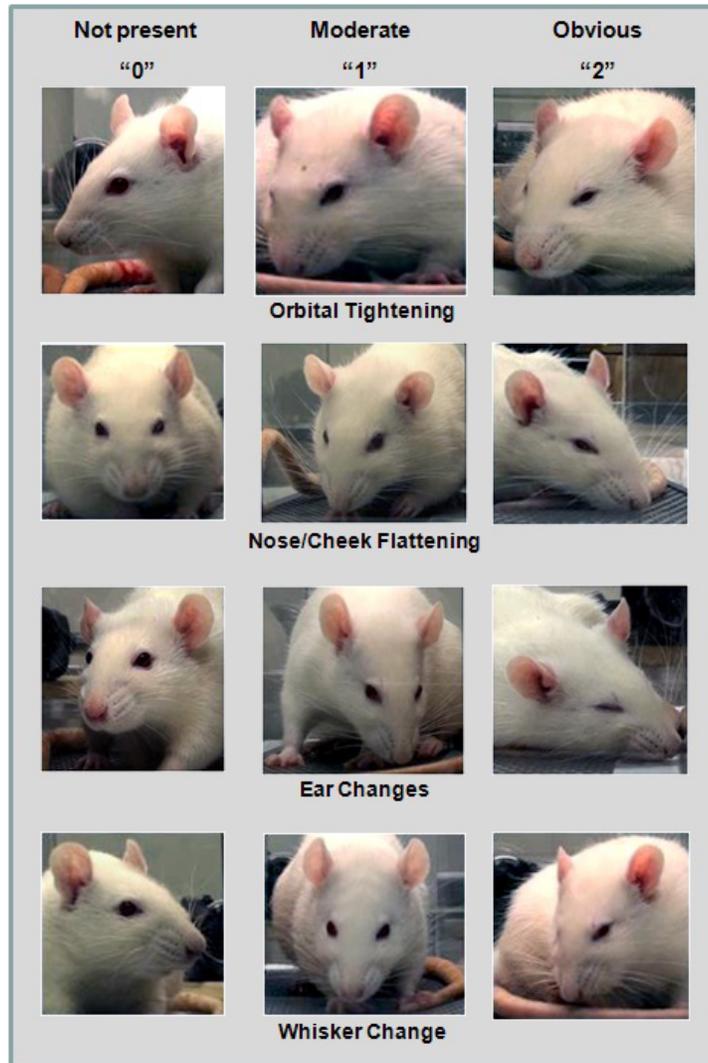


Figure 1. L'échelle des expressions faciales chez le rat pour quantifier la douleur, zéro étant l'absence de douleur (Sotocinal et al, 2011)

La nociception

La nociception s'explique par le processus sensoriel à l'origine d'un message nerveux qui provoque la douleur. En ce sens, l'ensemble des fonctions de l'organisme détecte, perçoit et réagit à des stimuli internes et externes potentiellement néfaste pour celui-ci (Sauleau & Dragomir, 2013).

La nociception implique quatre processus distincts où des réactions chimiques, thermiques et mécaniques sont observées : la transduction, la transmission, la modulation

et la perception (Chapman & Nakamura, 1999). La transduction du traumatisme tissulaire en signaux neuronaux a lieu dans les organes sensoriels terminaux appelés nocicepteurs. Cette première étape permet de convertir les stimuli nocifs en potentiels générateurs qui formeront des potentiels d'action (DeMarco & Pascoe, 2008). Ces structures nerveuses périphériques se situent dans la peau, les muscles, les fascias, les articulations, les tendons, les vaisseaux sanguins et les organes viscéraux. Cependant, certains organes tel que le système nerveux central en sont dépourvus (Chapman & Nakamura, 1999). Lors de dommages tissulaires, de nombreuses substances algogènes dont la bradykinine, les prostaglandines, les cytokines et certains facteurs de croissance peuvent activer les nocicepteurs (Kettner, 2008). Cette cascade entraîne inévitablement une transmission de la douleur.

La transmission de la douleur se fait essentiellement via deux types de fibres périphériques. Lors d'un stimulus douloureux, les fibres delta ($A\delta$) transmettent la douleur primaire tandis que les fibres C stimulent une douleur plus tardive, la douleur secondaire (Golan et al., 2010). Les terminaisons nerveuses libres des fibres $A\delta$ finement myélinisées fonctionnent comme des nocicepteurs thermiques et/ou mécaniques, conduisant les influx à 4-40 m/s. En outre, certaines fibres C amyéliniques qui conduisent lentement (1-3 m/s) agissent comme des nocicepteurs polymodaux, répondant à une variété de stimuli de haute intensité mécanique, chimique et thermique. La plupart des douleurs cutanées sont bien localisées produisant une sensation de piqûre ou de brûlure. Les fibres $A\delta$ produisent une sensation douloureuse brève, localisée, et ce, au niveau de la peau tandis que les fibres C génèrent habituellement une perception de brûlure diffuse. Les deux types de fibres sont présents en grand nombre dans la peau, les tissus profonds et les viscères. Une stimulation répétée de ces récepteurs produit normalement la douleur. En outre, certains neurones afférents primaires agissent comme "nocicepteurs silencieux" : normalement, ces organes terminaux ne répondent pas aux stimuli sensoriels inoffensifs, mais les événements nuisibles ou les changements chimiques peuvent les sensibiliser afin qu'ils fonctionnent ensuite comme nocicepteurs (Chapman & Nakamura, 1999; Livingston & Chambers, 2000). La transmission des signaux nociceptifs a lieu dans

la moelle épinière, et ce, par les neurones secondaires. Les afférences nociceptives entrent dans la moelle épinière principalement dans la corne dorsale de la substance grise. Les cornes dorsales participent directement au traitement sensoriel, effectuant l'intégration, la sélection et la dispersion appropriée des impulsions sensorielles. Ce site constitue un endroit clé où les agents neurotransmetteurs sont impliqués dans la propagation de l'influx, et donc, crée un site d'action important pour les médicaments. Les neurones secondaires transmettent ensuite le signal vers les centres intégrateurs de l'encéphale, soit le tronc cérébral, le thalamus, le système limbique et le cortex (Golan et al., 2010; Livingston & Chambers, 2000), et ceci bilatéralement chez les animaux (Castel et al., 2013; Castel A & Vachon P, 2014). Du thalamus et du système limbique, les derniers neurones dans la transmission nociceptive transmettent les informations vers les régions corticales somatosensorielles et frontales (Willis & Westlund, 1997). Cette transmission neuronale permet ainsi à l'animal de percevoir la douleur. Toutefois, les neurotransmetteurs peuvent jouer des rôles autant d'inhibition que d'excitation, pour finalement inhiber ou amplifier le stimulus nociceptif (Millan, 2002). Les agents analgésiques et anesthésiques utilisent un ou plusieurs mécanismes de contrôles comme les récepteurs NMDA et les GABAergiques, modulant ainsi la perception de la douleur (Jenkins et al., 2008).

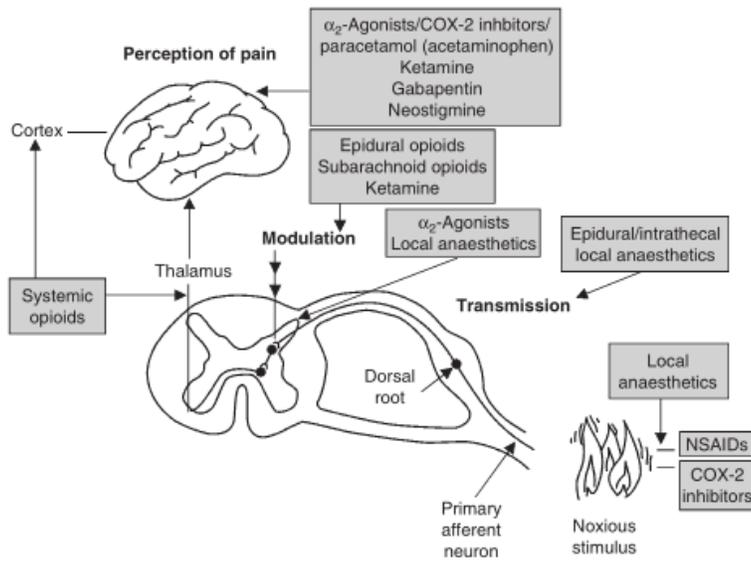


Figure 2. Les voies de la douleur et divers sites d'action des analgésiques. COX (Cyclo-oxygénase), AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens) et médicaments (Ghosh, 2012)

Anesthésie par inhalation

L'anesthésie par inhalation (ex. isoflurane) est facilement contrôlable et elle permet un réveil rapide et en douceur (Hacker, White, & Black, 2005). De plus, les animaux bénéficient d'oxygène, communément utilisé comme gaz transporteur, tout en améliorant l'oxygénation des tissus durant l'anesthésie. L'isoflurane a une solubilité élevée dans les lipides et est rapidement absorbé via les alvéoles pulmonaires dans le sang puis dans le cerveau. En général, la fonction cardiaque est mieux maintenue avec l'isoflurane qu'avec les anesthésiques injectables. Habituellement, une bonne relaxation musculaire s'observe avec l'isoflurane et les animaux récupèrent rapidement de l'anesthésie (Hildebrandt, Su, & Weber, 2008).

Cependant, ce type d'anesthésie requiert un équipement complexe permettant la libération d'agent volatil et d'une ventilation adéquate pour les gaz résiduels. Enfin, la plupart des agents volatils subissent très peu de biotransformation, mais plutôt ils sont pour la plupart expirés sous forme inchangée. Ils interfèrent généralement dans une faible mesure avec la fonction hépatique et le métabolisme d'autres médicaments, ce qui est

particulièrement important en recherche pharmacologique et toxicologique (Hedenqvist, 2008).

Tous les agents anesthésiques volatils induisent une dépression dose-dépendante de la pression artérielle systémique. Ce phénomène est principalement dû à une diminution du débit cardiaque. L'induction de l'anesthésie avec des agents volatils peut également être associée à des réponses réflexes des voies respiratoires supérieures comme la toux, la bronchoconstriction, le laryngospasme et la sécrétion excessive de mucus. Tous les anesthésiques volatils causent une vasodilatation entraînant la perte de chaleur. Une hypothermie mérite une attention particulière ainsi qu'une instauration de mesures préventives ou correctives pour promouvoir le bien-être animal (Diaz & Becker, 2010). Le degré d'irritation des anesthésiques volatils varie en fonction de l'agent utilisé et de sa concentration (Hedenqvist, 2008). Les rats Sprague-Dawley survivent à l'anesthésie par inhalation sans aucune modification pathologique, ce qui confirme l'utilité de l'isoflurane pour des expériences chez cette espèce (Siller-Matula & Jilma, 2008). Néanmoins, l'anesthésie par inhalation ne peut pas toujours être utilisée lors de protocoles particuliers (Hans & Bonhomme, 2006).

Anesthésie par injection

Un avantage d'utiliser des agents injectables est la variété de sites d'injection. Cependant, le choix de la voie d'administration va dépendre de plusieurs facteurs dont la durée d'anesthésie désirée, la formation du personnel, le matériel requis disponible et les effets sur les tissus. Chez les rongeurs, les voies intrapéritonéale (IP), intramusculaire (IM) ou sous-cutanée (SQ) pour les injections sont utilisées (Flecknell, 1996; Strokes et al., 2009). Rarement d'usage chez les petits rongeurs, la voie intraveineuse (IV) s'avère une méthode difficile pour les utilisateurs non expérimentés ce qui cause un stress aux animaux. Quoique rare et seulement si une contention maximale est possible chez le rat, l'injection IV dans la queue présente une alternative (Hajighahramani & Vesal, 2007). L'injection IP requiert un minimum d'habileté, dispose d'un site d'injection assez large et n'occasionne aucune lésion ou signe de douleur lorsque des agents anesthésiques sont administrés correctement (Swindle et al., 2002). De plus, cette simple technique occasionne un

minimum de détresse animale. L'administration intramusculaire de drogues irritantes provoque de l'inflammation au site d'injection et une faiblesse, résultant parfois en de l'automutilation. Dans ce cas, la voie IM est à éviter chez les rongeurs, mais peut être considérée si la procédure est terminale (Hajighahramani & Vesal, 2007).

En comparaison avec l'anesthésie par inhalation, la durée et la profondeur d'anesthésie varie énormément avec l'anesthésie injectable. Les variations sont plus discernables chez les rongeurs non-consanguins que consanguins, mais aussi entre les lignées de même phénotype (Flecknell, 1996). Cependant, elle a comme principal avantage de ne nécessiter que très peu de matériel, soit une aiguille et une seringue (Shibutani, 2000).

Pour atteindre une durée d'anesthésie appropriée, l'agent anesthésique injectable ne doit pas être métabolisé trop rapidement et doit se distribuer dans le SNC. Un autre problème avec ce genre d'anesthésie, induit par des médicaments qui sont métabolisés lentement, implique la longue durée du réveil qui suit l'anesthésie chirurgicale. Un réveil prolongé est particulièrement problématique chez les petits animaux comme les rongeurs, qui ont un métabolisme généralement élevé. Ils doivent inévitablement reprendre leur consommation de nourriture et boire peu de temps après l'anesthésie. En raison de leur grande surface corporelle, par rapport au poids du corps, les rongeurs sont plus sujets à l'hypothermie, et sans réchauffement actif, le taux de biotransformation du médicament est réduit et la récupération se prolonge davantage (Hedenqvist, 2008). En effet, chez les rats, le taux de mortalité associé aux protocoles anesthésiques est lié directement à l'hypothermie et à l'hyposie induites par l'anesthésie. Un réveil rapide ainsi qu'un contrôle de la profondeur de l'anesthésie sont donc primordiaux (Castro Alves et al., 2010). Pour surmonter certaines difficultés avec la récupération prolongée, il est avantageux d'utiliser des anesthésiques injectables par lesquels leurs actions peuvent être inversées par l'administration d'antagonistes, tel que l'atipamézole. (Hedenqvist, 2008)

Peu de drogues ont les propriétés requises pour une anesthésie idéale. Ainsi, une combinaison de drogues est utilisée pour améliorer la qualité d'anesthésie (Fish 1997). Classiquement, une combinaison d'agents anesthésiques implique soit des drogues

dissociatives ou des opioïdes administrés avec un agoniste alpha-2 adrénergique ou un sédatif comme l'acépromazine. L'ensemble entraîne une relaxation, un apaisement et une dépression du système nerveux central (Flecknell, 1996). Toutefois, la quantité d'information disponible sur la biotransformation des drogues anesthésiques utilisées en combinaison est négligeable. Les protocoles actuels impliquent généralement la kétamine pour les chirurgies des rongeurs (Richardson & Flecknell 2005). Lors d'une injection IM, l'acidité de la kétamine (pH 3,5) induit des dommages musculaires et de l'irritation nerveuse. Par exemple, de la nécrose peut être observée dans les muscles du membre postérieur (Papich, 2007; Pai & Heining, 2007).

De préférence, la voie IP est choisie pour cette drogue. De plus, la kétamine combinée avec la xylazine ou le diazépam ne cause aucune irritation et elle est convenable pour une injection IP chez les animaux de laboratoire (Wixson et al., 1987). Toutes les combinaisons ont leurs avantages et leurs inconvénients propres; les combinaisons de kétamine avec ou sans la xylazine sont l'alternative préférée par les anesthésistes lorsque l'anesthésie par inhalation ne peut être utilisée (Gaertner et al., 2008).

La kétamine produit une perte de conscience de courte durée et possède des propriétés analgésiques. La xylazine est un médicament analgésique de supplément utilisée pour minimiser les effets secondaires de l'utilisation de la kétamine comme les tremblements, la rigidité musculaire et l'excitation lors de la récupération (Lei et al., 2001; Sumitra et al., 2004). Les effets sédatifs additifs et analgésiques conduisent à une profondeur d'anesthésie chirurgicale, alors que les effets hypotenseurs de la xylazine sont en partie atténués par l'impact de la kétamine. En revanche, les actions indésirables telles que la dépression respiratoire peuvent être additives. Chez les petits rongeurs, la combinaison de kétamine et de xylazine entraîne une hypotension et une hypoventilation, mais la mortalité reste faible (Dittmar et al., 2004).

Dépression des systèmes de l'organisme induit par l'anesthésie

L'anesthésie produit une gamme d'effets relativement non spécifiques, tels que l'hypoxie, l'hypercapnie et l'hypothermie, ainsi que des effets secondaires plus spécifiques associés à

des agents particuliers (tels que l'hyperglycémie après l'administration d'agonistes alpha-2 comme la xylazine). Si ceux-ci ne sont pas corrigés ou évités par un choix plus approprié d'un protocole anesthésique, ces effets peuvent être d'une importance pour des projets de recherche spécifiques. En outre, une intervention chirurgicale ou autres traumatismes produisent une réaction de stress marquée, entraînant un métabolisme prolongé et des effets endocriniens (Richardson & Flecknell, 2005).

Surveillance et évaluation de la profondeur de l'anesthésie

Quel que soit l'état de santé de l'animal, il est utile de procéder à un examen clinique avant l'induction de l'anesthésie. S'il y a un écart par rapport à la normale, un examen clinique devrait être effectué et un diagnostic idéalement posé (Swindle et al., 2002). Si l'aspect général de l'animal est anormal, si des signes cliniques sont présents (jetage nasale ou oculaire, poils trempés au niveau de la région périnéale), l'induction de l'anesthésie devrait être retardée jusqu'à ce qu'un diagnostic soit posé à moins qu'il ne s'agisse d'un protocole ou on aurait induit une maladie. Il est utile de surveiller la nourriture et la consommation d'eau, ainsi que le poids de l'animal, quelques jours en phase pré-opératoire. Cela permet une évaluation de l'état de santé général et sera également utilisé dans le suivi de la récupération post-opératoire de l'animal, qui peut avoir une influence décisive sur le résultat final de la recherche (Flecknell, 1996; Karwacki, 2001).

Pour considérer une anesthésie adéquate, la profondeur de celle-ci doit être synonyme de bien-être animal. Une série d'observations cliniques peut être faite pour aider à l'évaluation de la profondeur de l'anesthésie. Celle-ci doit être assez profonde pour inhiber la perception de la douleur, mais pas trop dans le but de ne pas compromettre la survie de l'animal (Whelan & Flecknell, 1992). Après l'administration d'un anesthésique volatil ou d'une injection IP, la plupart des animaux deviennent ataxique, perdent leur réflexe de redressement et finalement restent immobiles. À cette profondeur d'anesthésie, ils peuvent facilement être réveillés par des stimuli douloureux, donc une anesthésie plus profonde doit être atteinte jusqu'à ce que les réponses à la douleur soient absentes. Cette séquence d'évènements ne sera pas visible si l'induction est rapidement réalisée par une injection IV d'un anesthésique tel que le propofol (Flecknell, 1996). Cependant, étant

donné l'effet dépressur de l'anesthésie sur le système respiratoire et le système cardiovasculaire, une anesthésie trop profonde n'est pas sans danger.

De nombreux agents anesthésiques dépriment la respiration, ce qui peut entraîner une hypoxie, de l'hypercapnie et de l'acidose. Pour maintenir les concentrations de dioxyde de carbone et d'oxygène dans des valeurs physiologiques, il peut être nécessaire d'utiliser une intubation trachéale et/ou une ventilation artificielle. Cependant, même en utilisant des équipements sophistiqués, le rôle de l'observation clinique telle que la couleur des muqueuses, la fréquence et la profondeur respiratoires ne peut pas être surestimées (Karwacki, 2001). La fréquence cardiaque et respiratoire ainsi que la pression sanguine permettent d'évaluer la profondeur de l'anesthésie. Outre ces paramètres physiologiques, les réflexes s'avèrent également une bonne utilité pour apprécier la perte de sensibilité. Le réflexe de retrait, ainsi que le réflexe palpébral, sont appropriés pour estimer la profondeur anesthésique chez le rat, de même que chez la majorité des animaux utilisés en recherche. Une profondeur adéquate se résume en une absence de réflexe, ce qui signifie que l'animal ne ressent pas la douleur (Whelan & Flecknell, 1992). Une alternative adéquate pour les rongeurs est réalisée par le pincement de la queue ou de l'oreille (Flecknell, 1996). Par ailleurs, une anesthésie non équilibrée se remarque par des signes précurseurs tels qu'une augmentation de la pression sanguine, une tachycardie ou une tachypnée, qui sont de bons indicateurs d'une anesthésie trop légère (Heard, 2004).

Le système respiratoire doit être évalué pour l'obtention d'une anesthésie adéquate et pour permettre une intervention sans douleur pour l'animal. De bons paramètres tels que la fréquence et la profondeur respiratoires ainsi qu'un profil des gaz sanguins permettent une évaluation de la fonction respiratoire durant l'anesthésie (Flecknell, 1996). D'autres caractéristiques d'une anesthésie inadéquate sont une hypoxie et une hypercapnie modérée à sévère. Une hypercapnie modérée peut être tolérée chez les animaux en santé pour une période raisonnable, mais peut être difficile à corriger sans avoir recours à une ventilation mécanique si elle persiste. L'hypoxie est corrigée facilement par un apport d'oxygène avec un masque durant l'anesthésie (Swindle et al., 2002). Le système cardiovasculaire peut également être évalué par des équipements non invasifs.

L'oxymètre de pouls permet de mesurer la fréquence cardiaque ainsi que la saturation en oxygène chez l'animal à l'aide d'une sonde placée sur le membre postérieur de l'animal (Swindle et al., 2002). Les gaz sanguins, la pression sanguine ainsi que le volume-minute ou le volume courant peuvent aussi être mesurés chez les rongeurs (Flecknell, 1996; Ordodi et al., 2005). La couleur des muqueuses, la fréquence respiratoire ainsi que le réflexe de retrait sont des observations minimales à effectuer, mais qui permettent toutefois une bonne estimation de la profondeur d'anesthésie lors d'absence d'équipements spécialisés.

Une attention particulière devrait être accordée au contrôle de la température corporelle (Diaz & Becker, 2010). L'hypothermie est une cause fréquente de décès anesthésique. L'hypothermie prolonge également le temps de récupération de l'anesthésie et influencera le métabolisme des médicaments. Cette notion est particulièrement importante chez les petits rongeurs car ils perdent de la chaleur rapidement du à leur petit ratio surface-volume. Les mécanismes d'homéostasie que la température du corps influence sont déprimés pendant l'anesthésie et de l'hypothermie sévère peut s'enchaîner. La chute de la température corporelle peut être exacerbée par la présence de gaz froid et sec à partir d'un appareil anesthésique. En outre, le rasage de l'animal avant l'opération supprime sa couche d'air isolante et l'utilisation de désinfectants cutanés comme l'alcool provoque une perte de chaleur. De plus, au cours des interventions chirurgicales, l'administration de fluides IV à la température de la pièce refroidit l'animal (Fecknell, 1996).

Une gestion pré-opératoire et opératoire minutieuse permet de réduire toute baisse de température corporelle. La plupart des animaux ont besoin de chauffage supplémentaire et devraient être réchauffés afin de minimiser les pertes de chaleur. Une isolation thermique efficace peut être assurée soit en enveloppant l'animal dans du coton, suivi d'une enveloppe extérieure de feuille d'aluminium, ou à l'aide de papier-bulles. Lors de l'isolation thermique de petits rongeurs, s'assurer que la queue soit incluse dans l'emballage, car la perte de chaleur de cette partie du corps peut être considérable. Un chauffage supplémentaire peut être fourni par des lampes ou des couvertures chauffantes, mais il faut prendre soin de ne pas brûler l'animal. Pendant ce temps, il est important de

préchauffer les couvertures et les lampes chauffantes avant qu'elles ne soient nécessaires, afin de permettre que leur température se stabilise et pour éviter une période de chauffage inadéquat lorsque la couverture ou la lampe est en préchauffage (Fecknell, 1996). La surveillance de la température corporelle se fait à l'aide d'une sonde rectale (Dallman et al., 2006) et est une mesure approximative non-invasive et fiable de la température corporelle interne du rat (Rodrigues et al., 2006).

KÉTAMINE

D'abord utilisé chez des soldats américains pendant la guerre du Vietnam dans les années 60 et 70, la kétamine fut développée pour répondre à la nécessité d'un agent anesthésique injectable peu coûteux pouvant être utilisé en toute sécurité par un personnel relativement inexpérimenté. Son utilisation fut exploitée en raison de sa fenêtre thérapeutique étendue, mais surtout parce qu'elle est l'un des rares agents qui ne déprime pas la fonction respiratoire à des doses anesthésiques. L'utilisation de kétamine seule est limitée chez la plupart des espèces, mais en combinaison avec des analgésiques, elle s'avère très intéressante (Green et al., 1981; Pai & Heining, 2007).

Mécanismes d'action

Le mécanisme d'action principale de la kétamine est son effet antagoniste non-sélectif des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), créant ainsi une dépression du système nerveux central (Fitzgibbon et al., 2002). Outre son affinité pour le récepteur NMDA, la kétamine interagit avec d'autres récepteurs, y compris les récepteurs du glutamate non-NMDA, les récepteurs opioïdes, les récepteurs nicotiques et muscariniques de l'acétylcholine et les récepteurs GABA_A (Knobloch et al., 2006). Les récepteurs NMDA font partie de la famille des récepteurs du glutamate, principal neurotransmetteur activateur du SNC (De Groot & Sontheimer, 2011). Ils sont obligatoirement formés de sous-unités NR1 et NR2 (Monyer et al, 1992). Ces complexes sont hautement perméables aux ions Ca²⁺ (Meyer & Fish, 2008; Golan et al., 2012). Les récepteurs NMDA sont présents au niveau cérébral et spinal. Pour être activés, le glutamate ainsi que la glycine, son co-activateur, doivent se fixer sur ce récepteur glutamatergique. Une fois le récepteur NMDA activé, il

ouvre les canaux qui permettent un efflux de K^+ et un influx de Ca^{2+} (Golan et al., 2012). Pour une diminution de l'excitabilité neuronale, le blocage des récepteurs NMDA est un mécanisme primordial induisant l'anesthésie et l'analgésie chez les animaux (Pai & Heining, 2007).

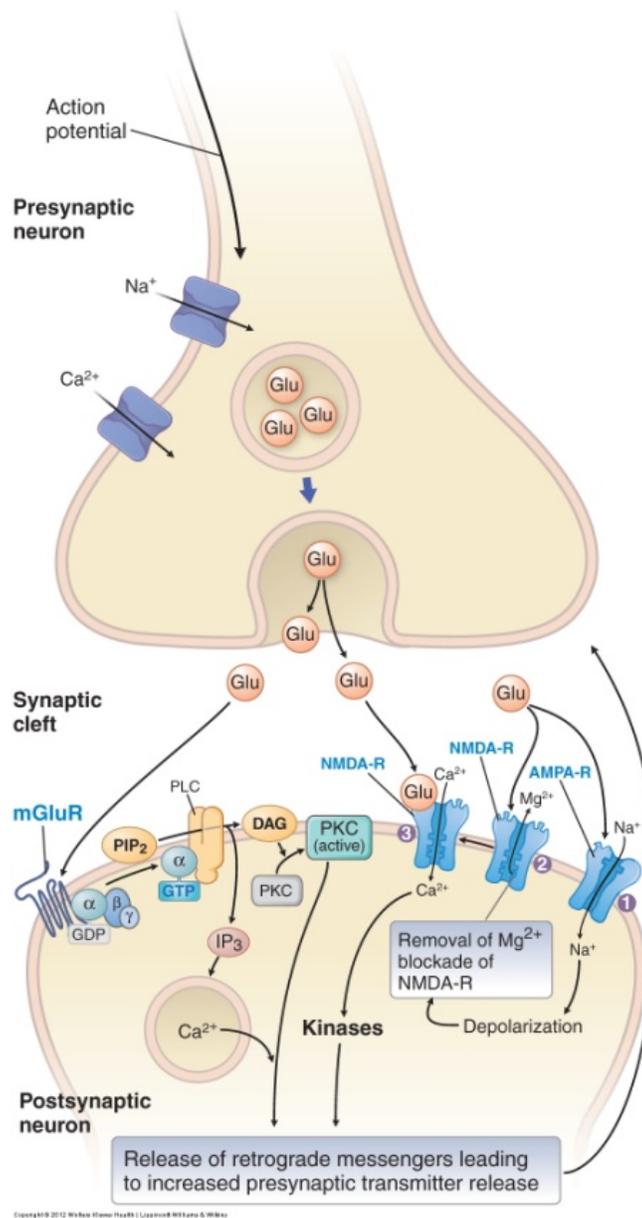


Figure 3. Interactions entre différentes classes de récepteurs du glutamate tel que les métabotropiques, AMPA et NMDA. La kétamine vient se fixer aux récepteurs NMDA, bloquant ainsi sa liaison avec le glutamate, ce qui empêche la transmission du potentiel d'action.

(Golan et al., 2012)

La kétamine procure une anesthésie sédatrice et analgésique qualifiée de dissociative (Dittmar et al., 2004). De plus, la kétamine cause de l'amnésie et une immobilité (Struck et al., 2001). Une dissociation se produit entre différentes parties du cerveau : certaines sont inhibées (thalamocortex) et d'autres sont activées (système limbique).

Les effets secondaires les plus communs de la kétamine sont l'hypersalivation, l'agitation, une mydriase ainsi qu'une ouverture permanente des yeux lors de l'anesthésie (Chung & Yoon, 2008). Lors de l'anesthésie, et afin d'éviter les lésions cornéennes, une application d'onguent ophtalmique est de mise pour la lubrification des yeux. La kétamine est souvent combinée avec un sédatif qui permet une relaxation musculaire, ce qui antagonise ses effets indésirables (Hildebrandt, 2008).

Effets au niveau des différents systèmes de l'organisme

Tout agent anesthésique peut faire varier les paramètres physiologiques observés chez plusieurs espèces, et ce, avec une variabilité inter-individuelle (Avsaroglu et al., 2003). En effet, l'âge, le sexe, la souche animale ainsi que l'environnement influencent la réponse anesthésique (Struck et al., 2011).

Systeme nerveux central

Au niveau du SNC, la kétamine provoque des hallucinations, de la confusion et de l'agitation au réveil. Tous ces effets indésirables, que procure la kétamine, font partis de la définition d'anesthésie dissociative, dans lequel les échanges neuronaux entre le thalamus et le cortex sont interrompus (Hedenqvist, 2008). Cet état se caractérise par une perte de conscience, des mouvements réflexes anormaux et une raideur musculaire (Craven, 2007). Des tremblements, de la spasticité musculaire et des crises convulsives ont été rapportés chez certaines espèces (Papich, 2002). Des hallucinations au réveil chez quelques espèces nécessiteront un tranquillisant pour adoucir cet effet adverse.

Tout agent anesthésique crée un déséquilibre dans l'homéostasie de l'animal. L'organisme fonctionne anormalement et ses mécanismes de thermorégulation sont altérés. En effet, de l'hypothermie surviendra après l'administration de la kétamine (Meyer & Fish, 2008; Rodrigues et al., 2006).

Système cardiovasculaire

La kétamine stimule indirectement le système nerveux sympathique causant ainsi une augmentation de la pression sanguine (Golan et al., 2012). Chez le rat, une augmentation de la fréquence cardiaque ainsi que de la pression sanguine ont été rapportées (Kumar & Kumar, 1984; Hadji & Vesal, 2007). Lors de certaines conditions où la stabilité hémodynamique est compromise, cet effet pourrait être bénéfique (Cuvellier, 2012). Les fonctions vasculaire, endothéliale et myocardique sont aussi affectées (Rodrigues et al., 2006). En outre, la kétamine augmente la résistance vasculaire pulmonaire ainsi qu'une diminution subséquente du débit sanguin pulmonaire, ce qui pourrait nuire à l'élimination du CO₂ (Rodrigues et al., 2006). De plus, de l'hypertension, de la tachyarythmie ainsi que des myoclonies figurent sur la liste des effets secondaires (Golan et al., 2012).

Système respiratoire

Les altérations du système respiratoire causées par la kétamine sont de deux ordres. L'une étant favorable pour le confort de l'animal. En effet, la bronchodilatation causée par la kétamine serait bénéfique dans le cas d'asthme ou d'hyperréactivité des voies respiratoires puisque les voies aériennes sont généralement bien maintenues avec une certaine préservation des réflexes pharyngés et laryngés. La kétamine préserve également les réflexes de protection des voies respiratoires et digestives supérieures comme la toux et la déglutition (Craven, 2007; Cuvellier, 2012). L'intubation endotrachéale deviendra ainsi une technique plus ardue. Une respiration apnéique chez certains animaux nécessitera éventuellement une supplémentation en oxygène (Papich, 2002). Parmi les effets adverses, une salivation importante pouvant partiellement obstruer les voies respiratoires supérieures se remarque chez certains sujets (Davison et al., 2007).

Contre-indications

La kétamine élève la pression intracrânienne au niveau du liquide céphalorachidien (LCR) et il est donc préférable de s'abstenir de son utilisation lors d'études sur le SNC. La kétamine augmente également la pression intraoculaire et on devrait éviter son utilisation lors de glaucome (Papich, 2002). Toute réaction d'hypersensibilité pourrait causer des dommages sévères. Dans ce cas, un agent anesthésique alternatif devrait être considéré. L'hypertension et la tachycardie sont autant des facteurs qui ne font pas bon ménage avec la kétamine (Golan et al., 2012).

XYLAZINE

Durant les années 1960, des études cliniques démontraient les propriétés dépressives de la xylazine sur le SNC. Elle a ensuite été introduite à l'usage vétérinaire comme sédatif, analgésique et relaxant musculaire. À ce jour, la xylazine est couramment utilisée seule ou en combinaison avec d'autres médicaments chez de nombreuses espèces (Greene & Thurmon, 1988).

Mécanismes d'action

La xylazine est un agoniste α_2 -adrénergique, offrant une sédation, une analgésie et de la relaxation musculaire (Dittmar et al., 2004). Ses récepteurs sont localisés au niveau du système nerveux central, du système gastro-intestinal, de l'utérus, des plaquettes et des reins (Hellebrekers, 2011). Les effets analgésique et sédatif de la xylazine sont liés à la dépression du système nerveux central en stimulant les récepteurs α_2 -adrénergiques centraux, ou via son effet sur les récepteurs opioïdes (Greene & Thurmon, 1988). Il existe une variabilité entre les différentes espèces de l'expression des sous-types de récepteurs α_2 -adrénergiques. Les effets observés sont difficiles à extrapoler d'une espèce à l'autre (Ongioco et al., 2000). Certains récepteurs α_2 -adrénergiques et peut-être la xylazine stimulent les récepteurs α_2 présynaptiques modulant la relâche de norépinéphrine. De plus, la xylazine rehausse l'activité vagale et baroréceptrice par l'entremise d'un mécanisme central (Greene & Thurmon, 1988). En recherche, la xylazine est considérée

adéquate lorsqu'elle est utilisée seule ou en combinaison avec d'autres agents anesthésiques et analgésiques tels que la kétamine (Saha et al., 2005).

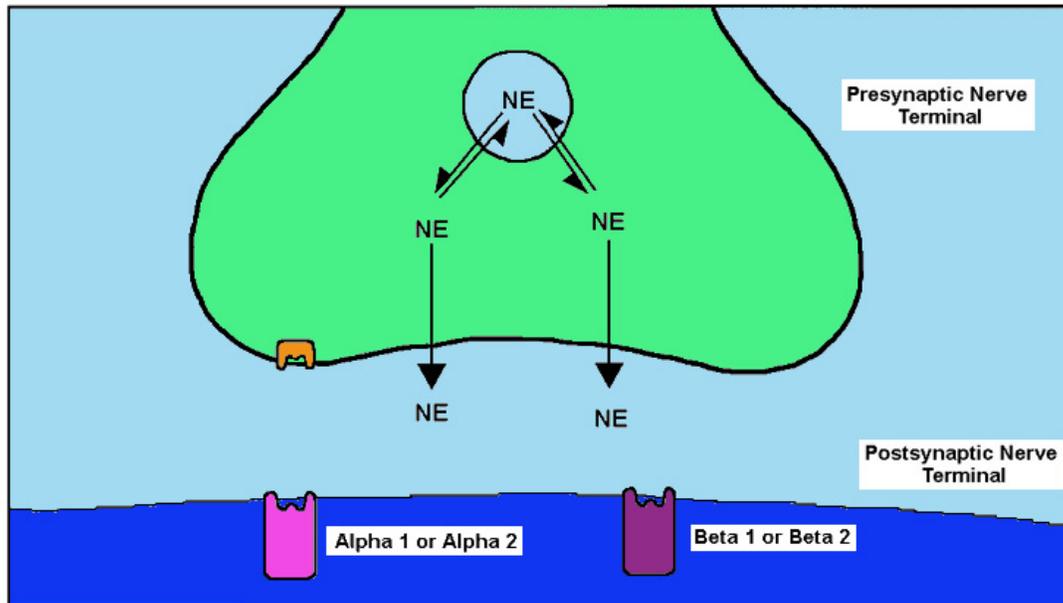


Figure 4. La xylazine vient se fixer aux récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques, bloquant ainsi la relâche de norépinéphrine (Université de Kentucky, 2015).

Toutefois, les agonistes $\alpha 2$ -adrénergiques ne provoquent pas une anesthésie et sont souvent combinés avec des anesthésiques dissociatifs comme la kétamine (Kastner, 2006). En cas de surdose ou lors d'un besoin d'atteindre un réveil rapide, de nombreux antagonistes de ces récepteurs tels que l'atipamézole, la yohimbine ou la tolazoline agissent pour inhiber ses effets (Flecknell, 1996; Komulainen & Olson, 1991), ce qui raccourcit considérablement le temps de récupération et renverse les dépressions respiratoire et cardiovasculaire associées à son administration (Richardson & Flecknell, 2005).

De l'hypotension, une dépression respiratoire, de l'hyperglycémie et de la diurèse marquée sont les principaux effets adverses de la xylazine (Dittmar et al., 2004).

Effets au niveau des différents systèmes de l'organisme

La xylazine diminue de façon significative la fréquence cardiaque chez les animaux non prémédiqués par des médicaments anticholinergiques. Elle provoque une hypertension transitoire suivie d'hypotension. Des arythmies associées à la xylazine comprenant un bloc sino-auriculaire, un bloc atrio-ventriculaire, une bradycardie, une dissociation atrioventriculaire (AV) et une arythmie sinusale sont des effets secondaires fréquemment associés avec les α 2-agonistes en raison de l'activité vagale réflexe. De plus, un α 2-agoniste abaisse la libération de noradrénaline dans le système nerveux sympathique (Greene & Thurmon, 1988; Hajighahramani & Vesal, 2007). Bien que la bradycardie ait été observée chez les rats recevant de la xylazine, il n'y a pas de changements dans la conductivité du myocarde.

De la polyurie est observée chez les rats recevant de la xylazine. Ceci est causé par l'inhibition de la libération d'hormone anti-diurétique et à l'effet diurétique osmotique de l'hyperglycémie (Hajighahramani & Vesal, 2007).

Contre-indications

La xylazine peut provoquer le travail chez les femelles gestantes, donc elle est à utiliser avec précaution. Chez les patients présentant une maladie cardiaque, la xylazine doit être utilisée prudemment et on devrait même éviter son utilisation. En raison de la dépression cardiaque et de l'hypotension, elle ne devrait normalement pas être utilisée avec des tranquillisants comme les phénothiazines (Papich, 2002). La xylazine induit de l'hypoventilation et augmente la pression intra-crânienne, ainsi, il serait préférable d'éviter son utilisation lorsqu'un patient présente les conditions nommées précédemment. La déshydratation pourrait amplifier les effets cardiovasculaires indésirables des agonistes alpha-2, ce qui n'est pas souhaitable. Finalement, un animal ayant un diabète mellitus devrait ne pas être traité à la xylazine dû à l'hyperglycémie induite par ce médicament (Cuvellier, 2012).

COMBINAISON KÉTAMINE-XYLAZINE

La co-administration de kétamine-xylazine (KX) est un protocole anesthésique couramment utilisé chez les animaux de laboratoire (Flecknell, 1996 ; Richardson & Flecknell, 2005). Les propriétés sédatives et la relaxation musculaire de la xylazine sont bénéfiques puisqu'elles réduisent les effets secondaires de la kétamine comme les tremblements et la rigidité musculaire (Saha et al., 2005). La combinaison KX fournit une anesthésie considérée relativement sécuritaire et peut être administrée sans avoir besoin d'équipements spécialisés pour le suivi des animaux (Struck et al., 2011). La combinaison KX induit une bradycardie, une hypercapnie et une acidose pouvant être dues à une hypoventilation causée par cette combinaison anesthésique (Rodrigues et al., 2006 ; Swindle et al., 2002). Des actions indésirables, telle que la dépression respiratoire, peuvent être additives lors de cette utilisation. Chez les petits rongeurs, la combinaison de kétamine et de xylazine entraîne une hypotension et une hypoventilation. Toutefois, le risque de mortalité reste faible (Dittmar et al., 2004).

La combinaison KX se révèle être non irritante et appropriée pour l'injection IP chez le rat de laboratoire (Hajighahramani & Vesal, 2007). Il est toutefois noté que la réponse à l'anesthésie par la KX varie énormément entre les individus et que certains rats n'atteignent pas une anesthésie chirurgicale (Struck et al., 2011).

BIOCHIMIE SANGUINE MODIFIÉE PAR L'ADMINISTRATION KÉTAMINE-XYLAZINE

Aucune modification de la concentration du glucose sérique ne semble se produire chez les rats lors d'une administration de kétamine (Saha et al., 2005). Cependant, l'injection de xylazine peut induire une hyperglycémie ainsi qu'une diminution de l'insuline sérique (Plumb, 2008). Tout comme l'isoflurane, la kétamine combinée avec la xylazine cause une hyperglycémie aiguë. Ceci est associé à une diminution de l'insulinémie, d'ACTH et de corticostérone ainsi qu'une augmentation du glucagon plasmatique et d'hormone de croissance. Chez les rongeurs, cette hyperglycémie est toutefois temporaire lors d'une administration concomitante d'isoflurane et on remarque plutôt, lors d'une administration

prolongée de cet agent anesthésique, une hypoglycémie (Simpson, 1997 ; Veilleux-Lemieux et al., 2013).

Avec une combinaison kétamine-xylazine, on observe une hypoprotéinémie et une hypoalbuminémie (Meyer & Fish, 2008; Veilleux-Lemieux et al., 2013). Chez les rats Sprague-Dawley, la créatinine et l'urée demeurent inchangées lors de cette même administration (Veilleux-Lemieux et al., 2013). La combinaison de kétamine-xylazine a des conséquences importantes sur de nombreux paramètres biochimiques et peut significativement altérer certaines données de plusieurs protocoles de recherche. Par exemple, une hypoprotéinémie et une hypoalbuminémie peuvent modifier la liaison d'autres médicaments concomitants, modulant ainsi leur distribution et voir leur effet au sein de l'organisme.

Agents	Dose	Informations
<i>Kétamine</i>	<i>22 mg/kg IM</i> <i>25-40 mg/kg IM</i>	<i>Sédation légère</i> <i>Forte sédation</i>
<i>Xylazine</i>	<i>5-10 mg/kg SQ, IM, IP</i>	<i>Sédation, peut causer de la nécrose si administrer IM</i>
<i>K.étamine-Xylazine</i>	<i>75-95 mg/kg kétamine et 5 mg/kg xylazine IM, IP</i>	<i>Anesthésie</i>

Tableau I. Tableau sommaire illustrant les doses utilisées de la kétamine et de la xylazine et leurs effets chez les rats (Carpentier JW, 2013)

PHARMACOCINÉTIQUE DE LA KÉTAMINE ET LA XYLAZINE

Paramètres pharmacocinétiques

La pharmacocinétique permet l'évaluation quantifiée et la caractérisation de la libération, l'absorption, la distribution, le métabolisme et de l'excrétion (LADME) des médicaments. Les facteurs biologiques, physiologiques et physico-chimiques qui influencent les

processus de transfert des médicaments dans l'organisme modifient également le taux et l'étendue de LADME des médicaments (Makoid & Vuchetich, 2013). Sommairement, la pharmacocinétique étudie le devenir d'un xénobiotique après son administration dans l'organisme, par opposition à la pharmacodynamie qui décrit les effets qu'un xénobiotique produit sur l'organisme. Les données pharmacocinétiques, tel que la dose et la concentration, sont nécessaires pour optimiser la réponse pharmacodynamique, soit l'effet désiré (Benet, 1984). En ce sens, il est possible de quantifier l'effet d'une drogue en fonction de sa concentration, en suivant ainsi sa courbe sigmoïde (Figure 5). L'effet s'accroît avec la concentration pour parvenir à un effet maximal (E_{max}), soit un plateau. Toute augmentation de dose au-delà de E_{max} est inutile (Fourcade et al, 2014). Plusieurs facteurs dont la physiologie, certains paramètres biochimiques tel que l'hypoalbuminémie, le sexe, la génétique des animaux, la variabilité interindividuelle, la nutrition et même l'environnement peuvent faire varier la pharmacocinétique des drogues (Struck et al., 2012).

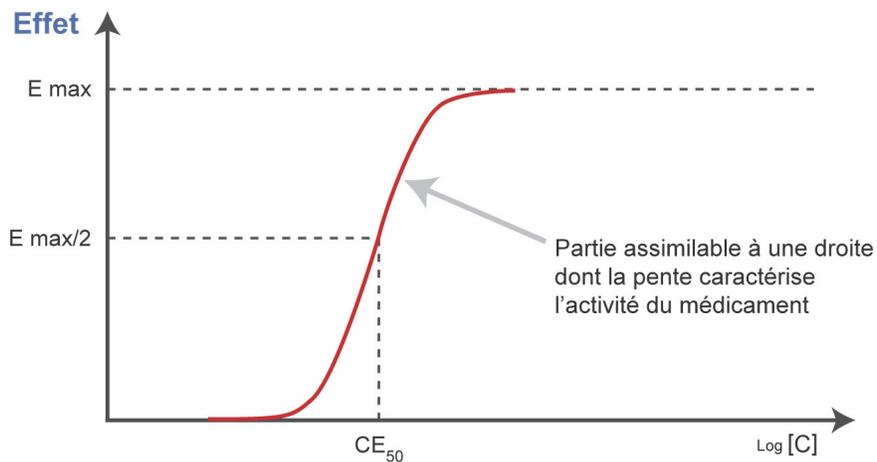


Figure 5. Relation concentration-effet (Collège National de Pharmacologie Médicale, 2015).

La libération est la relâche d'une drogue sous sa forme pharmaceutique, soit par une désintégration (forme solide), une dispersion ou une dissolution (poudre). L'absorption se définit par le transfert d'un médicament à partir de son site d'administration vers la

circulation sanguine. Aussi nommée biodisponibilité (F), elle se définit par la fraction de la dose extravasculaire administrée qui atteint la circulation systémique en comparant les concentrations atteintes lors d'une administration intraveineuse (Jang et al., 2001). Comme la présente étude vise la pharmacocinétique du mélange KX suite à une administration IP uniquement, la biodisponibilité ne sera pas calculée. La biodisponibilité est normalement rapportée lorsque l'administration est extravasculaire (Aiello & Moses, 2013). La formule pour calculer la F absolue est de comparer l'exposition plasmatique (AUC) après une administration extravasculaire et une administration intravasculaire :

$$F (\%) = AUC_{ev} / AUC_{iv} \times DOSE_{iv} / DOSE_{ev} \times 100$$

Ensuite, la distribution décrit le déplacement de cette substance vers les sites extravasculaires tels que les organes et les tissus adipeux. Cette distribution variera dépendamment du flux sanguin de chaque organe. La plupart des médicaments ne sont pas répartis de manière égale dans tout l'organisme, mais ils ont tendance à s'accumuler dans certains tissus ou compartiments liquides spécifiques. La distribution et l'élimination peuvent se faire simultanément. En règle générale, la distribution est beaucoup plus rapide que l'élimination.

Le volume de distribution (Vd) est dépendant de la concentration d'un médicament et estime sa distribution à travers le volume tissulaire (Gunaratna, 2001; Aiello & Moses, 2013). Il est estimé en divisant la quantité de drogue présente dans l'animal à l'équilibre divisé par la concentration plasmatique. Il est généralement exprimé en litres par kilogramme (L/kg). Le Vd peut être calculé à l'aide de l'équation suivante où K_{el} est la constante d'élimination (CL/Vd):

$$Vd = F \times Dose / (AUC \times K_{el})$$

Le Vd apparent pour un médicament est déterminé par son hydrosolubilité ou sa liposolubilité, sa liaison plasmatique aux protéines et sa perfusion tissulaire. Les médicaments qui tendent à maintenir des concentrations élevées dans le plasma en raison de leur faible solubilité dans les lipides, d'une forte liaison aux protéines plasmatiques ou

d'une faible liaison tissulaire ont un faible Vd. À l'opposé, lorsque le médicament est fortement lié à un tissu particulier par sa grande affinité, provoquant ainsi la drogue à quitter la circulation, un grand Vd résultera. La valeur du Vd est caractéristique pour chaque médicament et pour une espèce donnée. Cependant, un certain nombre de facteurs cliniquement significatifs peuvent influencer le Vd tel que l'âge, l'état fonctionnel des reins, du foie et du cœur, l'accumulation de fluides et la concentration des protéines plasmatiques (Jang et al., 2013). Une dose nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique souhaitée peut être calculée à partir de la formule suivante, dans laquelle D est la dose et C la concentration plasmatique nécessaire pour un médicament donné :

$$D = C \times Vd \times \text{poids corporel (en kg)}$$

Le métabolisme des drogues se fait principalement par le foie, transformant ceux-ci en métabolites actifs ou inactifs, et ce, par des procédés enzymatiques. Les voies métaboliques qui participent activement à la dégradation des drogues sont collectivement appelées biotransformation. La phase I des réactions de biotransformation qui présente ou expose des groupes fonctionnels par hydroxylation, oxydation ou déalkylation, rend les composés inactifs et améliore leur solubilité dans l'eau. Cette phase est caractérisée par les enzymes cytochromes P450 (CYP). Les cytochromes P450 présents dans le rein atteignent 10% du niveau retrouvé dans le foie (Aiello & Moses, 2013). Dans les réactions de biotransformation de phase II, le produit de la phase I est conjugué à un glucide, formant un glucuronide, ou à un groupement sulfate, dont le produit final soluble est excrété dans l'urine ou la bile (Srinivas et al., 2005).

Le système enzymatique des cytochromes P450 se compose d'une superfamille d'hémoprotéines qui dégradent une grande variété de produits chimiques exogènes y compris les médicaments, les substances cancérigènes, les toxines et les composés endogènes comme les stéroïdes, les acides gras et les prostaglandines (Badyal & Dadhich, 2001). Les enzymes CYP, situées entre autres dans les microsomes des hépatocytes, sont classés en plusieurs familles d'isoenzymes (par exemple CYP1, 2 et 3) basé sur des séquences de protéines homologues. Ces familles d'isoenzymes sont subdivisées par la

suite en groupes fonctionnels plus étroitement liés, par exemple le CYP3A et ses sous-classes CYP3A4 et CYP3A5 (CYP3A1 et CYP3A2 chez le rat) (Lu et al, 2003). Une hétérogénéité ainsi qu'une variabilité intra-individuelle et inter-espèces des enzymes CYP justifient les précautions portées lors d'usage de médicaments (Srinivas et al., 2005).

L'excrétion d'un médicament est principalement liée à la clairance. La CL se définit comme le volume plasmatique d'un médicament éliminé par unité de temps. La CL est l'un des paramètres pharmacocinétiques les plus importants et dépend de la capacité intrinsèque des organes tels que le foie et les reins à excréter ou métaboliser un médicament (Gunaratna, 2001). Le rein excrète les médicaments par filtration glomérulaire et par la sécrétion tubulaire et peut également être un site de dégradation métabolique pour certains médicaments, tel que la kétamine. La clairance est actuellement reconnue pour se produire dans de nombreux tissus (Srinivas, Meier-Kriesche, & Kaplan, 2005). La CL se calcule par la formule suivante dans laquelle l'AUC est l'exposition plasmatique correspondant à l'aire sous la courbe (Jang et al., 2001) :

$$CL = F \times Dose / AUC$$

Le temps de demi-vie d'un médicament ($T_{1/2}$) est le temps nécessaire pour que la concentration plasmatique d'un médicament diminue de moitié. Celui-ci est directement lié au Vd et à la CL : avec l'augmentation de CL, $T_{1/2}$ diminue et lorsque le Vd augmente, $T_{1/2}$ augmente. Ainsi, le temps de demi-vie est un paramètre secondaire de la clairance et de la distribution du médicament (Jang et al., 2011) :

$$T_{1/2} = Vd/CL \times 0,693$$

N'étant pas classiquement définie comme paramètre pharmacocinétique primaire, la liaison aux protéines influence de manière significative la distribution des médicaments et affecte ainsi leur vitesse d'élimination (Srinivas et al., 2005). Deux paramètres essentiels pour évaluer l'exposition de la drogue chez l'animal sont la concentration maximale atteinte dans le sang (C_{max}) et l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en

fonction du temps (AUC). Tous ces paramètres pharmacocinétiques sont essentiels pour une bonne compréhension de la fonction d'un médicament et de son utilisation judicieuse.

Pour obtenir des valeurs de pharmacocinétique, le modèle non-compartmental s'appuie sur des équations algébriques. Ce dernier est de mise lorsque le métabolisme d'un médicament supporte l'élimination de 1^{er} ordre, en supposant que la drogue ne passe pas par d'autres compartiments. Cette dernière a largement surpassé l'utilisation du modèle compartmental (équations différentielles linéaires ou non), faisant ainsi d'elle une méthode simple et couramment utilisée pour calculer les paramètres pharmacocinétiques tels que le Vd, T_{1/2} et la CL. Par exemple, l'AUC se calcule par la règle des trapèzes en supposant l'aire sous la courbe est la somme de plusieurs trapèzes (Gabrielsson & Weiner, 2012).

La pharmacocinétique de la kétamine et de la xylazine

La kétamine est une molécule de la famille des cycloalkylarylamines qui s'apparente à la phéncyclidine puisqu'elle est l'un de ses 200 produits dérivés (Lin, 1996; Pai & Heining, 2007). La kétamine est un mélange de deux isomères optiques, soit la S- et R-kétamine. Les deux énantiomères sont la N-déméthylé en S- et R-norkétamine respectivement, produits par les CYP microsomaux hépatiques. La S-kétamine possède un effet analgésique quatre fois plus importants que la forme R, suggérant une affinité supérieure à la forme R pour les récepteurs NMDA (Capponi et al., 2009).

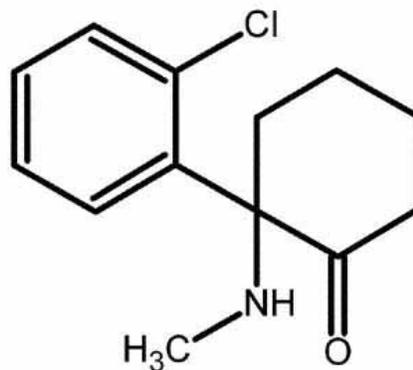


Figure 6. Structure chimique de la kétamine (Adamowicz & Kala, 2005)

La xylazine est un analogue de la clonidine, celle-ci faisant partie de la famille des imidazolines. Cette drogue est compatible avec plusieurs agents pouvant ainsi être combinée en une seule injection. Son pH se situe approximativement à 5.5 (Plumb, 2008).

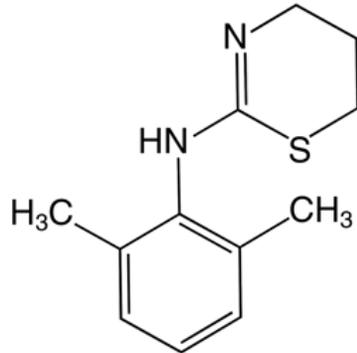


Figure 7. Structure chimique de la xylazine (St-Germain Lavoie, Pailleux, Vachon & Beaudry, 2013)

a. Absorption et distribution

La kétamine a un début d'action rapide et une grande liposolubilité. Initialement, la kétamine est distribuée dans les tissus fortement vascularisés et possède une affinité pour les récepteurs situés dans le cerveau, occasionnant ainsi une perte de conscience (Struck et al., 2011). Ensuite, cette molécule est distribuée au niveau des organes modérément perfusés, tels que les muscles et la graisse. La xylazine est rapidement absorbée et distribuée au niveau de tous les organes, contrairement à la kétamine, mais possède une affinité pour les reins et le SNC (Salonen, 1992).

b. Métabolisme

La kétamine est métabolisée essentiellement par le foie en un métabolite actif, la norkétamine et en plusieurs métabolites inactifs, comme par exemple le 6-hydroxynorkétamine (Meyer & Fish, 2008; Adamowicz & Kala, 2005). Ce processus est accompli par les enzymes CYP P450 (Meyer & Fish, 2008). La norkétamine est hydroxylée pour former des composés hydroxy-norkétamine qui peuvent être conjugués à des dérivés glucuronidés plus solubles dans l'eau afin de faciliter l'excrétion urinaire, puis métabolisé en déhydronorkétamine. Cette dernière semble être le métabolite de la kétamine le plus

abondant autre que la norkétamine (Knobloch et al., 2006; Adamowicz & Kala, 2005).

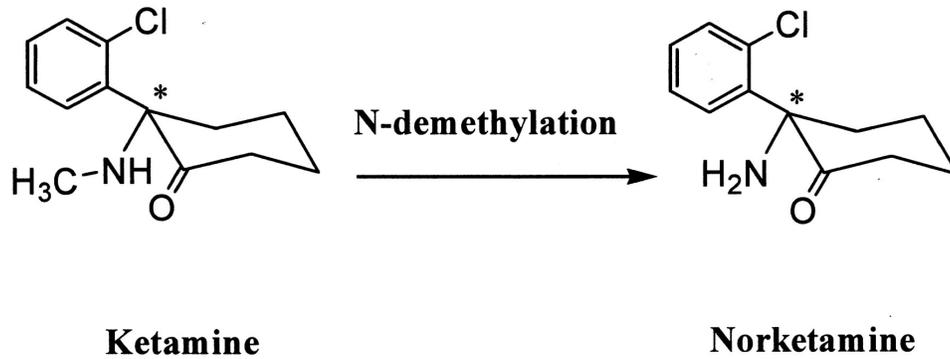


Figure 8. La N-déméthylation de la kétamine par les cytochromes P450 du foie. La kétamine est N-déméthylée en norkétamine (Hijazi & Boulieu, 2002)

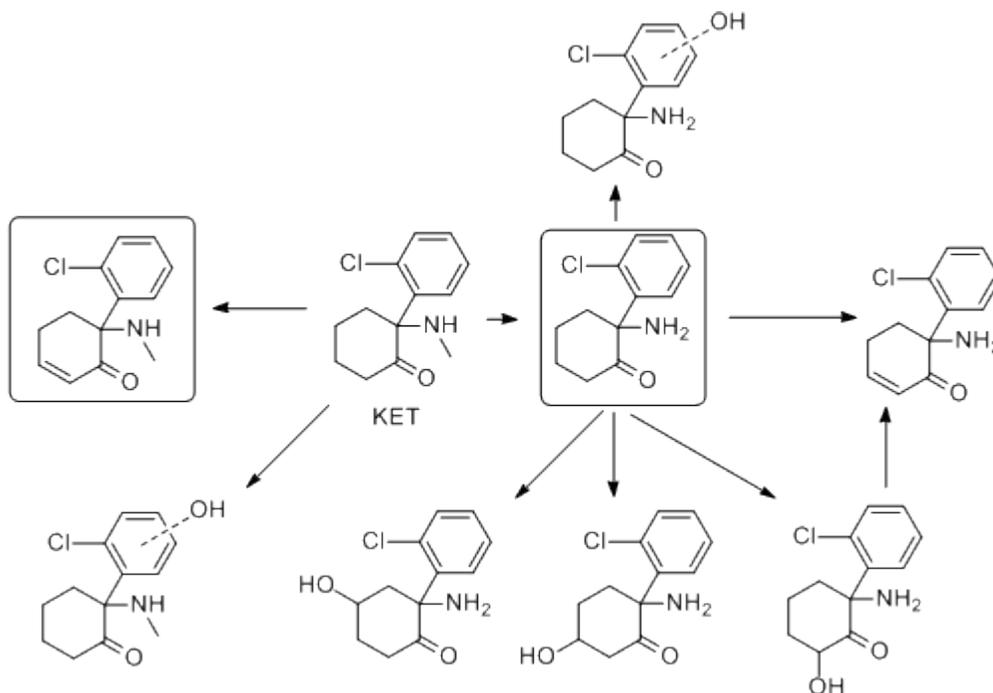


Figure 9. Les différents métabolites de la kétamine produits par les cytochromes P450 du foie. (Bluelight [Internet], 2000)

Chez le rat, les enzymes du CYP P450, principalement du CYP3A et aussi CYP2C, CYP2B et CYP2D, sont impliqués dans le métabolisme de phase 1 de la kétamine, et ce, au niveau du foie. Par conséquent, si le métabolisme des cytochromes P450 est entravé, l'exposition systémique de cette molécule est augmentée de façon importante ce qui peut entraîner des effets indésirables (St-Germain Lavoie et al., 2013). La xylazine semble être rapidement et largement métabolisée par le foie. En ce qui trait aux enzymes CYP450 impliqués dans le métabolisme de la xylazine, la littérature offre peu de documentations. Néanmoins, certaines molécules connues comme le chloramphénicol inhibent les CYP3A, ce qui réduit profusément le métabolisme de la xylazine (Grubb et al., 1997). Ceci permet au CYP3A de jouer un rôle dans le métabolisme de la xylazine. De plus, l'étude de Grubb et al. (1997) soutient fortement que le métabolisme de la xylazine est contrôlé par le CYP3A dans les microsomes hépatiques chez le rat (St-Germain Lavoie et al., 2013).

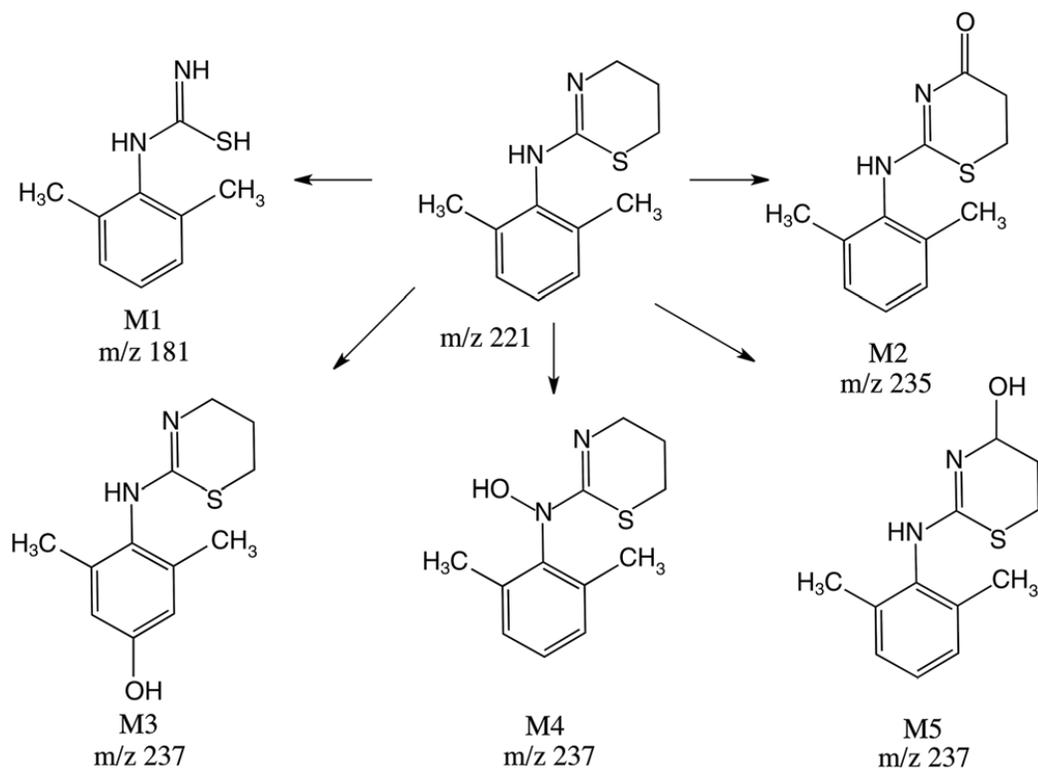


Figure 10. Voies métaboliques de la xylazine observées dans les microsomes hépatiques de rats (St-Germain Lavoie et al., 2013)

c. Élimination et excrétion

L'élimination de la kétamine se fait principalement dans l'urine et son temps de demi-vie est variable selon les espèces (Majewski-Tiedeken, Rabin, & Siegel, 2008). Chez le rat, la kétamine a une clairance hépatique élevée de 1 L/min et un grand volume de distribution de 3 L/kg, résultant en une demi-vie de 2 h (Struck et al., 2008). Un taux d'extraction hépatique élevé suggère que l'altération du flux sanguin hépatique pourrait influencer le taux de clairance de la kétamine. Cette caractéristique signifie que le facteur limitant dans le métabolisme de la kétamine est la capacité du flux sanguin hépatique à transporter la drogue aux hépatocytes et non la capacité enzymatique des hépatocytes à métaboliser le médicament (Struck et al., 2011).

La xylazine est éliminée principalement dans l'urine puisqu'on y retrouve jusqu'à 70 % de sa quantité après une administration intraveineuse ou orale (Veilleux-Lemieux et al., 2013). La clairance de la xylazine est mal définie chez le rat et plusieurs hypothèses sont pilotées. En effet, après l'administration de cette molécule, celle-ci possède un large volume de distribution et une clairance métabolique rapide qui ne sont pas essentiellement dépendants du débit sanguin hépatique. Par contre, le flux sanguin hépatique peut être influencé par l'alimentation et par l'état de jeûne. Trente minutes après un repas, une augmentation du débit sanguin splanchnique et hépatique se produit chez le rat. En outre, la privation de nourriture cause une diminution de la clairance plasmatique de plusieurs médicaments (Struck et al., 2011). De plus, lors d'études chez les rats préalablement injectés de LPS, les paramètres pharmacocinétiques de la xylazine pouvaient être associés à une durée d'anesthésie plus longue puisque l'exposition plasmatique de la drogue (AUC) augmente et sa clairance diminue, et ce, même si les fractions excrétées urinaires sont augmentées (Veilleux-Lemieux et al., 2012).

Lors d'une administration de kétamine-xylazine chez le rat, le temps de demi-vie est d'approximativement 2h (Struck et al., 2011). Cependant, dans une étude antérieure, le temps de demi-vie et la constante d'élimination de la kétamine et xylazine sont, respectivement, 8.5 et 13 h et ensuite, 0.081 et 0.0536 h chez les vieux rats (> 2 ans) (Veilleux-Lemieux et al., 2013).

Implications cliniques

Une injection de kétamine-xylazine (kétamine 75-100mg/kg et xylazine 5-10mg/kg, IP) chez le rat produit une anesthésie d'une durée d'environ 45 min (Swindle et al., 2002). Cependant, plusieurs facteurs physiologiques peuvent modifier la durée de l'anesthésie. Sachant que la clairance de la kétamine est dépendante du débit sanguin hépatique, une altération de celle-ci induira une anesthésie de longue durée (Struck et al. 2011). De plus, une diminution du métabolisme de la kétamine induit par une lipidose hépatique chez la souris obèse augmente sa concentration plasmatique pouvant mener à une toxicité (Chung et Yoon, 2008). Ensuite, une prévention de l'hypothermie diminue les risques de compromettre la clairance des drogues, pouvant ainsi éviter une réduction de leur métabolisme (Tortorici et al., 2007). Une compréhension détaillée de la pharmacocinétique des agents anesthésiques en relation avec la physiologie animale permet de diminuer les impacts cliniques d'une anesthésie, surtout chez le rat gériatrique.

LE MÉTABOLISME ET LE VIEILLISSEMENT

Modèles utilisés pour la recherche

Plusieurs axes de recherche s'intéressent au vieillissement de la population. En pratique, le but n'est pas nécessairement de prolonger indéfiniment la vie humaine, mais de trouver les moyens d'atténuer la sévérité d'un grand nombre de conditions douloureuses et de guérir des maladies qui surviennent avec l'âge, ce qui améliore la qualité de vie (Burek & Hollander, 1980). Le vieillissement est un phénomène physiologique irréversible et progressif, caractérisé par des changements dégénératifs dans la structure et la fonction de différents organes et tissus. La qualité de vie chez les patients âgés augmente considérablement grâce aux progrès et à l'amélioration de la science. L'acquisition de connaissances sur le phénomène de vieillissement chez l'humain a naturellement augmenté les demandes de modèles animaux appropriés (Folkow & Svanborg, 1993). En recherche, le rat compte parmi les animaux les plus utilisés, et ce, après la souris. Ces rongeurs possèdent plusieurs caractéristiques nécessaires pour être un modèle idéal de recherche sur le vieillissement, et ce, comparativement à un animal de plus grande taille

avec une longévité plus longue (par exemple le chien, le primate non-humain ou le porc). Ils sont facilement accessibles auprès des compagnies et relativement peu dispendieux à l'achat et pour la maintenance; aisément maniable et s'adaptent très bien à un nouvel environnement; possédant une uniformité génétique et un génome connu, les paramètres physiologiques sont bien définis et caractérisés; comme modèle vieillissant, leur courte longévité permet d'étudier les effets à long terme de traitements expérimentaux sur la santé et le bien-être humain (Rand, 2011).

Particularités physiologiques et anatomiques du rat reliées au métabolisme du médicament

Bien que le métabolisme des rongeurs ressemble à celui de l'humain, certaines caractéristiques sont uniques au rat. Certains organes clés sont nécessaires au métabolisme des drogues, dont le foie, les reins, les poumons et le cœur. Il est donc primordial de connaître le fonctionnement de ces organes pour une meilleure compréhension de l'impact que l'organisme peut avoir sur la pharmacocinétique des drogues.

Le foie du rat consiste en quatre lobes, soit le médian, le droit latéral, le gauche et le caudal, par contre il ne possède pas de vésicule biliaire, la bile s'écoulant en continu. La bile de chaque lobe est libérée par des conduits. Ces conduits forment alors le canal cholédoque, qui pénètre dans le duodénum approximativement 25 mm en aval du sphincter du pylore.

Le rat, comme d'autres rongeurs, possède un rein unipapillaire, qui se compose d'une papille et d'un calice qui pénètre directement dans l'uretère. Des néphrons longs et courts sont présents. Unique en son genre, le rat est le seul animal dont les reins peuvent contenir des quantités importantes d'oxydase d'acide L-aminé.

Changements gériatriques et pathologies rencontrées chez le rat

a. Système digestif

Les changements gériatriques reliés au poids hépatique sont importants dans l'évaluation de la capacité du foie à métaboliser les xénobiotiques. Le dosage d'un médicament est principalement basé sur le poids de l'animal et, par conséquent, la connaissance du rapport en poids hépatique/poids corporel est plus pertinente dans l'évaluation de la quantité d'un médicament donné. Le vieillissement est généralement associé à une diminution du poids et du volume hépatique et une réduction du flot sanguin hépatique (Schmucker, 1990). De plus, le vieillissement chez le rat se caractérise par un dépôt de lipofuscine, d'hémosidérine et de lipides dans les hépatocytes, changements associés à une diminution de la fonction hépatique. Le mécanisme de ces changements semble provenir d'un dérèglement du processus de dégradation autophagique. Des corps d'inclusion intranucléaires trouvés dans les hépatocytes ne sont pas un phénomène infrequent. Au contraire, ces structures représentent une invagination cytoplasmique dans le noyau cellulaire et peuvent similairement se retrouver chez les rats normaux, en présence d'hépatocytes néoplasiques et lors de toxicité. On retrouve également chez les rats âgés un déficit structurel et fonctionnel des mitochondries hépatiques (Irisarri & Hollander, 1994). Il existe une corrélation entre la réduction de volume des mitochondries et l'activité réduite des enzymes hépatiques chez les rats mâles gériatriques (Schmucker, 1990).

Le foie représente le principal organe dans le métabolisme de premier passage des médicaments absorbés dans la circulation sanguine à partir des intestins. Un déclin dans le métabolisme impliquant l'activité enzymatique a été rapporté dans le foie gériatrique par rapport aux autres organes (Hard & Alden, 1994). Le métabolisme de phase I est catalysé par le cytochrome P450, le cytochrome b5 et la NADPH-cytochrome C réductase. Une diminution reliée avec l'âge est généralement observée dans la concentration des cytochromes P450 et dans l'activité de la NADPH-cytochrome c réductase, alors qu'il n'y a aucun changement dans le cytochrome b5, et ce, chez le rat mâle, mais pas chez la femelle (Van Bezooijen, 1984; Navarro & Boveris, 2004; Kato & Takanaka, 1968). Une diminution d'une sous-famille des CYP450, CYP2E1, chez les rats âgés de plus de 11 mois est

probablement due à des modifications post-translationnelles des protéines CYP2E1. En effet, la diminution des enzymes CYP450 et CYP2E1 peut être corrélées avec une accumulation de dommages oxydatifs. Comme aucun changement n'a été observé dans l'activité du CYP3A ou leur teneur en protéines et en ARNm, il semble que ces isoformes devraient être moins touchés par le stress oxydatif (Wauthier & Verbeck, 2004). Tous ces changements amènent des quantités croissantes de médicaments normalement métabolisés par le foie vers les tissus extra-hépatiques. Néanmoins, il faut toujours garder à l'esprit que les changements liés à l'âge dans le métabolisme des médicaments chez le rat dépendent fortement du sexe, ce qui n'est pas le cas chez l'homme. Par conséquent, la prudence devrait être exercée dans l'extrapolation de ces données à la situation humaine.

Une lésion significative qui est fréquemment observée chez les rats vieillissants est la prolifération des canaux biliaires. Au départ, il se produit une augmentation du nombre de canaux biliaires dans les espaces portes, qui deviennent dilatés, bordés par un épithélium atrophique et entourés par du tissu conjonctif collagénique, ce qui entraîne un aspect cirrhotique du foie (Percy & Barthold, 2007).

Tous ces changements amèneront inévitablement des répercussions sur le métabolisme et l'excrétion des drogues chez les vieux rats. En effet, lorsque le foie altéré n'a plus la capacité de métaboliser la kétamine, celle-ci sera redistribuée dans les autres organes et tissus, augmentant ainsi la durée d'anesthésie (Heydapour, 2008). Plus précisément, la kétamine et la xylazine sont métabolisées par les enzymes CYP450 et excrétées par les reins. Les changements séniles du foie affecteront une fois de plus l'excrétion de la molécule si celle-ci demeure inchangée dans l'organisme (Veilleux-Lemieux et al., 2013). Ces altérations métaboliques sont le résultat de changements progressifs durant l'âge adulte plutôt que des altérations brusques reliées à l'âge avancé (Rikans & Bruce, 1982).

b. Système urinaire

Une augmentation de l'excrétion urinaire quotidienne de protéines a été rapportée dans la plupart des études portant sur des rats nourris *ad libitum*, entraînant une protéinurie marquée chez les animaux séniles. L'albumine est une protéine plasmatique de haut poids

moléculaire qui s'échappe dans l'urine lorsque la perméabilité de la barrière de filtration glomérulaire a été altérée. Une albuminurie liée à l'âge est principalement le résultat de modifications dans la perméabilité sélective glomérulaire, même si un défaut de réabsorption proximale de la protéine ne peut être exclue. Un passage anormal d'albumine plasmatique dans l'espace urinaire pourrait être dû à des changements hémodynamiques tels que la réduction du débit capillaire ou à une augmentation de la pression transcapillaire (Haley & Bulger, 1983). De plus, une diminution d'électronégativité dans la membrane basale glomérulaire engendre pareillement une albuminurie chez les rats vieillissants. Le taux de filtration glomérulaire dépend essentiellement de la prise de nourriture. Suite à l'ingestion d'un repas riche en protéines, le débit sanguin et la filtration glomérulaire augmentent de 50% chez les rats adultes. Cependant, pour maintenir une filtration glomérulaire adéquate chez les rats séniles, il y aura une hypertrophie rénale (Corman & Michel, 1987). Toutefois, certains changements amèneront une croissance continue des glomérules et de la région médullaire tel qu'un affaiblissement du taux de filtration glomérulaire et de la circulation sanguine. (Corman & Owen, 1994; Bengel et al., 1981). Les modifications morphologiques liées à l'âge dans la structure rénale proviennent surtout de l'hypertrophie rénale, de l'atrophie tubulaire, de l'infiltration interstitielle et de l'épaississement de la membrane basale, et ce, sans perte de néphrons. Une protéinurie légère, des fuites de phosphate ou de calcium et des problèmes de concentration urinaire indiquent des modifications liées avec l'âge se retrouvant dans la membrane basale glomérulaire, le transport tubulaire et dans le contrôle hormonal respectivement (Corman & Owen, 1994).

La liaison des médicaments aux protéines est principalement déterminée par la concentration d'albumine sérique. Une capacité de liaison réduite en raison de la baisse du taux d'albumine plasmatique entraînerait une augmentation de la proportion de produits chimiques libres dans le sang, ce qui pourrait se traduire par une toxicité pour certains organes cibles. Bien que le foie soit le principal organe pour le métabolisme des médicaments, le rein est tout de même un site important du métabolisme extra-hépatique. Son système enzymatique métabolisant les médicaments, tels que les cytochromes P450

et les mono-oxygénases NADPH-dépendantes qui sont responsables de la biotransformation des médicaments oxydatifs, est connu pour se produire principalement dans les segments contournés des tubules proximaux. Certaines études ont montré que le vieillissement diminue significativement les microsomes rénaux CYP450 et l'activité réductase NADPH (Hard & Alden, 1994).

Les vieux rats souffrent souvent d'une glomérulonéphrite progressive et d'une néphropathie (Percy & Barthold, 2007). La néphropathie progressive chronique a une incidence de 75% chez les lignées de rats Sprague-Dawley et Fisher 344. L'âge, le sexe, la diète, l'immunité et les hormones du rat sont tous des facteurs prédisposant qui jouent un rôle primordial dans le développement de cette condition. Les cortex rénaux sont habituellement bosselés et parfois irréguliers, avec présence de pâleur chez certains animaux affectés. Les modifications glomérulaires varient d'un épaissement minimal à marqué des membranes basales avec de la sclérose segmentaire et des adhésions à la capsule de Bowman. Les tubules rénaux sont fréquemment dilatés et bordés par les cellules épithéliales aplaties. Outre la protéinurie associée à la maladie, une perte de poids est également une condition secondaire chez les rats gravement touchés et une fois ce stade atteint, on retrouve un haut taux de mortalité. De plus, la maladie à un stade avancé a été associée à de l'hypertension causé secondairement par de l'insuffisance rénale (Anver & Cohen, 1979; Percy & Barthold, 2007; Bolton & Sturgill, 1980).

c. Système nerveux central

Les neurones ne subissent aucune division cellulaire (sauf au niveau de l'hippocampe et de la région subventriculaire). Ils sont sensibles à l'accumulation et au dépôt de matériaux étrangers tel que les métaux lourds et la lipofuscine. L'accumulation de la lipofuscine se retrouve dans les neurones et les astrocytes (King, 1994; Krinke & Eisenbrandt, 1994). La production de lipofuscine est considérée comme une conséquence des effets de peroxydation par des radicaux libres biologiques des lipides membranaires. (Krinke & Eisenbrandt, 1994; Berlin & Wallace, 2007)

Plusieurs changements dégénératifs sont observés dans le cerveau vieillissant. On observe une dystrophie axonale ainsi qu'une démyélinisation segmentaire des axones myélinisés (Fujisawa, 1994). Le vieillissement du cerveau montre généralement une réduction du volume du cervelet et du striatum ainsi qu'une diminution du nombre de synapses entre les cellules granulaires et de Purkinje (Zhang et al., 2013). Les paramètres vasculaires tels que la densité des vaisseaux régressent avec l'âge. Ensuite, des dommages oxydatifs ont été observés dans le parenchyme nerveux ainsi que dans les mitochondries (Gilmer et al., 2010).

Même si la barrière hémato-encéphalique conserve ses fonctions, celle-ci serait plus perméable à certaines molécules, comme les amphétamines. Cet exemple suggère la possibilité de pénétration accrue de certains agents dans le cerveau âgé du rat. Conséquemment, le cerveau est plus vulnérable à la toxicité ou les effets prolongés de ces molécules et celui-ci ne peut fonctionner correctement une fois les dommages amorcés (Krinke & Eisenbrandt, 1994).

En termes communs, la caractérisation anatomique du cerveau âgé comprend une atrophie associée à l'élargissement secondaire des ventricules et à la perte de neurones et de la myéline. La perte de neurones est effectivement liée à une baisse de contacts synaptiques, à une dégénérescence secondaire des fibres nerveuses et à un déclin de la fonction neuronale. Par la suite, lorsque le système nerveux est endommagé, une perte de capacité à répondre de façon adéquate s'ensuit et une nouvelle détérioration se produit (Percy & Barthold, 2007). Les lipides ne sont pas uniquement des composants structurels de membranes cellulaires, ils jouent également un rôle important dans l'activité fonctionnelle. Le métabolisme affaibli des lipides dans un organisme âgé peut entraîner un certain nombre de processus pathologiques chez l'homme et les animaux. En effet, une haute teneur dans les tissus cérébraux de substrats facilement oxydés tels que les acides gras polyinsaturés contribue à l'augmentation des niveaux de peroxydes lipidiques dans la portion mitochondriale des tissus cérébraux. Dans ces conditions, la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale devient une source importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont un sous-produit instable et très réactif. Ces ROS sont capables

d'endommager de nombreuses macromolécules biologiques telles que l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides (Tian et al., 1998). Les ROS provoquent la modification des protéines par oxydation associée à une augmentation de dommages membranaires et ainsi, altèrent le fonctionnement normal des cellules nerveuses (Ovsepyan et al., 2013).

La perméabilité de la barrière hémato-encéphalique est souvent augmentée en cas d'insuffisance rénale. Cette déficience de la barrière de protection du SNC contribue probablement à la sensibilité aux médicaments observés chez les patients urémiques, qui peuvent également souffrir de lésions cérébrales diffuses. En outre, la fonction rénale modifie les concentrations et les échanges d'électrolytes, d'enzymes, de glucose et de lactate au niveau du cerveau (Fabre & Balant, 1976).

a. Système cardiovasculaire

La sénescence est associée à des changements notables dans la structure cardiaque, soit une augmentation de la masse cardiaque, principalement en raison d'une perte de cardiomyocytes et par une hypertrophie des cellules restantes. Une telle perte de cellules est accompagnée d'une fibrose endocardique accrue, ce qui pourrait expliquer à la fois la perte d'élasticité du ventricule gauche et la forte incidence des arythmies. La structure vasculaire est également modifiée par une diminution du flot sanguin coronaire et une augmentation de la charge vasculaire cardiaque. De plus, un déclin dans le nombre de myocardiocytes et une réduction d'élasticité des cellules musculaires lisses cardiaques et vasculaires peuvent nuire à la performance cardiaque et à la réactivité vasculaire (Heymes et al., 1994; Delp et al., 1998).

La lésion cardiaque la plus couramment rencontrée chez les rats de laboratoire consiste en un mélange de dégénérescence de fibres musculaires et/ou une nécrose accompagnée d'une infiltration de cellules mononucléaires et d'une fibrose de remplacement. Cette lésion a été désignée sous le nom de cardiomyopathie progressive chronique. L'apparition de thrombi présente une incidence distincte liée à l'âge. Un thrombus peut être trouvé dans l'une des cavités cardiaques, mais l'oreillette gauche est de loin le site le plus fréquent. En addition, les lésions vasculaires cardiaques sont

relativement communes chez les rats Sprague-Dawley et sont caractérisées par une hyalinisation progressive ou une sclérose de la paroi des artères coronaires. Dans les cas plus prononcés, la lumière des vaisseaux est réduite.

La dégénérescence cardiaque est souvent présente chez les rats âgés de plus d'un an. De l'hypertrophie ventriculaire modérée à marquée ainsi que des stries pâles peuvent être visibles sur l'épicaarde. Des changements typiques tels qu'une atrophie des myofibrilles, une vacuolisation ou une fragmentation du sarcoplasme, une perte de stries transversales et une infiltration de cellules mononucléaires sont visibles lors d'un examen microscopique (Percy & Barthold, 2007).

Paramètres biochimiques et hématologiques

Le vieillissement entraîne plusieurs changements biochimiques et hématologiques qui peuvent affecter l'anesthésie des animaux. Les globulines, qui ont comme fonction d'inhiber certaines protéases sanguines, ont tendance à augmenter avec l'âge. En corrélation avec les maladies rénales chroniques progressives, c'est la globuline α -1 sanguine qui est affectée (Loeb & Carakostas, 1994). Le cholestérol s'accumule autant dans le sang chez les rats gériatriques à l'exception des phospholipides hépatiques. Cependant, l'excrétion d'acides biliaires reste constante. Les problèmes hépatiques et l'obésité seraient des causes primaires de ce phénomène (Uchida et al., 1978). Alternativement, la concentration plasmatique du peptide natriurétique atrial augmente avec l'âge et est reconnue pour augmenter la perméabilité endothéliale de l'eau et de l'albumine (Belmin et al., 1993). Le niveau de cortisol sérique est significativement en ascension chez les rats séniles (Heymes et al., 1994). Une réduction de l'activité du système rénine-angiotensine (SRA) dans le vieillissement se remarque, principalement due à une diminution de la sécrétion de rénine par les reins. La densité des récepteurs angiotensine-1 est également diminuée dans le cerveau des rats séniles et le blocage de ces récepteurs inhibe la consommation d'eau chez les jeunes rats adultes (Begg et al., 2012). L'angiotensine II possède plusieurs propriétés pro-inflammatoires et peut agir localement comme une chimiokine et une molécule inflammatoire (Boos & Lip, 2006).

Une tendance à la baisse pour les globules rouges ainsi que pour les lymphocytes, appartenant aux globules blancs, se remarque lors de l'analyse hématologique. En effet, la modification de la concentration d'érythrocytes peut perturber le volume de distribution de certains médicaments. D'autre part, les monocytes et les neutrophiles sont à la hausse lors du vieillissement (Stromberg, 1994).

En présence d'une hypoalbuminémie chez les rats âgés, la partie libre du médicament (non liée aux protéines), qui est active et éventuellement toxique, est plus grande que dans des conditions normales (Fabre & Galant, 1976). La baisse d'albumine sérique suggère un désordre de production au niveau du foie ou d'une insuffisance rénale laissant traverser l'albumine dans l'urine, amenant ainsi une protéinurie. En revanche, la globuline sérique augmente nettement avec l'âge. Cela peut être représenté par une plus grande synthèse des globulines ou un ralentissement de la dégradation en réponse à la perte de protéines dans l'urine. (Berg, 1965; Barthold, 1979).

Remarquablement, les niveaux sanguins de créatinine et d'urée sont généralement inchangés, et ce, même en présence de néphropathie progressive chronique. Pour avoir une augmentation sérique de ces paramètres, une perte de 75% des néphrons est nécessaire pour causer une azotémie. Les rats sévèrement atteints de cette maladie semblent maintenir un degré remarquable de compensation jusqu'à ce qu'ils deviennent moribond, lors duquel l'urée et la créatinine sont souvent anormales (Barthold, 1979).

L'aspartate aminotransférase (AST) et l'alanine transaminase (ALT), des enzymes hépatiques, sont à la hausse chez les animaux gériatriques. En effet, ces élévations enzymatiques peuvent potentiellement être attribuées à leur libération hors du cytoplasme des cellules hépatiques et être ainsi acheminer vers la circulation sanguine. L'AST et l'ALT sont des biomarqueurs dans le diagnostic de lésions hépatiques, car ils sont libérés dans la circulation sanguine après des dommages cellulaires (El-Rahim et al., 2012).

Test (Unit)	N	Mean	Range
Total Protein, g/dl	723	6.16	5.90 - 6.60
A/G Ratio	693	1.42	1.10 - 2.70
Albumin, g/dl	724	3.59	3.30 - 4.60
Alkaline Phosphatase, IU/l	719	160.00	136.00 - 188.00
Total Bilirubin, mg/dl	723	0.55	0.10 - 1.00
Urea Nitrogen, mg/dl	724	14.30	13.00 - 16.00
Creatinine, mg/dl	724	0.54	0.50 - 0.60
Glucose, mg/dl	724	146.30	112.00 - 176.00
Alanine Aminotransferase, IU/l	725	34.40	28.00 - 40.00
Aspartate Aminotransferase, IU/l	725	100.60	87.00 - 114.00
Creatine Kinase, IU/l	724	362.00	344.00 - 380.00
Lactate Dehydrogenase, IU/l	724	389.00	360.00 - 418.00
Gamma glutamyl Transpeptidase, IU/l	579	0.50	0.00 - 1.00
Calcium, mg/dl	718	10.04	9.40 - 11.00
Chloride, meq/l	720	104.00	102.00 - 105.00
Phosphorus, mg/dl	672	8.11	7.30 - 10.00
Potassium, meq/l	725	5.15	4.70 - 6.20
Sodium, meq/l	725	144.00	141.00 - 150.00
Total Cholesterol, mg/dl	709	61.70	54.00 - 74.00
Triglycerides, mg/dl	653	73.00	61.00 - 99.00

Tableau II. Paramètres biochimiques normaux pour les rats Sprague-Dawley mâles âgés de 8 à 12 semaines (Charles River [Internet], 2006)

PHARMACOCINÉTIQUE DES DROGUES LORS DU VIEILLISSEMENT

Le vieillissement est associé à une augmentation de l'activité inflammatoire dans le sang, notamment l'augmentation des taux circulants de TNF- α , IL-6, d'antagonistes des cytokines et des protéines de la phase aiguë. L'augmentation de l'activité inflammatoire chez les personnes âgées peut s'expliquer par des processus pathologiques incluant l'obésité (Bruunsgaard et al., 2000). Par exemple, chez les patients ayant des atteintes hépatiques, des altérations de la clairance des médicaments métabolisés par le CYP3A ont été établies. La réponse des médiateurs de l'inflammation en phase aiguë a été rapportée pour supprimer l'activité CYP chez l'homme. Cette inhibition peut conduire à des concentrations anormalement élevées dans le plasma et de toxicité de médicaments qui

sont normalement métabolisés par ces enzymes du CYP, maintenant rendues non-fonctionnelles. Le TNF- α et l'interleukine-1, deux importantes cytokines inflammatoires jouent probablement un rôle. Ces facteurs ont été rapportés à inhiber les enzymes CYP chez les rats et les souris (Badyal & Dadhich, 2001).

L'anesthésie réduit considérablement le flot sanguin rénal chez les rats sénescents, mais n'a aucun effet chez les rats juvéniles. Celle-ci produit une plus grande diminution du débit cardiaque et de la circulation sanguine, et ce, au niveau de plusieurs organes chez le rat sénescence (Tuma Irion et al., 1985). Une baisse considérable dans la clairance rénale des médicaments ou de leurs métabolites est bien documentée. Cela résulte probablement d'une combinaison de facteurs, notamment une réduction du débit sanguin rénal qui provoque une baisse du taux de filtration glomérulaire et une perte progressive de néphrons fonctionnels. (Schmucker & Wang, 1980). De plus, l'augmentation de la graisse corporelle, généralement au détriment de la masse musculaire, peut prolonger les temps de rétention des médicaments liposolubles. En outre, la diminution signalée de la teneur en eau corporelle peut contribuer à une réduction du volume de distribution de certains médicaments (Schmucker & Wang, 1980).

L'inflammation peut également affecter la barrière hémato-encéphalique et ainsi altérer la fonction du SNC. La glycoprotéine P (P-gp) est une pompe à efflux qui contrôle la capacité de nombreux médicaments et substances endogènes à accéder au cerveau. Des travaux *in vitro* suggèrent que les états inflammatoires à médiation par le lipopolysaccharide (LPS) et le TNF- α altèrent l'activité de la P-gp (Veilleux-Lemieux et al., 2012). L'inhibition de la P-gp signifierait que, pendant les processus inflammatoires, la capacité d'un hôte à expulser certains médicaments du cerveau pourrait être diminuée de manière significative. Des altérations de la barrière hémato-encéphalique peuvent également être responsable d'un prolongement de l'anesthésie (Salkeni et al., 2009).

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Le vieillissement apporte inévitablement des changements au niveau des organes filtres de l'organisme amenant ainsi une altération du métabolisme et de l'excrétion de certaines drogues et médicaments fréquemment utilisés chez les patients gériatriques. La sénescence peut modifier les résultats expérimentaux en diminuant la fonction hépatique et la filtration rénale, en modulant la pression sanguine ou en modifiant la fonction du SNC. Considérant que des études précédentes ont identifié une anesthésie de plus longue durée chez les vieux rats ainsi qu'une récupération plus lente de celle-ci, il est essentiel de déterminer comment les changements métaboliques modifient ces paramètres lors de l'administration de drogues anesthésiques fréquemment utilisées en médecine des animaux de laboratoire chez les animaux vieillissants.

Avec une population humaine vieillissante, de plus en plus de projets de recherche seront faits sur des animaux âgés. Afin d'améliorer les procédures anesthésiques qui nécessiteront des chirurgies ou des manipulations dans le cadre d'un projet de recherche, le choix du protocole anesthésique est primordial. La combinaison de kétamine et de xylazine, étant considérée comme le protocole anesthésique injectable de choix chez les rongeurs, il s'avère nécessaire d'étudier la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de cette combinaison anesthésique chez les animaux vieillissants.

Nos hypothèses sont en faveur d'une augmentation progressive des concentrations plasmatiques de kétamine et de xylazine chez les animaux vieillissants qui se traduira par une anesthésie de plus longue durée. De plus, l'âge des animaux aura des répercussions sur les paramètres physiologiques lorsqu'ils seront anesthésiés. Le métabolisme des organes sélectionnés (les reins, le foie et le cerveau) auront des changements métaboliques qui devrait expliquer les paramètres durant l'anesthésie, donc il devrait y avoir une réduction du métabolisme. Cette dernière hypothèse sera considérée dans le cadre d'un autre projet de maîtrise.

Les objectifs principaux du protocole expérimental sont :

- Évaluer les changements pharmacocinétiques et physiologiques associés à une administration de kétamine et de xylazine chez les rats Sprague-Dawley à différents âges, soit à 3, 6, 12 et 18 mois.
- Mesurer les valeurs biochimiques et évaluer l'histologie de quelques organes cibles chez les rats Sprague-Dawley de différents âges afin de comparer ou déceler une pathologie affectant le métabolisme de la kétamine et de la xylazine.
- En somme, faire des études *in vivo* et *in vitro* en relation avec l'anesthésie et le métabolisme de la kétamine et la xylazine afin d'offrir plus d'information pour une anesthésie adéquate des rats, permettant une meilleure utilisation des rats âgés en recherche.

ARTICLE

Physiological, pharmacokinetic and liver metabolism comparisons between 3-, 6-, 12- and 18-month-old male Sprague Dawley rats under ketamine-xylazine anesthesia

Marie-Chantal GIROUX¹), Raphael SANTAMARIA¹), Pierre HÉLIE²), Patrick BURNS³), Francis BEAUDRY¹), and Pascal VACHON^{1,4}*)

Departments of ¹) Department of Biomedicine, ²) Department of Pathology and Microbiology, and ³) Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada, ⁴) Ste-Justine Hospital Research Center, Montréal, Canada

Address for correspondance: P. Vachon, Department of Veterinary Medicine Biomedicine, Faculty of Veterinary, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe Qc, Canada J2S 2M2

Accepted and published in:

Giroux, M.C., Santamaria, R., Hélie, P., Burns, P., Beaudry, F. and Vachon, P. (2015). Physiological, pharmacokinetic and liver metabolism comparisons between 3-, 6-, 12- and 18-month-old male Sprague Dawley rats under ketamine-xylazine anesthesia. *Experimental Animals*. <http://doi.org/10.1538/expanim.15-0039>.

Abstract

The main objective of this study was to compare the physiological changes (withdrawal and corneal reflexes, respiratory and cardiac frequency, blood oxygen saturation, and rectal temperature) following intraperitoneal administration of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) to 3-, 6-, 12- and 18-month-old male Sprague Dawley rats (n=6/age group). Plasma pharmacokinetics, liver metabolism, and blood biochemistry were examined for a limited number of animals to better explain anesthetic drug effects. Selected organs were collected for histopathology. The results for the withdrawal and corneal reflexes suggest a shorter duration and decreased depth of anesthesia with aging. Significant cardiac and respiratory depression, as well as decreased blood oxygen saturation, occurred in all age groups however, cardiac frequency was the most affected parameter with aging, since the 6-, 12-, and 18-month-old animals did not recuperate to normal values during recovery from anesthesia. Pharmacokinetic parameters ($T_{1/2}$ and AUC) increased and drug clearance decreased with aging, which strongly suggests that drug exposure is associated with the physiological results. The findings for liver S9 fractions of 18-month-old rats compared with the other age groups suggest that following a normal ketamine anesthetic dose (80 mg/kg), drug metabolism is impaired, leading to a significant increase of drug exposure. In conclusion, age and related factors have a substantial effect on ketamine and xylazine availability, which is reflected by significant changes in pharmacokinetics and liver metabolism of these drugs, and this translates into shorter and less effective anesthesia with increasing age.

Key words: anesthesia, ketamine, liver metabolism, pharmacokinetics, xylazine

Introduction

The combination of ketamine and xylazine (KX) is commonly used for anesthesia in rodents (Flecknell, 1996; Richardson & Flecknell, 2005). Ketamine is an antagonist of the NMDA glutamate receptor (Dittmar and al, 2004; Plumb, 2008) and it can also bind to opioids and GABAergic receptors (Knobloch and al, 2006). Ketamine is known for its analgesic properties and its induction of a dissociative anesthesia (Fitzgibbon and al, 2002; Flecknell, 1996). Xylazine is an α 2-adrenergic agonist that causes sedation, analgesia, and muscular relaxation (Dittmar and al, 2004; Flecknell, 1996; Greene & Thurmon, 1988; Plumb, 2008). KX combinations have proven to be nonirritating and suitable for intraperitoneal injections in laboratory rats (Hajighahramani & Vesa, 2007; Struck and al, 2011). The sedative and muscle relaxant properties of xylazine are beneficial because they reduce the side effects of ketamine, such as tremors and muscular rigidity (Saha and al, 2005). KX combinations induce bradycardia, hypercapnia, and acidosis (Rodrigues and al, 2006; Swindle and al, 2002). Other adverse effects, such as respiratory depression, may be additive (Schwenke & Cragg, 2004). In rodents, the KX combination causes mainly hypotension and hypoventilation (Dittmar and al, 2004). KX anesthesia varies greatly between individuals, and some rodents do not achieve an adequate surgical anesthesia, which is reflected by the high ranges of anesthetic doses of these drugs that are reported in the literature (Dittmar and al, 2004; Saha and al, 2005).

In a previous publication (Veilleux-Lemieux and al, 2013), we showed that the pharmacokinetics of ketamine (125 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) differed greatly between young (3 months) and old (>2 yrs of age) Sprague Dawley rats. The half-lives of both ketamine and xylazine in old rats were significantly increased, which could be explained in part by a decrease in function of liver enzymes with aging. However, no pharmacodynamic parameters were evaluated during anesthesia in that study, and only a limited number of organs were collected for histopathology, which limits the rationalization of these findings. No study has evaluated the pharmacodynamic and pharmacokinetic changes associated with this increased anesthesia effect with aging.

The main objective of this study was therefore to compare the pharmacodynamic (withdrawal and corneal reflexes) changes associated with the administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg of xylazine in rats from 3 to 18 months of age, as well as other associated anesthetic changes (cardiac and respiratory frequencies, blood oxygen saturation, and rectal temperature), to better understand if the anesthesia changes with aging are progressive or changed significantly after a given age. A reduced dose of ketamine was chosen due to the severe toxicity seen in 12-month-old rats in our previous study (Giroux and al, 2015). Pharmacokinetics and blood biochemistry were performed in a reduced number of animals to explain changes associated with physiological measures that occur during anesthesia. Ketamine is metabolized primarily by liver CYP3A (Mooradian, 1988; Saha and al, 2005) to its active metabolite norketamine (Mössner and al, 2011). Alterations in liver metabolism (e.g., hepatic clearance) with aging could explain the higher area under the curve (AUC) observed in the aging rats. The aim of this *in vitro* study was to assess the influence of aging on CYP3A metabolism of ketamine using liver S9 fractions from 3-, 6-, 12-, and 18-month-old rats.

Materials and methods

Subjects

Twenty-four male specific pathogen-free Sprague Dawley (CrI:CD(SD)) rats from Charles River (St-Constant, QC, Canada) were used for this study. Two- and 3-month-old rats (n=6/age group) were purchased and kept until they were, respectively, 3 and 6 months old. Twelve 8-month-old retired breeder rats were purchased and kept until they were at 12 and 18 months of age (n=6/age group). At the time of experimentation, the 3-, 6-, 12-, and 18-month-old rats weighed, respectively, 484.0 ± 18.0 g, 732.1 ± 50.4 g, 790.0 ± 65.1 g, and 998.0 ± 74.7 g. All rats were housed in a standard laboratory animal environment under a 12:12-hour light cycle in a controlled environment with a temperature of $21 \pm 2^\circ\text{C}$, humidity of $50 \pm 20\%$, and fresh filtered air with 15 changes/hour. The rats had *ad libitum* access to food (2018 Teklad Global 18% Protein

Rodent Diet, Harlan Teklad, Bartonville, IL, USA) and reverse osmosis water. The rats were housed individually in ventilated cages (Green Line IVC Sealsafe Plus, Tecniplast Chester, PA, USA) changed once a week. They were housed on corncob bedding (7097 Corncob, Harlan Teklad, Bartonville, IL, USA) and had a high temperature polycarbonate rat retreat (Bio-Serv, Flemington, NJ, USA) and one Nylabone (Bio-Serv, Flemington, NJ, USA) for environmental enrichment. The Institutional Animal Care and Use Committee of the Ste-Justine Hospital Research Center approved the protocol prior to animal use in agreement with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (Canadian Council on Animal Care, 1993).

Treatments

The study was performed in two phases. Rats were first examined for physiological changes and reflexes following KX administration. The KX pharmacokinetics were then evaluated in 3 animals of each age group after a one week washout period. It was considered that this interval was sufficient, since repeated administration of ketamine will only affect drug efficacy when rats receive moderate doses (40 mg/kg) of ketamine for 10 consecutive days (Uhing and al, 2004). The other 3 animals of each group were used to evaluate *in vitro* liver metabolism. For both study phases, animals received 80 mg/kg of ketamine (Ketalean, Bimeda-MT, Cambridge, ON, Canada) and 10 mg/kg of xylazine (Xylamax, Bimeda-MTC, Cambridge, ON, Canada) intraperitoneally and non-medicated ophthalmic gel to maintain a good lubrication of the cornea following KX induction. Animals remained on a circulating hot water blanket (Heat Therapy Pump, Kent Scientific, Harrington, CT, USA) during anesthesia up to recovery.

Evaluation of reflexes and physiological changes

Following the intraperitoneal KX injection, different parameters were monitored at chosen time points (5, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min). The corneal reflex was evaluated by softly pressing on the cornea with a cotton tip, and the withdrawal reflex was assessed by pressing the interdigital hind paw skin with hemostatic forceps. A small animal

oximeter (CANL-425V, Med Associates, St-Alban, VT, USA) was used to monitor cardiac frequency and blood oxygen saturation (SaO₂) by taping the probe onto the right hind paw. Respiratory frequency was taken over 1 min by direct observation, and rectal temperature (Thermalert TH-8, Physitemp, Clifton, NJ, USA) was taken with a rectal probe. The recovery time was the time at which the first voluntary movement occurred following KX injection.

Blood sampling for biochemistry and pharmacokinetics

During anesthesia, jugular vein blood collections (0.2 ml/time point) were rapidly collected for the pharmacokinetics study. When necessary (when the withdrawal reflex was present; after 45, 60, and 90 min for the 3-, 6-, and 12-18-month-old rats, respectively), individual blood collections were performed under isoflurane anesthesia (0.5 ml/min oxygen) using a face mask (total collection time: less than 1 min). Blood was collected in 1 ml microtainer K3-EDTA tubes (Becton, Dickenson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), preserved on ice, and centrifuged within 30 min. Plasma was then collected and kept at -80°C until HPLC-MS/MS analysis. At the last blood collection of pharmacokinetics study, rats were euthanized with CO₂. Using the same 3 animals as for the pharmacokinetics study, intracardiac blood samples (1ml) were then collected at the end of the study in serum tubes (Becton, Dickenson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) for biochemistry and refrigerated until processed (within 24 h) at the diagnostic service of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal by automatic evaluation with a Synchron CX5 Clinical System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Since all rats were under the influence of KX anesthesia, the values obtained in each groups should vary with age. The selected biochemical parameters included glucose, blood urea nitrogen, creatinine, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, total protein, albumin, and globulins. Experimental values were compared with normal ranges taken from published findings (Charles River, 2006; Sharp & La Regina, 1998).

Histological preparations

Immediately following euthanasia, the kidneys, liver, heart, and lungs of each animal were collected and preserved in a neutral buffered formalin solution (10%) prior to histological preparations (paraffin embedding; hematoxylin-eosin staining). Specimens were sent to the pathology department of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal for processing. All slides were evaluated by a board certified veterinary pathologist (Dr Pierre Hélie DMV, DACVP).

Bioanalytical methods, pharmacokinetics and statistical analyses

A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer (HPLC-MS/MS) that has previously been described (Lavoie and al, 2013) was used for the analysis of ketamine and xylazine plasmatic concentrations. All pharmacokinetic parameters were calculated using WinNonLin 5.2 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) and noncompartmental methods (Rowland & Towzer, 1995). The elimination rate constant (K_{el}) was calculated using a minimum of three measured plasma concentrations, and a terminal elimination half-life ($T_{1/2}$) was calculated using $0.693/k_{el}$. The area under the curve from time 0 to the last measurable concentration (AUC_{0-t}) was calculated using the linear trapezoidal rule, and with the last measured plasma concentration, the area under the curve extrapolated to infinity ($AUC_{0-\infty}$) was calculated using the equation $AUC_{0-t} + C_{last}/k_{el}$. Relative clearance (CL/F) was calculated by dividing the administered drug dosage by the $AUC_{0-\infty}$.

Drug metabolism in liver S9 fractions

Liver S9 fractions from 3-, 6-, 12-, and 18-month-old male Sprague Dawley rats were prepared, and Michaelis-Menten parameters were determined for primary metabolic pathways. Midazolam was used to verify and validate CYP3A activity in liver S9 fractions prepared from tissues obtained from animals of different age groups (Halama and al, 2013; Mooiman and al, 2013; Shimizu and al, 2007).

Ketamine, d₄-ketamine, norketamine, d₄-norketamine, midazolam, d₄-midazolam, α-hydroxymidazolam, and d₄-α-hydroxymidazolam were obtained in solution from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Other chemicals, including acetonitrile, formic acid, methanol, sodium phosphate dibasic, and sodium phosphate monobasic were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Commercial rat liver S9 fractions and NADPH regeneration solutions were obtained from Corning Gentest (Tewksbury, MA, USA).

For each age group, three livers were pooled and homogenized in a 50 mM TRIS-HCl buffer, pH 7.4, containing 150 mM KCl and 2 mM EDTA at a ratio of 1:4 (w:v). The homogenates were centrifuged at 9,000 *g* for 20 minutes. The total amount of protein in each supernatant was determined using the standard Coomassie protein assay (Bradford). Supernatant aliquots were kept at -80 °C until usage. No significant differences in total amount of proteins were noted between age groups. The incubations were performed as previously described (Lavoie and al, 2013; Santamaria and al, 2014) and were performed minimally in triplicate. They were performed at various concentrations ranging from 1 to 100 μM of ketamine or midazolam in 0.5 mg/ml of S9 fraction proteins diluted in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4). Liver S9 enzyme suspensions (total volume of 100 μL) were fortified with 5 μl of NADPH-regenerating solution A (Cat. No. 451200, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) and 1 μl of solution B (Cat. No. 451200, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) and preincubated at 37°C for 5 min prior to the addition of ketamine or midazolam. For the determination of K_m and V_{max}, the concentration of norketamine or α-hydroxymidazolam was determined after 10 min incubation to calculate the initial rate of formation (i.e., V_i). Fifty microliters of samples were taken and mixed with 250 μl of the deuterated internal standard solution (1 μM d₄-norketamine or d₄-α-hydroxymidazolam in acetonitrile) in a 1.5 ml centrifuge tube. Samples were centrifuged at 12,000 *g* for 10 min, and 200 μl of the supernatant was transferred into an injection vial for HPLC-MS/SRM analysis.

The concentrations of norketamine and α-hydroxymidazolam were determined using an HPLC-MS/SRM assay derived from our previous publication (Santamaria and al, 2014). Metabolites and corresponding deuterium-labeled molecule analogues were analyzed in full-scan MS/MS using a Thermo Scientific linear ion trap mass spectrometer

(Thermo LTQ-XL) and the quantification was based on specific post-processing selected reaction monitoring (SRM) extracted ion chromatograms. The SRM transitions were set to m/z 242.1 \rightarrow 179.0, 246.1 \rightarrow 183.0, 342.1 \rightarrow 297.0, and 346.1 \rightarrow 301.0 for norketamine, d₄-norketamine, α -hydroxymidazolam, and d₄- α -hydroxymidazolam, respectively. The analytical range used was from 0.05 μ M to 50 μ M.

Michaelis-Menten equation (Mézière and al, 2013) analyses were performed with GraphPad PRISM (6.0f) software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) using the non-linear curve-fitting module with an estimation of the goodness of fit.

The initial velocity (v_i) was determined using Equation 1.

$$v_i = \frac{d[P]}{dt} = \frac{[\alpha\text{-hydroxymidazolam}]_{10\text{ min}}}{10\text{ min}} \text{ or } \frac{[\text{norketamine}]_{10\text{ min}}}{10\text{ min}} \quad (1)$$

The initial rate (v_i) was calculated based on the concentration of norketamine or α -hydroxymidazolam measured after a 10-minute incubation of rat liver S9 enzyme suspensions in ketamine or midazolam. Additionally, the enzyme-mediated clearance (CLu_{int}) that would occur without physiological limitations including protein binding or hepatic blood flow was determined using Equation (2).

$$CLu_{int} = \frac{V_{max}}{K_m} \quad (2)$$

Statistics

For the physiological results (heart rate, respiratory frequency, oxygen saturation, and rectal temperature), statistical analyses were performed for each age group using an analysis of variance (ANOVA) linear model with repeated measures and a post hoc Dunnett's test. All analyses were performed with SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) to evaluate the effect of time for rectal temperature, heart rate, respiratory frequency, and oxygen saturation results. An ANOVA linear model with repeated measures was used to compare the age effect. A priori contrasts were done with an adjustment of alpha by Bonferroni sequential correction to compare means of each group. All results were expressed as the mean \pm SEM (excepted for pharmacokinetic and biochemistry results, which were expressed with the standard deviation (SD)), and differences were considered significant at $p < 0.05$.

For the *in vitro* liver S9 fraction study, the statistical differences were assessed with a one-way ANOVA and a Tukey's multiple comparisons test using GraphPad PRISM (version 6.0f); $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Reflexes and physiological changes

The withdrawal reflex (WR) (Fig. 1) showed a clear difference in anesthesia duration between the different age groups following the administration of KX. The WR was absent in all 3- and 6-month-old animals at 15 and 30 min, whereas it was absent at 30 min only in all the 12-month-old animals. In 18-month-old animals, only 83% lost the reflex at 15 to 45 min. The WR was present again at 45, 60, 120, and 90 min in all the 3-, 6-, 12-, and 18-month-old rats, respectively. The first voluntary movements were noted at 66.7 ± 7.3 , 88.8 ± 29.7 , 122.2 ± 16.5 , and 104.3 ± 17.5 min in the 3-, 6-, 12-, and 18-month-old rats, respectively. The corneal reflex results following KX anesthesia are shown in Fig. 2. The reflex was absent in all groups at 15 and 30 min, except for two 3-month-old rats. The 3-month-old rats lost their corneal reflex very rapidly, since it was already absent following KX administration. The corneal reflex was present again in 40-60% of rats in all groups at tentatively selected time points, with the evaluations ending when all animals had a positive corneal reflex.

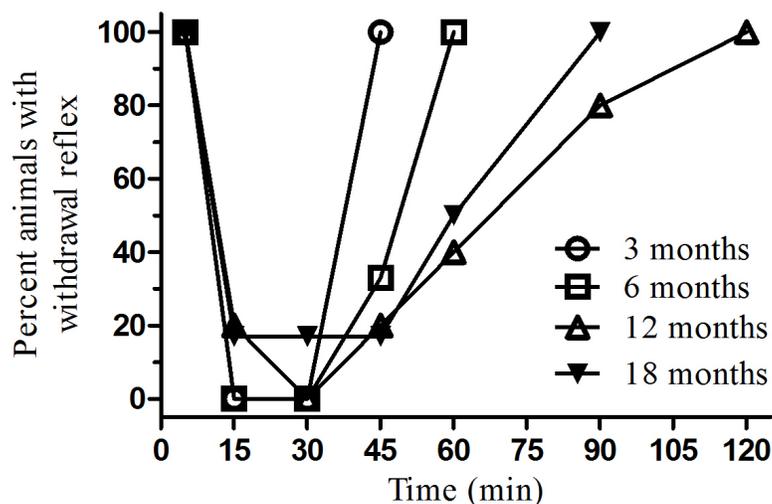


Fig. 1. Percent of Sprague Dawley rats (n = 6/group; 3, 6, 12, and 18 months old) showing a positive withdrawal reflex when evaluated at selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min), following the intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine.

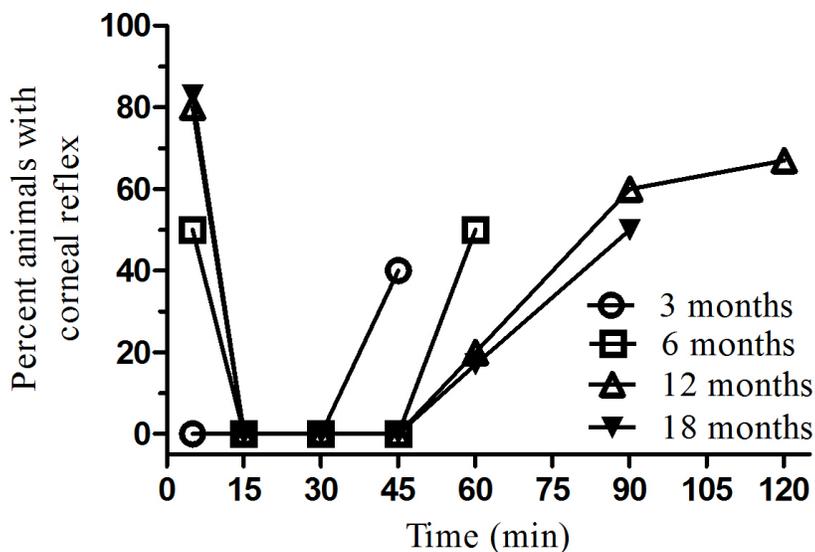


Fig. 2. Percent of Sprague Dawley rats (n = 6/age group; 3, 6, 12, and 18 months old) showing a positive corneal reflex evaluated at tentatively selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min), with evaluation ending when all animals had a positive

corneal reflex following the intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine.

Cardiac frequency (Fig. 3) varied significantly with time in the 3- ($F_{4,20}=2.71$, $P =0.05$), 6- ($F_{4,25}=3.12$, $P <0.05$), 12- ($F_{6,30}=7.13$, $P <0.01$), and 18-month-old rats ($F_{5,25}=4.61$, $P <0.01$). Significant age group differences are shown in Fig. 3. Respiratory frequency (Fig. 4) varied significantly with time in the 3- ($F_{4,20}=6.99$, $P =0.002$), 6- ($F_{4,20}=7.21$, $P <0.001$), 12- ($F_{6,30}=4.78$, $P <0.002$), and 18-month-old rats ($F_{5,25}=6.45$, $P <0.01$). No significant age group differences occurred (Fig. 4). Blood oxygen saturation (Fig. 5) did not vary significantly for 6-month-old rats but varied significantly in the 3- ($F_{4,20}=3.71$, $P =0.03$), 12- ($F_{6,30}=10.12$, $P <0.001$), and 18-month-old rats ($F_{5,25}=7.07$, $P <0.0005$). Since these comparisons were done with the results for the 5-min time point result, this suggests that blood oxygen saturation returned to near normal values ($> 90\%$) at the end of anesthesia, except in the 6-month-old rats. Significant age group differences are shown in Fig. 5.

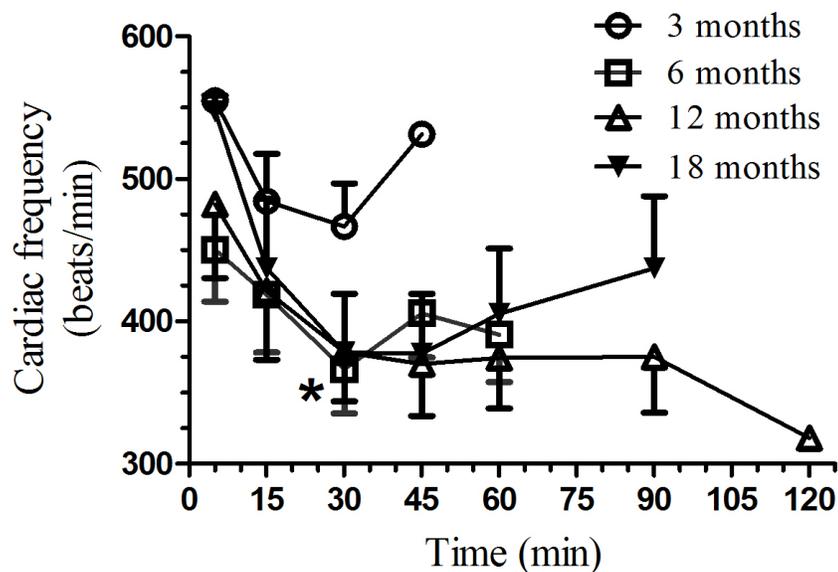


Fig. 3. Mean (\pm SE) cardiac frequency (beats/min) in Sprague Dawley rats ($n = 6$ /age group; 3, 6, 12, and 18 months old) following an intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine. The heart rate was evaluated with a pulse

oximeter tentatively at selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min), with evaluation ending when all animals had a positive withdrawal reflex. A significant difference between the 3-month-old group and the older groups was seen only at the 30 min time point. * $P < 0.01$ (post hoc Dunnett's test).

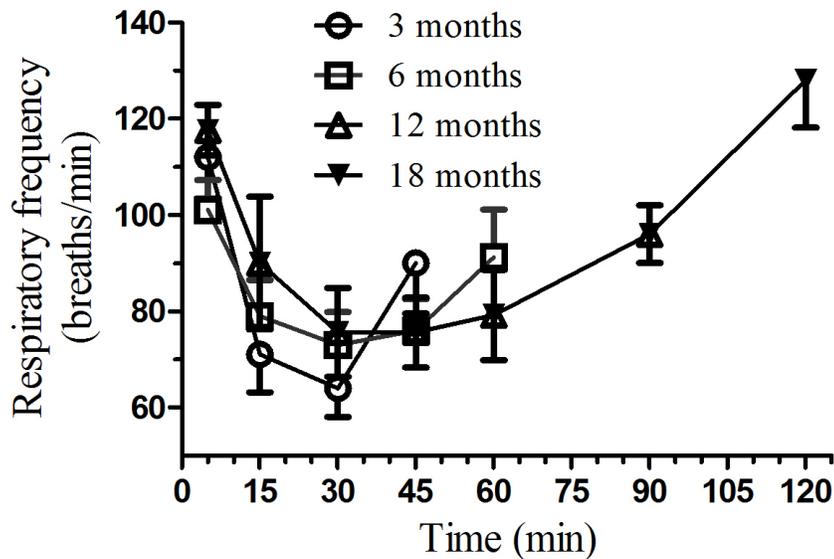


Fig. 4. Mean (\pm SE) respiratory frequency (breaths/min) in Sprague Dawley rats ($n = 6$ /age group; 3, 6, 12, and 18 months old) following an intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine. The respiratory frequency was measured by direct observation at 5, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min, and measurement ended when all animals had a positive withdrawal reflex. No significant difference between groups.

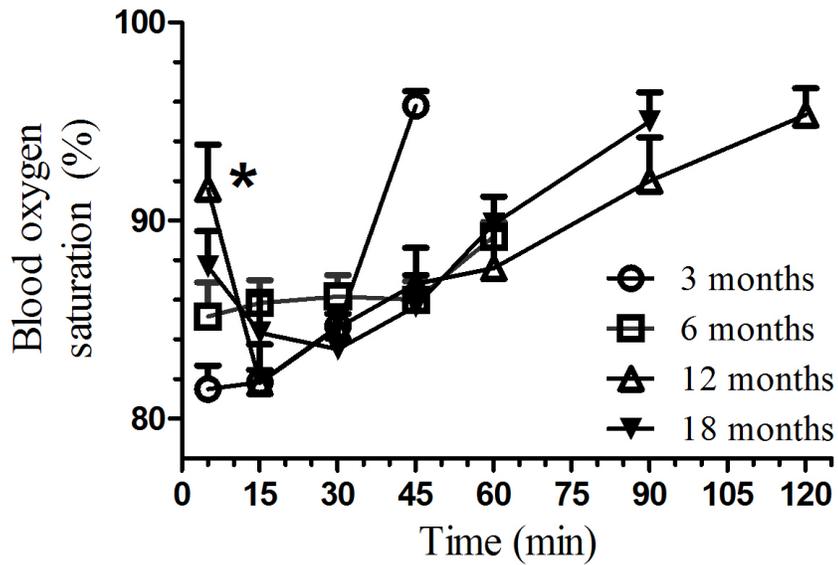


Fig. 5. Mean (\pm SE) blood oxygen saturation (%) in Sprague Dawley rats ($n = 6$ /age group; 3, 6, 12, and 18 months old) following an intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine. The SaO₂ was evaluated with a pulse oximeter at tentatively selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min), with evaluation ending when all animals had a positive withdrawal reflex. A significant difference (post hoc Dunnett's test*) between groups was seen only at 5 min between 3- ($P < 0.002$) and 6-month-old ($P < 0.02$) animals compared with 12-month-old animals.

Rectal temperature (Fig. 6) did not vary with time in the 3- ($F_{4,20}=1.79, P < 0.17$), 6- ($F_{4,20}=2.30, P < 0.09$), and 12-month-old rats ($F_{6,30}=1.32, P < 0.28$). However, rectal temperature was significantly affected in the 18-month-old rats ($F_{5,25}=5.57, P < 0.0005$).

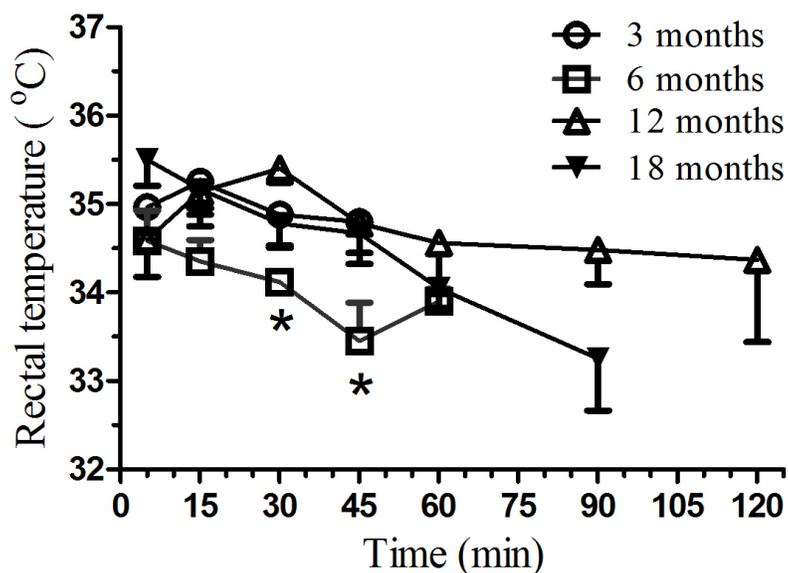


Fig. 6. Mean (\pm SE) rectal temperature ($^{\circ}$ C) in Sprague Dawley rats ($n = 6$ /age group; 3, 6, 12, and 18 months old) following an intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine. The rectal temperature was evaluated at tentatively selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min), with evaluation ending when all animals had a positive withdrawal reflex. A significant difference between 6-month-old animals and other age groups was seen at 30 and 45 min ($P < 0.01$; post hoc Dunnett's test).

Pharmacokinetics

Mean pharmacokinetic parameters (\pm SD) are presented in Table 1, and mean concentration-time profiles are presented in Fig. 7. Drug exposure increased for both ketamine and xylazine with aging, as shown by the AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$. Compared with the 3-months-old rats, ketamine exposure (AUC_{0-t}) increased by factors of 1.98, 2.94, and 4.15 in the 6-, 12-, and 18-month-old rats, respectively, whereas xylazine exposure increased by factors of 1.33, 1.85 and 2.78. The terminal elimination rate constant (K_{el}) decreased, and the terminal elimination half-lives ($T_{1/2}$) increased for both ketamine and xylazine with increasing age. These parameters were not calculated for 18-month-old rats, since the correlation of the data measured from the last three data points was less than 90%.

The relative clearance of both drugs decreased with aging. When compared with the 3-month-old rats, relative clearance was decrease by 58, 74, and 77% for ketamine and by 30, 52, and 67% for xylazine in the 6-, 12-, and 18-month-old rats, respectively.

Table 1. Mean (SD) plasmatic pharmacokinetic parameters following a single intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) administered to male Sprague Dawley rats (n=3/group) of different ages.

Pharmacokinetic parameters (units)	Age (months)			
	3	6	12	18
Ketamine				
AUC _{0-t} (µg.h/ml)	2.02 (0.03)	4.01 (0.28) ⁴	5.88 (0.13) ^{4,3}	8.39 (0.44) ^{4,4}
AUC _{0-∞} (µg.h/ml)	3.24 (0.16)	7.77 (0.71) ¹	12.75 (2.25) ^{4,2}	13.94 (1.22) ^{4,2}
k _{el} (h ⁻¹)	0.14 (0.01)	0.08 (0.02) ²	0.07 (0.02) ^{2,ns}	ND
T _{1/2} (h)	5.61 (0.28)	8.41 (1.44) ^{ns}	10.29 (2.90) ^{2,ns}	ND
CL/F (ml·min ⁻¹)	24.76 (1.24)	10.35 (0.95) ⁴	6.41 (1.15) ^{4,1}	5.77 (0.50) ^{4,ns}
Xylazine				
AUC _{0-t} (µg.h/ml)	2.67 (0.19)	3.54 (0.17) ²	4.94 (0.35) ^{4,3}	7.42 (0.22) ^{4,3}
AUC _{0-∞} (µg.h/ml)	2.83 (0.26)	4.00 (0.11) ²	5.87 (0.01) ^{4,4}	8.56 (0.38) ^{4,4}
k _{el} (h ⁻¹)	0.34 (0.04)	0.26 (0.02) ¹	0.22 (0.05) ^{1,ns}	ND
T _{1/2} (h)	2.09 (0.29)	2.71 (0.26) ^{ns}	3.25 (0.73) ^{ns,ns}	ND
CL/F (ml·min ⁻¹)	3.55 (0.32)	2.50 (0.07) ³	1.70 (0.01) ^{4,2}	1.17 (0.05) ^{4,1}

AUC_{0-∞}, area under curve extrapolated to infinity; AUC_{0-t}, area under curve from time zero to the last measured concentration; k_{el}, terminal elimination rate constant; T_{1/2}, terminal elimination half-life; CL/F, relative clearance rate; ND, not determined. Post hoc Tukey statistics reported for 6-, 12-, and 18-month-old rats when compared with 3-month-old animals (first value) as well as for 6-12 and 12-18 groups (second value): ¹p < 0.05; ²p < 0.01; ³p < 0.001; ⁴p < 0.0001. ns, non-significant

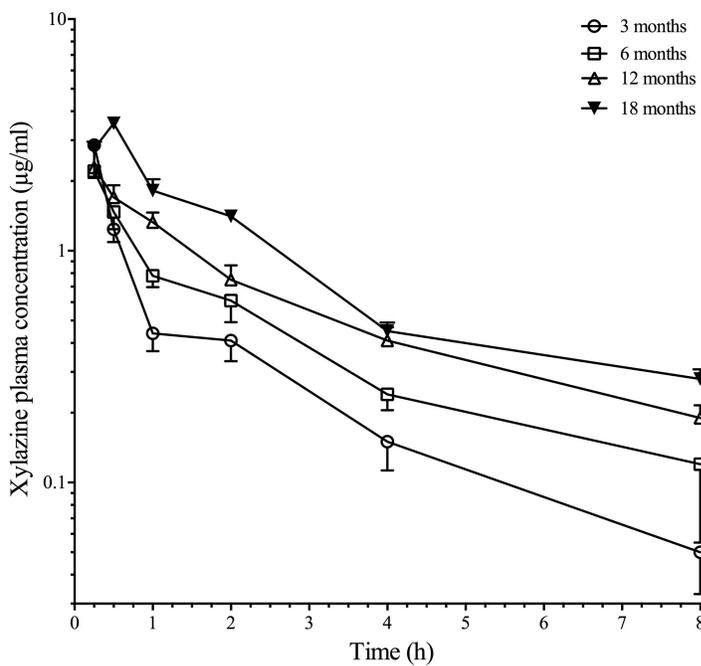
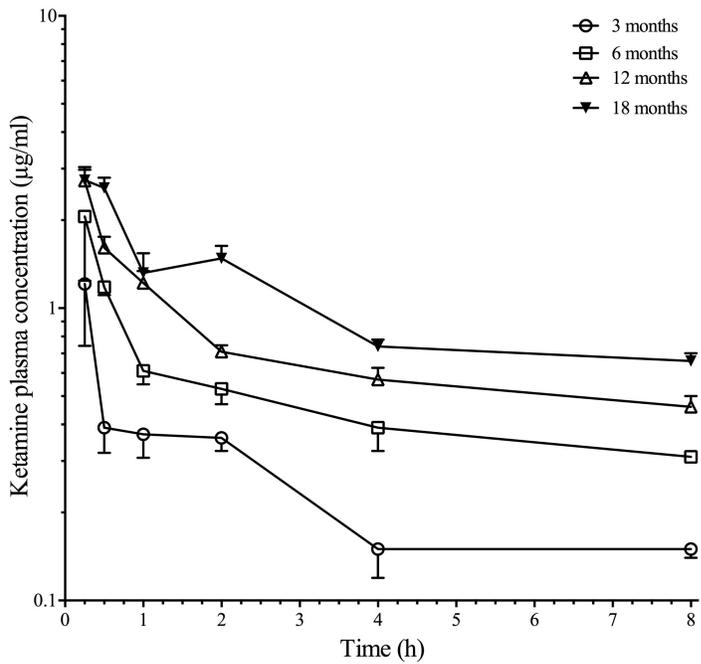


Fig. 7. Mean (\pm SD) concentration-time profiles of ketamine (top) and xylazine (bottom) in male Sprague Dawley rats ($n=3/\text{group}$; 3, 6, 12, and 18 months old) following a single intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg).

Histopathology

No lesions were observed in selected tissues from the animals independently of the age group.

Blood biochemistry

Mean biochemical parameters (\pm SD) are presented in Table 2. All parameters were within normal limits except for an increase with age above the higher limit values for BUN and ALT. ALT fell within normal limits if we consider the post-anesthesia concentrations (Veilleux-Lemieux and al, 2012). Glucose concentrations increased with aging and were slightly above normal in 12-month-old rats and very high in 18-month-old rats. Creatinine concentrations also increased with aging but stayed within normal limits. Total proteins were within normal limits in all groups, however, albumin decreased with aging. In another study, it was reported that a decrease in total proteins occurred with aging and post KX administration (Veilleux-Lemieux and al, 2012).

Table 2. Mean (SD) biochemistry parameters following a single intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) administered to male Sprague Dawley rats (n=3/group) of different ages.

Biochemistry parameters (units)	Normal values	Age (months)			
		3	6	12	18
Glucose (mmol/l)	4.4-16.7	9.3 (1.3)	12.9 (3.2)	17.6 (6.0)	28.8 (9.0)
BUN (mmol/l)	3.9-8.2	9.6 (1.1)	9.9 (1.7)	11.8 (1.8)	13.0 (2.3)
Creatinine (mmol/l)	35-123	40.0 (3.5)	45.3 (5.8)	58.7 (8.3)	65.7 (16.0)
ALT (U/l)	28-40	55.7 (9.2)	48.7 (9.0)	56.0 (15.9)	62.0 (7.2)
ALP (U/l)	150-220	215.3 (53.4)	138.0 (28.2)	142.3 (23.7)	164.7 (35.3)
Total proteins (g/l)	58-66	64.6 (0.6)	61.1 (1.0)	56.1 (6.1)	59.4 (7.2)
Albumin (g/l)	33-46	32.8 (0.3)	31.5 (1.8)	28.3 (2.6)	28.3 (3.9)
Globulins (g/l)	17-30	31.8 (0.6)	29.6 (1.8)	27.8 (3.6)	31.1 (1.3)

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen

Drug metabolism in liver S9 fractions

The results were consistent with the kinetics following a Michaelis-Menten enzymatic reaction for all rat liver S9 fractions from all age groups (Fig. 8), and the data were compatible with those of commercial rat liver S9 fractions (data not shown). The derived data are presented in Table 3. Midazolam is a well-characterized substrate of CYP3A and the primary biotransformation product is α -hydroxymidazolam. The observed K_m values were not significantly different when comparing age groups (Table 3). This suggests that the enzyme-substrate complex structure was not significantly different between midazolam and CYP3A with age. However, the derived V_{max} suggested a rapid saturation of the CYP3A enzyme active sites in liver S9 fractions of 18-month-old rats, thus affecting significantly the intrinsic clearance ($CL_{u_{int}}$) of the drug. Interestingly, the derived K_m value for ketamine significantly changed in 18-month-old rats. This observation is very distinctive compared with the rat liver CYP3A-mediated metabolism of midazolam.

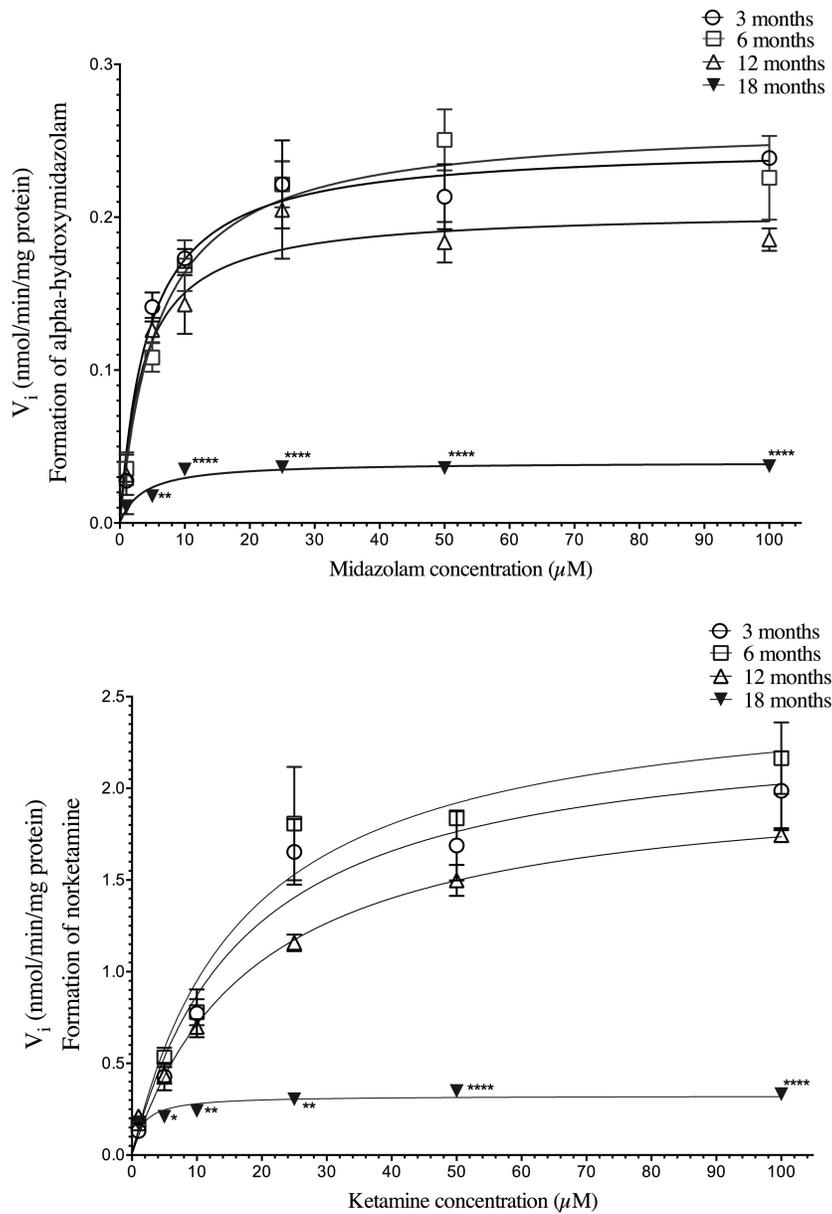


Fig. 8. Determination of Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) using nonlinear regression fitting in S9 liver fractions from 3-, 6-, 12-, and 18-month-old rats. Each point represents the mean (\pm SD) of experiments in triplicate. Significant differences in the initial rate of formation (V_i) were observed starting at the 5 μM substrate concentration for liver S9 fractions of 18-month-old rats.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$.

Table 3. Kinetic parameters associated with the formation α -hydroxymidazolam and norketamine in liver S9 fractions from aging rats.

α -Hydroxymidazolam	V_{max} nmol min ⁻¹ mg ⁻¹	K_m μ M (nmol ml ⁻¹)	CL _{int} ml min ⁻¹
3 month liver S9 fractions	0.247 (\pm 0.017)	4.32 (\pm 0.26)	0.057
6 month liver S9 fractions	0.264 (\pm 0.021)	6.22 (\pm 0.99)	0.042
12 month liver S9 fractions	0.216 (\pm 0.020)	4.18 (\pm 0.05)	0.052
18 month liver S9 fractions	0.040 (\pm 0.003) ¹	3.76 (\pm 1.45) ³	0.011
Norketamine			
3 month liver S9 fractions	2.39 (\pm 0.23)	15.99 (\pm 4.28)	0.150
6 month liver S9 fractions	2.61 (\pm 0.18)	18.38 (\pm 3.85)	0.142
12 month liver S9 fractions	2.07 (\pm 0.07)	19.04 (\pm 0.94)	0.109
18 month liver S9 fractions	0.68 (\pm 0.02) ²	2.65 (\pm 0.49) ⁴	0.256

^{1,2}p < 0.001; ³p > 0.05; ⁴p < 0.05

Discussion

In this study, ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) caused a short duration anesthesia in all 3- and 6-month-old rats; however, it was increased in the 12-month-old rats and even more so in 18-month-old rats. The withdrawal reflex and the first voluntary movement following KX administrations occurred progressively later with aging. These results suggest a clear effect on anesthesia depth and duration with aging and related factors. Regarding the physiological changes seen with KX anesthesia, cardiac frequency significantly decreased in 6-, 12-, and 18-month-old animals when compared with the 3-month-old rats. Cardiac frequency remained depressed in older rats at the end of anesthesia. Respiratory frequency significantly decreased in all groups but returned to near normal values during recovery from anesthesia. The decreased blood oxygen saturation is most probably associated with the decreased cardiac and respiratory

frequencies. These results suggest a strong effect of KX administration that was not importantly affected by aging, except for cardiac frequency. Apart from the 18-month-old rats, rectal temperature did not show a significant difference with aging following KX administration. Our previous results (Giroux and al, 2015, Veilleux-Lemieux and al, 2013) showed an increase in the depth and duration of KX anesthesia with increasing age, although much higher doses (125 mg/kg) were administered to the animals; however, cardiac and respiratory frequencies as well as blood oxygen saturation were similarly affected at both 80 and 125 mg/kg with increasing age.

KX injectable anesthesia is mostly used in laboratory animals (Flecknell, 1996; Richardson & Flecknell, 2005). Ketamine produces short unconsciousness and has analgesic properties. Xylazine is an analgesic medication used to minimize side effects of the use of ketamine such as muscle stiffness (Lei and al, 2001; Saha and al, 2005; Sumitra and al, 2004). The analgesic and sedative properties of this drug combination leads to an increased depth of anesthesia associated with respiratory depression, bradycardia, hypercapnia, and acidosis (Rodrigues and al, 2006; Sharp & La Regina, 1998; Swindle and al, 2002). Our results confirm these cardiac and respiratory effects but show that the cardiac depression is more pronounced with aging, with a long recovery of respiratory frequency for the animals over 3 months of age. However, blood oxygen saturation is significantly decreased in younger animals in the first 5 min following KX administration.

The pharmacokinetics results confirm results obtained for the withdrawal and corneal reflexes; that is, a longer anesthesia duration was correlated with greater drug exposure. For both ketamine and xylazine, drug exposure (AUC) increases, and the clearance decreases, with aging. The significant increase in the AUC values of both ketamine and xylazine suggests that toxicity occurs in aged animals if higher drug concentrations are used (Giroux and al, 2015). The half-lives of ketamine and xylazine are, respectively, 2 and 1 h in 8-12 week-old rats (Veilleux-Lemieux and al, 2012). In our previous study, we found that the half-lives of ketamine and xylazine were, respectively, 8.5 and 13 h in aged rats (> 2 years old) (Veilleux-Lemieux and al, 2013). Therefore, the pharmacokinetics are affected as rats age, and this could be due to many factors. A decrease in albumin plasmatic concentrations with aging would increase the free fraction

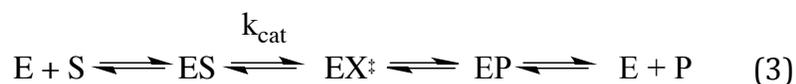
of drugs in plasma and therefore increase anesthesia depth. Many other factors can affect the pharmacokinetics of drugs, such as sex, nutrition, environmental conditions, and diseases (Jenkins, 2007; Singh and al, 2014; Sumitra and al, 2004; Veilleux-Lemieux and al, 2013). Many changes associated with aging could affect the metabolism of drugs, such as chronic subclinical inflammation, obesity (e.g., storage of the lipid-soluble drugs in fat tissues), and diminished exercise (Mézière and al, 2013). We evaluated S9 liver metabolism, as it is one of the important organs responsible for drug metabolism, the others being the kidney and the brain.

Ketamine is metabolized by the liver (Meyer & Fish, 2008) into active metabolites, mainly norketamine, an NDMA receptor antagonist (Holtman and al, 2008) and hydroxynorketamine, a nicotinic acetylcholine receptor antagonist (Song and al, 2012). Norketamine induces anesthesia, whereas hydroxynorketamine is not an anesthetic (Leung & Baillie, 1986) but possesses antidepressive properties (Singh and al, 2014). From our findings, we see that formation of norketamine results in a very rapid saturation in the liver S9 fractions of 18-month-old rats, suggesting that following a commonly administered anesthetic dose of ketamine (80 mg/kg), drug metabolism is impaired, leading to a significant increase of drug exposure (AUC) and a decrease of elimination. These results are in accordance with our recent *in vivo* investigation (Fitzgibbon and al, 2002; Veilleux-Lemieux and al, 2013). Our results suggest that norketamine is mainly produced in animals of 3-12 months of age and would contribute much less to the anesthesia with aging. Further studies should measure the plasma concentration of norketamine to confirm this hypothesis. Xylazine is metabolized into multiple metabolites, and up to 70% is eliminated in the urine (Park Choo & Choi, 1991). Rat cytochrome P450 enzymes, mainly CYP3A, are involved in the metabolism of ketamine and xylazine (Sun & Scott, 2010), and qualitative changes in liver metabolism with aging could explain the high blood concentration of both drugs as the rat ages (Rikans & Notley, 1982). CYP2B6 plays a non-negligible role in the metabolism of ketamine; however, when looking at the concentration of individual CYPs, CYP 3A is predominantly involved in the metabolism of these anesthetic drugs (Portmann and al, 2010; Zanger & Klein, 2013). A previous study demonstrated alterations of hepatic clearance of a CYP3A substrate, rate of absorption,

and hepatic blood flow following anesthesia (Uhing and al, 2004), and altogether liver metabolism appears to be one of the mechanisms explaining alterations in anesthetic drug effects. Although the liver is often assumed to be the main organ for drugs metabolism, Edwards *et al.* showed that ketamine metabolism may also occur in the kidney and to a lesser extent in the lung and gut (Edwards & Mather, 2001). Also, ketamine is a racemate of equal concentrations of (R)- and (S)-enantiomers, and the (R)-enantiomer is much more potent than the (S)-enantiomer. This also holds true for the enantiomers of norketamine (Ebert and al, 1997). These findings were obtained when norketamine was evaluated as an NMDA receptor antagonist in cortical and spinal cord preparations (Ebert and al, 1997). Our findings do not suggest a clear correlation between anesthesia depth and duration with liver metabolism, and this may be due in part to the metabolism in other organs, the distribution of different enantiomers in different organs, and the differences in permeability of the blood-brain barrier that occurs with aging and associated factors.

K_m is an indicator of the affinity that an enzyme has for a particular substrate, hence the thermodynamic stability of the enzyme-substrate complex. The stability of the enzyme-substrate complex is closely related to the enzyme structure. It plays a central role in defining the energetically favored binding cluster of the substrate in the active enzyme site (Lavoie and al, 2013). As shown *in silico*, the structure of the binding cluster may lead to different metabolites or affect the rate of formation (Sun & Scott, 2010). Fig. 8 shows results consistent with the kinetics following a Michaelis-Menten enzymatic reaction for all rat liver S9 fractions from all age groups; these data were compatible with those of commercial rat liver S9 fractions (data not shown). The derived data are presented in Table 3. Midazolam is a well-characterized substrate of CYP3A, and its primary biotransformation product is α -hydroxymidazolam. As illustrated in Table 3 and Fig. 8, the observed K_m values were not significantly different when comparing age groups. This is interesting because it suggests that the enzyme-substrate complex structure was not significantly different between midazolam and CYP3A (i.e., CYP3A1 and CYP3A2) with age. However, the derived V_{max} suggests a rapid saturation of the CYP3A enzyme active sites in liver S9 fractions of 18-month old rats, significantly affecting the intrinsic clearance ($CL_{U_{int}}$) of the drug. Interestingly, the derived K_m value for ketamine changed

significantly in geriatric rats. This observation is very distinctive compared with the rat liver CYP3A-mediated metabolism of midazolam. The K_m value is directly related to the thermodynamic stability of the binding cluster of ketamine in the active site of CYP3A. The data indicates a significant decrease of K_m in liver S9 fractions of 18-month-old rats and suggests that ketamine may have stronger interactions with CYP3A active site residues, leading to a more thermodynamically stable enzyme-substrate complex. However, it may also suggest that the enzyme binds the substrate more tightly and consequently requires more energy to form the activated transition state complex (EX^\ddagger), a necessary intermediary in formation of the enzyme-product complex (EP), as shown in Equation 3.



Free energy difference associated with the formation of the enzyme-substrate complex ($\Delta G_{\text{binding}}$) can have a significant impact on the observed K_m , but an increase of the ΔG^\ddagger (difference in free energy between EX^\ddagger and ES) can also significantly decrease the rate constant k_{cat} (i.e., turnover number), which represents the number of substrate molecules each enzyme site can convert to a metabolite per unit of time. The rate constant k_{cat} can be related to V_{max} using the Equation 4.

$$V_{\text{max}} = k_{cat} \times [E_{\text{total}}] \quad (4)$$

As illustrated in Fig. 8 and Table 3, derived V_{max} values shows significant differences with age, specifically when comparing with results obtain from liver S9 fractions of 18-month-old rats. A decreased V_{max} suggests a rapid saturation of the CYP3A enzyme active sites, similar to what was observed with the reference CYP3A substrate midazolam. These results are therefore compatible with the formation of a more stable enzyme-substrate complex (ES) but a less favorable transition state complex (EX^\ddagger), leading to an increase of ΔG^\ddagger and thus a decrease of k_{cat} and V_{max} . Conformational change of the CYP3A active site with age can potentially explain these results, and protein misfolding is characteristic of several age-related problems. The interaction of the active site residues is substrate dependent, and the results appear to suggest that an energetically favored binding cluster of ketamine in the active site of CYP3A is observed with age, but interestingly, this effect was not observed for midazolam. The formation of a

more stable enzyme-substrate complex (ES) may have severe consequences on drug-drug interactions, a major issue in geriatric populations. The observed $CL_{u_{int}}$ diminishes with aging, which is associated with the midazolam CYP3A-catalyzed reaction, but increases for ketamine (Table 3). The calculation of $CL_{u_{int}}$ assumes that the concentration of the enzyme catalytic sites remain constant. This assumption cannot be made if conformational changes of the CYP3A active site occurs with aging. Consequently, $CL_{u_{int}}$ cannot be compared between age groups for the ketamine CYP3A-mediated reaction.

No gross pathologies were found, and blood biochemistry parameters were near normal considering the effects of the KX anesthesia. With high BUN and normal creatinine concentrations, the results may suggest the beginning of a subclinical renal disease; however, no histopathological findings were noted in older animals. High ALT and ALP may be the side effects of a long-term high fat diet (Madsen & Tuba, 1952; Uthandi & Ramasamy, 2011), however, these parameters are also increased with KX anesthesia. Increased glycemia could be caused by xylazine, which is known to induce hyperglycemia (Michaelis & Menten, 1913). Ketamine and xylazine are molecules that bind to albumin. A lower albumin plasmatic concentration with aging will increase the unbound fraction of ketamine and xylazine in the blood and could explain in part the longer recovery from anesthesia awakening in older rats (Dayton and al, 1983). KX anesthesia associated with hypoalbuminemia could also reflect the drug effect on hepatic metabolism even without lesions (Hijazi & Boulieu, 2002; Meyer & Fish, 2008). In the present study, blood biochemistry and histopathology offered little explanation for the physiological changes seen during KX anesthesia.

Ketamine and xylazine are widely distributed in tissues because they are lipophilic drugs (Song and al, 2012). Since rats show an increase in fat deposits in organs with aging and also get less exercise, these fats deposits could act as a form of storage and slow release of ketamine and xylazine. These drugs should also penetrate readily well perfused organs such as the brain; however, both ketamine and xylazine are known to decrease brain perfusion (Lei and al, 2001). With aging, there is a disruption of the blood-brain barrier (Mooradian, 1988; Tucsek and al, 2014), making it less permeable to molecules, which is caused by activation of drug efflux pumps (Krinke & Eisenbrandt, 1994). All these

characteristics explain the decrease in anesthesia depth and duration as well as the longer time to recovery seen in aging animals (Veilleux-Lemieux and al, 2013; Waterman & Livingston, 1978). Further studies evaluating the availability of ketamine and xylazine in brain tissue should be conducted to verify this hypothesis. However, increasing the xylazine concentrations would be detrimental in aging animals, since it causes pulmonary edema and effusion at high blood concentrations (Amouzadeh and al, 1989; Amouzadeh and al, 1993; Giroux and al, 2015). Reversing this effect with an α 2-antagonist (e.g., yohimbine) following recovery is an option that needs to be evaluated.

Conclusion

Physiological differences between the experimental groups suggest that KX injectable anesthesia is a poor anesthetic choice for aging rats. Age and the related factors have a substantial effect on ketamine and xylazine availability by changing the pharmacokinetics of these drugs, which translated into shorter and less effective anesthesia in aging rats.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Guy Beauchamp, a statistician in the Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, for the statistical analyses. This study was funded by the CALAM/CALAS 2014 research fund (Pascal Vachon) as well as the Fond du Centenaire de la Faculté de Médecine Vétérinaire (Marie-Chantal Giroux and Raphaël Santamaria) and the Fond de Recherche pour la Médecine des Animaux de Laboratoire (Pascal Vachon). This project was also funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (Francis Beaudry; Discovery Grant no. 386637-2010). The HPLC-MS/MS analyses were performed on instruments funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (Francis Beaudry; Research Tools and Instruments Grants no. 439748-2013).

References

Amouzadeh, H.R., Sanqiah S. and Qualls C.W. Jr. (1989). Effects of some hepatic microsomal enzyme inducers and inhibitors on xylazine-ketamine anesthesia. *Vet. Hum. Toxicol.* 31, 532-534.

Amouzadeh, H.R., Qualls, C.W.Jr., Wyckoff, J.H., Dzata, G.K., Sangiah, S., Mauromoustakos, A. and Stein, L.E. (1993). Biochemical and morphological alterations in xylazine-induced pulmonary edema. *Tox. Path.* 21, 562-571.

Canadian Council on Animal Care. (1993). *Guide to the care and use of experimental animals* (Vol. 1, 2nd ed.). Ottawa (Canada) : Canadian Council on Animal Care.

Charles River [Internet] : Clinical Laboratory parameters for CRL: CD(SD) rats. (2006). Available at http://www.criver.com/files/pdfs/rm/cd/rm_rm_rc_clinical_parameters_cd_rat_06.aspx.

Dayton, P.G., RL Stiller, R.L., Cook, D.R. and Perel, J.M. (1983). The binding of ketamine to plasma proteins: emphasis on human plasma. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24, 825-831.

Dittmar, M.S, Fehm, N.P., Vatankhah, B. and Markus, H. (2004). Ketamine/xylazine anesthesia for radiologic imaging of neurologically impaired rats: dose response, respiratory depression, and management of complications. *Comp. Med.* 54, 642-655.

Ebert, B., Mikkelsen, S., Thorkildsen, C. and Borgbjerg, F.M. (1997). Norketamine, the main metabolite of ketamine, is a non-competitive NMDA receptor antagonist in the rat cortex and spinal cord. *Eur J Pharmacol.* 333, 99-104.

Edwards, S.R. and Mather, L.E. (2001). Tissue uptake of ketamine and norketamine enantiomers in the rat: indirect evidence for extrahepatic metabolic inversion. *Life Sci.* 69, 2051-2066.

Fitzgibbon, E.J., Hall, P., Schroder, C., Seely J, and Viola, R. (2002). Low dose ketamine as an analgesic adjuvant in difficult pain syndromes: a strategy for conversion from parenteral to oral ketamine. *J. Pain. Symptom Manage.* 23, 165-170.

Flecknell, P.A. (1996). *Laboratory animal anesthesia*. Academic Press, London.

Giroux, M.C., Hélie P., Burns, P., and Vachon, P. (2015). Anesthetic and pathological changes following high doses of ketamine and xylazine in Sprague Dawley rats. *Exp. Anim.* 64, 253-260.

Greene, S.A. and Thurmon, J.C. (1988). Xylazine--a review of its pharmacology and use in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 11, 295-313.

Hajighahramani, S. and Vesa, N. (2007). Evaluation of several drug combinations for intraperitoneal anaesthesia in adult male rats. *Iranian J. Vet. Res.* (University of Shiraz), 8(19).

Hijazi, Y. and Boulieu, R. (2002). Contribution of CYP3A4, CYP2C9 and CYP2B6 in N-demethylation of ketamine in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 30, 853–858.

Halama, B., Hohmann, N., Burhenne, J., Weiss, J., Mikus, G. and Haefeli, W.E. (2013). A nanogram dose of the CYP3A probe substrate midazolam to evaluate drug interactions. *Clin. Pharmacol. Therap.* 93, 564-571.

Holtman, J.R. Jr., Crooks, P.A., Johnson-Hardy, J.K., Hojomat, M., Kleven, M. and Wala. E.P. (2008). Effects of norketamine enantiomers in rodent models of persistent pain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 676-85.

Jenkins, A.J. (2007). Toxicokinetics and factors affecting pharmacokinetic parameters. In Karch, S.B. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Abused Drugs* (1st ed., p. 21-24). London : CRC Press.

Knobloch, M., Portier C.J., Levionnois, O.L., Theurillat, R., Thormann, W., Spadavecchia, C. and Mevissen, M. (2006). Antinociceptive effects, metabolism and disposition of ketamine in ponies under target-controlled drug infusion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 373–386.

Krinke, G.J. and Eisenbrandt D.L. (1994). Non-neoplastic changes in the brain. In Mohr U., Dungworth D.L. and Capen, C.C. *Pathobiology of the Aging Rat* (Vol. 2., p. 3-19). Washington D.C., USA : ILSI Press.

Lavoie, D.S., Pailleux, F., Vachon, P. and Beaudry, F. (2013). Characterization of xylazine metabolism in rat liver microsomes using liquid chromatography-hybrid triple quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 27, 882-888.

Lei, H., Grinberg, O, Nwaigwe, C., Hou, H.G., Williams, C., Swartz, H.M. and Dunn, J.F. (2001). The effect of ketamine-xylazine anesthesia on cerebral blood flow oxygenation observed during nuclear magnetic resonance perfusion imaging and electron paramagnetic resonance oximetry. *Brain Res.*, 913, 174-179.

Leung, L.Y. and Baillie, T.A. (1986). Comparative pharmacology in the rat of ketamine and its two principal metabolites, norketamine and (Z)-6-hydroxynorketamine. *J. Med. Chem.* 29, 2396-2399.

Madsen, N.B. and Tuba, J. (1952). On the source of the alkaline phosphatase in rat serum. *J. Biol. Chem.* 195, 741-750.

Meyer, R.E. and Fish, R.E. (2008). Pharmacology of injectable anesthetics, sedatives, and tranquilizers. In Fish R.E., Brown, M.J., Danneman, P.J. and Karas, A.Z. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals* (1st ed., p. 27-82). San Diego, USA : Academic Press.

Mézière, A., Paillaud, E. and Plaud, B. (2013). Anesthesia in the elderly. *Presse Med*, 42, 197-201.

Michaelis, L. and Menten, M.L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 334-336.

Mooiman, K.D., Maas-Bakker, R.F., Rosing, H., Beijnen, J.H., Schellens, J.H. and Meijerman, I. (2013). Development and validation of a LC-MS/MS method for the in vitro analysis of 1-hydroxymidazolam in human liver microsomes: application for determining CYP3A4 inhibition in complex matrix mixtures. *Biomed. Chromatogr*, 27, 1107-1116.

Mooradian, A.D. (1988). Effect of aging on the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging*, 9, 31-39.

Mössner, L.D., Schmitz, A., Theurillat, R., Thormann, W. and Mevissen, M. (2011). Inhibition of cytochrome P450 enzymes involved in ketamine metabolism by use of liver microsomes and specific cytochrome P450 enzymes from horses, dogs, and humans. *Am. J. Vet. Res*, 72, 1505-1513.

Park Choo, H.-Y. and Choi, S.-O. (1991). The metabolism of xylazine in rats. *Arch. Pharm. Res*, 14, 346-351.

Plumb, D.C. (2008). *Plumb's Veterinary Drug Handbook* (6th ed., p. 935-938). Hoboken : Wiley-Blackwell.

Portmann, S., Kwana, H.Y., Theurillata, R., Schmitzb, A., Mevissenb, M. and Thormann, W. (2010). Enantioselective capillary electrophoresis for identification and characterization of human cytochrome P450 enzymes which metabolize ketamine and norketamine in vitro. *J. Chromatogr. A*, 1217, 7942-7948.

Richardson, C.A. and Flecknell, P.A. (2005). Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: Are we making progress? *Altern. Lab. Anim*, 33, 119-127.

Rikans, L.E. and Notley, B.A. (1982). Age-related changes in rat hepatic microsomal drug metabolism are substrate selective. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 220, 574-578.

Rodrigues, S.F., de Oliveira, M.A., Martins, J.O., Sannomiya, P., de Cássia Tostes, R., Nigro, D., Carvalho, M.H. and Fortes, Z.B. (2006). Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s.c. route. *Life Sci*, 79, 1630-1637.

Rowland, M. and Towzer, T.N. (1995). *Clinical pharmacokinetics: concepts and application* (3rd ed, p. 367-389). Philadelphia, USA : Lippincott, Williams and Wilkins.

Saha, J.K., Xia, J., Grondin, J.M., Engle, S.K. and Jakubowski, J.A. (2005). Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp. Biol. Med*, 230, 777-784.

Santamaria, R., Pailleux, F. and Beaudry, F. (2014). In vitro ketamine CYP3A-mediated metabolism study using mammalian liver S9 fractions, cDNA expressed enzymes and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 28, 1660-1669

Sharp, P.E. and La Regina, M.C. (1998). Important biological features. In Suckow MA. *The laboratory rat* (1st ed., p. 14-16). London : CRC Press.

Schwenke, D.O. and Cragg, P.A. (2004). Comparison of depressive effects of four anesthetic regimens on ventilator and cardiovascular variables in the guinea pig. *Comp. Med*, 54, 77-85.

Shimizu, M., Uno, T., Tamura, H.O., Kanazawa, H., Murakami, I., Sugawara, K. and Tateishi, T. (2007). A developed determination of midazolam and 1'-hydroxymidazolam in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry: application of human pharmacokinetic study for measurement of CYP3A activity. *J. Chromatogr. B*, 847, 275-281.

Singh, N.S., Zarate, C.A. Jr., Moaddel, R., Bernier, M. and Wainer, I.W. (2014). What is hydroxynorketamine and what can it bring to neurotherapeutics? *Expert Rev. Neurother*, 14, 1239-42.

Song, G., Wu, H., Yoshino, K. and Zamboni, W.C. (2012). Factors affecting the pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposomal drugs. *J. Liposome Res*, 22, 177-92.

Struck, M.B., Andrutis, K.A., Ramirez, H.E. and Battles, A.H. (2011). Effect of a short-term fast on ketamine-xylazine anesthesia in rats. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci*, 50, 344-8.

Sumitra, M., Manikandan P, Rao, KV, Nayeem, M., Manohar, B.M. and Puvanakrishnan, R. (2004). Cardiorespiratory effects of diazepam-ketamine, xylazine-ketamine and thiopentone anesthesia in male Wistar rats--a comparative analysis. *Life Sci*, 75, 1887-1896.

Sun, H. and Scott, D.O. (2010). Structure-based drug metabolism predictions for drug design. *Chem Biol Drug Des*, 75, 3-17

Swindle, M.M., Vogler, G.A., Fulton, L.K., Marini, R.P. and Popilskis, S. (2002). Preanesthesia, anesthesia, analgesia and euthanasia. In Franklin, M.L., Quimby, F.W., Fox, J.G. and Anderson, L.C. *Laboratory Animal Medicine* (2nd ed., p. 956-960). Amsterdam : Elsevier Science.

Tucsek, Z., Toth, P., Sosnowska, D., Gautam, T., Mitschelen, M., Koller, A., Szalai, G., Sonntag, W.E., Ungvari, Z. and Csiszar, A. (2014). Obesity in aging exacerbates blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and oxidative stress in the mouse hippocampus: effects on expression of genes involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*, 69, 1212-1226.

Veilleux-Lemieux, D., Beaudry, F., Hélie, P. and Vachon, P. (2012.) Effects of endotoxemia on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of ketamine and xylazine anesthesia in Sprague-Dawley rats. *Vet. Med. Res. Reports*, 3, 99-109.

Veilleux-Lemieux, D., Castel, A., Carrier, D., Beaudry, F. and Vachon, P. (2013). Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague Dawley rats. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci*, 52, 567-570.

Uhing, M.R., Beno, D.W., Jiyamapa-Serna, V.A., Chen, Y., Galinsky, R.E., Hall, S.D. and Kimura, R.E. (2004). The effect of anesthesia and surgery on CYP3A activity in rats. *Drug Metab. Dispo*, 32, 1325-1330.

Uthandi, A. and Ramasamy, K. (2011). Hepatoprotective activity of sesame meal on high fat fed Wistar rats. *Int J. Pharma. Sci. Res*, 2, 205-211.

Waterman, A.E. and Livingston, A. (1978). Effects of age and sex on ketamine anaesthesia in the rat. *Br. J. Anaesth.* 50, 885-889.

Zanger, U.M. and Klein, K. (2013). Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Front. Gen*, 4, 1-12.

DISCUSSION

Avec la demande accrue d'utilisation d'animaux gériatriques en recherche en fonction d'une population humaine vieillissante, une attention particulière doit être en place pour effectuer une anesthésie ajustée pour atteindre certains objectifs de recherche nécessitant une intervention chirurgicale. À cet égard, la physiologie du rat vieillissant implique des changements dégénératifs qui peuvent perturber le fonctionnement normal du métabolisme, notamment les fonctions des organes métabolisant les drogues tels que le foie et les reins (Hard & Alden, 1994). L'altération fonctionnelle de ces organes s'observe par des modifications au niveau de la pharmacocinétique des drogues (Veilleux-Lemieux et al., 2013). En effet, certains médicaments administrés peuvent causer des effets indésirables, s'observant par soit une augmentation du taux de morbidité ou de mortalité. Face à ces situations critiques, plusieurs résultats de recherche peuvent être altérés. Cet enjeu trop commun met en relief l'importance d'une connaissance accrue des effets du vieillissement chez le rat ainsi que des modifications apportées au sein de l'anatomie pour pallier ces effets néfastes des drogues, parfois irréversibles.

L'anesthésie des animaux en recherche est de mise lorsqu'une chirurgie ou toute autre procédure sont effectuées pour immobiliser le patient, par exemple pour effectuer une imagerie. La limitation des équipements spécialisés, lorsque requis, force souvent les utilisateurs d'animaux à s'orienter vers des molécules plus aisées à administrer. La combinaison de kétamine et de xylazine, étant considérée comme le protocole anesthésique injectable de choix chez les rongeurs, est l'alternative préférée lorsque l'anesthésie par inhalation ne peut être utilisée (Gaertner et al., 2008; Richardson et Flecknell, 2005). Le foie métabolise ces deux drogues et leur excrétion se fait principalement par les reins (Meyer et Fish, 2008).

Nous avons évalué le protocole anesthésique de KX chez le rat Sprague-Dawley lors du vieillissement. Pour connaître les effets du vieillissement sur les paramètres physiologiques, biochimiques et pharmacocinétiques de ces drogues, nous avons utilisé des rats de différents âges, soit de 3, 6, 12 et 18 mois. Effectivement, la comparaison des

différentes données obtenues en fonction avec l'âge permet de mieux comprendre le processus du vieillissement et d'interpréter ces changements avec certaines altérations métaboliques chez le rat (Veilleux-Lemieux et al., 2013).

Pour accomplir ce projet, des rats âgés de 3, 6, 12 et 18 mois ont reçu une anesthésie de 80mg/kg de kétamine et 10mg/kg de xylazine. Des mesures pharmacodynamiques ont été enregistrées et plusieurs prises de sang ont été effectuées à des temps précis pour évaluer les paramètres pharmacocinétiques à l'aide de la méthode tandem par chromatographie liquide de haute performance et spectrométrie de masse (HPLC-MS/MS). Comme la présente étude visait la pharmacocinétique du mélange KX suite à une administration IP uniquement, la biodisponibilité n'a pas été calculée. Afin d'obtenir des renseignements sur les paramètres biochimiques, des prélèvements sanguins ont été collectés la fin de l'étude, soit avant l'euthanasie. Les organes tels que les reins, le foie, le cœur et les poumons ont ainsi été récoltés afin de déceler des lésions au niveau histologique. Les résultats obtenus ont démontré que le vieillissement causait des changements pharmacocinétiques, biochimiques et physiologiques importants lors d'une anesthésie aux injectables.

En effet, nous avons établi que la durée d'anesthésie était significativement augmentée chez les groupes âgés comparativement aux rats âgés de 3 mois. À cet âge, aucun changement gériatrique n'est perceptible et plusieurs paramètres ont été déterminés, par exemple les valeurs biochimiques sanguines et les valeurs physiologiques. En ce qui concerne les paramètres physiologiques, le premier réflexe volontaire et cornéen retardaient avec l'âge. Une baisse significative dans la fréquence cardiaque chez les 6, 12 et 18 mois fut notée après 30 minutes d'anesthésie de plus qu'une saturation d'oxygène inférieure au temps zéro. Nous avons également observé une diminution significative de la température rectale chez les plus vieux rats, soit les 12 et 18 mois, et ce, tout au long de l'anesthésie. Ayant une perfusion sanguine réduite et un métabolisme plus lent causé par une altération de la thermorégulation, le métabolisme des drogues est ainsi modifié et s'observe par une récupération anesthésique plus lente chez les rats vieillissants.

Tous les paramètres biochimiques se situaient dans les valeurs normales, sauf une valeur au-dessus de la limite supérieure pour l'urée et l'ALT ainsi qu'une valeur inférieure à la normale pour l'albumine, et ce, chez tous les groupes d'âge. Les concentrations de glucose augmentent avec le vieillissement étant légèrement supérieures à la normale chez les rats âgés de 12 mois et très hautes chez les rats âgés de 18 mois. Les concentrations de créatinine ont également augmenté avec l'âge, mais sont restées dans les limites normales. En ce qui concerne la nécropsie et l'analyse histopathologique, aucun rat ne présentait de changements significatifs, autant sur le niveau macroscopique que microscopique.

Les paramètres pharmacocinétiques de la kétamine et de la xylazine semblent grandement affectés chez les rats vieillissants. En effet, la concentration plasmatique de ces deux drogues augmente avec l'âge, et ce, avec des changements notables dès l'âge de 6 mois. En relation avec le vieillissement, un accroissement du $T_{1/2}$ ainsi qu'une diminution de la clairance reflètent bien la prolongation du temps d'anesthésie chez les vieux rats. De plus, l'analyse des fractions microsomiales hépatique démontre une saturation des CYP450 ainsi qu'une altération du métabolisme de la kétamine, notamment observable chez les rats de 18 mois. Cette trouvaille correspond fortement à l'augmentation significative de l'AUC et la diminution de la CL observées.

Les hypothèses premières de l'étude sont testées en parti par les résultats obtenus, en englobant l'ensemble des paramètres utilisés. Nos hypothèses étaient en faveur d'une augmentation progressive des concentrations plasmatiques de kétamine et de xylazine chez les animaux vieillissants qui se traduirait par une anesthésie de plus longue durée. De plus, l'âge des animaux a eu des répercussions sur les paramètres physiologiques lorsqu'ils étaient anesthésiés. Le métabolisme hépatique comportait des changements qui expliquaient en partie les paramètres observés durant l'anesthésie, soit une altération du métabolisme de la kétamine et de la xylazine.

Cependant, de multiples interactions directes ou indirectes entre les différents paramètres étudiés ont rendu difficile et voire complexe l'atteinte d'une analyse absolue.

En premier lieu, notre hypothèse était qu'une augmentation de la concentration plasmatique de drogues s'observait avec le vieillissement, se traduisant par une anesthésie plus longue chez les vieux rats. D'une part, les premiers réflexes volontaire et cornéen retardent en fonction de l'âge, ce qui pourrait être expliqué par une concentration plasmatique de drogues plus élevée chez les rats vieillissants. Nous observons également une baisse de la fréquence cardiaque ainsi qu'une diminution de la saturation d'oxygène chez tous les groupes à l'exception des 3 mois. Les valeurs de saturation d'oxygène sont revenues à la normale après l'anesthésie sauf pour le groupe de 6 mois où la saturation d'oxygène est restée basse. Ces phénomènes proviennent des effets possibles du vieillissement et aussi aux effets causés par la combinaison de kétamine et xylazine sur différentes parties de l'organisme. En effet, la xylazine est connue pour causer une dépression cardiaque (Richardson & Flecknell, 2005). L'hypotension et la bradycardie sont d'autres effets de la combinaison de ces deux drogues chez le rat (Rodrigues et al, 2006). La fréquence respiratoire fut en chute constante pour tous les groupes suite à l'administration de KX, et ce, jusqu'à 30 minutes d'anesthésie puis remonta graduellement par la suite. La combinaison kétamine et xylazine cause une dépression respiratoire dose-dépendante (Fish et al, 2008) ce qui explique nos résultats. Quant à la kétamine, utilisée seule ou en combinaison, elle occasionne une hypercapnie et une acidose métabolique réduisant la PaO₂ de même que le pH artériel (Sumitra et al, 2004). De plus, nous avons noté une baisse de la température rectale chez les plus vieux rats, et ce, même pendant la phase de réveil. L'hypothermie observée chez les plus vieux rats est une conséquence dose-dépendante de l'anesthésie à la kétamine et la xylazine (Rodrigues et al, 2006). Avec le vieillissement, certains organes filtres perdent leur capacité à éliminer certaines substances tels que les xénobiotiques (Hard & Alden, 1994). De ce fait, les drogues s'accumulent dans le sang et l'atteinte d'une concentration élevée peut engendrer des effets indésirables comme une anesthésie prolongée ou des effets toxiques. En somme, les changements liés au vieillissement et les effets indésirables de la combinaison de kétamine et xylazine sont responsables d'une durée anesthésiques plus longues chez les rats âgés.

Pour la deuxième hypothèse, étant donné les effets connus du vieillissement sur les fonctions hépatique et rénale se résultant en une altération de la pharmacocinétique des drogues, nous pensions que le temps d'anesthésie des rats augmenterait avec l'âge. Nous nous attendions une augmentation des AUC des deux molécules, une diminution de leur clairance et une augmentation de leur temps de demi-vie. Lors de notre expérimentation, la durée d'anesthésie de tous les groupes a été supérieure à celle du groupe de 3 mois. Tous les paramètres évalués concordaient avec notre hypothèse et une association avec une réduction d'activité des enzymes hépatiques du CYP 450, plus précisément les CYP3A, pourrait expliquer ces observations. Une baisse significative de la clairance est démontrée par un temps de réveil prolongé chez les vieux rats suivant une anesthésie de kétamine-xylazine. La concentration maximale obtenue d'une drogue est largement utilisée pour déterminer l'efficacité et la toxicité des médicaments, en se référant sur sa fenêtre thérapeutique. Une augmentation du temps d'exposition de l'animal à des concentrations thérapeutiques, combinée à une augmentation significative de l'AUC suggère qu'une toxicité de KX pourrait se produire si on utilise une concentration plus élevée de médicaments chez les rats âgés (Giroux et al. 2015).

Par ailleurs, le vieillissement par son effet délétère sur les fonctions rénale ou hépatique, peut moduler l'excrétion des drogues par ces organes. Dans notre étude, la biochimie autant que les examens histopathologiques, n'ont pas démontré des altérations sur ces organes et ainsi, offrent peu d'information sur les changements physiologiques observés lors de l'administration de KX. Aucun changement dégénératif ne fut noté sur les reins, le foie, les poumons et le cœur des animaux. Étant donné que le prélèvement sanguin pour la biochimie a été pris sous anesthésie, certains paramètres présentent des changements exprimés autant par le vieillissement que par la combinaison de kétamine-xylazine. Les concentrations de glucose augmentent avec l'âge et sont un peu au-dessus de la normale chez les rats de 12 mois et haute chez les rats de 18 mois. Cependant, la xylazine est connue pour être une molécule hyperglycémiant, suite à une administration prolongée (Dittmar et al., 2004; Simpson, 1997 ; Veilleux-Lemieux et al., 2013). Les concentrations de créatinine augmentent également avec l'âge, mais restent toutefois dans les limites

normales. Avec une urée augmentée pour tous les groupes et une concentration de créatinine normale, les résultats suggèrent peut-être un début d'une maladie rénale sous clinique, mais l'histopathologie ne relève aucune lésion chez les vieux rats. Cependant, les CYP 450 rénaux sont également impliqués dans le métabolisme des drogues. Ceux-ci sont possiblement affectés ou saturés, tout comme les enzymes hépatiques, d'où l'augmentation de la durée d'anesthésie et l'observance d'une diminution de la clairance. De plus, une azotémie pré-rénale ne peut être exclue, se traduisant par une déshydratation, une hypovolémie ou une maladie cardiaque. Une ALT augmentée pour les 3, 6, 12 et 18 mois peut indiquer un effet adverse d'une diète riche en gras, et ce, sur le long terme, mais celle-ci est également augmentée avec une anesthésie KX. La kétamine et la xylazine sont deux molécules qui se lient à l'ALB. La faible concentration plasmatique d'ALB observée chez tous les groupes augmente la fraction non liée de la KX dans le compartiment sanguin, ce qui pourrait également expliquer la longue récupération anesthésique des rats (Dayton et al., 1983). Il est courant d'observer une hypoalbuminémie ainsi qu'une hypoprotéinémie lors d'anesthésie, reflétant un effet sur le métabolisme hépatique, et ce, même sans lésion (Meyer & Fish, 2008).

Une anesthésie sans complications et un réveil rapide sont des éléments essentiels pour promouvoir des procédures adéquates favorisant de meilleurs résultats de recherche. Il est donc primordial d'avoir un protocole anesthésique judicieux pour l'espèce utilisée, et ajustée pour le protocole expérimental. Selon les résultats obtenus dans notre étude, la combinaison de kétamine-xylazine était appropriée pour les groupes 3 à 12 mois, mais pas pour les 18 mois. Ceci suggère que des ajustements des doses doivent être envisagés pour les rats vieillissants. Plusieurs autres substances sont métabolisées par les CYP450, donc il serait fort probable que leur métabolisme soit également affecté. Les changements dégénératifs observés chez les rats ont des répercussions majeures sur les protocoles anesthésiques déjà instaurés et des conséquences très importantes pourraient survenir suite à une administration de drogues, autre que la kétamine et la xylazine. De plus, les effets adverses que procure la combinaison KX telle que la bradycardie, l'hypotension et l'hypoventilation sont néfastes pour l'animal. L'addition de ces effets secondaires aux

effets du protocole expérimental ou à une condition sous-jacente déjà présente chez l'animal amplifie ainsi le degré de sévérité des conséquences.

Ainsi, pour assurer une interprétation plus juste de nos résultats, il aurait été intéressant de poursuivre des analyses supplémentaires, pour permettre de mieux interpréter les différentes transformations observables. L'utilisation d'appareillage spécialisé, telle qu'un capnographe ou un électrocardiographe, nous aurait permis de faire une analyse plus précise ou comparative en ce qui concerne les fréquences cardiaque et respiratoire, la dernière étant évaluée visuellement. L'oxymètre de pouls, qui mesure à la fois la fréquence cardiaque et la saturation d'oxygène, comprend plusieurs avantages : la technique est moins invasive et rapide, en plus d'être peu dispendieuse. Cependant, certaines limitations ont été documentées par Mendelson (1992) tel que lors d'hypothermie, d'hypotension ou de vasoconstriction, les signaux émis pouvant être trop faibles pour être captés par l'oxymètre de pouls.

Les données de pharmacocinétique de KX nous ont permis de déceler une altération dans le métabolisme des drogues puisque les concentrations plasmatiques étaient plus grandes chez les vieux rats suite à leur administration. Toutefois, une analyse des cytochromes 450 hépatiques se serait avérée très utile pour quantifier la capacité enzymatique du métabolisme de ces molécules. Le vieillissement occasionne des changements enzymatiques faisant en sorte que ceux-ci n'accomplissent pas leur fonction de manière efficace et, pour cette raison que la concentration plasmatique des drogues est en croissance continue chez les animaux gériatriques. De plus, sachant que la kétamine, lors de son métabolisme, est transformée en son métabolite actif la norkétamine, il serait intéressant de quantifier la présence de cette dernière dans le compartiment sanguin pour supporter l'existence d'une altération métabolique et mieux expliquer les altérations anesthésiques en fonction de l'âge des animaux. Bien que le foie soit considéré comme le principal organe pour le métabolisme des médicaments, le rein et le cerveau sont des sites importants du métabolisme extra-hépatique. Certaines études ont montré que le vieillissement diminue significativement les microsomes rénaux CYP450 et l'activité

réductase NADPH, ce qui pourrait contribuer à une anesthésie de plus longue durée si les concentrations sanguines des drogues sont augmentées (Hard & Alden, 1994).

Un prélèvement sanguin pour la biochimie, et ce, avant l'anesthésie de KX aurait permis une analyse plus sensible des paramètres évalués. Les résultats biochimiques ne nous permettaient pas de préciser l'origine de ces changements, oscillant entre le vieillissement ou l'effet de l'anesthésie. L'addition de données pré-anesthésiques aurait permis de valider l'exactitude des valeurs obtenues. Si on soupçonne un désordre du métabolisme de la kétamine et de la xylazine, une collection et une analyse des concentrations de drogues dans l'urine auraient pu évaluer la fraction d'extraction des drogues ainsi que certains paramètres comme l'albumine. Cette dernière peut aussi provenir d'un désordre de production au niveau du foie. Une densité urinaire aurait pu également nous indiquer un problème rénal en corrélation avec les paramètres biochimiques observés. Une augmentation de l'excrétion quotidienne de protéines a été rapportée dans la plupart des études portant sur des rats nourris *ad libitum*, entraînant une protéinurie marquée chez les animaux sénescents, suggérant une insuffisance rénale (Haley & Bulger, 1983).

Avec le vieillissement et l'inflammation chronique, il existe une altération de la barrière hémato-encéphalique la rendant moins perméable à certaines molécules, causée par une dysfonction des pompes à efflux, par exemple la glycoprotéine P (Veilleux-Lemieux et al., 2012). Cela signifie que la capacité d'un hôte à expulser certains médicaments hors du cerveau pourrait être diminuée de manière significative. Conséquemment, le cerveau est plus vulnérable aux effets prolongés de ces molécules (Krinke & Eisenbrandt, 1994). Les altérations de la barrière hémato-encéphalique avec le vieillissement peuvent donc être responsables d'une prolongation de l'anesthésie (Salkeni et al., 2009). D'autres études évaluant la biodisponibilité de la kétamine et de xylazine dans le tissu cérébral devraient être menées pour vérifier cette hypothèse.

Plusieurs facteurs dont les changements physiologiques et biochimiques ainsi que le sexe, la génétique des animaux, la variabilité interindividuelle, la nutrition et voir même l'environnement peuvent faire varier la pharmacocinétique des drogues (Struck et al.,

2012). De plus, puisque les rats augmentent leurs dépôts graisseux lors du vieillissement, généralement au détriment de la masse musculaire, les temps de rétention des médicaments liposolubles sont souvent prolongés (Schmucker & Wang, 1980). Avec tous ces éléments non négligeables, plusieurs études complémentaires seront nécessaires afin de comprendre les interactions complexes du métabolisme des drogues avec le vieillissement des animaux. En ce qui concerne les protocoles anesthésiques, plusieurs autres agents doivent inévitablement avoir un métabolisme altéré, et ainsi, de nombreuses répercussions s'observeront lors de l'anesthésie chez les animaux âgés, peu importe l'espèce. Il est toutefois difficile d'extrapoler nos résultats obtenus sur les diverses espèces utilisées en recherche en raison de leurs différences morphologie et métabolisme, donc d'autres études devront se mettre en place pour valider ces hypothèses. La recherche ne cesse de s'approfondir dans les connaissances et la technologie se développe très rapidement. L'avancement de certains projets d'études permettra d'élucider certaines incompréhensions sur le fonctionnement de l'organisme et de promouvoir une qualité de vie meilleure pour ces modèles animaux.

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de démontrer que le vieillissement occasionne des changements sur les paramètres physiologiques, pharmacologiques et biochimiques lors d'une anesthésie de kétamine et de xylazine chez les rats Sprague-Dawley. Un réveil post-opératoire rapide, et sans séquelle, est de mise chez les animaux de laboratoire pour atteindre les meilleurs résultats possibles pour tout projet de recherche. Les résultats de ce présent projet confirment que le vieillissement cause une augmentation de la concentration plasmatique des drogues, ce qui s'illustre par une plus longue durée d'anesthésie et un réveil plus tardif chez les vieux animaux. Pour les rats plus âgés, il serait valable de réviser les protocoles anesthésiques utilisés pour limiter les complications post-anesthésiques et ainsi leur procurer un réveil plus rapide.

Les modèles animaux sont constamment en révision de nouvelles compétences, soit en raffinant leur génétique ou en développant différentes maladies pour mieux comprendre leur fonctionnement. Ceci étant dit, il serait souhaitable d'être sensible aux divers protocoles anesthésiques chez les espèces utilisées afin d'assurer une meilleure récupération, par exemple en évaluant les paramètres physiologiques. Le domaine des animaux de laboratoire est en constante évolution, les résultats de recherche se doivent d'être à la fine pointe, donc l'utilisation appropriée d'agents anesthésiques devrait suivre le même envol.

RÉFÉRENCES

Aiello, S.E. et Moses, M.A. 2013. The Merck Veterinary Manual. Repéré à <http://www.merckmanuals.com/vet/index.html>.

Anver, M.R. et Cohen, B.J. (1979). Lesions Associated with Aging. Dans Baker , H.J., Lindsey, J.R. et Weisbroth, S.H., *The laboratory Rat* (Volume I, p. 377-399). New York , USA : Academic Press.

Ashcroft, A.E. 2013. An Introduction to Mass Spectrometry. Repéré à <http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>.

Avsaroglu, H., Van der Sar, A.S., Van Lith, H.A., Van Zutphen, L.F. et Hellebrekers, L.J. (2007). Differences in response to anaesthetics and analgesics between inbred rat strains. *Lab Anim*, 1, 337-344.

Badyal, D.K. et Dadhich, A.P. (2001). Cytochrome P450 and Drug Interactions. *Indian J Pharmacol*, 33, 248-259.

Baldwin, M.A. (2005). Mass Spectrometers for the Analysis of Biomolecules. *Methods Enzymol*, 402, 3-48.

Barthold, S.W. (1979). Chronic Progressive Nephropathy in Aging Rats. *Toxicol Path*, 7 (1), 1-6.

Begg, D.P., Sinclair, A.J. et Weisinger, R.S. (2012). Reductions in water and sodium intake by aged male and female rats. *Nutrition Res*, 32, 865–872.

Belmin, J., Corman, B., Merval, R. et Tedgui, A. (1993). Age-related changes in endothelial permeability and distribution volume of albumin in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 264, H679-H685.

Benet, L.Z. (1984). Pharmacokinetic parameters: which are necessary to define a drug substance? *Eur J Resp Dis Suppl*, 134, 45-61.

Bengele, H.H., Mathias, R.S., Perkins, J.H. et Alexander, E.A. (1980). Urinary concentrating defect in the aged rat. *Am J Physiol Renal Physiol*, 240, F147-F150.

Berg, B.N. (1965). Spontaneous Nephrosis, with Proteinuria, Hyperglobulinemia, and Hypercholesterolemia in the Rat. *Exp Biol Med*, 119, 417-420.

Berlin, M. et Wallace, R.B. (2007). Aging and the Central Nervous System. *Experimental Aging Research: An International Journal Devoted to the Scientific Study of the Aging Process*, 2(2), 125-164.

Bolton, W.K. et Sturgill, B.C. (1980). Spontaneous Glomerular Sclerosis in Aging Sprague-Dawley Rats. *Am J Pathol*, 98, 339-356.

Boos, C.J. et Lip, G.Y.H. (2006). Is Hypertension an Inflammatory Process? *Curr Pharm Design*, 12, 1623-1635.

Bruunsgaard, H., Skinhoj, P., Pedersen, A.N., Schroll, M. et Pedersen, B.K. (2000). Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol*, 121, 255-260.

Burek, J.D. et Hollander, C.F. (1980). Experimental Gerontology. Dans Baker, H.J., Lindsesy, J.R. et Weisbroth, S.H. *The Laboratory Rat* (Volume II, p. 149-159). New York, USA : Academic Press.

Capponi, L., Schmitz, A., Thormann, W., Theurillat, R. et Mevissen, M. (2009). In vitro evaluation of differences in phase 1 metabolism of ketamine and other analgesics among humans, horses, and dogs. *Am J Vet Res*, 70, 777-786.

Castel, A., Hélie, P., Beaudry, F. et Vachon, P. (2013). Bilateral central pain sensitization in rats following a unilateral thalamic lesion may be treated with high doses of ketamine. *Vet Res*, 9, 59.

Castel, A., et Vachon, P. (2014). Gabapentin reverses central pain sensitization following a collagenase-induced intrathalamic hemorrhage in rats. *J Pain Res*, 7, 5-12.

Castro Alves, H.N., da Silva, A.L., Olsson, I.A., Orden, J.M. et Antunes, L.M. (2010). Anesthesia with intraperitoneal propofol, medetomidine, and fentanyl in rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 49, 454-459.

Chapman, C.R. et Nakamura, Y. (1999). A passion of the soul: An introduction to pain for consciousness researchers. *Conscious Cogn*, 8, 391-422.

Chung, E.Y. et Yoon, J.R. (2008). Ketamine potentiates neurotoxicity in obese mice. *Korean J Anesthesiol*, 55(4), 473-478.

Corman, B.J. et Michel, J.B. (1987). Glomerular filtration, renal blood flow, and solute excretion in conscious aging rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 253, 555-560.

Corman, B.J. et Owen, R.A. (1994). Normal Development, Growth, and Aging of the Kidney. Dans Mohr, U., Dungworth, D.L. et Capen, C.C. *Pathobiology of the Aging Rat* (Volume 1, p. 195-209). Washington DC, USA : ILSI Press.

Covey, T.R., Lee, E.D. et Henion, J.D. (1986). High-speed Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Drugs in Biological Samples. *Analyt Chem*, 58 (12), 2453-2460.

Craven, R. (2007). Ketamine. *Anaesthesia*, 1, 48-53.

Cuvellier, S. (2012). *DMV3132 - Anesthésie, analgésie et réanimation vétérinaire*. Recueil inédit, Université de Montréal.

Dallmann, R., Steinlechner, S., von Hörsten, S. et Karl, T. (2006). Stress-induced hyperthermia in the rat: comparison of classical and novel recording methods. *Lab Anim*, 40, 186-193.

Davison, K.E., Hughes, J.M., Gormley, E., Lesellier, S., Costello, E. et Corner, L.A. (2007). Evaluation of the anaesthetic effects of combinations of ketamine, medetomidine, romifidine and butorphanol in European badgers (*Meles meles*). *Vet Anaesth Analg*, 34, 394-402.

Dayton, P.G., Stiller, R.L., Cook, D.R., et Perel, J.M. (1983). The binding of ketamine to plasma proteins: emphasis on human plasma. *Eur J Clin Pharmacol*, 24, 825-831.

de Groot, J. et Sontheimer, H. (2011). Glutamate and the biology of gliomas. *Glia*, 59, 1181-1189.

Delp, M.D., Evans, M.V. et Duan, C. (1998). Effects of aging on cardiac output, regional blood flow, and body composition in Fischer-344 rats. *J Appl Physiol*, 85, 1813-1822.

De Marco, G.J. et Pascoe, P.J. (2008). Anatomy, Physiology and Effects of Pain. Dans Fish, R.E., Brown, M.J., Danneman, P.J. et Karas, A.Z. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals* (p. 10-12). San Diego, USA : Academic Press.

Diaz, M. et Becker, D.E. (2010). Thermoregulation: physiological and clinical considerations during sedation and general anesthesia. *Anesth Prog*, 57, 25-32.

Dittmar, M.S., Fehm, N.P., Vatankhah, B. et Horn, M. (2004). Ketamine/xylazine anesthesia for radiologic imaging of neurologically impaired rats: dose response, respiratory depression, and management of complications. *Comp Med*, 54, 652-655.

Domon, B. et Aebersold, R. (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, 312, 212-217.

El-Rahim, A.H.A., Alam, S.S. et El Raouf, A.A. (2012). Genetic and biochemical studies on hepatocytes of young and old heat-stressed rats. *J Arab Soc Med Res*, 7, 78-85.

Fabre, J. et Balant, L. (1976). Renal failure, drug Pharmacokinetics and drug action. *Clin Pharmacokinet*, 1, 99-120.

Fish, R.E., Brown, M.J., Danneman, P.J. et Karas, A.Z. (2008) *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. San Diego, USA : Academic Press.

Fitzgibbon, E.J., Hall, P., Schroder, C., Seely, J. et Viola, R. (2002). Low dose ketamine as an analgesic adjuvant in difficult pain syndromes: a strategy for conversion from parenteral to oral ketamine. *J Pain Symptom Manage*, 23, 165-170.

Flecknell, P.A. (1996). *Laboratory animal anaesthesia*. London: Academic Press.

Folkow, B. et Svanborg, A. (1993). Physiology of cardiovascular aging. *Physiol Rev*, 73(4), 725-769.

Fourcade, O., Geeraerts, T., Minville, V. et Samii, K. (2014). *Traité d'Anesthésie et de Réanimation* (4e Éd., p. 107). Lavoisier, Paris: Médecine Sciences Publications.

Fujisawa, K. (1994). Aging of Spinal Ganglion Neuron. Dans Mohr, U., Dungworth, D.L. et Capen, C.C. *Pathobiology of the Aging Rat* (Volume 2, p. 21-34). Washington DC, USA : ILSI Press.

Gabrielsson, J. et Weiner, D. (2012). Non-compartmental analysis. *Methods Mol Biol*, 929, 377-389.

Gaertner, D.J., Hallman, T.M., Hankenson, F.C. et Batchelder, M.A. (2008). Anesthesia and Analgesia for Laboratory Rodents. Dans: Fish, R.E., Brown, M.J., Danneman, P.J. et Karas, A.Z. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals* (2^e éd., p. 240-282). San Diego : Academic Press.

Ghosh, S. (2012). Introduction to Pain, religion and Analgesia. Dans: Ghosh, S. Repéré à <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/pain-in-perspective/introduction-to-pain-religion-and-analgesia>.

Gilmer, L.K., Ansari, M.A., Roberts, K.N. et Scheff, S.W. (2010). Age-related changes in mitochondrial respiration and oxidative damage in the cerebral cortex of the Fischer 344 rat. *Mech Ageing Dev*, 131, 133-143.

Giroux, M.C., Hélie, P., Burns, P. et Vachon, P. (2015). Anesthetic and pathological changes following high doses of ketamine and xylazine in Sprague Dawley rats. *Exp Anim*, 64(30), 253-260.

Golan, D.E., Tashjian, A.H., Armstrong, E.J. et Armstrong, A.W. (2010). *Principles of pharmacology* (3e éd., p. 176-177-261). Philadelphie, USA : Lippincott Williams & Wilkins.

Green, C.J., Knight, J., Precious, S. et Simpkin, S. (1981). Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10-year experience. *Lab Anim*, 15, 163-170.

Grubb, T.L., Muir, W.W., Bertone, A.L., Beluche, L.A. et Garcia-Calderon, M. (1997). Use of yohimbine to reverse prolonged effects of xylazine hydrochloride in a horse being treated with chloramphenicol. *J Am Vet Med Assoc*, 210, 1771-1773.

Hacker, S.O., White, C.E. et Black, I.H. (2005). A comparison of target-controlled infusion versus volatile inhalant anesthesia for heart rate, respiratory rate, and recovery time in a rat model. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 44, 7-12.

Hajjighahramani, S., Vesal, N. (2007). Evaluation of several drug combinations for intraperitoneal anaesthesia in adult male rats. *Iranian J Vet Res Univ Shiraz*, 8(2), 106-115.

Haley, D.P., Bulger, R.E. (1983). The aging male rat : Structure and function of the kidney. *Am J Anat*, 1(67), 1-13.

Hard, G.C. et Alden, C.L. (1994). Susceptibility of the Kidney to Toxic Substances. Dans Mohr, U., Dungworth, D.L. et Capen, C.C. *Pathobiology of the Aging Rat* (Volume 1, p. 241-257). Washington DC, USA : ILSI Press.

He, S., Atkinson, C., Qiao, F., Chen, X. et Tomlinson, S. (2010). Ketamine-Xylazine-Acepromazine Compared with Isoflurane for Anesthesia during Liver Transplantation in Rodents. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 49, 45-51.

Heard, D.J. (2004) Anesthesia, Analgesia and Sedation of Small Mammals. Dans Quesenberry, K.E., Carpenter, J.W. *Ferrets, Rabbits and Rodents Clinical Medicine and Surgery* (2e éd., p. 356-369). Philadelphia, USA : Saunders.

Hedenqvist, P. (2008). *Anaesthesia and analgesia for surgery in rabbits and rats: A comparison of the effects of different compounds*. (Thèse de doctorat (Ph.D.), Karolinska Institutet, Suède). Repéré à <http://www.metris.nl/media/documents/laboras/Publications/2008%20Hedenqvist%20Anaesthesia%20and%20Analgesia%20in%20rats%20compound%20comparison.pdf>.

Heydappour, F. (2008). The effect of hypernatraemia on ketamine anaesthesia in male rats. *Iranian J Vet Res Shiraz Univ*, 9 (2), 162-167.

Heymes, C., Swynghedauw, B. et Chevalier, B. (1994). Activation of angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme gene expression in the left ventricle of senescent rats. *Circulation*, 90:1328-1333.

Hildebrandt, I.J., Su, H. et Weber, W.A. (2008). Anesthesia and other considerations for in vivo imaging of small animals. *ILAR J*, 49, 17-26.

Irisarri, E. et Hollander, C.F. Aging of the Liver. Dans Mohr, U., Dungworth, D.L. et Capen, C.C. *Pathobiology of the Aging Rat* (Volume 2, p. 341-349). Washington DC, USA : ILSI Press.

Jang, G.R., Harris, R.Z. et Lau, D.T. (2001). Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery research. *Med Res Rev.*, 21(5), 382-396.

Jemal, M. (2000). High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. *Biomed Chromatogr*, 14(6), 422-429.

Jenkins, A., Lobo, I.A., Gong, D., Trudell, J.R., Solt, K., Harris, R.A. et Eger II, E.I. (2008). General Anesthetics Have Additive Actions on Three Ligand Gated Ion Channels. *Int Anesth Res Soc*, 107(2), 486-493.

Karwacki, Z., Kowianski, P. et Morys, J. (2001). General anaesthesia in rats undergoing experiments on the central nervous system. *Folia Morphol*, 60(4), 235-242.

Kato, R. et Takanaka, A. (1968). Metabolism of Drugs in Old Rats (I) Activities of NADPH-Linked Electron Transport and Drug-Metabolizing Enzyme Systems in Liver Microsomes of Old Rats. *Jap J Pharm*, 18, 381-388.

King, R.H.M. Changes in the Peripheral Nervous System. Dans Mohr, U., Dungworth, D.L. et Capen, C.C. *Pathobiology of the Aging Rat* (Volume 2, p. 35-53). Washington DC, USA : ILSI Press.

Knobloch, M., Portier, C.J., Levionnois, O.L., Theurillat, R., Thormann, W., Spadavecchia, C. et Mevissen, M. (2006). Antinociceptive effects, metabolism and disposition of ketamine in ponies under target-controlled drug infusion. *Toxicol Appl Pharmacol*, 216, 373-386.

Kohn, F.D. et Clifford, C.B. (2002). Biology and Disease of Rats. Dans Fox, J.G., Anderson, L.C., Franklin, M.L. et Quimby, F.W. *Laboratory Animal Medicine* (3e éd., p. 121-158.). New York, USA: Elsevier Science.

Krinke, G.J. et Eisenbrandt, D.L. (1994). Nonneoplastic Changes in the Brain. Dans Mohr, U., Dungworth, D.L. et Capen, C.C. *Pathobiology of the Aging Rat* (Volume 2, p. 3-19). Washington DC, USA : ILSI Press.

Lei, H., Nwaigwe, C., Williams, C. et Dunn, J.F. (2001). Effects of Ketamine and Ketamine-Xylazine Anesthesia on Cerebral Blood Flow in Rat Observed Using Arterial Spin Tagging Perfusion Imaging. *Brain Res*, 913, 174-179.

Livingston, A., Chambers, P. (2000). The Physiology of Pain. Dans Flecknell, P. et Waterman-Pearson, A. *Pain Management in Animals* (1ère éd., p. 11-13). London : WB Saunders.

Loeb, W.F. et Carakostas, M.C. (1994). Changes in Serum Biochemistry. Dans Mohr, U., Dungworth, D.L. et Capen, C.C. *Pathobiology of the Aging Rat* (Volume 1, p. 7-13). Washington DC, USA : ILSI Press.

Longley, L.A. (2008). *Anaesthesia of Exotic Pets* (1ère éd.). London : Saunders Elsevier.

Lu, S.K., Callahan, S.M. et Brunner, L.J. (2003). Suppression of Hepatic CYP3A1/2 and CYP2C11 by Cyclosporine Is Not Mediated by Altering Growth Hormone Levels. *JPET* 305, 331-337.

Majewski-Tiedeken, C.R., Rabin, C.R. et Siegel, S.J. (2008). Ketamine exposure in adult mice leads to increased cell death in C3H, DBA2 and FVB inbred mouse strains. *Drug Alcohol Depend*, 92, 217-227.

Makoid, M.C., Vuchetich, P.J. (2013). Basic Pharmacokinetics. Repéré à <http://nova-transnet.com/zonanova/downloads/documentos/Basic%20Pharmacokinetics.pdf>.

Mendelson, Y. (1992). Pulse oximetry: theory and applications for noninvasive monitoring. *Clin Chem*, 38, 1601-1607.

Meyer, R.E. et Fish, R.E. (2008). Pharmacology of Injectable Anesthetics, Sedatives, and Tranquilizers. Dans Fish, R.E., Brown, M.J., Danneman, P.J. et Karas, A.Z.. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals* (1ère éd., p. 27-82). San Diego: Academic Press.

Millan, M.J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66, 355-4764.

Molony, V. et Kent, J.E. (1997). Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J Animal Sci*, 75, 266-272.

Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. et Seeburg, P.H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 256, 1217-1221.

Ongioco, R.R., Richardson, C.D., Rudner, X.L., Stafford-Smith, M. et Schwinn, D.A. (2000). Alpha2-adrenergic receptors in human dorsal root ganglia: predominance of alpha2b and alpha2c subtype mRNAs. *Anesthesiol*, 92, 968-976.

Ordodi, V.L., Mic, F.A., Mic, A.A., Toma, O., Sandesc, D. et Paunescu, V. (2005). A Simple Device for Invasive Measurement of Arterial Blood Pressure and ECG in the Anesthetized Rat. *Timisoara Med J*, 55(3), 235-237.

Ovsepyan, L.M., Kazaryan, G.S., Akopdzhanyan, A.A. et Lvov, M.V. (2013). Age-Dependent Changes in Phospholipid Content and Neutral Lipid Contents during Aging. *Adv Gerontol*, 3(1), 42-45.

Navarro, A. et Boveris, A. (2004) Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287, 1244-1249.

Pai, A. et Heining, M. Ketamine. (2007). *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 7(2), 59-63.

Papich, M.G. (2007). *Saunders Handbook of Veterinary Drugs* (2e éd., p. 351-352). St-Louis: Saunders Elsevier.

Percy, D.H. et Barthold, S.W. (2007). *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits* (3e éd., p. 161-169). Iowa, USA : Blackwell Publishing Professional.

Plumb, D.C. (2008). *Plumb's Veterinary Drug Handbook* (6e éd., p. 935-938). Iowa, USA : Blackwell Publishing Professional.

Richardson, C.A. et Flecknell, P.A. (2005). Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? *Altern Lab Anim*, 33, 119-127.

Rikan, L.E. et Bruce, A.N. (1982). Age-related changes in hepatic microsomal drug metabolism are substrate selective. *J Pharmacol Exp Therap*, 220 (3), 574-578.

Rodrigues, S.F., de Oliveira, M.A., Martins, J.O., Sannomiya, P., de Cássia Tostes, R., Nigro, D., Carvalho, M.H. et Fortes, Z.B. (2006). Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s.c. route. *Life Sci*, 79, 1630-1637.

Saha, J.K., Xia, J., Grondin, J.M., Engle, S.K., Jakubowski, J.A. (2005). Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp Biol Med*, 230, 777-784.

Salkeni, M.A., Lynch, J.L., Otamis-Price, T. et Banks, W.A. (2009). Lipopolysaccharide impairs blood-brain barrier P-glycoprotein function in mice through prostaglandin- and nitric oxide-independent pathways. *J Neuroimmune Pharmacol*, 4, 276-282.

Salonen, J.S. (1992). Chemistry and pharmacokinetics of the alpha2-adrenoreceptor agonist, Dans Short, C.E. et Van Poznak, A. *Animal Pain* (1ère éd., p. 191-200). New York, USA: Churchill Livingstone.

Sandhu, S.K. et Kaur, G. (2002). Alterations in oxidative stress scavenger system in aging rat brain and lymphocytes. *Biogerontol*, 3, 161-173.

Sauleau, P., Dragomir, S. et Kuchenbuch, M. Neurophysiology. Repéré à <https://sites.google.com/site/aphysionado/home/fonctionsn/somesthesie/nociception>

Schmucker, D.L. (1990). Hepatocyte Fine Structure During maturation and Senescence. *J Electron Microsc Tech*, 14, 106-125.

Schmucker, D.L. et Wang, R.K. (1980). Age-Related Changes in Liver Drug Metabolism: Structure vs Function. *Exp Biol Med*, 165, 178-187.

Sharp, P.E. et LaRegina, M.C. (1998). *The laboratory rat* (1ère éd., p. 6-11). Floride, USA : CRC Press.

Shibutani, M. (2000). Anesthesia, Artificial Ventilation and Perfusion Fixation. Dans Krinke, G.J. *The Laboratory Rat* (1ère éd., p. 512-514). San Diego : Academic Press.

Siller-Matula, J.M. et Jilma, B. (2008). Strain differences in toxic effects of long-lasting isoflurane anaesthesia between Wistar rats and Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol*, 46, 3550-3552.

Simpson, D.P. (1997). Prolonged (12 hours) intravenous anesthesia in the rat. *Lab Anim Sci*, 47, 519-523.

Singh, P., Pratap, K., Kinjavdekar, P., Aithal, H.P., Singh, G.R. et Pathak, R. (2006). Xylazine, ketamine and their combination for lumbar epidural analgesia in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 53, 423-431.

Song, G., Wu, H., Yoshino, K. et Zamboni, W.C. (2012). Factors affecting the pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposomal drugs. *J Liposome Res*, 22(3), 177-192.

Sotocinal, S.G., Sorge, R.E., Zaloum, A., Tuttle, A.H., Martin, L.J., Wieskopf, J.S., Mapplebeck, J.C., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J.J., King, O.D. et Mogil, J.S. (2011). The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*, 7, 55.

Srinivas, T.R., Meier-Kriesche, H.U. et Kaplan, B. (2005). Pharmacokinetic principles of immunosuppressive drugs. *Am J Transplant*, 5(2), 207-217.

St-Germain Lavoie, D., Pailleux, F., Vachon, P. et Beaudry, F. (2013). Characterization of xylazine metabolism in rat liver microsomes using liquid chromatography-hybrid triple quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. *Biomed Chromatograph*, 27, 882-888.

Stokes, E.L., Flecknell, P.A. et Richardson, C.A. (2009). Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. *Lab Anim*, 43, 149-154.

Stromberg, P.C. (1994). Changes in the Hematologic System. Dans Mohr, U., Dungworth, D.L. et Capen, C.C. *Pathobiology of the Aging Rat* (Volume 1, p. 15-24). Washington DC, USA : ILSI Press.

Struck, M.B., Andrutis, K.A., Ramirez, H.E. et Battles, A.H. (2011). Effect of a short-term fast on ketamine-xylazine anesthesia in rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 50, 344-348.

Sumitra, M., Manikandan, P., Rao, K.V., Nayeem, M., Manohar, B.M. et Puvanakrishnan, R. (2004). Cardiorespiratory effects of diazepam-ketamine, xylazine-ketamine and thiopentone anesthesia in male Wistar rats--a comparative analysis. *Life Sci*, 75(15), 1887-1896.

Swindle, M.M., Vogler, G.A., Fulton, L.K., Marini, R.P. et Popilskis, S. (2002). Preanesthesia, Anesthesia, Analgesia and Euthanasia. Dans Fox, J.G., Anderson, L.C., Franklin, M.L. et Quimby, F.W. *Laboratory Animal Medicine* (2e éd., p. 956-960). New York, USA : Elsevier Science.

Thurmon, J.C., Tranquilli, W.H. et Benson, G.J. (1996). Pharmacology : Preanesthetics and Anesthetic Adjuncts. Dans Thurmon, J.C., Tranquilli, W.H. et Benson, G.J. *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia* (3e éd., p. 183-209). Baltimore, USA : Lippincott Williams and Wilkins.

Tian, L., Cai, Q. et Wei, H. (1998). Alterations of Antioxidant Enzymes and Oxidative Damage to Macromolecules in Different Organs of Rats During Aging. *Free Rad Biol Med*, 24(9), 1477-1484.

Tortotici, M.A., Kochanek, P.M. et Poloyac, S.M. (2007). Effects of hypothermia on drug disposition, metabolism, and response: A focus of hypothermia-mediated alterations on the cytochrome P450 enzyme system. *Crit Care Med*, 35(9), 2196-204.

Tuma, R.F., Irion, G.L., Vasthare, U.S. et Heine, L.A. (1985). Age-related changes in regional blood flow in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 249, H485-H491.

Uchida, K., Nomura, Y., Kadowaki, M., Takase, H., Takano, K. et Takeuchi, N. (1978). Age-related changes in cholesterol and bile acid metabolism in rats. *J Lipid Res*, 19, 544-552.

Van Bezooijen, C.F. (1984). Influence of age-related changes in rodent liver morphology and physiology on drug metabolism - a review. *Mech Ageing Dev*, 25(1-2), 1-22.

Veilleux-Lemieux, D., Beaudry, F., Hélie, P. et Vachon, P. (2012). Effects of endotoxemia on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of ketamine and xylazine anesthesia in Sprague–Dawley rats. *Vet Med: Res Reports*, 3, 99-109.

Veilleux-Lemieux, D., Castel, A., Carrier, D., Beaudry, F. et Vachon P (2013). Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague-Dawley rats. *J Am J Lab Anim Sci*, 52, 567-570.

Wauthier, V. et Verbeeck, R.K. (2004). Age-related changes in the protein and mRNA levels of CYP2E1 and CYP3A isoforms as well as in their hepatic activities in Wistar rats. What role for oxidative stress? *Arch Toxicol*, 78, 131–138.

Whelan, G. et Flecknell, P.A. (1992). The assessment of depth of anesthesia in animals and man. *Lab Anim*, 26, 153-162.

Willis, W.D. et Westlund, K.N. (1997). Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol*, 14(1), 2-31.

Wixson, S.K., White, W.J., Hughes, H.C., Lang, C.M. et Marshall, W.K. (1987). The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats. *Lab Anim Sci*, 37, 736-742.

Zhang, X., Wub, J., Liub, H. et Zhang, X. (2013). Age- and gender-related metabonomic alterations in striatum and cerebellar cortex in rats. *Brain Res*, 1507, 28–34.

