

Université de Montréal

Optimisation de l'anesthésie du lapin (*Oryctolagus cuniculus*)
par l'application des principes du *Enhanced Recovery After Surgery* (ERAS)

Par

Frédéric Rousseau-Blass

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires, option sciences cliniques

Décembre 2020

© Frédéric Rousseau-Blass, 2020

Université de Montréal

Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Optimisation de l'anesthésie du lapin (*Oryctolagus cuniculus*)
par l'application des principes du *Enhanced Recovery After Surgery* (ERAS)**

Présenté par

Frédéric Rousseau-Blass

A été soumis à un jury composé des personnes suivantes

Éric Troncy

Président-rapporteur

Daniel Pang

Directeur de recherche

Claire Grosset

Codirectrice

Javier Benito

Membre du jury

Résumé

L'adaptation des principes ERAS à l'anesthésie du lapin pourrait améliorer leur taux de mortalité périopératoire élevé. Le développement d'un protocole IM réversible pourrait raccourcir le réveil et diminuer les complications. Les objectifs de ce mémoire sont 1) d'investiguer la relation entre l'administration d'oxygène et la ventilation et 2) de définir les paramètres PK-PD du midazolam IV midazolam et son antagoniste flumazénil chez le lapin.

Dans une étude prospective, randomisée, à l'aveugle, 25 lapins de Nouvelle-Zélande (4 mâles, 21 femelles ; 3,1–5,9 kg ; 1 an) ont été anesthésiés avec l'alfaxalone (4 mg/kg), dexmédétomidine (0,1 mg/kg) et midazolam (0,2 mg/kg) IM et randomisés à attendre 5 ($n = 8$) ou 10 ($n = 17$) minutes entre l'injection anesthésique et l'administration d'oxygène (100%) ou air médical (masque, 1 L/minute). Avant ($PRE_{oxy/air}5/10$) et 2 minutes après l'oxygène ou l'air médical ($POST_{oxy/air}5/10$), la fréquence respiratoire (f_R), pH, $PaCO_2$, PaO_2 ont été investigués. L'hypoxémie ($PaO_2 < 88$ mmHg) était présente à tous les temps PRE : $PRE_{oxy}5$ [71 (61–81) mmHg] ; $PRE_{oxy}10$ [58 (36–80) mmHg] et $PRE_{air}10$ [48 (32–64) mmHg]. L'hypoxémie a persisté avec l'air médical : $POST_{air}10$ [49 (33–66) mmHg]. L'administration d'oxygène a corrigé l'hypoxémie, mais était associée avec une diminution de f_R ($> 70\%$; $p = 0,016$, deux groupes) et de l'hypercapnie ($p = 0,016$, deux groupes). f_R restait inchangé avec l'air médical ($p = 0,5$). $PaCO_2$ était plus élevé avec l'oxygène que l'air ($p < 0,001$). L'administration d'oxygène précoce a résolu l'hypoxémie liée à l'anesthésie, mais a empiré l'hypoventilation démontrant que la stimulation respiratoire hypoxique est un facteur important contribuant à la ventilation lorsque ce protocole anesthésique est utilisé.

Dans une étude prospective, randomisée, à l'aveugle et croisé, 15 lapins de Nouvelle-Zélande (7 mâles, 8 femelles ; 2,73 – 4,65 kg ; 1 an) ont reçu midazolam IV (1,2 mg/kg) à T0 suivi de flumazénil IV (FLU ; 0,05 mg/kg) ou saline (SAL ; même volume) pour renverser la perte du réflexe de redressement (LORR). Le traitement (FLU/SAL) était injecté 30 secondes après LORR. L'échantillonnage sanguin artériel était analysé avec la technique de chromatographie liquide/spectrométrie de masse. Le temps pour le retour du réflexe de redressement (ReRR) était analysé. Demi-vie, clairance plasmatique and volume de distribution du FLU étaient 26,3 min [95%CI : 23,3–29,3], 18,74 mL/min/kg [16,47–21,00] et 0,63 L/kg [0,55–0,71], respectivement. ReRR était 25 fois plus rapide pour FLU (23 [8–44] secondes) versus SAL (576 [130–1141] secondes ; $p < 0,001$, 95%CI [425–914 secondes]). Le retour de la sédation (LORR) était présent dans les deux groupes (4/13 FLU ; 7/13 SAL) à 1540 [858–2328] secondes. Le flumazénil a rapidement antagonisé la sédation du midazolam. Cependant, le potentiel de resédation après l'utilisation du flumazénil nécessite une surveillance accrue durant la période de réveil.

Abbréviations : ERAS, *Early Recovery after surgery*; PK-PD, pharmacocinétique-pharmacodynamique; IM, intramusculaire; IV, intraveineux; f_R , fréquence respiratoire; $PRE_{oxy/air}$, avant l'administration d'oxygène ou d'air médical; $POST_{oxy/air}$, 2 minutes après l'administration d'oxygène ou d'air médical; FLU, flumazénil; SAL, saline; LORR, perte du réflexe de redressement.

Mots-clés : lapin, anesthésie, *Early Recovery After Surgery* (ERAS), flumazénil, réflexe de redressement, pré-oxygénation, hypoxémie, gaz sanguin

Abstract

Adapting ERAS guideline principles to rabbit anesthesia could improve their risk of perioperative mortality which remains elevated. The development of a reversible IM protocol could hasten recovery and decrease complications. The objectives of this thesis were 1) to investigate the relationship between oxygen administration and ventilation, 2) to define PK-PD parameters of IV midazolam and its antagonist flumazenil in rabbits.

In a prospective, randomized, blinded study, 25 New Zealand White rabbits (4 males, 21 females; 3.1–5.9 kg; 1 year old) were anesthetized with IM alfaxalone (4 mg/kg), dexmedetomidine (0.1 mg/kg) and midazolam (0.2 mg/kg) and randomized to a 5 ($n = 8$) or 10 ($n = 17$) minutes waiting period between drug injection and oxygen (100%) or medical air administration (facemask, 1 L/minute). Immediately before (PRE_{oxy/air}5/10) and 2 minutes after oxygen or medical air (POST_{oxy/air}5/10), respiratory rate (f_R), pH, PaCO₂, PaO₂ were investigated. Hypoxemia (PaO₂ < 88 mmHg) was observed at all PRE times. PRE_{oxy}5 [71 (61–81) mmHg]; PRE_{oxy}10 [58 (36–80) mmHg] and PRE_{air}10 [48 (32–64) mmHg]. Hypoxemia persisted when breathing air: POST_{air}10 [49 (33–66) mmHg]. Oxygen administration corrected hypoxemia but was associated with decreased f_R (> 70%; $p = 0.016$, both groups) and hypercapnia ($p = 0.016$, both groups). f_R was unchanged breathing air ($p = 0.5$). PaCO₂ was higher when breathing oxygen than air ($p < 0.001$). Early oxygen administration resolved anesthesia-induced hypoxemia, but worsened hypoventilation indicating that hypoxic respiratory drive is an important contributor to ventilation using the studied drug combination.

In a prospective, randomized, blinded, crossover study, 15 New Zealand White rabbits (7 males, 8 females; 2.73 – 4.65 kg, 1 year old) received IV midazolam (1.2 mg/kg) followed by IV flumazenil (FLU; 0.05 mg/kg) or saline control (SAL; equal volume) to reverse loss of righting reflex (LORR). Midazolam was injected (T0). Treatment (FLU/SAL) injected 30 seconds after LORR. Arterial blood samples were collected and analyzed using liquid chromatography/mass spectrometry. Time to return of righting reflex (ReRR) compared between groups. FLU terminal half-life, plasma clearance and volume of distribution were 26.3 min [95%CI: 23.3–29.3], 18.74 mL/min/kg [16.47–21.00] and 0.63 L/kg [0.55–0.71], respectively. ReRR was 25 times faster in FLU (23 [8–44] seconds) versus SAL (576 [130–1141] seconds; $p < 0.001$, 95%CI [425–914 seconds]). Return of sedation (LORR) occurred in both groups (4/13 in FLU; 7/13 in SAL) at 1540 [858–2328] seconds. Flumazenil quickly and reliably reversed sedation from midazolam injection. However, the potential re-sedation after flumazenil administration warrants careful monitoring in the recovery period.

Abbreviations: ERAS, Early Recovery after surgery; PK-PD, pharmacokinetic-pharmacodynamic; IM, intramuscular; IV, intravenous; f_R , respiratory rate; PRE_{oxy/air}, before oxygen or medical air administration; POST_{oxy/air}, 2 minutes after oxygen or medical air administration; FLU, flumazenil; SAL, saline; LORR, loss of righting reflex.

Keywords: rabbit, anesthesia, Early Recovery After Surgery (ERAS), flumazenil, righting reflex, pre-oxygenation, hypoxemia, blood gas

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux	7
Liste des figures	8
Liste des sigles et abréviations	9
Remerciements.....	10
Chapitre 1 – Revue de littérature	11
1. Introduction.....	11
2. Historique du <i>Early Recovery After Surgery</i> (ERAS).....	12
3. Les concepts du ERAS en anesthésie.....	13
4. Les concepts du ERAS en médecine vétérinaire.....	15
5. L’anesthésie chez le lapin	16
6. Démarche scientifique et résultats préliminaires	18
6.1 Projet pilote phase 1	18
6.2 Projet pilote phase 2.....	19
6.3 Projet pilote phase 3.....	19
6.4 Problématique de la supplémentation en oxygène	20
7. Tableau	22
8. Figures	25
Chapitre 2 – Hypoventilation suite à l’administration d’oxygène.....	29
1. Abstract.....	31
2. Introduction.....	32
3. Materials and methods	33

4. Results	36
5. Discussion.....	38
6. Conclusion	42
7. Table	43
8. Figures	45
9. References.....	48
Chapitre 3 – Pharmacocinétique et pharmacodynamique du flumazénil	52
1. Abstract.....	54
2. Introduction.....	55
3. Materials and Methods.....	56
4. Results	61
5. Discussion.....	62
6. Conclusion	68
7. Tables.....	69
8. Figures	72
9. References.....	76
Discussion générale	81
Hypoventilation suite à l’administration d’oxygène	81
Pharmacocinétique et pharmacodynamique du flumazénil.....	85
Perspectives de recherche	87
Informations supplémentaires et réflexion.....	89
Conclusion	91
Références.....	92
Annexe	97

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1. Résumés des éléments ERAS en anesthésiologies et recommandations associées....22

Chapitre 2

Tableau 1. Blood gases values33

Chapitre 3

Table 1. Pharmacokinetic parameters of midazolam.....69

Table 2. Pharmacokinetic parameters of 1-OH-midazolam.....70

Table 3. Pharmacokinetic parameters of flumazenil.....71

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1. Délai pour le retour de la position sternale suivant ATI ou SAL.....	25
Figure 2. Délai pour le retour de la position sternale suivant différents dosages de FLU....	26
Figure 3. Délai pour le retour de la position sternale suivant ATI-FLU ou ATI-SAL.....	27
Figure 4. Fréquence respiratoire avec et sans supplémentation d'oxygène.....	28

Chapitre 2

Figure 1. Experimental timeline.....	45
Figure 2. Arterial PaO ₂ , respiratory rate and PaCO ₂	46

Chapitre 3

Figure 1. Experimental timeline.....	72
Figure 2. Example of plasma midazolam concentration.....	72
Figure 3. Example of plasma midazolam concentration.....	73
Figure 4. Example of plasma flumazenil concentration.....	73
Figure 5. Delay for the return of righting reflex.....	74
Figure 6. Sedation scale scores.....	74
Figure 7. Mean arterial pressures.....	75

Liste des sigles et abréviations

ASA: *American Society of Anesthesiologists*

ERAS : *Early Recovery after Surgery*

GDT : *Goal Directed Therapy*

ARRIVE : *Animal Research Reporting of In Vivo Experiments*

APPA : *American Pet Products Association*

FiO₂ : fraction inspirée d'oxygène

PaO₂ : pression partielle artérielle en oxygène

PaCO₂ : pression partielle artérielle en dioxyde de carbone

f_R : fréquence respiratoire

FLU : flumazénil

ATI : atipamézole

SAL : saline

PK : pharmacocinétique

PD : pharmacodynamique

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon superviseur, Dr Pang, pour la patience dont il a su faire preuve durant la rédaction de ce mémoire. Son expérience en tant que chercheur et professeur chevronné lui a permis de m'accompagner et me supporter à travers les différentes épreuves et défis que comporte la recherche. De plus, en combinant cette maîtrise à un diplôme d'études spécialisées, Dr Pang a été témoin des embûches auxquelles j'ai fait face ainsi que des baisses de motivation une fois ma formation professionnelle terminée. Malgré tout, il m'a toujours écouté et inspiré par son exemple de persévérance. Sa passion pour l'anesthésie est contagieuse et m'a permis de mener à terme ce mémoire. Je tiens également à remercier tous les membres de mon comité conseil, particulièrement Dr Claire Grosset, pour leur support et leur disponibilité.

J'aimerais également remercier mes collègues du laboratoire qui ont su m'épauler durant mon parcours en recherche. Colin, Viviane et Maxime ont été au centre de ma recherche et leur disponibilité et générosité se sont transformées en amitié. C'est grâce à eux que j'ai découvert le plaisir de la recherche.

Les employés du FANI ont également contribué grandement à mon projet et ont su contribuer à ma formation en m'exposant pour la première fois aux animaux de laboratoire. Un merci tout spécial à Vanessa et Normand qui ont démontré tellement d'amour pour mes lapins et qui en ont pris soin pendant toute la durée du projet.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille et mes amis qui m'ont écouté et encouragé tout au long de mon parcours scolaire. La complétion d'une maîtrise est un processus avec une courbe d'apprentissage importante, surtout pour quelqu'un avec un intérêt porté vers la clinique. Le fait de sortir de ma zone de confort m'a permis de devenir un anesthésiologiste plus complet. Le support de mon entourage et leur confiance en ma capacité de mener à terme ce projet sont la clé derrière mon succès.

Chapitre 1 – Revue de littérature

1. Introduction

Le terme anesthésie, provenant du mot grecque *anaesthesia*, signifie insensibilité. Cette perte de sensation généralisée ou locale est désirable lors de procédures qui seraient autrement douloureuses ou stressantes. La myorelaxation, l'analgésie et la sédation/perte de conscience, piliers d'une anesthésie balancée, sont rendues possibles par l'utilisation de drogues déprimant le système nerveux central et périphérique. Cependant, cette dépression neuronale affecte également l'homéostasie du patient. Ceci est parfois compliqué par des comorbidités importantes ou des conséquences de la procédure, expliquant les risques variables, mais toujours présents, d'une anesthésie générale[1].

Dans le but de diminuer ces risques, plusieurs normes de pratiques, incluant la gestion des voies respiratoires difficiles et du jeûne préopératoire, ont été intégrées dans le domaine de l'anesthésie[2, 3]. Éventuellement, l'impact de ces nouvelles normes a été évalué dans le but de créer des lignes directrices de pratiques basées sur les évidences scientifiques. C'est ainsi que le concept du *Early Recovery After Surgery* (ERAS) a vu le jour. Ce consensus regroupe les meilleures pratiques dans différentes spécialités chirurgicales et anesthésiques. L'application de ces principes au continuum de soins a permis de diminuer drastiquement le taux de complications mineurs et majeurs incluant les décès[4].

Malgré le succès international connu par l'initiative ERAS, aucun équivalent vétérinaire n'existe à ce jour. Pourtant, de multiples rapports démontrent que le taux de mortalité peri-anesthésique (excluant les euthanasies) chez les patients vétérinaires en bonne santé est considérablement plus élevé que le risque chez les patients humains (0,05% chez le chien vs 0,00000145% chez les hommes et 0.00000077% chez les femmes)[5, 6]. Cette différence est particulièrement frappante lorsque les données chez le lapin sont examinées. En effet, un lapin en bonne santé (statut ASA 1-2) a un risque de décès 730 000 fois plus élevé qu'un humain ayant le même statut. C'est ce constat qui a motivé la recherche présentée dans ce mémoire.

Les objectifs de cette recherche sont les suivants : appliquer certains éléments du consensus ERAS et investiguer leur impact respectif sur la qualité des soins péri-anesthésiques chez le lapin. Le

premier traitement investigué est l'administration d'oxygène chez le lapin. La seconde investigation porte sur l'utilisation du flumazénil pour diminuer le temps de sédation chez le lapin.

En premier lieu, la revue de littérature présentée au chapitre 1 aborde l'impact des protocoles ERAS en médecine humaine et les études s'y rapportant en médecine vétérinaire. Les facteurs de risques associés avec l'anesthésie du lapin y seront présentés, ainsi que le raisonnement clinique et les résultats préliminaires ayant motivé ce mémoire. Le chapitre 2 est une étude prospective investiguant les bienfaits de l'administration d'oxygène chez le lapin de Nouvelle-Zélande. Cet article scientifique a été publié en mai 2020 dans le journal VAA (*Veterinary Anesthesia and Analgesia*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaa.2020.04.012>). Le chapitre 3 est une étude pharmacocinétique-pharmacodynamique du flumazénil chez le lapin dans le but d'investiguer son efficacité pour diminuer le temps de réveil. Cet article scientifique a été resoumis après révisions mineures dans JAALAS (*Journal of the American Association of Laboratory Animal Science*, manuscript ID : JAALAS-20-000084.R1). Le chapitre 4 est une discussion revenant sur les points intéressants mis en évidences dans les chapitres 1, 2 et 3.

2. Historique du *Early Recovery After Surgery* (ERAS)

Dans les années 1990, le Dr. Henrik Kehlet, ancien professeur de chirurgie à l'Université de Copenhague, créa le concept de *fast-track surgery*. Cette approche, basée sur le développement et l'application de lignes directrices, regroupe les meilleures pratiques pour améliorer la récupération rapide des patients suite à une procédure chirurgicale[7]. En améliorant la gestion et la stabilisation des patients tout au long du continuum de soins (pré, intra et post-opératoire), la vision du Dr Kehlet a permis de diminuer la durée d'hospitalisation de 10 à 2 jours dans le domaine des chirurgies colorectales[8].

En 2001, un groupe de chercheurs, incluant le Dr. Kehlet, a repris et amélioré le concept développé 10 ans plus tôt, en mettant l'emphase sur une approche multimodale. Le but de celle-ci était d'améliorer non seulement la rapidité (*fast-track*), mais la qualité de la récupération du patient[4, 9]. C'est ainsi qu'est né le groupe d'étude ERAS, signifiant <Early Recovery after Surgery>, souvent traduit par Récupération Rapide Après Chirurgie (RRAC)[10]. En utilisant une approche multimodale, l'objectif de cette équipe multidisciplinaire était de réduire les complications minant

la récupération du patient. En 2010, la société ERAS a été mis sur pied afin de "promouvoir le développement des soins peropératoires de qualité et d'améliorer la récupération des patients par la recherche, l'éducation, les audits cliniques et l'implémentation de pratiques basées sur les preuves scientifiques"[11].

Depuis leur création, les protocoles ERAS font l'objet de plusieurs méta-analyses ou études multicentriques randomisées. La première revue Cochrane ayant analysé l'impact de leur application incluait 4 études cliniques randomisées et contrôlées. Malgré le faible nombre de patients considérés (237 patients; 119 ERAS, 118 conventionnels), les trouvailles corroboraient déjà ce que la société ERAS avançait : une diminution marquée des complications et du temps d'hospitalisation[12]. D'autres études multicentriques à large cohorte, études rétrospectives et méta-analyses ont par la suite renforcé les évidences cliniques des bienfaits du ERAS : réduction de la mortalité (jusqu'à 5 ans post-opératoire), du taux de complications mineurs et majeurs (jusqu'à 50%) ainsi que de la durée d'hospitalisation (2 à 3 jours en moyenne)[13-16]. Toutefois, un questionnement a émergé suite à plusieurs de ces études concernant l'impact de l'adhésion aux protocoles mis en place sur la magnitude de l'effet bénéfique. À cet effet, Gustafsson et al. a démontré une adhésion moyenne au protocoles ERAS de 42% à 69% selon les années dans le domaine des chirurgies colorectales. Conséquemment, la survie 5 ans post-op pour les patients ayant reçu des soins adhérent à $\geq 70\%$ au ERAS était nettement améliorée (78% vs 64%; $p < 0,001$) en comparaison aux autres patient ($\leq 70\%$ d'adhésion)[14]. Ceci confirme que la magnitude de l'impact positif dépend non seulement de la production de lignes directrices appropriées, mais surtout de leur application en règle. Ceci a également été démontré dans plusieurs autres domaines, entre autres par l'auteur de ce mémoire, dans le domaine de la qualité du rapport de l'information dans les publications scientifiques (*ARRIVE guidelines*)[17].

3. Les concepts du ERAS en anesthésie

Près de 20 ans suivant la publication des premiers protocoles ERAS, ces derniers ont été implémentés dans 12 spécialités chirurgicales différentes, et ce dans plus de 25 pays, permettant de renforcer les preuves scientifiques justifiant leur utilisation[18]. Puisque les recommandations ERAS touchent le domaine chirurgical, l'anesthésiologiste et l'équipe d'anesthésie sont des acteurs importants contribuant à l'application de ces directives. En 2015, des directives ERAS pour l'anesthésie des procédures gastro-intestinales ont été publiées[19, 20]. Cette revue en deux parties

adresse la physiologie importante pour ce type de procédures ainsi qu'une déclaration de consensus révisant les meilleures pratiques dans le continuum de soins. En se basant sur les preuves scientifiques disponibles dans la littérature ainsi que leurs expériences, le panel de spécialistes a révisé chaque recommandation pour leur attribuer un statut de recommandation forte ou faible (Tableau 1). Cette distinction a été faite en se basant sur l'équilibre des effets désirables et indésirables rapportés suite à l'application d'une recommandation. Au total, 18 éléments de la période périopératoire ont été évalués. Parmi ceux-ci, l'utilisation d'une fraction inspirée d'oxygène (FiO_2) augmentée durant la pré-oxygénation et l'utilisation de protocoles permettant un réveil rapide ont été fortement recommandés par le groupe de spécialistes. En effet, tel que démontré par Edmark et al., l'utilisation de FiO_2 croissantes (60, 80 et 100%) augmente le délai avant la désaturation lors de l'induction (jusqu'à 411 secondes pour atteindre une saturation périphérique $< 90\%$)[21]. Pour certaines pathologies/procédures (ex. : imagerie pulmonaire), le risque augmenté d'atélectasie suite à l'administration d'une FiO_2 élevée surpasse les bienfaits de cette pratique[22]. Autrement, plusieurs investigations confirment l'impact positif de la pré-oxygénation chez la majorité des patients[23, 24]. En ce qui a trait aux protocoles permettant une récupération rapide, plusieurs revues ERAS ont souligné l'importance (recommandation forte) de favoriser un réveil de courte durée[20, 25, 26]. Un retour plus rapide à un état d'éveil normal permet de diminuer significativement les risques de complications majeurs. En effet, une mobilisation rapide est l'un des facteurs les plus importants pour diminuer les risques de thromboses reliés au décubitus prolongé[27]. Similairement, un réveil rapide permet une prise de nourriture plus tôt dans la phase post-opératoire, permettant de diminuer les risques d'iléus post-opératoire et des nausées associées[28]. Les stratégies employées pour éviter un réveil prolongé sont l'utilisation d'agents sédatifs et analgésiques de courte durée, l'utilisation d'antagonistes ou des techniques anesthésiques locorégionales permettant d'éviter l'anesthésie générale[20]. Les recommandations décrites ci-haut sont incluses dans la revue de Feldheiser et al. Elles ont été instaurées dans plusieurs établissements hospitaliers à travers le monde. Cependant, de par la nouveauté des lignes directrices ERAS en anesthésie, les audits cliniques et les méta-analyses manquent pour évaluer l'impact de leur intégration dans le parcours des patients en chirurgie gastro-intestinale. Similairement, aucun protocole ou lignes directrices ERAS n'existe en médecine vétérinaire, malgré la qualité grandissante des soins apportés.

4. Les concepts du ERAS en médecine vétérinaire

La variabilité des espèces rencontrées ainsi que la nouveauté du concept d'ERAS en médecine humaine peuvent expliquer en partie l'absence de lignes directrices adaptées à la médecine vétérinaire. Cependant, l'investigation de concepts propres au ERAS dans le domaine vétérinaire pourrait constituer la prémisse de l'élaboration de protocoles officiels et standardisés[29-31]. En effet, Hasiuk et al. a investigué l'effet de l'atipamezole (antagoniste alpha-2 adrénergique) sur le délai du réveil et l'analgésie lors d'ovariohystérectomie féline. Lors de cette étude clinique prospective et randomisée, un protocole anesthésique à base de dexmédétomidine (agoniste alpha-2 adrénergique), de kétamine (cyclohexamine) et d'hydromorphone (opioïde) était utilisé pour permettre l'intubation endotrachéale et l'administration d'oxygène supplémentée en isoflurane (anesthésique volatil). Une fois la chirurgie terminée (dernière suture cutanée), l'atipamézole (ATI) était administré en intramusculaire au groupe expérimental, versus un volume similaire de saline (SAL) pour le groupe placebo. Le délai pour retrouver un décubitus sternal ainsi que l'évaluation de la sédation globale à l'aide d'une échelle descriptive simple étaient désignés comme variables d'intérêts. Une différence significative a pu être mise en évidence pour ces deux paramètres, notamment une médiane de 15 minutes pour retrouver un décubitus sternal dans le groupe ATI comparativement à 60 minutes dans le groupe SAL ($p < 0,001$). De plus, l'analgésie post-opératoire du groupe ATI n'était pas inférieur au groupe SAL, justifiant l'utilisation de ce protocole pour favoriser un réveil amélioré. Un autre domaine ayant fait l'objet d'investigations vétérinaires en lien avec les concepts ERAS est l'utilisation judicieuse des opioïdes dans la période périopératoire. Plusieurs régimes d'administration régulière d'analgésiques ont été remplacés par des administrations basées sur le confort/douleur de l'animal. En se servant de ce principe, Bini et al. ont pu diminuer de 4 fois la quantité de méthadone administrée après une chirurgie d'ostéotomie et nivellement du plateau tibial chez le chien. Ce faisant, la fréquence des effets secondaires, incluant vomissement, vocalisation et anorexie, était significativement réduite[30]. Plusieurs autres études investiguant indépendamment des principes reliés au ERAS existent en médecine vétérinaire[32-34]. Cependant, aucune méta-analyse ou consensus n'existe pour évaluer leur pertinence chez différentes espèces et ainsi définir des algorithmes de pratiques standardisés comme le protocole ERAS. Des lignes directrices sur l'anesthésie des chats et chiens ont été publiées en 2020. Bien qu'elles soient pratiques et se basent sur les preuves scientifiques, plusieurs informations relèvent toujours de l'expérience des auteurs par manque de recherche[31]. De plus,

ces lignes directrices ne considèrent que deux espèces et omettent les espèces exotiques. Pourtant ces dernières ont le plus haut risque de mortalité périopératoire, démontrant le besoin criant d'améliorer les standards actuels.

5. L'anesthésie chez le lapin

Le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) est parmi les espèces d'animaux de compagnie les plus fréquemment anesthésiés en médecine vétérinaire[6]. En effet, ils sont fréquemment utilisés en recherche et cette espèce est très populaire comme animal de compagnie avec plus de 1 million d'individus recensés en 2018 au Royaume-Uni et environ 2,24 millions de lapins aux États-Unis en 2017-2018 d'après l'*American Pet Products Association* (APPA)[35-37]. Sa nature de proie en fait un animal stressé ayant régulièrement besoin de sédation ou anesthésie, même pour des procédures simples et non-invasives (radiographie, pose de cathéter, etc.).

Malgré le nombre important d'individus anesthésiés annuellement, le taux de mortalité péri-anesthésique reste très élevé chez le lapin. Dans l'étude de Brodbelt portant sur les risques de mortalité périopératoire chez les petits animaux (CEPSAF), le lapin était la 3^e espèce la plus fréquemment anesthésiée[6]. Cependant, l'incidence de mortalité chez des individus en santé (ASA 1-2; 0,73%) était 6 et 14 fois plus élevé que le chat et le chien, respectivement. Un constat similaire était présent lorsque les individus malades (ASA >3) étaient examinés, avec près de 1 lapin sur 13 (7,37%) qui n'ont pas survécu à la procédure. Dans l'investigation du CEPSAF, les facteurs de risques n'ont pas été extensivement investigués puisque les données sur la gestion anesthésique étaient insuffisantes. Cependant, la plupart des lapins n'étaient pas intubés (maintien au masque) et la supplémentation en oxygène était rare. De plus, 59% des causes de décès étaient rapportées comme inconnues, reflétant la surveillance anesthésique souvent inadéquate chez le lapin. Dix ans après la parution du CEPSAF, la situation ne s'est pas améliorée : l'étude de 2018 de Lee et al. rapporte un taux de mortalité de 4,8%[38]. Puisque la forte majorité des individus étaient classés comme statuts ASA 1 et 2, ce taux est en réalité plus élevé que celui rapporté par le CEPSAF. Toutefois, la comparaison des données entre ces deux études doit tenir compte de la puissance statistique plus faible dans l'article de 2018.

Plusieurs facteurs physiologiques ont été mis de l'avant pour expliquer le risque important de morbidité et mortalité anesthésique chez le lapin. En ce qui a trait au système respiratoire, une sensibilité accrue à la dépression respiratoire de certains agents sédatifs a été décrite[39, 40]. De

plus, ces lagomorphes ont une respiration nasale obligatoire ainsi qu'une quantité de tissu importante au niveau de l'oropharynx, augmentant les risques d'obstruction des voies respiratoires supérieures en présence d'écoulements nasaux ou positionnement inadéquat de la tête[41]. Toujours en lien avec leur anatomie, l'intubation endotrachéale de cette espèce reste un défi même pour des personnes expérimentées[42]. En effet, l'intubation est compliquée par une ouverture de gueule limitée, de longues incisives, une langue et des muscles masticateurs importants, une quantité de tissu redondant dans l'oropharynx ainsi qu'une position caudale du larynx qui rend sa visualisation difficile sans endoscope[38]. Ces difficultés pourraient expliquer que plusieurs vétérinaires optent pour l'anesthésie au masque ou au masque laryngé (type V-gel), ce qui peut être associé à d'autres complications en cas de positionnement inadéquat ou en cas de déplacement per-anesthésique accidentel normalement évitées par l'intubation endotrachéale[43]. Un autre facteur de risque relié au système respiratoire est la haute prévalence chez cette espèce du pathogène pulmonaire *Pasteurella multocida*[44]. Cette bactérie cause fréquemment des dommages pulmonaires sous-cliniques qui peuvent mener à une décompensation une fois l'animal anesthésié. Finalement, le statut d'herbivore du lapin implique un système gastro-intestinal proéminent qui peut causer des désordres de ventilation/perfusion pulmonaire (*V/Q mismatch*) lors du décubitus latéral et dorsal[45, 46]. En conclusion, l'ensemble de ces étiologies peuvent mener à de l'hypoxémie et de l'hypoventilation, compliquant grandement la gestion anesthésique.

L'évaluation du système cardiovasculaire du lapin révèle des complications supplémentaires à l'anesthésie de cet animal. Par exemple, la pose de cathéter intraveineux peut être compliquée par la petite taille et du patient et leur niveau de stress élevé en clinique. D'ailleurs, il est primordial d'adresser ce stress avec un protocole de sédation adéquat avant ou pendant la procédure, afin d'éviter une relâche massive de catécholamines augmentant le risque d'arythmies cardiaques[47].

L'hypothermie est une autre complication rencontrée fréquemment lors de l'anesthésie du lapin. En effet, leur aire de surface importante en rapport avec leur volume augmente la perte de chaleur, particulièrement lorsque ces derniers sont mouillés durant la procédure (ie. flush de saline). De surcroît, les lapins sont prédisposés au développement d'ulcère cornéen post-anesthésique, puisqu'ils gardent souvent les yeux ouverts durant l'anesthésie générale. Ce risque qui peut sembler anodin nécessite toutefois des soins supplémentaires et entraîne un stress et une douleur oculaire importante, augmentant la durée d'hospitalisation. Finalement, plusieurs comorbidités

préopératoires peuvent causer de la déshydratation, de l'anorexie ou des problèmes gastro-intestinaux augmentant le risque anesthésique du patient. Comme pour toutes les espèces, l'anesthésie en elle-même peut mener à des complications importantes comme une stase gastrique augmentant une fois de plus la durée d'hospitalisation[47].

En conclusion, l'ensemble de ces complications se traduit par une augmentation du risque de mortalité péri-anesthésique chez le lapin. C'est majoritairement durant le premier 24h post-opératoire que le 2/3 des décès surviennent[6]. L'effet prolongé des drogues anesthésiques combiné à l'arrêt ou la diminution de la surveillance anesthésique et du support (ventilation, fluidothérapie, etc.) permettent en partie d'expliquer le risque accru associé à cette période du processus anesthésique.

6. Démarche scientifique et résultats préliminaires

Dans le but d'éviter l'effet prolongé des drogues anesthésiques dans la période post-opératoire, nous avons développé un protocole anesthésique injectable combinant un agent de courte durée (alfaxalone) avec des agents sédatifs réversibles (dexmédétomidine et midazolam). Ce protocole a été utilisé sur 24 lapins de Nouvelle-Zélande lors d'une collaboration avec un autre laboratoire de recherche (Rech-1876). Ces lapins devaient subir une procédure chirurgicale peu douloureuse et de courte durée (25-30 minutes; délai moyen de 45 minutes entre l'induction et l'injection de l'antagoniste dans les 3 phases du projet pilote) conformément au protocole de recherche préétabli, cependant le plan et la gestion anesthésique ont été gérés par notre équipe. Les lapins devaient être anesthésiés un total de 3 fois avec plusieurs semaines d'intervalle. Notre implication dans ce projet se limitait aux différentes anesthésies et lors de l'euthanasie à la fin du protocole expérimental.

6.1 Projet pilote phase 1

Après une période d'acclimatation de deux semaines, chaque lapin recevait en intramusculaire (IM) le protocole suivant : alfaxalone 4mg/kg, dexmédétomidine 0,1mg/kg et midazolam 0,2mg/kg. Par la suite, ils étaient retournés dans une cage pour une période standardisée de 10 minutes après laquelle chaque lapin était transféré sur une table d'examen. Une pré-oxygénation de 5 minutes était effectuée à l'aide d'un masque ajusté avant l'installation d'un dispositif supraglottic (V-Gel, DocsInnovent, UK) permettant la ventilation assistée si nécessaire. Un oxymètre de pouls, un capnographe et un électrocardiogramme étaient utilisés pour le suivi anesthésique. Les animaux étaient ensuite préparés et transférés dans la salle de chirurgie. La dichotomisation des groupes

expérimentaux était faite de manière aléatoire, à l'insu de l'équipe de recherche. Ainsi, une fois la procédure terminée, les lapins recevaient une dose de 1mg/kg d'atipamezole ou un volume similaire de saline. La variable d'intérêt était le délai depuis l'injection du traitement (ATI/SAL) jusqu'au retour de la position sternale. Suite au test de normalité, les données ont été évaluées avec des test statistiques non-paramétriques (Mann-Whitney et Kruskal Wallis). Une valeur de p de < 0,05 était considérée significative. L'injection de l'atipamézole a permis de réduire de 34% le temps de réveil (position sternale) avec notre protocole de sédation ($p < 0,0001$, 95% IC de la différence [24-57 minutes]; Figure 1).

6.2 Projet pilote phase 2

Malgré l'effet marqué de notre traitement, le délai pour retrouver la position sternale restait long (75 minutes) pour que ce protocole soit utilisé dans un contexte clinique. Nous avons donc décidé d'inclure le flumazénil (antagoniste des benzodiazépines) lors de la 2^e période du projet. Avant de procéder à ce prochain projet pilote, nous devions décider la dose de flumazénil à administrer. Une revue de la littérature vétérinaire a révélé un intervalle étendu de dosages pour l'utilisation du flumazénil chez le lapin. En effet, seuls quelques rapports de cas rapportaient une utilisation anecdotique et très variable (0,02 mg/kg à 0,1 mg/kg IV, IM ou SC) de l'antagoniste[48-50]. Malgré son utilisation fréquente en clinique, un intervalle similaire basé sur l'expérience locale et internationale de spécialistes en médecine exotique nous a été rapporté. Afin d'investiguer l'effet des différentes doses possibles, 4 traitements expérimentaux ont été choisis lors de la 2^e anesthésie : flumazénil 0,02; 0,05 et 0,1mg/kg IM ainsi qu'un groupe contrôle (SAL). À noter que tous les volumes d'injection était similaires par l'ajout de saline et chaque groupe recevait également l'atipamezole afin de tester l'effet supplémentaire apporté par le flumazénil. Suite à la 2^e phase du projet pilote, aucun des dosages n'a eu d'impact significatif sur le délai du réveil ($p = 0,78$; Figure 2). L'augmentation du nombre de groupe expérimentaux sans pouvoir augmenter la taille de l'échantillon durant ce projet pilote réduisait notre pouvoir statistique. En effet, il était difficile de tirer des conclusions avec ce second résultat.

6.3 Projet pilote phase 3

Finalement, pour augmenter les chances de mettre en évidence un effet du flumazénil (si présent), la 3^e phase d'anesthésie fut approchée de la manière suivante : les individus recevraient la dose la plus élevée de flumazénil (0,1mg/kg IM; muscles épaxiaux lombaires) ou un volume similaire de

saline. Une fois de plus, l'atipamézole fut conservé dans les deux groupes expérimentaux. L'ajout du groupe flumazénil à un dosage correspondant à l'intervalle supérieur rapporté dans la littérature n'a eu aucun effet significatif sur le délai du réveil ($p = 0,50$, 95% IC de la différence [-33 – 18 minutes]; Figure 3) À ce moment, plusieurs questions cliniques restaient à élucider. Premièrement, est-ce que cette absence d'effet du flumazénil sur le réveil du patient était réelle ou est-ce que cet impact était masqué par l'effet important de l'atipamézole ou par la faible taille d'échantillon de ce projet pilote? De plus, est-ce qu'un problème d'absorption causé par la voie d'administration IM pouvait expliquer l'absence d'effet du flumazénil? Finalement, l'utilisation fréquente des benzodiazépines chez le lapin et l'absence de données pharmacocinétiques (PK) et pharmacodynamiques (PD) sont la base du questionnement investigué par l'article présenté au chapitre 3.

6.4 Problématique de la supplémentation en oxygène

En plus d'investiguer l'effet de différents antagonistes sur la durée du réveil, le projet pilote a permis de mettre en lumière une problématique inattendue lors de la supplémentation en oxygène. En effet, lors de l'anesthésie des lapins, plusieurs paramètres vitaux étaient surveillés pour assurer leur sécurité, incluant la fréquence respiratoire (F_R). Durant la période d'attente de 10 minutes dans la cage, les lapins étaient également surveillés, mais ne recevaient aucune supplémentation en oxygène, pour éviter de les stimuler. Par la suite, ils étaient placés sur une table d'examen pour être pré-oxygénés à l'aide d'un masque ajusté. À ce moment, une diminution marquée de la F_R , incluant quelques épisodes d'apnée, était remarquée chez l'entièreté des lapins. Le premier réflexe de l'équipe fut de suspecter une contamination du système anesthésique par un agent volatil. Le système a donc été changé et lors de la prochaine anesthésie, une attention particulière a été portée à cet effet inattendu. Les valeurs de la F_R ont été regroupés pour tous les lapins, puisqu'aucune dichotomisation expérimentale n'était présente durant la phase pré-opératoire. De plus, un test de Wilcoxon pour comparaison de données sériées non-paramétrique fut utilisé. Une valeur de p de $< 0,05$ était considérée significative. Tel que remarqué durant la phase 1, une diminution drastique de la F_R était toujours présente une fois les animaux pré-oxygénés au masque ($p < 0,0001$, 95% IC de la différence [-28 – 16 rpm]; Figure 4). Cet effet inattendu a duré pendant au moins 5 minutes (temps de la prochaine évaluation de la F_R), avec un retour des valeurs de base à 25 minutes post sédation. Puisque la fonction respiratoire (incluant la F_R , l'oxygénation et la ventilation) n'était pas une variable d'intérêt lors de l'élaboration du plan expérimental, plusieurs cofacteurs importants

comme la stimulation du placement du V-gel et plusieurs données manquantes (gaz sanguin) nous empêchaient de tirer des conclusions basées sur ces résultats. Il fallait donc prévoir une anesthésie sans autres manipulations où la prise d'échantillon sanguin permettrait une investigation adéquate de ce phénomène. C'est donc lors de l'euthanasie planifiée des lapins que les données du chapitre 2 ont été recueillies dans le but d'élucider cette problématique.

7. Tableau

Tableau 1. Résumés des éléments ERAS en anesthésiologies et recommandations associées[20]

Table 4 ERAS elements: summary and recommendations.		
Perioperative element	Summary and recommendation	Recommendation grade
Risk assessment	Preoperative scoring tools and functional capacity tests can be used to identify patients at risk of complications and to stratify perioperative risk.	POSSUM: strong Lee Index: strong Cardiovascular Risk Calculator: strong Walk tests: strong CPET: strong General Surgery Acute Kidney Injury Risk Index: strong
Preoperative optimization	Cessation of smoking and alcohol intake at least 4 weeks before surgery is recommended. Encouraging patients is not enough; pharmacological support and individual counselling should be offered to every patient who smokes and to alcohol abusers undergoing elective surgery. Optimization of medical conditions, such as cardiovascular diseases, anaemia, COPD, nutritional status and diabetes should follow international recommendations.	Smoking cessation: high NRT and counselling: high Alcohol cessation: low Medical optimization: strong Optimize preoperative anaemia reduces morbidity and mortality: moderate
Pre-anaesthetic medication	Long-acting anxiolytic and opioids should be avoided as they may delay discharge. Short-acting benzodiazepine should be avoided in the elderly.	Strong.
Preoperative fasting and carbohydrates (CHOs) loading	Intake of clear fluids should be allowed until 2 h before induction of anaesthesia. Solids should be allowed until 6 h. Preoperative treatment with oral CHOs should be routinely administered except in patients with documented delayed gastric emptying or slow gastrointestinal motility and as well in patients undergoing emergency surgery.	Adherence to fasting guidelines (avoid overnight fasting): strong Administration of preoperative CHOs: strong Administration of preoperative CHOs in diabetic and obese patients: weak
Preventing and treating postoperative nausea and vomiting (PONV)	Aggressive PONV prevention strategy should be included in an ERAS protocol ¹⁰² . All patients with 1–2 risk factors should receive a combination of two antiemetics. Patients with 3–4 risk factors should receive 2–3 antiemetics. Total intravenous anaesthesia (TIVA) with propofol and opioid-sparing strategies should be encouraged.	Strong
Standard anaesthetic protocol	Anaesthetic depth should be guided either maintaining an end tidal concentration of 0.7–1.3 MAC or BIS index between 40 and 60 with the aim not only to prevent awareness but also to minimize anaesthetic side effects and facilitate rapid awakening and recovery. Avoid too deep anaesthesia (BIS < 45), especially in elderly patients	Strong
Neuromuscular blockade (NMB) and neuromuscular monitoring	It remains controversial if deep neuromuscular blockade during laparoscopic surgery improves operating conditions. Neuromuscular function should be always monitored when using NMBA to avoid residual paralysis. Long-acting NMBA should be avoided. When NMBA are administered neuromuscular function should be monitored by using a peripheral nerve stimulator to ensure adequate muscle relaxation during surgery and optimal restoration of neuromuscular function at the end of surgery. A TOF ratio of 0.9 must be achieved to ensure adequate return of muscle function and thus preventing complications.	Monitoring neuromuscular function: strong Reversing neuromuscular blockade: strong
Inspired Oxygen Concentration	1) The inspired fractional concentration of oxygen should be titrated to produce normal arterial oxygen levels and saturations. Prolonged periods of high inspired oxygen concentrations which result in hyperoxia should be avoided.	1) Strong 2) Strong

Table 4 (Continued)

Perioperative element	Summary and recommendation	Recommendation grade
Preventing intraoperative hypothermia	2) 100% inspired oxygen concentrations can be used for pre-oxygenation prior to anaesthesia or for short periods to overcome hypoxia. Intraoperative hypothermia should be avoided by using active warming devices.	Strong.
Surgical techniques	Laparoscopic surgery for gastrointestinal surgery is recommended when the expertise is available. Transverse incisions for colonic resections can be preferred.	Laparoscopic approach: strong Transverse incisions for colonic surgery: low
Nasogastric intubation	Prophylactic use of NGTs is not recommended for patients undergoing elective colorectal surgery, while its use in patients undergoing gastrectomy and oesophagectomy is still debatable. Patients with delayed gastric emptying after surgery should be treated by inserting a NGT.	Strong.
Intraoperative glycaemic control	Glucose levels should be kept as close to normal as possible without compromising safety. Employing perioperative treatments that reduce insulin resistance without causing hypoglycaemia is recommended.	Strong.
Perioperative haemodynamic management	The goal of perioperative fluid therapy is to maintain fluid homeostasis avoiding fluid excess and organ hypoperfusion. Fluid excess leading to perioperative weight gain more than 2.5 kg should be avoided, and a perioperative near-zero fluid balance approach should be preferred. GDFT should be adopted especially in moderate–high-risk patients. Inotropes should be considered in patients with poor contractility $CI < 2.5$ l/min). Colloids should not be used in septic patients and in patients with reduced renal function. Large amount of colloids can impair haemostasis. In patients receiving epidural analgesia arterial hypotension should be treated with vasopressors, ensuring the patient is normovolaemic. In the absence of surgical losses postoperative intravenous fluid should be discontinued and oral intake (1.5 l/day) encouraged.	GDFT: Strong in high-risk patients and for patients undergoing surgery with large intravascular fluid loss (blood loss and protein/fluid shift) GDFT: low in low-risk patients and in patients undergoing low-risk surgery Perioperative near-zero fluid balance: moderate Use of advanced hemodynamic monitoring: strong in high-risk patients and for patients undergoing surgery with large intravascular fluid loss (blood loss and protein/fluid shift)
Balanced crystalloids vs. 0.9% saline	0.9% saline should be avoided and balanced crystalloid solution used in the preoperative period. The use of 0.9% saline should be restricted in hypochloaemic and acidotic patients.	Strong
Pain management	Analgesic techniques should aim to not only provide optimal pain control, but also to facilitate the achievement of important milestones such as tolerance of oral intake, and early mobilization. Opioids side effects are dose-dependent and delay recovery. Opioid-sparing analgesic strategies, including regional analgesia techniques, should be implemented in a context of a multimodal analgesic regimen. Postoperative pain management should be procedure-specific	MMA: strong <i>Open abdominal surgery</i> TEA: strong for using it IVLI: moderate for using it CWI: weak for using it TAP blocks: moderate for using it <i>Laparoscopic abdominal surgery</i> TEA: weak for using it IVLI: moderate for using it Intrathecal morphine: moderate for using it TAP blocks: moderate for using it
Postoperative Delirium	Preventive measure as avoidance of prolonged fasting, deep anaesthesia, disturbance of sleep-wake cycle or delirigenic medications like benzodiazepines, atropine should be implemented. Systematic delirium screening and symptom-	Strong

Table 4 (Continued)

Perioperative element	Summary and recommendation	Recommendation grade
Attenuation and treatment of postoperative ileus	oriented treatment should be performed and potential underlying medical causes should be ruled out. Primary POI is an inevitable consequence after gastrointestinal surgery and its pathogenesis is multifactorial. Multimodal preventing strategies should be adopted to facilitate the recovery of gastrointestinal function.	Moderate
Early mobilization	Achievement of mobilization goals requires a multidisciplinary approach. Patients should be given written information setting daily targets for ambulation in hospital. Patients should be encouraged to increase their physical activity in the preoperative period. Patients should use a diary or pedometer to record their daily physical activity.	Weak.

8. Figures

Figure 1. Délai pour retour de la position sternale suivant ATI ou SAL

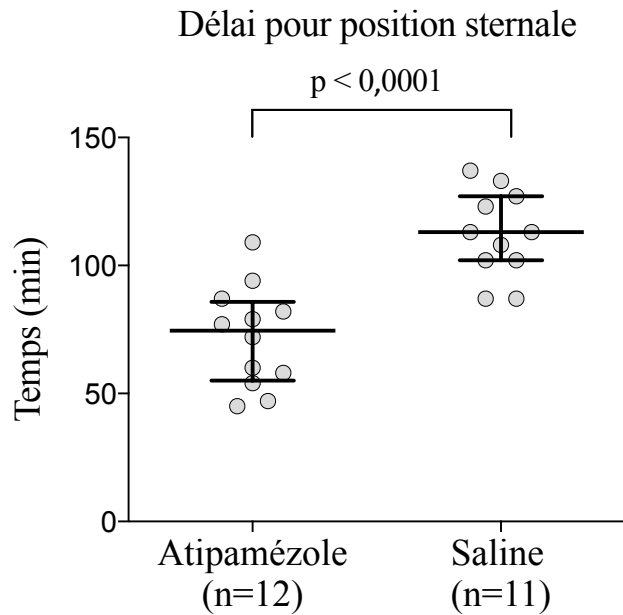


Figure 1. Graphique en nuage de points du délai (en minutes) pour le retour de la position sternale suite à l'administration d'alfaxalone 4mg/kg, dexmédétomidine 0,1mg/kg et midazolam 0,2mg/kg IM chez 24 lapins de Nouvelle-Zélande. Un lapin a été exclu suite à une mauvaise injection. La ligne horizontale centrale représente la médiane, les deux autres lignes représentent l'intervalle interquartile. Les groupes expérimentaux sont atipamézole 1mg/kg IM ou un volume égal de saline. Le groupe atipamézole avait un délai significativement diminué par rapport au groupe témoin ($p < 0,0001$).

Figure 2. Délai pour retour de la position sternale suivant ATI et FLU à différents dosages ou ATI-SAL

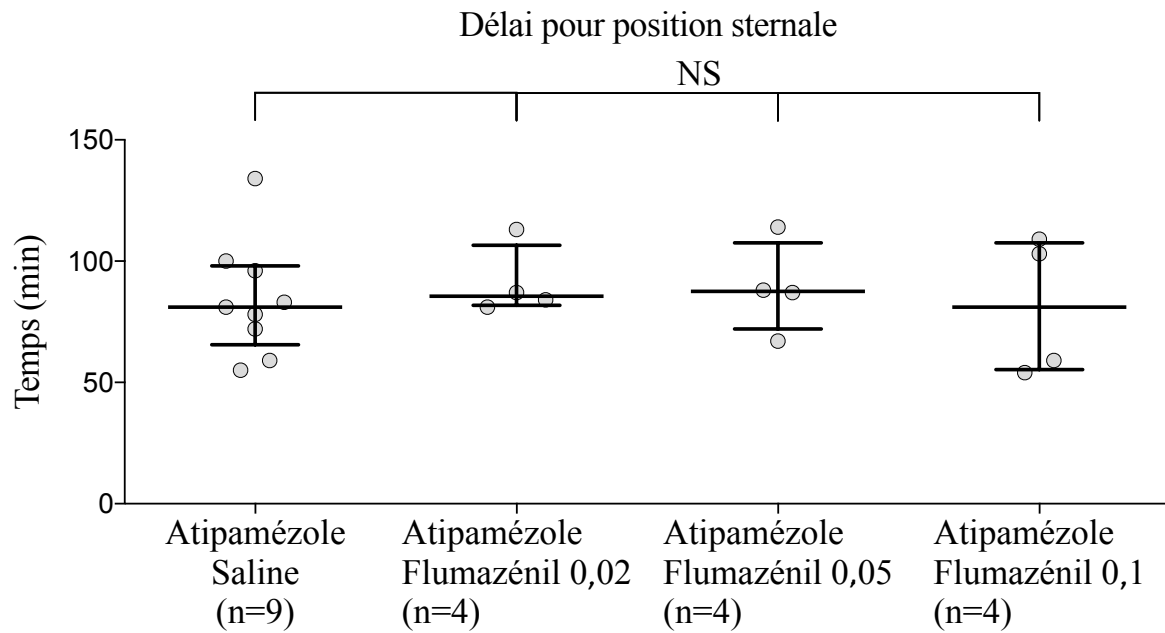


Figure 2. Graphique en nuage de points du délai (en minutes) pour le retour de la position sternale suite à l'administration d'alfaxalone 4mg/kg, dexmédétomidine 0,1mg/kg et midazolam 0,2mg/kg IM chez 24 lapins de Nouvelle-Zélande. Trois lapins ont été exclus suite à l'absence de données. La ligne horizontale centrale représente la médiane, les deux autres lignes représentent l'intervalle interquartile. Les groupes expérimentaux sont atipamézole 1mg/kg IM et une dose variable de flumazénil (0,02 ; 0,05 ou 0,1mg/kg IM) ou un volume égal de saline. Aucune différence significative (NS) n'a été démontrée.

Figure 3. Délai pour retour de la position sternale suivant ATI-FLU ou ATI-SAL

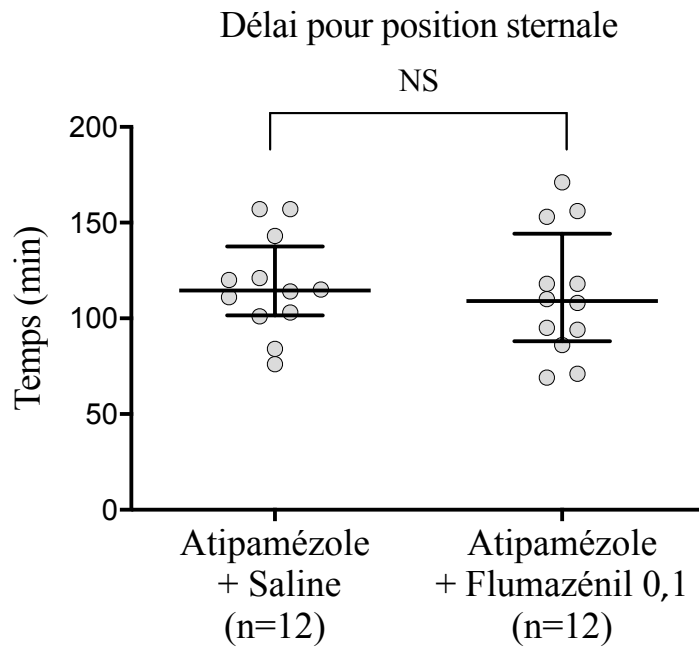


Figure 3. Graphique en nuage de points du délai (en minutes) pour le retour de la position sternale suite à l'administration d'alfaxalone 4mg/kg, dexmédétomidine 0,1mg/kg et midazolam 0,2mg/kg IM chez 24 lapins de Nouvelle-Zélande. La ligne horizontale centrale représente la médiane, les deux autres lignes représentent l'intervalle interquartile. Les groupes expérimentaux sont atipamézole 1mg/kg et flumazénil 0,1mg/kg IM ou un volume égal de saline. Aucune différence significative (NS) n'a été démontrée.

Figure 4. Fréquence respiratoire avec et sans supplémentation d'oxygène

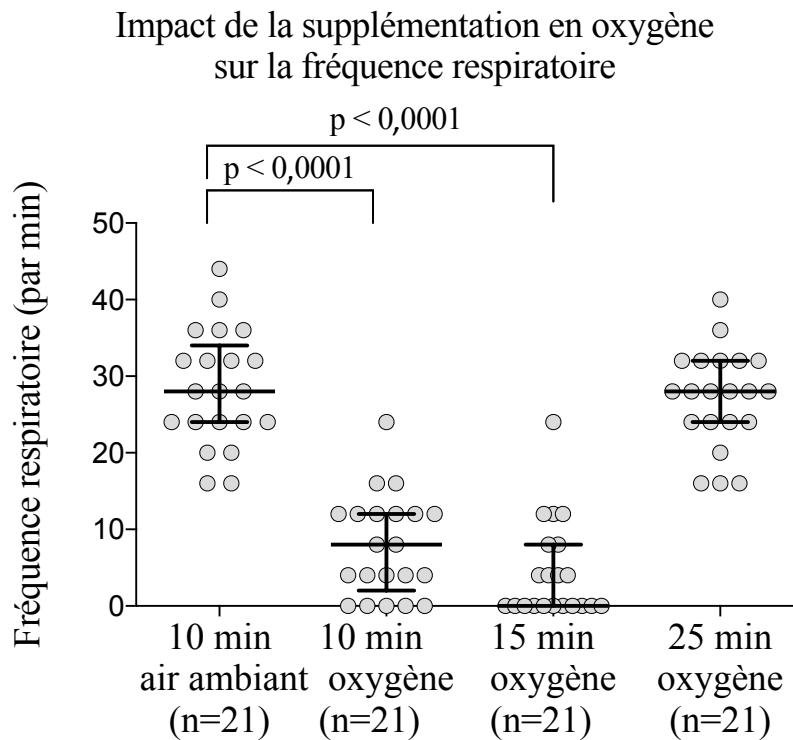


Figure 4. Graphique en nuage de points de la fréquence respiratoire (par minute) suite à l'administration d'alfaxalone 4mg/kg, dexmédétomidine 0,1mg/kg et midazolam 0,2mg/kg IM chez 24 lapins de Nouvelle-Zélande. Trois lapins ont été exclus suite à une déviation du protocole. La ligne horizontale centrale représente la médiane, les deux autres lignes représentent l'intervalle interquartile. Il n'y a qu'un seul groupe expérimental et les différentes colonnes représentent différents temps : 1) 10 minutes après l'injection initiale, sans supplémentation d'oxygène (O₂), 2) 10 minutes après l'injection initiale, avec supplémentation d'oxygène (O₂) au masque (1L/min) 3) 15 minutes après l'injection initiale, avec supplémentation d'oxygène (O₂) au masque (1L/min) et 4) 25 minutes après l'injection initiale, avec supplémentation d'oxygène (O₂) au masque (1L/min). Une différence significative (p < 0,0001) était présente entre le 1^{er} temps et les deux suivants. Le 4^e temps n'avait pas de différence significative avec le 1^{er}.

Chapitre 2 – Hypoventilation suite à l’administration d’oxygène

L’article suivant a été publié en mai 2020 dans le journal VAA (*Veterinary Anesthesia and Analgesia*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaa.2020.04.012>). Il décrit l’hypoventilation secondaire à l’administration d’oxygène chez le lapin anesthésié avec un nouveau protocole intramusculaire à base d’alfaxalone.

Rousseau-Blass F, Pang DSJ. Hypoventilation following oxygen administration associated with alfaxalone–dexmedetomidine–midazolam anesthesia in New Zealand White rabbits

Contribution des auteurs :

FRB : planification du projet, manipulations expérimentales, analyse et interprétation des données, rédaction du manuscrit

DP : planification du projet, manipulations expérimentales, analyse et interprétation des données, rédaction du manuscrit

Hypoventilation following oxygen administration associated with alfaxalone–dexmedetomidine–midazolam anesthesia in New Zealand White rabbits

Frédéric Rousseau-Blass^{a,b} & Daniel SJ Pang^{a,b,c}

^aFaculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

^bGroupe de recherche en pharmacologie animale du Québec (GREPAQ), Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

^cDepartment of Veterinary Clinical and Diagnostic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, Canada

Correspondence: Daniel SJ Pang, Department of Veterinary Clinical and Diagnostic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, 3280 Hospital Drive NW, Calgary, AB T2N 4Z6, Canada. E-mail: dsjpang@ucalgary.ca

1. Abstract

Objective To investigate the relationship between oxygen administration and ventilation in rabbits administered intramuscular alfaxalone-dexmedetomidine-midazolam.

Study design Prospective, randomized, blinded study.

Animals A total of 25 male and female New Zealand White rabbits, 3.1–5.9 kg and aged 1 year.

Methods Rabbits were anesthetized with intramuscular alfaxalone (4 mg kg^{-1}), dexmedetomidine (0.1 mg kg^{-1}) and midazolam (0.2 mg kg^{-1}) and randomized to wait 5 ($n = 8$) or 10 ($n = 8$) minutes between drug injection and oxygen (100%) administration (facemask, 1 L minute^{-1}). A control group ($n = 9$) was administered medical air 10 minutes after drug injection. Immediately before ($\text{PRE}_{\text{oxy/air}5/10}$) and 2 minutes after oxygen or medical air ($\text{POST}_{\text{oxy/air}5/10}$), respiratory rate (f_R), pH, PaCO_2 , PaO_2 , bicarbonate and base excess were recorded by an investigator blinded to treatment allocation. Data [median (range)] were analyzed with Wilcoxon, Mann–Whitney and Kruskal–Wallis tests and $p < 0.05$ considered significant.

Results Hypoxemia ($\text{PaO}_2 < 88 \text{ mmHg}$, 11.7 kPa) was observed at all PRE times: $\text{PRE}_{\text{oxy}5}$ [71 (61–81) mmHg, 9.5 (8.1–10.8) kPa]; $\text{PRE}_{\text{oxy}10}$ [58 (36–80) mmHg, 7.7 (4.8–10.7) kPa] and $\text{PRE}_{\text{air}10}$ [48 (32–64) mmHg, 6.4 (4.3–8.5) kPa]. Hypoxemia persisted when breathing air: $\text{POST}_{\text{air}10}$ [49 (33–66) mmHg, 6.5 (4.4–8.8) kPa]. Oxygen administration corrected hypoxemia but was associated with decreased f_R ($> 70\%$; $p = 0.016$, both groups) and hypercapnia ($p = 0.016$, both groups). Two rabbits (one per oxygen treatment group) were apneic (no thoracic movements for 2.0–2.5 minutes) following oxygen administration. f_R was unchanged breathing air ($p = 0.5$). PaCO_2 was higher when breathing oxygen than air ($p < 0.001$).

Conclusions and clinical relevance Early oxygen administration resolved anesthesia-induced hypoxemia; however, f_R decreased and PaCO_2 increased indicating that hypoxemic respiratory drive is an important contributor to ventilation using the studied drug combination.

Keywords blood gas, hypoventilation, hypoxemia, hypoxic respiratory drive, rabbit.

2. Introduction

Approximately 300,000 rabbits are used annually for research in the European Union and Canada and rabbits are increasingly popular pets (European Union annual report 2013; Canadian Council on Animal Care Animal Data report 2016). The frequent requirement for sedation and general anesthesia in many research studies and the reported high perianesthetic morbidity and mortality compared with cats and dogs, highlight the need for improved perianesthetic care (Brodbelt et al. 2008).

Limited perianesthetic monitoring often precludes definitively identifying the primary cause of death in rabbits, but ventilation problems including failure to achieve or maintain a patent airway, and underlying respiratory disease and impaired gas exchange are often implicated (Tran et al. 2001; Unoki et al. 2003; Bateman et al. 2005; Benato et al. 2013; Flecknell 2016). Additionally, the majority (64%) of perianesthetic deaths in rabbits occur postoperatively (Brodbelt et al. 2008). Use of short-acting, reversible anesthesia protocols that support ventilation or allow rapid control of the airway may reduce the mortality rate in rabbits.

Alfaxalone, a neurosteroid anesthetic, has been licensed for the intravenous (IV) induction of anesthesia in cats, dogs and rabbits. Improved solubility in an aqueous solution, conferred by formulation with cyclodextrin, allows intramuscular (IM) injection, for which it is licensed in cats in Australia. Off-label IM use has been described in multiple species, including rabbits, providing smooth induction of general anesthesia of short duration (Muir et al. 2008, 2009; Marsh et al. 2009; Huynh et al. 2015). Ketamine-medetomidine IM anesthetic protocols have been associated with prolonged recoveries in rabbits (Hedenqvist 2001). While it is unclear if an alfaxalone-dexmedetomidine IM protocol confers a benefit by shorter duration, when similar protocols were used in cats with the dexmedetomidine antagonised, recovery was faster with an alfaxalone based protocol (Buisman et al. 2015; Marín et al. 2020).

An injectable IM alfaxalone combination protocol was investigated in adult New Zealand White rabbits requiring intra-articular injections (Comité d'Éthique de l'Utilisation des Animaux of the Université de Montréal, protocol no. 17-Rech-1876). A combination of alfaxalone-dexmedetomidine-midazolam was based on a similar protocol in which IM dexmedetomidine and midazolam facilitated computed tomography (CT) scanning, followed by IV alfaxalone to induce general anesthesia and facilitate placement of a supraglottic airway device (SGAD; Engbers et al.

2017). During the intra-articular injections, an unexpected response to oxygen administration following induction of general anesthesia was observed in the rabbits. Within a few seconds of providing oxygen via a close-fitting facemask, respiratory rate (f_R) decreased substantially. This response to oxygen supplementation has been described on a few occasions in horses and wildlife (Cuvelliez et al. 1990; Seaman et al. 1994; Paterson et al. 2009; Fahlman et al. 2012; Coutu et al. 2015). When conditions are created whereby ventilation is driven by hypoxemia, the addition of supplemental oxygen can result in marked hypoventilation and hypercapnia.

The purpose of this study was to investigate the effect of oxygen administration on ventilation in rabbits anesthetized with IM alfaxalone–dexmedetomidine–midazolam. We hypothesized that rabbits would be hypoxemic after drug administration and that oxygen supplementation would increase the partial pressure of oxygen in arterial blood (PaO_2) with an associated decrease in ventilation and a concurrent increase in the partial pressure of arterial carbon dioxide ($PaCO_2$).

3. Materials and methods

Animals

A total of 25 New Zealand White and New Zealand White-Californian rabbits, 21 females and four males, weighing 3.9–5.9 kg, aged 1 year, were purchased from a commercial vendor (Charles River, QC, Canada) for an unrelated study and used in the study reported here. Animals were housed in individual plastic cages (70 × 70 × 45 cm, Allentown Inc., NJ, USA) with environmental enrichment (Jingle Ball and Dumbbells; Bio-Serv, NJ, USA) and regular, individual access to a pen (approximately 4 × 4 m) filled with wood shavings and enrichment toys. They were maintained on a 12:12 hours light-dark cycle [lights on at 06.00 hours; 270 (245–320) lux, median (range)] in a controlled housing room, humidity 35 (25–55) %, temperature 18 (17–19) °C. Animals were fed a commercial pelleted diet (5079-U.S. Charles River Autoclavable Rabbit; Charles River Laboratories, QC, Canada) and autoclaved hay from a local supplier (Ferme Lumunick, QC, Canada) with tap water *ad libitum*. Animals were free from specific pathogens based on virology, microbiology and parasitology testing. Animals were assessed twice daily, including observation of general appearance and activity level, and evaluation of feces production, appetite and water consumption. The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Comité d'Éthique de l'Utilisation des Animaux of the Université de Montréal, protocol no. 17-Rech-1876). All procedures were conducted in accordance with the principles outlined in

the current Guide to the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care). All procedures were performed during the light period with all experiments performed over two days. Sample size was estimated from preliminary data, with 80% power to detect a difference of 30 mmHg with alpha set at 5%. With PaO₂ and PaCO₂ as the primary outcomes of interest, a sample size of six animals per group was estimated (G*Power, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Germany).

Study design

The project consisted of two phases conducted at different times based on availability of rabbits and inclusion of a control group (Phase 2).

Phase 1

Rabbits (16 female New Zealand White) scheduled for euthanasia after an unrelated study of orthopedic surgery of the stifle were studied. The time between surgery and this study was at least 2 months. This study was performed as an approved addendum immediately preceding the planned euthanasia. Pre-established exclusion criteria included any abnormalities detected at the most recent physical examination (within the last 7 days), deviation from study protocol (such as failure to achieve arterial cannulation) or technical difficulties.

On the morning of the experiment, rabbits were transported in individual carrier cages to the holding room and allowed to acclimatize for one hour. The rabbits were block randomized (random number generator, www.random.org) to a waiting period of either 5 minutes ($n = 8$) or 10 minutes ($n = 8$) following injection of anesthetic drugs (Fig. 1). Treatment order was also randomized.

Each rabbit was administered two injections in the lumbar epaxial musculature, one injection per side, one immediately after the other, by an investigator blinded to group allocation. The first injection was alfaxalone (4 mg kg⁻¹; Jurox Animal Health, NSW, Australia) and the second was dexmedetomidine (0.1 mg kg⁻¹; Zoetis Canada, QC, Canada) and midazolam (0.2 mg kg⁻¹; Sandoz Canada Inc., QC, Canada). The rabbit was returned to its carrier cage and transferred to the adjacent procedure room. Before the end of the 5 or 10 minute waiting period, the rabbit was removed from the cage and onto a table where cannulations of a central auricular artery and auricular vein was performed using over-the-needle 20 gauge catheters (Becton Dickinson & Co., NJ, USA). The time for start of catheter placement was standardized and with sufficient time allocated to ensure that

the next step was at the predetermined time. Immediately following arterial catheter placement, the following data were collected in both the 5 minute and 10 minute oxygen groups before (PRE_{oxy5} and PRE_{oxy10}) and 2 minutes after oxygen administration (POST_{oxy5} and POST_{oxy10}): f_R (counting thoracic movement), pH, PaO₂, PaCO₂ and arterial hemoglobin oxygen saturation (SaO₂). After discarding 1 mL from the arterial catheter, arterial blood was collected into a heparinized 1 mL syringe (AirLife syringe; CareFusion, France), air expelled and the sample analyzed immediately after collection (i-STAT, CG8+ cartridges; Abbot, IL, USA). Heart rate (HR) was recorded manually by auscultation over 30 seconds at baseline (before injection) and at the PRE time point. For patient monitoring, arterial hemoglobin oxygen saturation was estimated with pulse oximetry (SpO₂; Masimo Corporation, CA, USA) probe placed on the tongue at the PRE time point. Data was recorded by investigators blinded to group allocation. Oxygen (1 L minute⁻¹) was provided with a close-fitting facemask connected to a Mapleson D (Bain) breathing system. Hypoxemia was defined as PaO₂ < 88 mmHg (11.7 kPa) (Barzago et al. 1992). When data collection was complete, the rabbit was euthanized with sodium pentobarbital (100 mg kg⁻¹; Euthansol; Merck Animal Health, QC, Canada) IV.

Phase 2

Rabbits (five female and four male New Zealand White-Californian) scheduled for euthanasia were sourced from an unrelated study (evaluation of pain associated with ear tagging for identification). The time between completion of the first phase and beginning of the second phase was at least two months. The experimental protocol was identical to that described for Phase 1, except for a waiting period of 10 minutes and administration of medical air (Praxair Canada Inc., ON, Canada) instead of oxygen. The time points were designated PRE_{air10} and POST_{air10}. Additionally, arterial pressure was measured via the arterial catheter connected to a transducer placed at the level of the heart and a sampling line inserted in the facemask for aspiration of gases by a sidestream capnograph for CO₂ measurement (LifeWindow LW6000; Digicare Biomedical, FL, USA). The gas analyzer accuracy was checked and confirmed by an independent company as part of a regular service contract within one month of experimentation. The blood pressure transducer accuracy was verified against specific pressures (between 0 and 200 mmHg) using a mercury manometer and zeroed to the atmosphere at the level of the heart before each experiment.

Statistical analyses

Distribution of data was assessed with a D'Agostino–Pearson omnibus normality test. Data did not consistently approximate a normal distribution; therefore, nonparametric tests were applied. PRE *versus* POST comparisons were performed for each group with a Wilcoxon test for f_R , PaO₂, PaCO₂, pH, bicarbonate (HCO₃⁻), base excess (BE) and mean arterial blood pressure. A Mann–Whitney test was used to compare SaO₂ values between oxygen groups at both PRE and POST time points whereas a Wilcoxon test was used to compare SaO₂ values between PRE and POST time points for the medical air group. A Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test was used to compare HR and PaCO₂ between the medical air and both oxygen groups. To assess the effect of the delay between drug administration and treatment on PaO₂ and PaCO₂ (oxygen or air), the PRE_{oxy5} group data was compared to the pooled PRE_{oxy/air10} groups using a Mann–Whitney test. The significance level (α) was set at 5%. Data are presented as median (range) and 95% confidence interval (95% CI) of the difference. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6.07 (GraphPad Software, CA, USA). The data supporting the study results are available in an electronic repository: <https://doi.org/10.7910/DVN/MWYALF>.

4. Results

All 25 rabbits completed the study. Arterial blood gas data from one animal in each oxygen group were excluded because of a technical error with the gas analyzer. Physiologic data from these animals were included in the analysis.

Hypoxemia was recorded at the PRE time point in all rabbits: PRE_{oxy5}: [71 (61–81) mmHg, 9.5 (8.1–10.8) kPa]; PRE_{oxy10}: [58 (36–80) mmHg, 7.7 (4.8–10.7) kPa]; PRE_{air10}: [48 (32–64) mmHg, 6.4 (4.3–8.5) kPa] (Fig. 2a). Hypoxemia resolved with oxygen supplementation: POST_{oxy5}: 95% CI 208–438 mmHg ($p = 0.016$); POST_{oxy10}: 68–419 mmHg ($p = 0.016$). PaO₂ was > 300 mmHg (40.0 kPa) in 11 of 14 (79%) animals (Fig. 2a). Of the three animals with the lowest PaO₂ during oxygen administration [134, 251, 257 mmHg (17.9, 33.5, 34.3 kPa)], two were apneic and the third was bradypneic. All animals in group air remained hypoxemic following medical air administration [POST_{air10}: 49 (33–66) mmHg, 6.5 (4.4–8.8) kPa ($p = 0.027$)] (Fig. 2a). SaO₂ was significantly higher at the PRE_{oxy5} than PRE_{oxy10} assessment (Table 1).

In both oxygen groups, oxygen administration resulted in decreased $f_R > 70\%$ (95% CI, 19–56 and 8–34 breaths minute⁻¹ in 5 and 10 minute groups, respectively; $p = 0.016$; Fig. 2a). This was accompanied by increased PaCO₂ [95% CI, 17.1–26 mmHg (2.3–3.5 kPa) and 16.8–29.1 mmHg

(2.2–3.9 kPa)] in groups 5 and 10, respectively ($p = 0.016$; Fig. 2c). Two rabbits (one in each oxygen group) became apneic for 2 and 2.5 minutes, beginning shortly (<15 seconds) following oxygen administration. Three other rabbits (two at POST_{oxy5} and one at POST_{oxy10}) were bradypneic (2, 2 and 3 breaths minute⁻¹). The f_R was significantly higher at PRE_{oxy5} than PRE_{oxy10} (95% CI, -20–0 breaths minute⁻¹; $p = 0.02$). There was no difference in f_R following oxygen supplementation between POST_{oxy5} and POST_{oxy10} (95% CI, -12–16; $p = 0.73$). In group air, f_R was unchanged by administration of medical air [PRE_{air10}: 40 (20–44); POST_{air10}: 40 (24–80) breaths minute⁻¹; 95% CI, 0–4; $p = 0.50$].

The POST PaCO₂ was significantly higher in both oxygen groups than in group air ($p = 0.013$); POST_{oxy10} *versus* POST_{air10}: $p < 0.001$; Fig. 2c. POST PaCO₂ was not different between oxygen groups ($p > 0.99$). The inspired CO₂ in group air was 7 (4–9) mmHg [0.9 (0.5–1.2) kPa]. PaCO₂ increased [PRE_{air10}: 45.6 (41.4–52.2) mmHg, 6.1 (5.5–7.0) kPa]; POST_{air10}: 50.2 (45.9–57.2) mmHg, 6.7 (6.1–7.6) kPa] ($p = 0.004$).

The effect of time (5 *versus* 10 minutes) was that PaO₂ was lower [95% CI, -29 to -8 mmHg (-3.9 to -1.1 kPa); $p = 0.001$] and PaCO₂ higher [95% CI, 2.6–9.5 mmHg (0.3–1.3 kPa); $p = 0.006$] in group 10 (Figs 2a & b).

Baseline HR (228–264 beats minute⁻¹) was similar among groups ($p > 0.99$ all comparisons). HR was decreased from baseline (before induction of anesthesia) at group 5 and group 10 PRE time points: [PRE_{oxy5}: 142 (115–176), 95% CI, -133 to -72 beats minute⁻¹] and [PRE_{oxy10}: 140 (133–182), 95% CI, -123 to -62 beats minute⁻¹] (both $p = 0.078$). A similar decrease from baseline was recorded in group air [PRE_{air10}: 164 (140–192), 95% CI -92 to -68 beats minute⁻¹; $p = 0.004$]. HR at PRE_{oxy} time points were not different among groups [95% CI -16–29 beats minute⁻¹; $p = 0.487$].

pH decreased significantly from PRE to POST time points in group 5 and group air but not in group 10 (Table 1). The decrease in median pH in group air was less than half the difference than in other groups. HCO₃⁻ and BE increased in all groups (Table 1). A *post hoc* analysis revealed an outlier at PRE_{oxy10} where a metabolic acidosis was recorded: pH 7.01, PaCO₂ 35.6 mmHg (4.7 kPa) and BE -19 mmol L⁻¹. This rabbit was not excluded, as it did not meet the predetermined exclusion criteria. Inclusion of these data prevented a statistically significant decrease in pH at the PRE_{oxy10} *versus* POST_{oxy10} comparison.

Mean arterial pressure (MAP) was statistically lower at POST_{air}10: 78 (69–98) mmHg than at PRE_{air}10: 82 (67–106) mmHg; 95% CI -4–2; $p = 0.043$.

5. Discussion

These results confirm, for the population and anesthesia protocol studied, the hypothesis that oxygen supplementation results in an increase in PaO₂ but is associated with a decrease in f_R and hypercapnia. Additionally, hypoxemia was observed in all rabbits without supplemental oxygen at 5 or 10 minutes after induction of anesthesia. The latter finding is similar to published reports of hypoxemia in rabbits administered a range of anesthetic and adjunct drug combinations: α_2 -adrenergic receptor agonist, benzodiazepine and ketamine [xylazine (3 mg kg⁻¹), midazolam (0.2 mg kg⁻¹) and ketamine (30 mg kg⁻¹) all IM; Dupras et al. 2001]; α_2 -adrenergic receptor agonist, opioid and alfaxalone [medetomidine (0.2 mg kg⁻¹) and morphine (1 mg kg⁻¹) IM with alfaxalone (10 mg kg⁻¹) IV; Navarrete-Calvo et al. 2014]; α_2 -adrenergic receptor agonist, benzodiazepine and alfaxalone [dexmedetomidine (0.1 mg kg⁻¹) and midazolam (0.5 mg kg⁻¹) IM with alfaxalone (0.3 mg kg⁻¹) IV; Engbers et al. 2017]. By contrast, the unexpected presentation of hypoventilation following oxygen administration has been infrequently described in the veterinary literature, limited to horses and wildlife (Cuvelliez et al. 1990; Paterson et al. 2009; Fahlman et al. 2012; Coutu et al. 2015) and not reported in rabbits.

When PaO₂ is adequate, ventilation is controlled by PaCO₂. Both peripheral and central chemoreceptors maintain PaCO₂ within the normal range by altering ventilation in response to changes in PaCO₂ (Dahan 1996). Multiple anesthetic drugs, including those used in this study, depress the ventilatory response to carbon dioxide in dogs and rabbits (Nishida et al. 2002; Lerche & Muir 2004; Muir et al. 2008; McDonnell & Kerr 2015). The resultant hypoventilation may be pronounced enough to cause hypoxemia. If this occurs, provided the ventilatory response to hypoxemia is not depressed, oxygen-sensing cells in the carotid body respond swiftly (2–10 seconds in humans), leading to an increase in minute ventilation (Dahan 1996; Kavanagh & Hedenstierna 2015). From the results reported here (reduction in f_R following administration of a high fraction of inspired oxygen in contrast to the absence of change in f_R with medical air), we speculate that hypoxic drive was responsible for ventilation at the PRE_{oxy}5/10 time points and that this drive was abolished with oxygen administration, leading to hypoventilation as the respiratory depressant effects of the drug combination remained. The hypoxemia observed in all groups reveal

the limitations of hypoxic drive to fully preserve PaO₂ with this drug combination. The mild increase in PaCO₂ in the medical air group in the absence of decreased f_R most likely resulted from rebreathing of CO₂ in the facemask as the median increase of 4.6 mmHg (0.6 kPa) was similar to the rebreathed CO₂. This result contrasts that seen in the oxygen groups, where significant increases in PaCO₂ [median difference 23.6 mmHg (3.1 kPa) in the 5 minute group and 20.6 mmHg (2.7 kPa) in the 10 minute group] exceeded rebreathed CO₂. However, as inspired CO₂ was not measured in these groups, this is based on a reasonable assumption that levels of rebreathing, using the same equipment, were similar.

Previous studies have described a similar finding in response to supplemental oxygen administration. In a study of eight North American elk (*Cervus canadensis manitobensis*) anesthetized with IM carfentanil and xylazine, the provision of supplemental oxygen was effective at raising PaO₂ and preventing hypoxemia, but hypercapnia [PaCO₂ > 80 mmHg (10.7 kPa)] was observed (Paterson et al. 2009). By contrast, animals in the room air control group were hypoxemic [PaO₂ approximately 30 mmHg (4.0 kPa)], with a less pronounced hypercapnia [PaCO₂ approximately 60 mmHg (8.0 kPa)] and higher f_R . In a study of horses anesthetized with an IV infusion of ketamine–xylazine–guaifenesin, a significant increase in PaCO₂ [54 ± 2 mmHg (7.2 ± 0.3 kPa)] was recorded 15 minutes after induction of general anesthesia in animals administered supplemental oxygen but not the control group breathing air (Coutu et al. 2015).

Dose-dependent respiratory depression from alfaxalone-based protocols has been reported in rabbits (Tutunaru et al. 2013; Navarrete-Calvo et al. 2014). A similar combination of IM dexmedetomidine (0.1 mg kg⁻¹) and midazolam (0.5 mg kg⁻¹), followed by induction with IV alfaxalone (0.3 mg kg⁻¹), was associated with a median f_R of 34 (range: 3–50 breaths minute⁻¹) and a median PaCO₂ of 65.1 (54.0–75.1) mmHg [8.7 (7.2–10.0) kPa] 5 and 15 minutes after induction, respectively (Engbers et al. 2017).

Cardiovascular depression can greatly alter the ventilation-to-perfusion equilibrium and cause an increase in alveolar deadspace, resulting in increased PaCO₂ (Kavanagh & Hedenstierna 2015). This confounding factor was investigated with the measurement of invasive arterial blood pressure. The lowest MAP recorded in the current study was 67 mmHg with the majority of rabbits displaying MAP > 80 mmHg. This agrees with previous findings in rabbits in which IM dexmedetomidine (0.025 mg kg⁻¹) combined with midazolam (0.2 mg kg⁻¹) resulted in a MAP >

80 mmHg (Bellini et al. 2014). Importantly, the absence of hypotension does not rule out perturbation of ventilation–perfusion matching by changes in cardiac output, particularly as α_2 -adrenergic agonist agents can markedly decrease cardiac output while maintaining or increasing arterial pressure through peripheral vasoconstriction (Klide et al. 1975). The absence of cardiac output monitoring is a limitation of this study, as some of the increase in PaCO₂ could be explained by an increase in alveolar deadspace. Nevertheless, all groups were administered the same anesthetic protocol so that an increased alveolar deadspace cannot explain the differences observed between the medical air and oxygen treatment groups. Two time points (5 and 10 minutes) for the oxygen groups were used to assess increasing drug effects on ventilation. The lower f_R in the PRE_{oxy}10 *versus* the PRE_{oxy}5 group suggests increasing respiratory depression as the drug effects increased. Following oxygen administration, f_R was similarly depressed in POST_{oxy}5 and 10 groups. This could reflect similar levels of depression induced by supplemental oxygen in combination with drug-induced respiratory depression. Assessment of sedation or anesthesia level could have been assessed to further investigate the impact of drug-induced respiratory depression. The presence of greater hypoxemia 10 minutes after injection of anesthetic drugs, compared with 5 minutes, could also reflect increasing drug effects and agrees with previous work supporting the benefits of early oxygen administration in sedated/anesthetized rabbits (Grint et al. 2008; Navarrete-Calvo et al. 2014). The associated respiratory acidosis in response to oxygen administration is a concern though the pH values recorded were close to normal ranges reported in these conscious rabbits (pH 7.37 ± 0.0 (Schroeder & Smith 2011); pH 7.40 ± 0.04 (Topal & Gül 2006)). Whereas a brief period of respiratory acidosis is likely to be well tolerated in healthy animals, intermittent positive pressure ventilation, through a SGAD or endotracheal intubation, would ensure adequate ventilation.

Alfaxalone has a short duration of action with minimal cardiovascular depressant effects at clinical doses in dogs and cats (Muir et al. 2008, 2009). It is licensed for IV induction of general anesthesia in rabbits and for IM use in cats in some countries. Off label IM administration in rabbits and cats provides a rapid, smooth induction of general anesthesia (defined as loss of the righting reflex; Franks 2008) of short duration (Muir et al. 2008, 2009; Marsh et al. 2009; Buisman et al. 2015; Huynh et al. 2015). When α_2 -adrenergic agonists are combined with alfaxalone or ketamine, recovery time is substantially prolonged in the absence of an α_2 -antagonist (Buisman et al. 2015; Hasiuk et al. 2015). The same may be true for rabbits, where IM alfaxalone (5 mg kg^{-1})–

dexmedetomidine (0.1 mg kg^{-1}) resulted in approximately 3 hours to recovery of sternal recumbency (Marin et al. 2020). In another study, similar doses of IM alfaxalone alone resulted in 30–60 minutes to recovery of sternal recumbency (Huynh et al. 2015). A disadvantage of administration of alfaxalone alone is that withdrawal reflexes in response to nociceptive stimulation are maintained, even at higher doses than in the present study (Huynh et al. 2015). Therefore, a clinically relevant objective is to utilize the short duration of action of alfaxalone and provide appropriate analgesia. The anesthetic protocol used in this study represents an effort to achieve these desirable characteristics. The unexpected hypoventilation and apnea after oxygen supplementation highlights the importance of assessing novel drug combinations and using appropriate perianesthetic monitoring.

This study has several limitations. The anesthetic protocol was selected based on the request from researchers for a short-acting alternative to a ketamine-based IM protocol; but further study is required to fully characterize its effects, and optimize dosing and management. The blood gas analyzer has not been formally validated in rabbits, although reference ranges using this analyzer have been published for this species (Ardiaca et al. 2013). To minimise interventions that could induce changes in cardiopulmonary values or level of sedation/anesthesia, body temperature was not measured; therefore, blood gases were not corrected for temperature. The delay between anesthetic injection and arterial blood sampling was relatively short (maximum of 12 minutes for POST_{oxy10}), with a smaller difference (5 minutes) among groups. Consequently, the change in body temperature should have been minimal with no difference among groups.

The addition of the control (medical air) group following the completion of the oxygen supplementation experiments is a limitation as treatment order randomisation could not be performed. The methodology for all groups was identical, with the exception of placement of an arterial catheter in the control group. Oxygen supplementation for two minutes was effective at increasing PaO₂ and causing the observed hypoventilation. A longer administration period would be needed to achieve a steady state, though this was not the goal of the study. The anesthetic drug combination produced an injectate volume of approximately 0.6 mL kg^{-1} . This was delivered as two injections to keep the volumes below the recommended IM volume of 0.5 mL kg^{-1} in rabbits (Diehl et al. 2001). This is a practical limitation of this protocol and may also increase stress from the requirement for two injections.

6. Conclusion

The combination of alfaxalone-dexmedetomidine-midazolam, at the doses studied, was associated with hypoxemia. This resolved with supplemental oxygen but oxygen administration resulted in hypoventilation. This effect was probably an attenuation of hypoxic respiratory drive in the presence of drug-induced depression of the ventilatory response to hypercapnia. Further research is needed to optimize this anesthetic protocol, characterize cardiovascular effects and evaluate it as an alternative to ketamine-based IM anesthesia.

Acknowledgements

This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council Discovery Grant (no. 424022-2013) and the Fondation J-Louis Lévesque. The authors thank Dr Sheila Laverty (Université de Montréal) for support to conduct this project and Hélène Richard (Université de Montréal) for technical support.

Authors' contributions

FRB and DSJP: study design, data collection, analysis and interpretation, preparation of manuscript.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

7. Table

Table 1. Blood gases values

Variable	Time point	Median	Range	<i>p</i> -value	Median difference (95% CI)
pH	PRE _{oxy} 5	7.38	7.34 – 7.43	0.016	0.07 (0.03 – 0.10)
	POST _{oxy} 5	7.31	7.26 – 7.37		
	PRE _{oxy} 10	7.39	7.01 – 7.48	0.125	0.07 (0.08 – 0.11)
	POST _{oxy} 10	7.33	7.09 – 7.39		
	PRE _{air} 10	7.40	7.30 – 7.44	0.004	0.02 (0.02 – 0.03)
	POST _{air} 10	7.38	7.28 – 7.42		
HCO ₃ ⁻ (mmol L ⁻¹)	PRE _{oxy} 5	22.5	19.4 – 26.2	0.016	8.2 (6.2 – 10.4)
	POST _{oxy} 5	30.8	27.6 – 32.7		
	PRE _{oxy} 10	25.2	10.9 – 32.8	0.016	6.2 (4.9 – 9.0)
	POST _{oxy} 10	32.8	17.1 – 39.0		
	PRE _{air} 10	28.2	25.9 – 31.3	0.008	1.1 (0.7 – 2.1)
	POST _{air} 10	29.2	26.8 – 31.7		
BE (mmol L ⁻¹)	PRE _{oxy} 5	-3	-6 – 2	0.016	7 (5 – 9)
	POST _{oxy} 5	4	1 – 7		
	PRE _{oxy} 10	0	-19 – 9	0.016	6 (3 – 8)
	POST _{oxy} 10	6	-13 – 14		
	PRE _{air} 10	3	0 – 6	0.38	0 (0 – 2)
	POST _{air} 10	5	0 – 7		
SaO ₂ (%)	PRE _{oxy} 5	94	91 – 96	0.044	5 (0 – 9)
	PRE _{oxy} 10	89	66 – 94		
	POST _{oxy} 5	100	99 – 100	0.99	0 (0 – 0)
	POST _{oxy} 10	100	100 – 100		
	PRE _{air} 10	83	54.0 – 92.0	0.78	0 (-1 – 1)
	POST _{air} 10	82	55.0 – 92.0		

Table 1 Arterial pH, standard bicarbonate (HCO_3^-), base excess (BE) and hemoglobin oxygen saturation (SaO_2) measured before and after 2 minutes of oxygen or medical air supplementation in rabbits administered intramuscular alfaxalone (4 mg kg^{-1}), dexmedetomidine (0.1 mg kg^{-1}) and midazolam (0.2 mg kg^{-1}). In group 5, seven rabbits breathed air spontaneously for 5 minutes after induction of anesthesia before administration of oxygen (measurement time points $\text{PRE}_{\text{oxy}5}$ and $\text{POST}_{\text{oxy}5}$); in group 10, seven rabbits breathed air spontaneously for 10 minutes before oxygen administration (measurement time points $\text{PRE}_{\text{oxy}10}$ and $\text{POST}_{\text{oxy}10}$) and in group air, nine rabbits breathed air spontaneously for 10 minutes before administration of medical air (measurement time points $\text{PRE}_{\text{air}10}$ and $\text{POST}_{\text{air}10}$) Data are presented as median (range) with 95% confidence intervals (95% CI) of the median difference between groups.

8. Figures

Figure 1. Experimental timeline

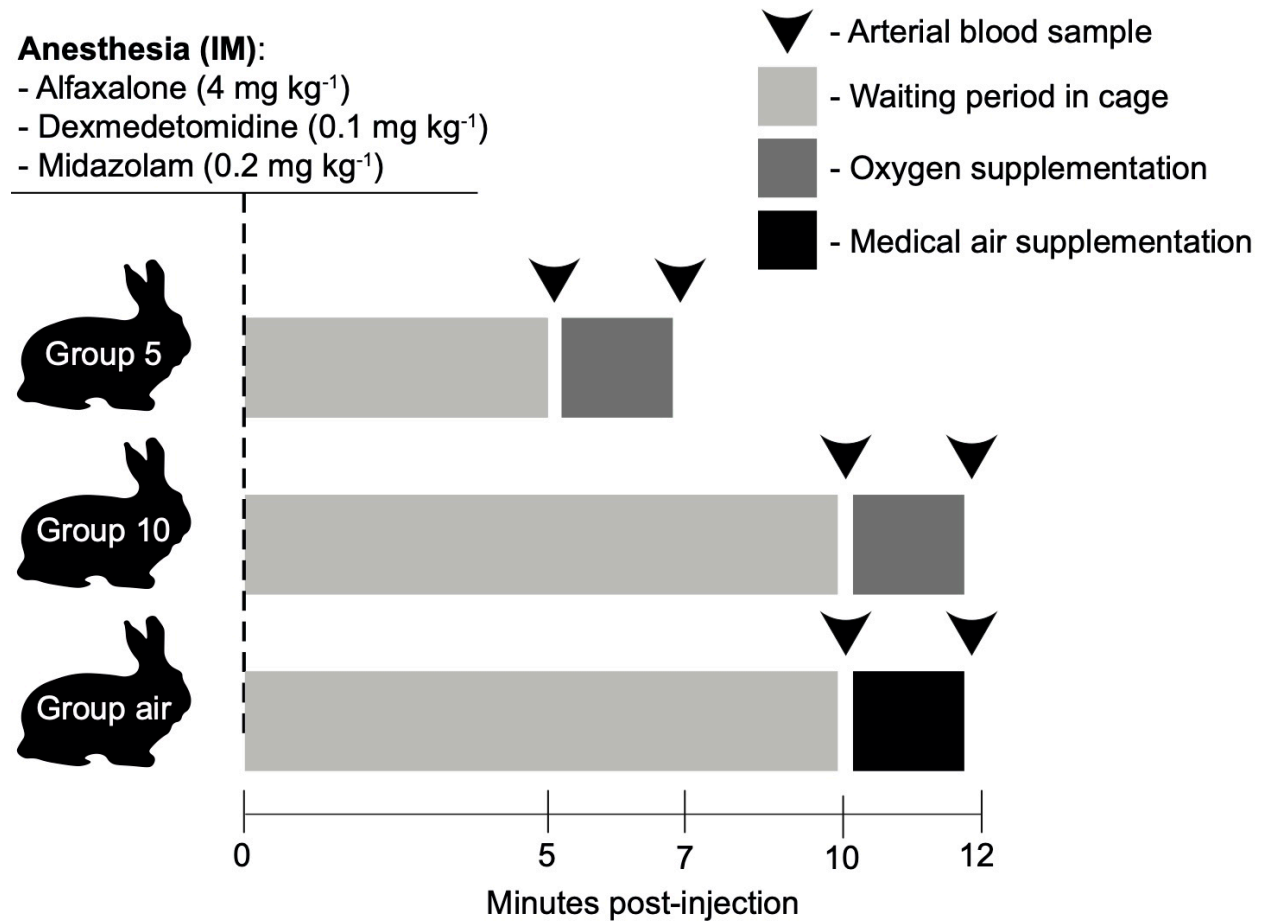


Figure 1 Experimental timeline. Groups differed in the waiting period following injection of anesthetic agents and gas supplementation. Arterial blood samples were collected and analyzed immediately before and after oxygen or medical air supplementation. Measurements from eight rabbits in group 5 and group 10, and nine rabbits in group air.

Figure 2. Arterial PaO₂, respiratory rate and PaCO₂

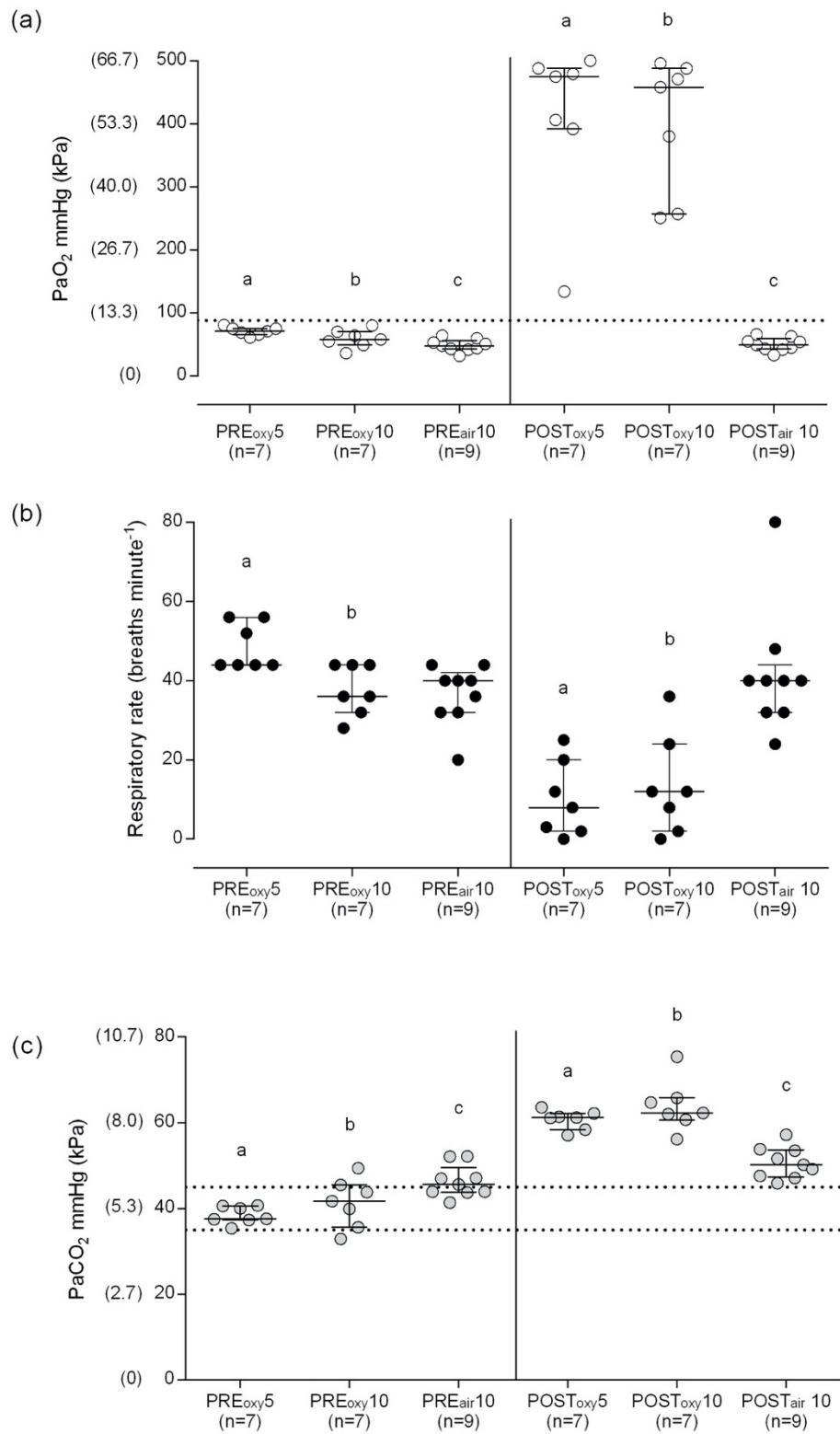


Figure 2 (a) Arterial partial pressures of oxygen (PaO_2), (b) respiratory rate and (c) arterial partial pressure of carbon dioxide (PaCO_2 measured in rabbits before (PRE time points) administration of intramuscular alfaxalone (4 mg kg^{-1})–dexmedetomidine (0.1 mg kg^{-1})–midazolam (0.2 mg kg^{-1}). After breathing air for either 5 or 10 minutes after induction of anesthesia, oxygen (1 L minute^{-1}) or air was administered for 2 minutes before further measurements (time points are $\text{POST}_{\text{oxy}5}$, $\text{POST}_{\text{oxy}10}$ and $\text{POST}_{\text{air}10}$; seven rabbits in group 5, seven rabbits in group 10 and nine rabbits in group air). Data are median and interquartile range superimposed over individual data points. Dotted horizontal line in (a) represents hypoxemia ($\text{PaO}_2 < 88 \text{ mmHg}$, 11.7 kPa). Dotted horizontal lines in (c) represent accepted normoventilation (PaCO_2 range $35\text{--}45 \text{ mmHg}$, $4.7\text{--}6.0 \text{ kPa}$).

*Significantly different from preanesthetic measurement within the same group ($p < 0.05$).

†Significantly different f_R from $\text{PRE}_{\text{oxy}5}$ at the same time point ($p < 0.05$).

‡Significantly different PaCO_2 from at $\text{PRE}_{\text{air}10}$, $\text{POST}_{\text{oxy}5}$ and $\text{POST}_{\text{oxy}10}$ ($p < 0.05$).

9. References

- Ardiaca M, Bonvehi C, Montesinos A (2013) Point-of-care blood gas and electrolyte analysis in rabbits. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 16, 175–195.
- Barzago MM, Bortolotti A, Omarini D et al. (1992) Monitoring of blood gas parameters and acid-base balance of pregnant and non-pregnant rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in routine experimental conditions. *Lab Anim* 26, 73–79.
- Bateman L, Ludders JW, Gleed RD, Erb HN (2005) Comparison between facemask and laryngeal mask airway in rabbits during isoflurane anesthesia. *Vet Anaesth Analg* 32, 280–288.
- Bellini L, Banzato T, Contiero B, Zotti A (2014) Evaluation of sedation and clinical effects of midazolam with ketamine or dexmedetomidine in pet rabbits. *Vet Rec* 175, 372.
- Benato L, Chesnel M, Eatwell K, Meredith A (2013) Arterial blood gas parameters in pet rabbits anaesthetized using a combination of fentanyl-fluanisone-midazolam-isoflurane. *J Small Anim Pract* 54, 343–346.
- Brodbelt DC, Blissitt KJ, Hammond RA et al. (2008) The risk of death: the confidential enquiry into perioperative small animal fatalities. *Vet Anaesth Analg* 35, 365–373.
- Buisman M, Wagner MC, Hasiuk MMM (2015) Effects of ketamine and alfaxalone on application of a feline pain assessment scale. *J Feline Med Surg* 18, 643–651.
- Canadian Council on Animal Care Animal Data Report, 2016. <https://www.ccac.ca/Documents/AUD/2016-Animal-Data-Report.pdf>. Last accessed 07 August 2018.
- Coutu P, Caulkett N, Pang D, Boysen S (2015) Efficacy of a portable oxygen concentrator with pulsed delivery for treatment of hypoxemia during equine field anesthesia. *Vet Anaesth Analg* 42, 518–526.
- Cuvelliez SG, Eicker SW, McLauchlan C, Brunson DB (1990) Cardiovascular and respiratory effects of inspired oxygen fraction in halothane-anesthetized horses. *Am J Vet Res* 51, 1226–1231.
- Dahan A (1996) General anesthesia and control of respiration. *Semin Anesth* 15, 328–334.

Diehl KH, Hull R, Morton D et al. (2001) A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 21, 15–23.

Dupras J, Vachon P, Cuveillez S, Blais D (2001) Anesthesia of the New Zealand rabbit using the combination of tiletamine-zolazepam and ketamine-midazolam with or without xylazine. *Can Vet J* 42, 455–460. [In French].

Engbers S, Larkin A, Rousset N et al. (2017) Comparison of a supraglottic airway device (v-gel®) with blind orotracheal intubation in rabbits. *Front Vet Sci* 4, 49.

European Union (2013) Seventh report on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union, 2013. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52013DC0859>. Last accessed 07 August 2018.

Fahlman A, Caulkett N, Arnemo JM et al. (2012) Efficacy of a portable oxygen concentrator with pulsed delivery for treatment of hypoxemia during anesthesia of wildlife. *J Zoo Wildl Med* 43, 67–76.

Flecknell P (2016) Anaesthesia of common laboratory species: special considerations. In: *Laboratory Animal Anaesthesia* (4th edn). Flecknell P (ed). Saunders Elsevier, USA. pp. 218–226.

Franks NP (2008) General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci* 9, 370–386.

Grint NJ, Smith HE, Senior JM (2008) Clinical evaluation of alfaxalone in cyclodextrin for the induction of anaesthesia in rabbits. *Vet Rec* 163, 395–396.

Hasiuk MM, Brown D, Cooney C et al. (2015) Application of fast-track surgery principles to evaluate effects of atipamezole on recovery and analgesia following ovariohysterectomy in cats anesthetized with dexmedetomidine-ketamine-hydromorphone. *J Am Vet Med Assoc* 246, 645–653.

Hedenqvist P (2001) Assessment of ketamine/medetomidine anaesthesia in the New Zealand White rabbit. *Vet Anaesth Analg* 28, 18–25.

Huynh M, Poumeyrol S, Pignon C (2015) Intramuscular administration of alfaxalone for sedation in rabbits. *Vet Rec* 176, 255.

Kavanagh BP, Hedenstierna G (2015) Respiratory physiology and pathophysiology. In: Miller's Anesthesia (8th edn). Miller RD (ed). Saunders Elsevier, USA. pp. 444–472.

Klide AM, Calderwood HW, Soma LR (1975) Cardiopulmonary effects of xylazine in dogs. *Am J Vet Res* 36, 931–935.

Lerche P, Muir WW 3rd (2004) Effect of medetomidine on breathing and inspiratory neuromuscular drive in conscious dogs. *Am J Vet Res* 65, 720–724.

Marín P, Belda E, Laredo FG et al. (2020) Pharmacokinetics and sedative effects of alfaxalone with or without dexmedetomidine in rabbits. *Res Vet Sci* 129, 6–12.

Marsh MK, McLeod SR, Hansen A, Maloney SK (2009) Induction of anaesthesia in wild rabbits using a new alfaxalone formulation. *Vet Rec* 164, 122–123.

McDonnell WN, Kerr CL (2015) Physiology, pathophysiology and anesthetic management of patients with respiratory disease. In: *Veterinary Anesthesia and Analgesia* (5th edn). Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ et al. (eds). Wiley Blackwell, USA. pp. 513–550.

Muir W, Lerche P, Wiese A et al. (2008) Cardiorespiratory and anesthetic effects of clinical and supraclinical doses of alfaxalone in dogs. *Vet Anaesth Analg* 35, 451–462.

Muir W, Lerche P, Wiese A et al. (2009) The cardiorespiratory and anesthetic effects of clinical and supraclinical doses of alfaxalone in cats. *Vet Anaesth Analg* 36, 42–54.

Navarrete-Calvo R, Gómez-Villamandos RJ, Morgaz J et al. (2014) Cardiorespiratory, anaesthetic and recovery effects of morphine combined with medetomidine and alfaxalone in rabbits. *Vet Rec* 174, 95.

Nishida T, Nishimura M, Kagawa K et al. (2002) The effects of dexmedetomidine on the ventilatory response to hypercapnia in rabbits. *Intensive Care Med* 28, 969–975.

Paterson JM, Caulkett NA, Woodbury MR (2009) Physiologic effects of nasal oxygen or medical air administered prior to and during carfentanil-xylazine anesthesia in North American elk (*Cervus canadensis manitobensis*). *J Zoo Wildl Med* 40, 39–50.

Seaman GC, Ludders JW, Erb HN, Gleed RD (1994) Effect of low and high fractions of inspired oxygen on ventilation in ducks anesthetized with isoflurane. *Am J Vet Res* 55, 395–398.

Schroeder CA, Smith LJ (2011) Respiratory rates and arterial blood-gas tensions in healthy rabbits given buprenorphine, butorphanol, midazolam, or their combinations. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50, 205–211.

Topal A, Gül N (2006) Comparison of the arterial blood gas, arterial oxyhaemoglobin saturation and end-tidal carbon dioxide tension during sevoflurane or isoflurane anaesthesia in rabbits. *Ir Vet J* 59, 278–281.

Tran HS, Puc MM, Tran J-LV et al. (2001) A method of endoscopic endotracheal intubation in rabbits. *Lab Anim* 35, 249–252.

Tutunaru AC, Sonea A, Drion P et al. (2013) Anaesthetic induction with alfaxalone may produce hypoxemia in rabbits premedicated with fentanyl/droperidol. *Vet Anaesth Analg* 40, 657–659.

Unoki T, Mizutani T, Toyooka H (2003) Effects of expiratory rib cage compression and/or prone position on oxygenation and ventilation in mechanically ventilated rabbits with induced atelectasis. *Respir Care* 48, 754–762.

Chapitre 3 – Pharmacocinétique et pharmacodynamique du flumazénil

L'article suivant a été resoumis après révisions mineures dans JAALAS (*Journal of the American Association of Laboratory Animal Science*, manuscript ID : JAALAS-20-000084.R1). Il décrit la pharmacocinétique et la pharmacodynamique du midazolam et son antagoniste, le flumazénil, chez le lapin.

Rousseau-Blass F, Cribb AE, Beaudry F, Pang DSJ. A Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Study of Intravenous Midazolam and Flumazenil in Adult New-Zealand White – Californian Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)

Contribution des auteurs :

FRB : planification du projet, manipulations expérimentales, analyse et interprétation des données, rédaction du manuscrit

AEC : planification du projet, analyse et interprétation des données, révision du manuscrit

FB : manipulations expérimentales, révision du manuscrit

DP : planification du projet, manipulations expérimentales, analyse et interprétation des données, rédaction du manuscrit

A Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Study of Intravenous Midazolam and Flumazenil in Adult New-Zealand White – Californian Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)

Frédéric Rousseau-Blass,^{1,2} Alastair E Cribb,³ Francis Beaudry,^{1,2} and Daniel SJ Pang^{1,2,4}

¹ *Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada;* ² *Groupe de recherche en pharmacologie animale du Québec (GREPAQ), Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada;*

³ *Cummings School of Veterinary Medicine, Tufts University, N Grafton, Massachusetts;* ⁴ *Department of Veterinary Clinical and Diagnostic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine (UCVM), University of Calgary, 3280 Hospital Drive NW, Calgary, Alberta, Canada*

Correspondence: Daniel SJ Pang, Department of Veterinary Clinical and Diagnostic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, 3280 Hospital Drive NW, Calgary, AB T2N 4Z6, Canada. E-mail: dsjpang@ucalgary.ca

Running title: PKPD of flumazenil and midazolam in rabbit

1. Abstract

Flumazenil, a competitive benzodiazepine antagonist, is commonly used in rabbits to shorten sedation or post-anesthetic recovery following benzodiazepine administration. However, no combined pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) data are available to guide its administration in this species. In a prospective, randomized, blinded, crossover study design, the efficacy of IV flumazenil (FLU; 0.05 mg/kg) or saline control (SAL; equal volume) to reverse the loss of righting reflex (LORR) induced by IV midazolam (1.2 mg/kg) in fifteen New Zealand White rabbits (2.73 – 4.65 kg, 1 year old) was investigated. Rabbits were instrumented with an arterial (central auricular artery) and venous (marginal auricular vein) catheters. After baseline blood sampling, IV midazolam was injected (T₀). Treatment (FLU/SAL) was injected 30 seconds after LORR. Arterial blood samples were collected 1 and 3 minutes after midazolam injection and 1, 3, 6, 10, 15, 21, 28, 36, 45 and 60 minutes following treatment injection. Plasma samples for midazolam, 1-OH-midazolam and flumazenil were analyzed using high performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and the time to return of righting reflex (ReRR) was compared between groups (Wilcoxon test). FLU terminal half-life, plasma clearance and volume of distribution were 26.3 min [95%CI: 23.3 to 29.3], 18.74 mL/min/kg [16.47 to 21.00] and 0.63 L/kg [0.55 to 0.71], respectively. ReRR was 25 times faster in FLU (23 [8 to 44] seconds) versus SAL (576 [130 to 1141] seconds; $p < 0.001$, 95%CI [425 to 914 seconds]). Return of sedation (lateral recumbency) occurred in both groups (7/13 in FLU; 12/13 in SAL) with return of LORR in a few animals (4/13 in FLU; 7/13 in SAL) at 1540 [858 to 2328] seconds. In the population and anesthesia protocol studied, flumazenil quickly and reliably reversed sedation from midazolam injection. However, the potential resedation after flumazenil administration warrants careful monitoring in the recovery period.

Abbreviations: BZD, Benzodiazepines

2. Introduction

Benzodiazepines (BZD) are a class of sedatives-hypnotics commonly used in exotic companion and laboratory animals (birds, reptiles and small mammals).^{10,18} The mechanism of action is mediated through enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) affinity for the GABA_A receptor and results in sedation, anxiolysis and muscle relaxation with minimal cardiorespiratory depression.¹⁷ The short-acting BZD, midazolam, is frequently used as a sole agent or in premedication combination in rabbits.^{11,23,24} The ability to deliver midazolam by the intramuscular route (in contrast to diazepam) is particularly useful in rabbits as their temperament often means that sedation is required for non-invasive procedures (e.g. radiography, intravenous catheterization).¹¹

The increasing popularity of rabbits, both as pets and in the research industry, creates a greater demand for rabbit anesthesia.¹⁴ Unfortunately, the risk of perianesthetic mortality remains higher in rabbits compared to dogs or cats, with the majority of deaths occurring during the recovery period.^{12,34} This tendency towards death occurring in recovery is likely multifactorial, including the continued sedative and depressive effects of sedative and anesthetic drugs during recovery, a period when physiologic monitoring and surveillance is frequently decreased.¹² Therefore, shortening the recovery period through pharmacological antagonism of drugs is an attractive approach that has already shown benefits in humans and animals.^{26,30}

Flumazenil (FLU) is a selective GABA_A receptor antagonist that antagonizes the clinical effects of midazolam through competitive inhibition at the benzodiazepine allosteric site of the GABA_A receptor.³¹ Its use reduces recovery and discharge times after benzodiazepine sedation in humans.³⁹ However, the potential for return of sedation following FLU antagonism has been reported.^{7,21,39} The available literature on the use of FLU in rabbits is very limited. Reports are largely limited to case reports, in which considerable variations in dosing exist (0.02 - 0.1 mg/kg IV, IM or SC).^{5,16,44} Furthermore, the quality and duration of recovery, and potential for re-sedation, is rarely described or quantified, making its frequent use in clinics largely anecdotal rather than evidence-based.

The objectives of this study were to investigate the pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) parameters of FLU and midazolam in rabbits, including the risk of re-sedation after FLU administration. A secondary objective was to assess sedation using a modified sedation scale in rabbits. Our hypotheses were that: 1. PK of FLU in rabbits are such that a dose of 0.05 mg/kg

would fully and safely reverse the sedative effects of midazolam; and 2. The modified sedation scale would be able to differentiate sedated and unsedated rabbits.

3. Materials and Methods

Animals

Fifteen male (n = 7) and female (n = 8) New Zealand White-Californian cross rabbits (range 2.73 – 4.65 kg, 1 year old), purchased from a commercial vendor (Ferme Laobec, Acton Vale, Québec, CA) were used. The rabbits were free from *Pasteurella multocida*, *Salmonella spp.*, *Bordetella bronchiseptica*, *Treponema cuniculi*, *Clostridium perfringens*, *Mycobacterium spp.*, rotavirus, poxvirus, calicivirus, endoparasites and ectoparasites. They were fed a commercial pelleted diet (5079-U.S. Charles River Autoclavable Rabbit food, Charles River Laboratories, QC, Canada) and autoclaved hay from a local supplier (Ferme Lumunick, QC, Canada) with tap water *ad libitum*. Rabbits were housed in individual cages (elevated cages, with perforated plastic flooring, without bedding; 70 cm X 70 cm x 45 cm, Allentown Inc., NJ, USA) with enrichment (Jingle Ball and Dumbbells, Bio-Serv, NJ, USA) in an environmentally controlled housing room (humidity 35 [25-55] %, temperature 18 [17-19] °C) and a light-dark cycle of 12:12 hours, with lights on at 0600 hours (270 [245-320] lux, median [range]). Each animal had weekly access to a pen (4 x 4 metres) filled with softwood pine shavings and enrichment toys. After a holding period of 2 weeks, rabbits were enrolled in the study. All rabbits were assessed twice daily, including observation of general appearance, activity level, feces production and evaluation of appetite and water consumption.

The study protocol was reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (18-Rech-1973). All procedures were conducted in accordance with the principles outlined in the current Guide to the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care). All procedures were performed during the light period (0800-1600) with all experiments performed over 2 periods of 5 days separated by 14 days.

Study design

This was a prospective, randomized, blinded, crossover trial with 2 treatment arms separated by a 2 week washout period. During the first arm of the study, rabbits were randomly allocated (random number generator, www.random.org) to receive a standard dose of midazolam (Sandoz, QC, Canada), followed by either flumazenil (FLU; Sandoz, QC, Canada) or saline control (SAL). Each

rabbit received the opposite treatment in the second arm. Treatment order was randomized (same method) for each arm and investigators were blinded to treatment allocation. Each rabbit was weighed (SRV930 scale, SR Instruments, NY, USA) and transported to a separate room for the experimental procedure. Rabbits were gently restrained with an adjustable fabric body wrap (Bunny Snuggle, Lomir Biomedical Inc, QC, Canada). Rabbits were habituated to handling and restraint during the 2 week holding period. The fur on the exterior surface of both ears was manually depilated and a local anesthetic cream (Lidocaine 2.5%, Prilocaine 2.5%, EMLA®, AstraZeneca, ON, Canada) applied with an occlusive dressing over the marginal auricular vein and central auricular artery (cream applied over approximately 2 cm²). The dressing was left in place for a minimum of 30 minutes after which the skin was aseptically prepared (0.5% chlorhexidine and alcohol swabs) for cannulation of the artery and vein using over-the-needle catheters (24-gauge, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA). An arterial blood pressure transducer (TruWave™, Edwards LifeScience, California, USA) was positioned and zeroed at the level of the heart (sternum) and connected to the arterial catheter using non-compliant tubing (Pressure tubing, Edwards LifeScience, California, USA) filled with heparinized saline. Arterial blood pressures were displayed on a multiparametric monitor (LifeWindow LW6000, Digicare Biomedical, Florida, USA). Once all catheters and instrumentation were installed, the baseline for systolic, mean and diastolic arterial blood pressures were recorded, followed by baseline arterial blood sampling. Subsequently, all rabbits received a midazolam bolus (1.2 mg/kg IV). The bolus was hand-injected over 5 seconds. Completion of the injection was the baseline (T0) to which all other times were referenced. Based on treatment allocation, FLU (0.05 mg/kg IV) or an equal volume of SAL was injected 30 seconds after loss of righting reflex (hand-injected over 5 seconds). Arterial blood samples were collected 1 and 3 minutes after midazolam injection and 1, 3, 6, 10, 15, 21, 28, 36, 45, and 60 minutes following treatment (FLU/SAL) injection (Fig. 1).

Behavioral assessment

Time from midazolam injection (T0) to head down, lateral recumbency, and loss of righting reflex (LORR) were recorded. Lateral recumbency and righting reflex were tested by attempting to place each rabbit in lateral or dorsal recumbency, respectively. Handling was standardized and performed by the same two investigators throughout. Lateral recumbency was tested at 2.5 minutes after midazolam injection and then every 2 minutes. The righting reflex was tested 5 minutes after

midazolam injection and every 2 minutes. Once lateral and LORR was achieved, the animal was not re-tested until return of the righting reflex (ReRR). The ReRR occurred spontaneously, without stimulation. For both lateral recumbency and righting reflex, a maximum of 3 trials were attempted. The delay between treatment injection (FLU/SAL) and ReRR was recorded. The delay between ReRR and any return to lateral recumbency or a second LORR was also recorded. Placement in lateral recumbency was tested every 2 minutes (maximum of 3 trials) after ReRR. LORR was tested every 2 minutes (maximum of 3 trials) after a return to lateral recumbency. Sedation levels were assessed using a modified version of the sedation scale described by Wagner et al. (Annexe).⁵¹ Sedation was assessed 4, 10 and 30 minutes after midazolam injection. If a rabbit displayed LORR, sedation was assigned the maximal score (14/14). Assessment of body position was performed 30 minutes after return to the cage. Exclusion criteria included any deviation from study protocol due to technical difficulty (failure to place venous or arterial catheter) or delayed/absent LORR.

Blood sampling

Arterial blood sampling technique was as follows: a 3mL syringe (Luer lock, Terumo, NJ, USA) was connected to a 3-way stop cock (Smiths Medical ASD, OH, USA) placed between the catheter extension and non-compliant tubing (Pressure tubing, Edwards LifeScience, California, USA). Three mL of blood was initially withdrawn (twice the line volume) followed by approximately 1 mL into a heparinized syringe (AirLife®, CareFusion, France). Air was expelled and the sample immediately placed on dry ice, for a maximum of 15 minutes, before centrifugation (sample did not freeze). The initial 3mL of blood was reinjected into the arterial catheter and the line flushed with 1 mL of heparinized saline. Samples were centrifuged at 2,000 g for 10 minutes within 10 minutes of collection. A volume of 300 µL of plasma was withdrawn from the sample and stored on dry ice until the end of the experimental period (approximately 6 hours), then stored at -80°C until analysis.

Plasma sample analysis

Drugs were extracted from rabbit plasma using a simple protein precipitation method. A total of 50 µL of sample was mixed with 250 µL of internal standard solution (500 ng/mL of d₅-FLU, d₆-midazolam and d₅-1-OH-midazolam in 50:50 methanol) in a 1.5 mL centrifuge tube. The sample was then vortexed vigorously and allowed to rest for 10 min at room temperature prior to centrifugation. Samples were centrifuged at approximately 12,000 g for 10 min and 200 µL of the

supernatant was transferred into an injection vial for analysis. The HPLC system was a Thermo Scientific Vanquish FLEX UHPLC system (San Jose, CA, USA). Chromatography was achieved using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic Phenyl 50 × 1 mm, with a particle size of 5 μm. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile (A) and water (B) (both fortified with 0.1% of formic acid) at a ratio of 5(A):95(B). From 0 to 1 minute, the ratio was maintained at 5(A):95(B). From 1 to 3 minutes the mobile phase ratio was set to 85(A):15(B). The mobile phase composition ratio was reverted at the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 5 minutes for a total run time of 8 minutes. The flow rate was fixed at 100 μL/min and 2 μL of samples were injected. A Thermo Scientific Q Exactive™ Plus Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA) was interfaced with the UHPLC system using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. Mass spectrometry detection was performed in positive ion mode and operating in scan mode at high-resolution, and accurate-mass (HRAM). Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases and they were set at 10 and 5 arbitrary units. The heated ESI probe was set to 4000 V, auxiliary gas set to 200°C and the ion transfer tube temperature was set to 300°C. The scan range was set to m/z 200-600. Data was acquired at a resolving power of 140,000 (FWHM) using automatic gain control target of 3.0x10⁶ and maximum ion injection time of 200 msec. Targeted drug quantification was performed at MS¹ level using specific precursor masses based on the monoisotopic masses (i.e [M+H]⁺ ions). Quantification was performed by extracting specific precursor ions using a 5 ppm mass window and peak area ratio with specific stable isotope-labeled internal standard was generated. Instrument calibration was performed prior all analysis and mass accuracy was notably below 1 ppm using Thermo Pierce calibration solution and automated instrument protocol. Precision and accuracy of the method has met generally accepted performance criteria in bioanalytical chemistry.¹⁵ The limit of quantification was 5 ng/mL for each analyte.

Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling

Pharmacokinetic parameters for midazolam and FLU were determined by non-compartmental analysis using PKSolver, a freely available add-in program for Microsoft Excel™ (Microsoft Co, Redmond, WA).⁵³ All pharmacokinetic analyses were carried out by designating the time of administration as t = 0 and all calculations were based on the time actual samples were taken. To carry out an assessment of drug concentration at which specific behavioral events occurred, the

plasma concentration at which the event occurred was determined by extrapolating the concentration based on the two time points bracketing the event. The following formula was used, where C_A = the concentration at the time point prior to the event (T_A ; minutes) and C_B = the concentration at the time point (T_B ; minutes) after the event. C_E and T_E (seconds) represent the drug concentration and the time of the event (e.g. loss of righting reflex, return of righting reflex), respectively.

$$C_E = (C_A) - ((C_A - C_B)/(T_B - T_A) * (T_E - (T_A * 60)))/60$$

Statistical analyses

Distribution of data was assessed with a D'Agostino-Pearson omnibus normality test. If data did not approximate a normal distribution, non-parametric tests were applied. The delay for ReRR, return to lateral recumbency and return to 2nd LORR were compared between both groups with a Wilcoxon test. The plasma concentrations of midazolam and FLU at these behavioral outcomes were compared with a two-tailed paired t-test. Time to head down, lateral recumbency and LORR represents the mean value for each rabbit from the two trials as there were no treatment differences before the FLU treatment injection (data not shown). To assess the incidence of 2nd LORR, body position (LORR or not) was evaluated with a Fisher's Exact test (one-tail) from ReRR until 60 minutes post-treatment injection. A one-tail test was used as a prediction was made on the direction of the association before collecting data (FLU reducing signs of sedation). Return to lateral recumbency after ReRR was analysed using the same method. Dose response curves were generated based on the cumulative number of animals showing response (e.g. LORR) and plasma log concentrations. The half-maximal effective concentration (EC50) was determined using the standard log(agonist) versus response function to generate a non-linear response curve (GraphPad Prism 6.07, GraphPad Software, CA, USA). Spearman's rank correlation coefficient was used to assess the correlation between initial midazolam concentration and time to LORR or plasma concentration at LORR. Mean arterial blood pressures (MAP) were compared between groups and timepoints with a mixed linear model using treatment, time and interaction between these two parameters as fixed effects. The significance level (α) was set at 5%. Parametric data are presented as mean \pm SD and non-parametric data are presented as median [range]. All data are presented with 95% confidence interval (95%CI) of the difference. Statistical analysis was performed with commercial software (GraphPad Prism 6.07, GraphPad Software, CA, USA). An *a priori* power

analysis estimated 12 rabbits (6 per group) were required to detect a mean difference of 30 seconds (standard deviation: 15 seconds) between FLU and SAL for the return of righting reflex (based on pilot data) with a power of 0.9 (1 - β error) and α of 5% (G*Power, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Germany). The data supporting the study results are available in an electronic repository: <https://doi.org/10.7910/DVN/2ODA3H>

4. Results

All rabbits (n = 15) completed the study. Two female rabbits were excluded from all data analysis, as one never achieved LORR after midazolam injection and one had a longer ReRR with FLU than SAL (>100 standard deviations from treatment group mean). Plasma analysis confirmed both rabbits received the intended drugs and PK data showed that plasma profiles were similar to the rest of the sample population (data not shown). Therefore, data were analysed from 7 males and 6 females.

The pharmacokinetic parameters of midazolam, 1-OH midazolam and FLU are presented in Tables 1, 2 and 3, respectively. Figs. 2, 3 and 4 show the plasma concentration curves over time from an exemplar rabbit for midazolam, 1-OH-midazolam and FLU, respectively. There was no correlation between the initial concentration of midazolam and the time to LORR ($p = 0.29$, Spearman $r = -0.32$ 95%CI [-0.74 to 0.31]) and no correlation between initial midazolam concentration and the plasma concentration of midazolam when LORR occurred ($p = 0.99$, Spearman $r = 0.003$ 95%CI [-0.56 to 0.57]). FLU administration did not influence midazolam and 1-OH-midazolam pharmacokinetics (Tables 1 and 2).

Following midazolam injection, times to achieve head down position and lateral recumbency were 69 [36 to 108] seconds and 164 [157 to 192] seconds, respectively. The time from midazolam injection to LORR was 326 [307 to 521] seconds and it occurred at a plasma midazolam concentration of 802 [633 to 1083] ng/mL. The midazolam EC_{50} for LORR was 810 ng/mL (95%CI [789 to 831] ng/mL).

The ReRR was 25 times faster in the FLU group (23 [8 to 44] seconds) than SAL group (576 [130 to 1141] seconds; $p < 0.001$, 95%CI [425 to 914 seconds], Fig. 5) and occurred at a significantly higher midazolam concentration (821 [497 to 1148] versus 456 [333 to 744] ng/mL; $p < 0.0001$). The FLU EC_{50} for ReRR was 165 ng/mL (95%CI [122 to 224] ng/mL). Rabbits in the FLU group

remained sternal significantly longer after ReRR (554 [354 to 1646] versus 150 [91 to 1359] seconds; $p = 0.016$ 95%CI [204 to 1210]) and their return to lateral recumbency also occurred at a lower midazolam concentration (54 [40 to 68] versus 442 [334 to 556] ng/mL; $p = 0.03$). Fewer rabbits returned to lateral recumbency after ReRR in the FLU 54% (7/13) versus SAL 92% (12/13) group ($p = 0.04$). Return to lateral recumbency occurred when FLU plasma concentration decreased below a median of 57.4 ng/mL [40.1 to 69.3], which took place at 1186 [726 to 2275] seconds. A number of rabbits reached LORR a second time after ReRR, with similar incidence between FLU 31% (4/13) and SAL 54% (7/13) groups ($p = 0.21$). The timing of the 2nd LORR was earlier for FLU (972 [858 to 1480] seconds) versus SAL (1840 [1147 to 2328] seconds; $p = 0.012$, 95%CI [79 to 1266 seconds]).

There was no difference in sedation score between treatment groups following midazolam and before treatment injections ($p > 0.99$). FLU treatment significantly decreased sedation scores at the first ($p < 0.001$, 95%CI [3.1 – 10.5]) but not the second ($p = 0.274$, 95%CI [-1.2 – 6.2]) timepoint following injection (Fig. 6).

There were no differences in mean arterial blood pressure at any time point between groups ($p = 0.75$). Mean arterial blood pressure was lower than baseline from 15 minutes post treatment injection in FLU ($p < 0.001$, Fig. 7) and SAL groups ($p = 0.035$). Following midazolam injection, 18/26 (73%) rabbits displayed nystagmus of 2-5 minutes duration and one rabbit exhibited teeth grinding in both treatment arms. Following FLU injection, no rabbits displayed agitation or other adverse behavioral effects. Thirty minutes after returning to their cage, no rabbits could be placed in lateral or dorsal recumbency.

5. Discussion

To our knowledge, this is the first study describing combined PK-PD parameters of IV FLU to antagonise midazolam in rabbits. FLU PK data (Table 3) reported in the current study are similar to the existing literature in rabbits.⁴¹ However, it must be acknowledged that the PK values obtained here are in the presence of midazolam. Although FLU-midazolam PK interactions have not been reported in other species³¹ and we did not observe an effect of FLU on midazolam PK, we cannot exclude this possibility. Najjar et al. investigated the PK of a constant rate infusion (CRI) of FLU (1 mg/kg/hr IV) in 10 New Zealand White rabbits.⁴¹ The reported terminal half-life (12 – 18 min) was lower than observed here, due at least in part to a higher clearance (approximately 35-40

mL/min/kg, nearly double the value reported here). They also reported that theophylline inhibited FLU clearance increasing the half-life of FLU to 28 – 42 minutes. Differences in PK modeling, administration method (IV vs CRI), or variability in study populations could also contribute to the differences observed.

FLU is currently licensed for IV use only in humans.⁴⁰ The same administration route was used in this study to decrease the impact of absorption on efficacy and to facilitate direct comparison with human data. Roncari et al (1986) reported a V_{ss} of 1.1 L/kg, somewhat higher than the 0.6 L/kg observed in the rabbits in this study (Table 3). However, Cl was 16.3 ml/min/kg in humans, compared to 18.7 ml/min/kg here. The result is a half-life of approximately 60 min in humans, compared to 26 min in this study.

Other routes of FLU administration have been investigated. Oral (PO) administration results in a considerable first-pass metabolism in the liver, decreasing bioavailability to 16%, with a peak effect occurring 20-90 minutes after administration.⁴³ Heniff et al. compared IV, sublingual, intramuscular and rectal (PR) administration of FLU (0.02 mg/kg; 0.1 mg/kg for PR) to reverse midazolam-induced respiratory depression in mixed breed dogs. No PK and limited PD data were reported; however, the onset of action was fastest following IV administration.²⁷ In another canine study, intralingual and oral submucosal administration of FLU (0.01 mg/kg) resulted in a similar peak plasma concentration as IV injection.⁵⁰ The time to peak concentrations following intralingual and submucosal administration was longer. At thirty minutes post-administration, plasma concentrations were higher compared to IV administration. Intraperitoneal and subcutaneous routes of administration are described in preclinical animal models reporting partial antagonism of benzodiazepine agonists.^{32,35} However, to our knowledge, no PK investigations have been reported for these two alternative routes. Therefore, further PK PD data are required to elaborate dosing guidelines using alternative routes of administration in animal species.

The PK of midazolam in humans is substantially different than in rabbits.⁴⁸ The half-life in humans is ~1.8 h, compared to ~30 min reported here. The V_d in humans and rabbits are similar at approximately 1.14 and 1.27 L/kg, respectively. This suggests that metabolism (reflected in the clearance) is much slower in humans (clearance of 5.5 ml/min/kg) than rabbits (clearance of 35 ml/min/kg).

The PK of midazolam previously reported in rabbits supports our results, with a half-life of 30 min, weight-normalized V_d and Cl of 0.83 L/kg and 19 mL/min/kg, respectively.⁶ Important differences in dosage (0.35 vs 1.2 mg/kg) could explain the small discrepancies in PK data between studies. Metabolism of midazolam by the liver leads to the production of an active metabolite, 1-OH-midazolam. This metabolite is produced in higher quantities after PO administration because of extensive first-pass metabolism, whereas it merely reached 1/70th of the parent drug plasma concentration after IV administration in humans.²⁹ Although this metabolite has approximately half the activity of the parent drug and displays a longer terminal half-life, it is unlikely that it contributed to midazolam duration of action at the plasma concentrations reached in rabbits after IV administration because the concentrations of midazolam achieved were much greater than the metabolite.¹⁷ There was no effect of FLU on the PK of midazolam or 1-OH-midazolam.

FLU (0.05 mg/kg IV) reliably reversed the sedative effects of midazolam (1.2 mg/kg IV) in less than 45 seconds, decreasing the duration of dorsal recumbency by a factor of 25. However, a return to lateral recumbency and LORR occurred following FLU administration. The time to return of lateral recumbency was longer after FLU administration and there was a significantly smaller proportion of rabbits affected when compared to the SAL group. These results are consistent with previous studies reporting the efficacy of FLU (pharmaceutical compound code: Ro 15-1788) as a BZD antagonist in humans, rabbits, dogs, cats, rats and mice.^{4,13,38,49} However, these studies also report variable antagonist effect sizes, duration of action, and risks of re sedation. Bonetti et al. first reported FLU reversal of midazolam-induced LORR in rats, with an IV FLU dose of 3 mg/kg reducing LORR duration by a factor of 6.⁹ This smaller effect size, as well as other differences reported in the literature assessing FLU antagonistic effects, could be explained by the agonist/antagonist dosage ratios, varying routes of administration, or varying outcomes of interest between studies.

In contrast to humans, studies guiding dosing of FLU are lacking for animal species. The recommended FLU dosing strategy in humans is to titrate to effect, with an initial dose of 0.2 mg IV followed by increments of 0.1 mg IV, repeated every 60 seconds (maximal dose of 1 mg) until desired arousal is achieved. A typical total dose is between 0.3 and 0.6 mg.⁴⁰ This titrated administration decreases the likelihood of failed antagonism, which has been reported in 5% of reversals in humans and could reflect inadequate agonist/antagonist ratio at the site of action, based

on individual variability.³⁶ One rabbit in the study did not achieve ReRR as expected following FLU despite plasma drug levels comparable to the rest of the sample population. Administration of FLU in veterinary patients is mostly reported as single injection. As such, the appropriate agonist/antagonist dose ratio is important to achieve the desired level of arousal. The midazolam dose used here was chosen based on pilot data and associated with reliable LORR, whereas the FLU dose was based on clinical reports in the literature.^{5,16,44} This resulted in an agonist/antagonist dose ratio of 1:24, approximately half that previously reported in dogs, where both sedation and muscle relaxation from midazolam (1 mg/kg, IV) were completely antagonised with FLU (0.08 mg/kg, IV; 1:13 ratio).⁴⁹ Although a lower agonist/antagonist ratio was used, FLU proved effective in providing a rapid and reliable reversal of midazolam sedation. Importantly, re sedation occurred in approximately half of rabbits given FLU.

The risk of re sedation in humans, resulting from a shorter clinical effect of FLU compared to the BZD agonist, has been reported in anesthesia and critical care, but remains controversial. Studies evaluating FLU as an antidote for BZD intoxication reported re sedation, however the BZD dosages were higher than those used clinically.^{1,39} Furthermore, the combination of BZD with other sedative agents (e.g. opioids) without proper reversal (e.g. naloxone) are important confounding factors preventing accurate assessment of re sedation after FLU administration.^{21,28,37} Finally, absence of re sedation was reported in multiple studies investigating the safety of FLU to antagonise midazolam.^{42,46,52}

The re sedation reported after the use of FLU in this study has been rarely described in the veterinary literature. Larouche et al. investigated the sedative effects of midazolam (1 mg/kg IM) followed by FLU (0.08 mg/kg IM) in ball pythons (*Python regius*). Signs of re sedation were reported 3 hours after reversal in all snakes (n = 9), although level of sedation and adverse effects were not described.³³ Considering that midazolam is extensively bound to plasma protein (96%) in comparison with FLU (50%), elimination of the latter could be more rapid, a proposed explanation in some reports of re sedation.^{2,28} However, this fails to explain the re sedation observed here, as FLU and midazolam PK profiles were similar (t_½ of 25 – 30 min). Therefore, the shorter duration of BZD antagonism leading to re sedation in rabbit could arise from inappropriate agonist/antagonist ratios (i.e. too low a dose of FLU) or from the difference in free fraction of FLU at the effect site (brain). The rate and extent of drug delivery/elimination to/from the brain is

affected by multiple factors that vary between species.²⁵ A good example of this is the blood-brain barrier efflux transporter P-glycoprotein resulting in faster elimination of FLU in rodents compared to humans.^{19,20} PK-PD studies in rabbits investigating FLU uptake and elimination from the brain are warranted to elucidate the mechanism(s) underlying the duration of action.

The delayed time to return of lateral recumbency when FLU was administered (compared to SAL) suggests FLU initially prevented effects of midazolam, but eventually dropped below a concentration that was effective. It should be pointed out that the approach used here of administering FLU immediately after the onset of midazolam effects would not be normal clinical practice. That is, we would only be reversing midazolam after the clinical procedure was completed, which can be anywhere from a few minutes to much longer in the case of a surgical procedure. In those clinical situations, re sedation may not have been observed because of the longer time periods between administration of midazolam and administration of FLU.

If re sedation is a clinical issue, there would be two possible ways to address this problem, neither of which were explored in this paper. The first would be to increase the initial dose of FLU. Doses of up to 0.1 mg/kg have been given to individual rabbits, but have not been systematically studied.⁵ Doubling the dose would be expected to extend the time of therapeutic efficacy by one half-life, or approximately 25 minutes. An alternative would be to administer a second dose of FLU. Given that the median time to a second loss of right reflex with FLU was about 19.8 minutes, and the median FLU concentration was 57.4 ng/mL, it would appear to be safe to administer a second dose of 0.05 mg/kg FLU. This is consistent with the recommendation in people, where repeat doses may be administered at 20-min intervals in the event of re sedation. Given the PK of midazolam in rabbits, the need to repeat FLU more than once appears unlikely unless an unusually high dose of midazolam was administered. It must be emphasized, however, that neither of these options were assessed in this study and are suggestions based on the PK profile of FLU.

The absence of cardiovascular adverse effects from FLU are consistent with previous studies in rabbits.^{8,45} Midazolam has a direct effect on contractility and systemic vascular resistance, potentially explaining the slow decrease in MAP over time in both treatment groups.⁴⁷

The sedation scale used in this study was adapted from a validated canine sedation scale.⁵¹ The modified scale was able to detect a difference in sedation between both treatment groups after

antagonism by FLU. This represents construct validity, though further work is required to confirm this with other sedation protocols and to assess reliability.

In addition to the rabbit that did not respond to FLU administration, another excluded rabbit never achieved LORR after midazolam injection. Both rabbits had plasma concentrations for midazolam and FLU that were similar to the sample population mean, suggesting that the potential for individual variability reported in this species² is most likely related to pharmacodynamic, and not pharmacokinetic differences. However, differences in brain concentrations cannot be discounted based on the data presented here. Five rabbits required a longer time to achieve LORR (7.5 to 10 minutes after midazolam injection). These rabbits were not excluded as all timings were corrected to when drugs were administered and individual timepoints were used. Excluding these rabbits would assume that PK-PD relationship was similar across rabbits which does not reflect the data presented here.

A limitation of this study was the single dose and route of administration used to determine the PK-PD profile of FLU in rabbits. Although this limits the generalizability of the results, these data remain the first available PK-PD profile of FLU and midazolam coadministration in rabbits and could be the basis for further investigations. The decision to perform a PK-PD study, applying standard methodology, was based on the goal of generating an evidence-base for clinical application. Another limitation was not using a midazolam CRI to confirm the plasma concentration at which the effect of FLU begins or wears off because both the concentration of FLU and midazolam were changing over time. As the plasma concentration of both FLU and midazolam decrease, it is difficult to isolate the sole effect of FLU plasma concentration on its duration of effect. Furthermore, without any assessment of the effect site (brain) concentration, the relationship between plasma concentration and brain concentration is unknown. However, the administration of midazolam as a single IV bolus was used to reflect clinical practice. This approach is more conservative as the risk of re sedation decreases with a longer delay between agonist and antagonist injection. A final limitation of this study was the absence of objective quantification of the impact of re sedation. As described, all rabbits completed the study without any observable adverse effect; nonetheless, objective measures of ventilation or oxygenation by blood gas analysis would provide a more accurate assessment of the risk associated with re sedation.

6. Conclusion

In conclusion, FLU (0.05 mg/kg, IV) antagonises the sedative effects of midazolam (1.2 mg/kg IV) in rabbits. However, there is a risk of re sedation at approximately 20 min post-FLU injection that warrants continued monitoring in the recovery phase. Further research is warranted to determine if alternative dosing strategies of FLU in rabbits can be used to avoid re sedation.

Acknowledgements

The authors thank Dr Maxime Rufiange, Dr Vivian Leung and Hélène Richard (Université de Montréal) for technical support. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) Discovery Grant (ID: 424022-2013) and the Fondation Lévesque (DSJ Pang). Bioanalytical laboratory instruments were funded by the Canadian Foundation for Innovation (CFI) and the *Fonds de Recherche du Québec (FRQ)*, the Government of Quebec (F. Beaudry CFI John R. Evans Leaders grant no. 36706). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

7. Tables

Table 1. Pharmacokinetic parameters of midazolam

Parameters	Units	Midazolam alone (n = 13)		Midazolam with flumazenil (n = 13)		Paired t-test
		Mean value	95% CI	Mean value	95%CI	p-value
t1/2	min	29.1	26.0 – 32.3	30.6	26.2 – 35.0	0.55
C ₀	ng/ml	2933	2507 – 3359	2920	2323 – 3517	0.89
AUC 0-t	ng/ml min	28579	26752 – 30406	28999	25967 – 32030	0.80
AUC 0-inf_obs	ng/ml min	34943	32727 – 37118	35264	31139 – 39388	0.88
MRT 0-inf_obs	min	36.71	33.22 – 40.20	35.72	31.05 – 40.39	0.71
Cl_obs	ml/min/kg	34.67	32.57 – 36.77	35.45	30.50 – 40.40	0.75
Vss_obs	L/kg	1.27	1.15 – 1.39	1.24	1.09 – 1.39	0.73

Table 1. Pharmacokinetic parameters of midazolam alone (1.2 mg/kg IV) or in the presence of flumazenil (0.05 mg/kg IV) in 13 adult New-Zealand White-Californian cross rabbits. t1/2: terminal elimination half-life; Tmax: time at maximal plasma concentration; C₀: extrapolated plasma concentration at time 0; AUC 0-t: area under the curve of plasma concentration over time from time 0 to final timepoint; AUC 0-inf_obs: area under the curve of plasma concentration over time from time 0 to infinite; MRT 0-inf_obs: mean residence time from time 0 to infinite; Cl_obs: clearance; Vss_obs: volume of distribution at steady state.

Table 2. Pharmacokinetic parameters of 1-OH-midazolam

		1-OH-midazolam alone (n = 13)		1-OH-midazolam with flumazenil (n = 13)		Paired t-test
Parameters	Units	Mean value	95% CI	Mean value	95%CI	p-value
t1/2	min	97.9	63.8 – 132.0	84.7	61.9 – 107.4	0.48
Tmax	min	17.4	9.7 – 25.1	20.8	15.9 – 25.8	0.43
Cmax	ng/ml	42.9	31.6 – 54.2	40.6	29.1 – 52.2	0.76
AUC 0-t	ng/ml min	2283	1662 – 2904	2200	1572 – 2828	0.84

Table 2. Pharmacokinetic parameters of 1-OH-midazolam following intravenous midazolam injection (1.2 mg/kg IV) alone or in the presence of flumazenil (0.05 mg/kg IV) in 13 adult New-Zealand White-Californian cross rabbits. t1/2: terminal elimination half-life; Tmax: time at maximal plasma concentration; Cmax: maximal plasma concentration; AUC 0-t: area under the curve of plasma concentration over time from time 0 to final timepoint.

Table 3. Pharmacokinetic parameters of flumazenil

Parameters	Units	Flumazenil (n = 13)	
		Mean value	95%CI
t _{1/2}	min	26.3	23.3 – 29.3
C ₀	ng/ml	195.2	158.6 – 231.8
AUC 0-t	ng/ml min	2248	2011 – 2484
AUC 0-inf_obs	ng/ml min	2776	2410 – 3143
MRT 0-inf_obs	min	34.03	30.00 – 38.07
Cl_obs	ml/min/kg	18.74	16.47 – 21,00
V _{ss_obs}	L/kg	0.6262	0.5460 – 0.7065

Table 3. Pharmacokinetic parameters of flumazenil (0.05 mg/kg IV) in 13 adult New-Zealand White-Californian cross rabbits. t_{1/2}: terminal elimination half-life; T_{max}: time at maximal plasma concentration; C₀: extrapolated plasma concentration at time 0; AUC 0-t: area under the curve of plasma concentration over time from time 0 to final timepoint; AUC 0-inf obs: area under the curve of plasma concentration over time from time 0 to infinite; MRT 0-inf obs: mean residence time from time 0 to infinite; Cl obs: clearance; V_{ss obs}: volume of distribution at steady state.

8. Figures

Figure 1. Experimental timeline

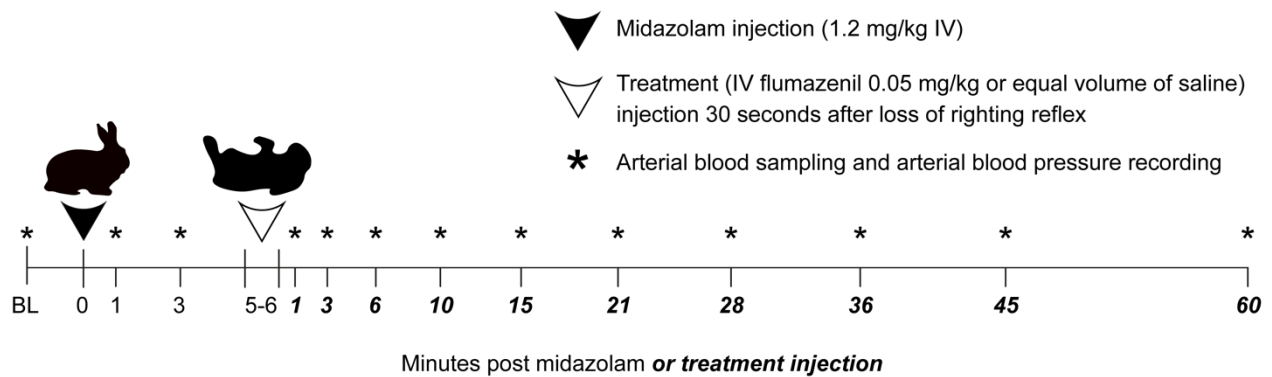


Figure 1. Experimental timeline. Randomized, controlled, cross-over study design with each rabbit receiving flumazenil or saline, separated by two weeks between treatments. Arterial blood samples collected and analyzed immediately after collection. n = 15 in each treatment group.

Figure 2. Example of plasma midazolam concentration

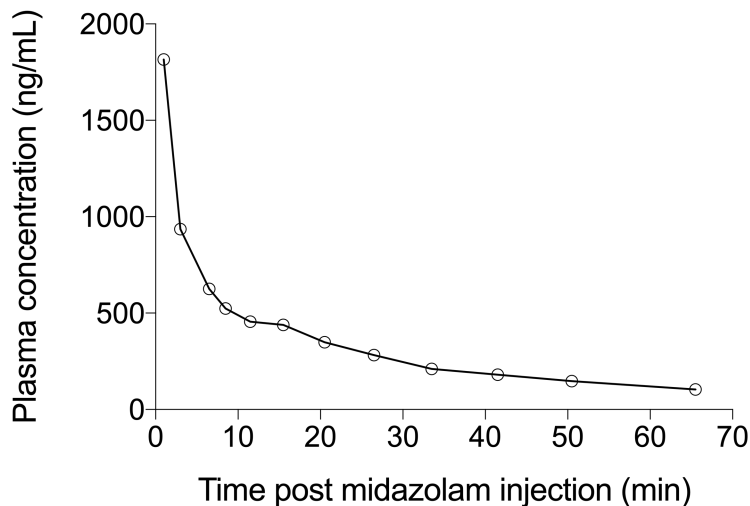


Figure 2. Example of observed plasma midazolam concentrations over time following an intravenous bolus of midazolam (1.2 mg/kg) in a New-Zealand White-Californian cross rabbit (ID: rabbit1arm1). Circles indicate arterial sampling times.

Figure 3. Example of plasma midazolam concentration

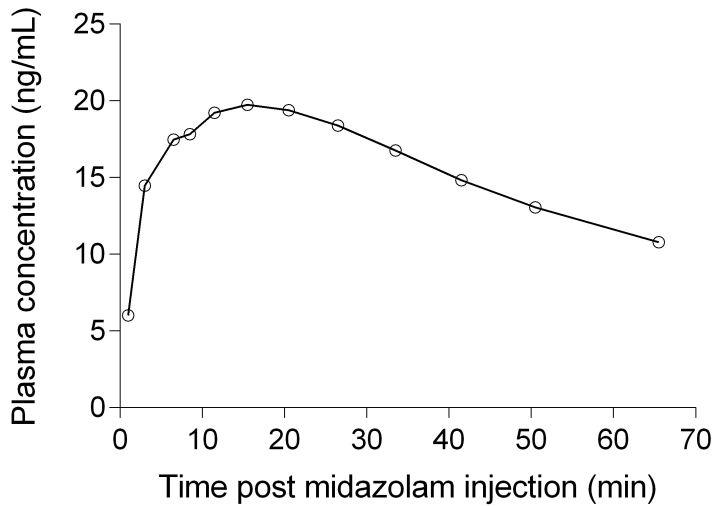


Figure 3. Example of observed plasma 1-OH-midazolam concentrations over time following an intravenous bolus of midazolam (1.2 mg/kg) in a New-Zealand White-Californian cross rabbit (ID: rabbit1arm1). Circles indicate arterial sampling times.

Figure 4. Example of plasma flumazenil concentration

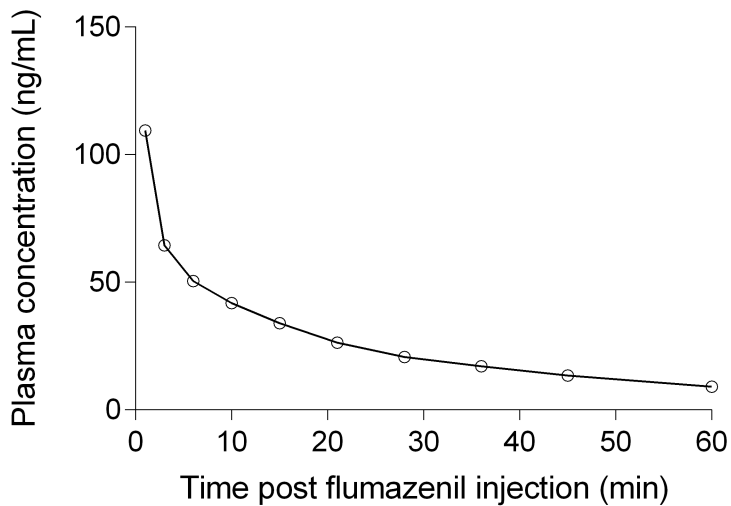


Figure 4. Example of observed plasma flumazenil concentrations over time following an intravenous bolus of flumazenil (0.05 mg/kg) in a New-Zealand White-Californian cross rabbit (ID: rabbit1arm1). Circles indicate arterial sampling times.

Figure 5. Delay for ReRR

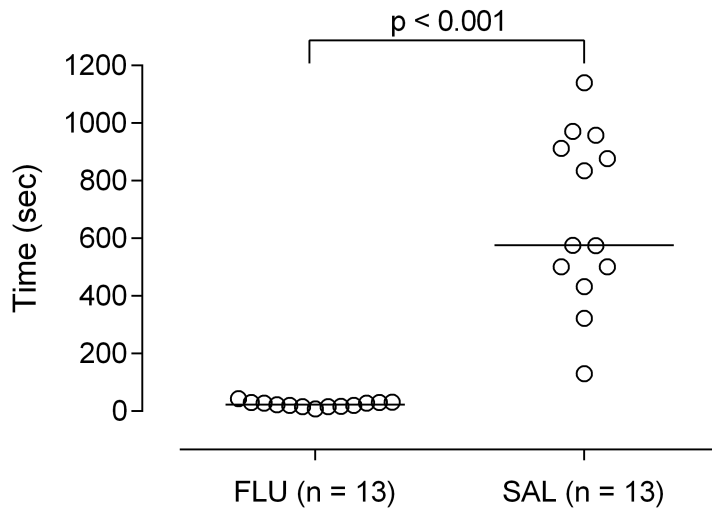


Figure 5. Time to return of righting reflex (ReRR) in 13 rabbits administered intravenous midazolam (1.2 mg/kg) followed by intravenous flumazenil (FLU, 0.05 mg/kg) or saline control (SAL, equal volume). Treatment (FLU/SAL) was administered 30 seconds after loss of righting reflex. Time to ReRR measured from FLU/SAL injection. Data are median (horizontal line) superimposed over individual data points. Time to ReRR significantly shorter in flumazenil group.

Figure 6. Sedation scale scores

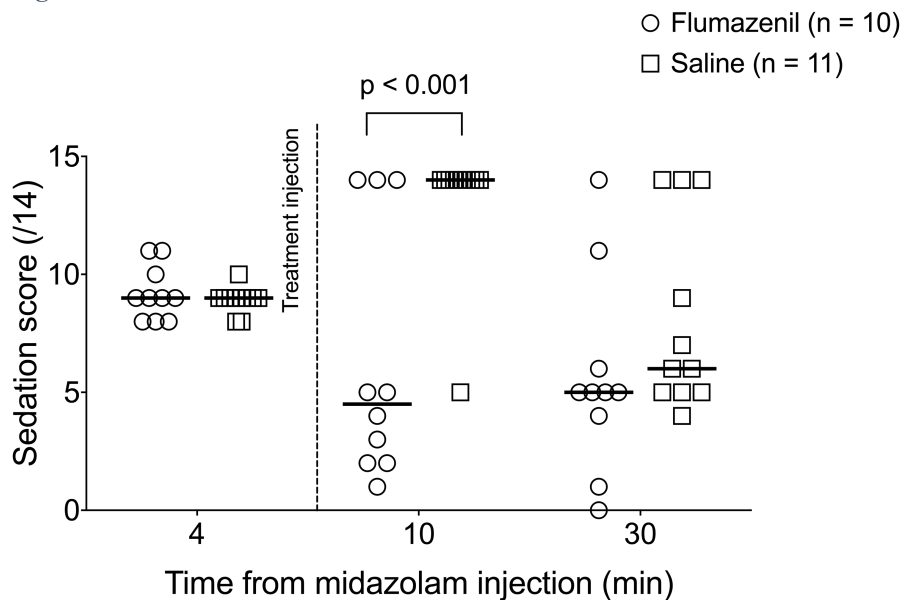


Figure 6. Scatter plot of sedation scale scores of rabbits administered intravenous midazolam (1.2 mg/kg) followed by intravenous flumazenil (FLU; 0.05 mg/kg) or saline control (SAL; equal

volume). Treatment (FLU/SAL) was administered 30 seconds after loss of righting reflex and time of injection is represented by vertical broken line. Horizontal lines represent median. Sedation scores were significantly lower in FLU group at the 10 minutes post-injection time point.

Figure 7. Mean arterial pressures

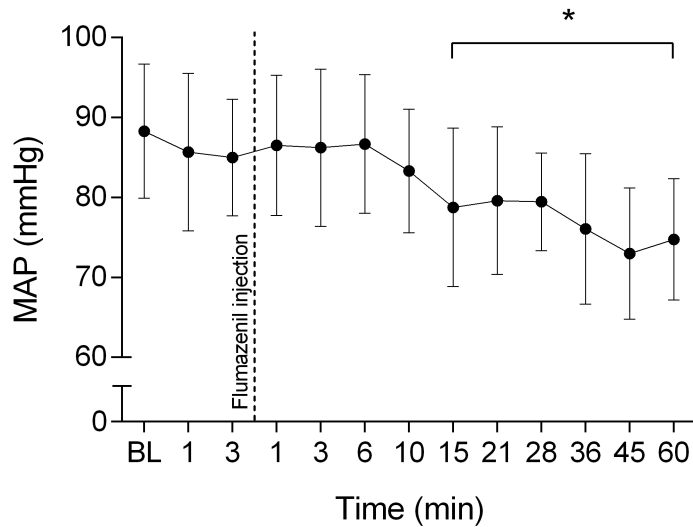


Figure 7. Mean arterial blood pressure (MAP) of rabbits administered intravenous midazolam (1.2 mg/kg) followed by intravenous flumazenil (0.05 mg/kg). Flumazenil was administered 30 seconds after loss of righting reflex and is represented by vertical broken line. Data are mean \pm SD. MAP was lower than baseline (BL) at each timepoint, beginning 15 minutes post treatment injection ($p < 0.001$).

9. References

1. Aarseth HP, Bredesen JE, Grynne B, Lyngdal PT, Storstein L, Wiik-Larsen E. 1988. Benzodiazepine-receptor antagonist, a clinical double-blind study. *Clin Toxicol* 26:283-292.
2. Avsaroglu H. 2008. Strain specific response to anaesthetics and analgesics in rat and rabbit. A pharmacogenetic approach. (PhD Dissertation). Utrecht University, Utrecht, The Netherlands
3. Amrein R, Hetzel W, Bonetti EP, Gerecke M. 1988. Clinical pharmacology of Dormicum (midazolam) and Anexate (flumazenil). *Resuscitation* 16:S5-S27.
4. Amrein R, Hetzel W. 1990. Pharmacology of Dormicum (midazolam) and Anexate (flumazenil). *Acta Anaesthesiol Scand* 34:6-15.
5. Baumgartner C, Bollerhey M, Ebner J, Schuster T, Henke J, Erhardt W. 2010. Effects of medetomidine-midazolam-fentanyl IV bolus injections and its reversal by specific antagonists on cardiovascular function in rabbits. *Can J Vet Res* 74:286-298.
6. Bienert A, Plotek W, Wiczling P, Kostrzewski B, Kaminska A, Billert H, Szczesny D, Zaba C, Tezyk A, Buda K, Bednarek E, Kaliszan R, Grzeskowiak E. 2014. The influence of the time of day on midazolam pharmacokinetics and pharmacodynamics in rabbits. *Pharm Rep* 66:143-152.
7. Birch BRP, Miller RA. 1995. An assessment of re sedation following flumazenil-induced antagonism of intravenous midazolam: comparison of psychomotor and amnesic recovery with a non-sedated reference group. *J Clin Psychopharmacol* 9:103-111.
8. Blake DW, Van Leeuwen AF, Petring OU, Ludbrook J, Ventura S. 1995. Haemodynamic response to simulated haemorrhage in the rabbit: interaction of i.v. anaesthesia and hypoxia. *Br J Anaesth* 75:610-615.
9. Bonetti EP, Pieri L, Cumin R, Schaffner R, Pieri M, Gamzu ER, Müller RKM, Haefely W. 1982. Benzodiazepine antagonist Ro 15-1788: neurological and behavioural effects. *Psychopharmacology* 78:8-18.
10. Boothe DM, editor. 2012. *Clinical pharmacolgy & therapeutics* (2nd edn). St-Louis (MO): Saunders Elsevier Publishing.
11. Borkowski R, Karas AZ. 1999. Sedation and anesthesia of pet rabbits. *Clin Tech Small Anim Pract* 14:44-49.

12. Brodbelt DC, Blissitt KJ, Hammond RA, Neath PJ, Young LE, Pfeiffer DU, Wood JLN. 2008. The risk of death: the confidential enquiry into perioperative small animal fatalities. *Vet Anaesth Analg* 35:365–373.
13. Brogden RN, Goa KL. 1988. Flumazenil. A preliminary review of its benzodiazepine antagonist properties, intrinsic activity and therapeutic use. *Drugs* 35:448–467.
14. Canadian Council on Animal Care. [Internet]. 2016. Animal Data Report. [Cited 09 May 2020]. Available at: <https://www.ccac.ca/Documents/AUD/2016-Animal-Data-Report.pdf>
15. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). [Internet]. 2018. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. [Cited 09 May 2020]. Available at: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
16. Chow EP, Bennett RA, Whittington JK. 2011. Total ear canal ablation and lateral bulla osteotomy for treatment of otitis externa and media in a rabbit. *J Am Vet Med Assoc* 239:228-232.
17. Fassoulaki A, Theodoraki K, Melemenis A. 2010. Pharmacology of sedation agents and reversal agents. *Digestion* 82:80-3.
18. Flecknell P, editor. 2016. Anaesthesia of common laboratory species: special considerations. In: *Laboratory Animal Anaesthesia* (4th edn). Waltham (MA): Saunders Elsevier Publishing.
19. Froklage FE, Syvanen S, Hendrikse NH, Huisman MC, Molthoff CFM, Tagawa Y, Reijneveld JC, Heimans JJ, Lammertsma AA, Eriksson J, de Lange, ECM, Voskuyl RA. 2012. [¹¹C]Flumazenil brain uptake is influenced by the blood-brain barrier efflux transporter P-glycoprotein. *EJNMMI Res* 2:1-8.
20. Froklage FE, Postnov A, Yaqub MM, Bakker E, Boellaard R, Hendrikse NH, Comans EFI, Schuit RC, Schober P, Velis DN, Zwemmer J, Heimans JJ, Lammertsma AA, Voskuyl RA, Reijneveld JC. 2017. Altered GABAA receptor density and unaltered blood–brain barrier [¹¹C]flumazenil transport in drug-resistant epilepsy patients with mesial temporal sclerosis. *JCBFM* 37:97-105.
21. Ghouri AF, Ruiz MA, White PF. 1994. Effect of flumazenil on recovery after midazolam and propofol sedation. *Anesthesiology* 81:333–339.

22. Greenblatt DJ, Ehrenberg BL, Grunderman J, Locniskar A, Scavone JM, Harmatz JS, Shader RI. 1989. Pharmacokinetic and electroencephalographic study of intravenous diazepam, midazolam, and placebo. *Clin Pharmacol Ther* 45:356-365.
23. Grint NJ, Murison PJ. 2008. A comparison of ketamine-midazolam and ketamine-medetomidine combinations for induction of anaesthesia in rabbits. *Vet Anaesth Analg* 35:113–121.
24. Grint NJ, Murison PJ. 2007. Peri-operative body temperatures in isoflurane-anaesthetized rabbits following ketamine-midazolam or ketamine-medetomidine. *Vet Anaesth Analg* 34:181–189.
25. Hammarlund-Udenaes M, Friden M, Syvanen S, Gupta A. 2008. On the rate and extent of drug delivery to the brain. *Pharm Res* 25:1737-1750.
26. Hasiuk MMM, Brown D, Cooney C, Gunn M, Pang DSJ. 2015. Application of fast-track surgery principles to evaluate effects of atipamezole on recovery and analgesia following ovariohysterectomy in cats anesthetized with dexmedetomidine-ketamine-hydromorphone. *J Am Vet Med Assoc* 246:645-653.
27. Heniff MS, Moore GP, Trout A, Cordell WH, Nelson DR. 1997. Comparison of routes of flumazenil administration to reverse midazolam-induced respiratory depression in a canine model. *Acad Emerg Med* 4:1115 - 1118.
28. Ilkiw JE, Farver TB, Suter C, McNeal D, Steffey EP. 2002. The effect of intravenous administration of variable-dose flumazenil after fixed-dose ketamine and midazolam in healthy cats. *J Vet Pharmacol Therap* 25:181-188.
29. Johnson TN, Rostami-Hodjegan A, Goddard JM, Tanner MS, Tucker GT. 2002. Contribution of midazolam and its 1-hydroxy metabolite to preoperative sedation in children: a pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis. *Br J Anaesth* 89:428-437.
30. Kehlet H. 1997. Multimodal approach to control postoperative pathophysiology and rehabilitation. *Br J Anaesth* 78:606–617.
31. Klotz U, Kanto J. 1988. Pharmacokinetics and clinical use of flumazenil (Ro 15–1788). *Clin Pharmacokinet* 14:1–12.
32. Kunchandy J, Kulkarni SK. 1986. Apparent pA₂ estimation of benzodiazepine receptor antagonists. *Method Find Exp Clin* 8:553-555.

33. Larouche CB, Beaufriere H, Mosley C, Nemet N. 2019. Evaluation of the effects of midazolam and flumazenil in the ball python (*Python regius*). *J Zoo Wildlife Med* 50:579-588.
34. Lee HW, Machin H, Adami C. 2018. Peri-anaesthetic mortality and non-fatal gastrointestinal complications in pet rabbits: a retrospective study on 210 cases. *Vet Anaesth Analg* 45:520-528.
35. Little HJ, Bichard AR. 1984. Differential effects of the benzodiazepine antagonist RO 15-1788 after general anaesthetic doses of benzodiazepines in mice. *Br J Anaesth* 56:1153-1160.
36. Longmire AW, Seger DL. 1993. Topics in clinical pharmacology: flumazenil, a benzodiazepine antagonist. *Am J Med Sci* 306:49-52.
37. Lu DZ, Fan HG, Kun M, Song ZL, Ming YS, Sheng J, Wang HB. 2011. Antagonistic effect of atipamezole, flumazenil and naloxone following anaesthesia with xylazine, tramadol and tiletamine/zolazepam combinations in pigs. *Vet Anaesth Analg* 38:301-309.
38. Massotti M, Lucantoni D. 1986. The peripheral benzodiazepine receptor ligand Ro 5-4864 induces supraspinal convulsions in rabbits. Reversal by the central benzodiazepine antagonist Ro 15-1788. *Psychopharmacology* 88:336-340.
39. Mathus-Vliegen EMH, de Jong L, Kos-Foekema HA. 2014. Significant and safe shortening of the recovery time after flumazenil-reversed midazolam sedation. *Digest Dis Sci* 59:1717-25.
40. Mylan Pharmaceuticals ULC. [Internet]. 2014. Product monograph: flumazenil injection USP. [Cited 09 May 2020]. Available at: https://pdf.hres.ca/dpd_pm/000322208.PDF
41. Najjar TA, Al-Hassan MI, Khan RMA. 1993. Theophylline inhibits the elimination of flumazenil in rabbits. *Int J Pharm* 98:51-55.
42. Pearson RC, McCloy RF, Morris P, Bardhan KD. 1990. Midazolam and flumazenil in gastroenterology. *Acta Anaesthesiol Scand* 92:21-24.
43. Roncari G, Ziegler WH, Guentert TW. 1986. Pharmacokinetics of the new benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 in man following intravenous and oral administration. *Br J Clin Pharmacol* 22:421-428.
44. Rose JB, Vergneau-Grosset C, Steffey MA, Johnson EG, Chen VS, Mohr FC, Harvey C, Sanchez-Migallon D. 2016. Adrenalectomy and nephrectomy in a rabbit (*Oryctolagus*

- cuniculus*) with adrenocortical carcinoma and renal and ureteral transitional cell carcinoma. *J Exot Pet Med* 25:332-341.
45. Sakamoto M, Yasumoto M, Ohsumi H, Choi H, Shibata Y, Kano T. 1994. Effects of midazolam and flumazenil on carotid sinus baroreflex control of circulation in rabbits. *Br J Anaesth* 73:384-387.
 46. Saletin M, Malchow H, Muhlhofer H, Fischer M, Pilot J, Rohde H. 1991. A randomised controlled trial to evaluate the effects of flumazenil after midazolam premedication in outpatients undergoing colonoscopy. *Endoscopy* 23:331-333.
 47. Shekerdemian L, Bush A, Redington A. 1997. Cardiovascular effects of intravenous midazolam after open heart surgery. *Arch Dis Child* 76:57-61.
 48. Smith MT, Eadie MJ, Brophy TO. 1981. The pharmacokinetics of midazolam in man. *Eur J Clin Pharmacol* 19:271-278.
 49. Tranquilli WJ, Lemke KA, Williams LL, Ballard G, Ko JCH, Benson GC, Thurmon, JC. 1992. Flumazenil efficacy in reversing diazepam or midazolam overdose in dogs. *J Vet Anaesth* 19:65-68.
 50. Unkel JH, Brickhouse TH, Sweatman Tw, Scarbecz M, Tompkins WP, Eslinger CS. 2006. A comparison of 3 routes of flumazenil administration to reverse benzodiazepine-induced desaturation in an animal model. *Pediatr Dent* 28:357-362.
 51. Wagner MC, Hecker KG, Pang DSJ. 2017. Sedation levels in dogs: a validation study. *BMC Vet Res* 13:110.
 52. Wille RT, Chaffee BW, Ryan ML, Elta GH, Walter V, Barnett JL. 2000. Pharmacoeconomic evaluation of flumazenil for routine outpatient EGD. *Gastrointest Endosc* 51:282-287.
 53. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. 2010. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Meth Prog Bio* 99:306-314.

Discussion générale

Hypoventilation suite à l'administration d'oxygène

Le développement d'un nouveau protocole anesthésique injectable, dans le but de diminuer les complications d'un réveil prolongé, a permis de mettre en évidence une problématique inattendue causée par la pré-oxygénation. En plus des rapports sur le cheval et le wapiti, une réponse similaire a été décrite chez le chien. Dix minutes après l'administration d'Althesin (mélange d'alfaxolone/alfadolone) en perfusion intraveineuse, la PaCO₂ des chiens recevant 100% d'oxygène était significativement plus élevée (58,6 mmHg) que ceux se ventilant à l'air ambiant (44,6 mmHg; $p < 0,01$)[51]. Fahlman et al. a également décrit un phénomène similaire lorsqu'un concentrateur d'oxygène portatif était utilisé pour supplémenter en oxygène des ours bruns et des mouflons d'Amérique anesthésiés[52]. Cependant, comme pour notre projet pilote, cette réponse n'était pas anticipée et ne faisait pas partie des variables investiguées. Pour cette raison, aucun groupe contrôle et aucune conclusion définitive ne peut être tirée de ce rapport. Un dernier article décrivant ce phénomène a été publié en 1994 et représente la première investigation prospective ayant pour but d'évaluer l'impact d'une FiO₂ élevée sur la ventilation chez le canard[53]. La f_R ainsi qu'une analyse des gaz sanguins étaient évaluées chez 7 canards anesthésiés avec 1,4% d'isoflurane dans l'oxygène. Chaque individu était soumis à une FiO₂ de 21, 40, 70, et > 90%. L'augmentation de la FiO₂ était accompagnée d'une réduction de la f_R et une augmentation de la PaCO₂ (hypoventilation croissante). Tous ces rapports du phénomène d'hypoventilation après oxygénation en présence de protocoles anesthésiques variables (anesthésique volatil, alpha-2 agoniste, alfaxalone, barbiturique) confirment que cette complication n'est pas unique à une seule combinaison d'agent. Pourtant, cette complication est rarement décrite dans les livres de référence ou les lignes directrices anesthésiques vétérinaires. Au contraire, le concept d'hypercapnie et apnée secondaire à l'administration d'oxygène est bien connu en médecine humaine.

L'apnée et l'hypercapnie associées à l'oxygène chez l'Homme

Une diminution de la ventilation en réponse à l'administration d'oxygène est bien connue et décrite chez les patients souffrant d'apnée du sommeil obstructive (OSA). Les gens souffrant de cette condition, dans laquelle le passage de l'air dans les voies respiratoires supérieures est réduit durant le sommeil, dépendent d'un niveau d'oxygénation faible comme stimulation respiratoire[54]. C'est ce qui explique que l'administration d'oxygène comme traitement de l'hypoxémie résulte en période d'apnée importante (jusqu'à 40 secondes) comparativement au groupe contrôle (air ambiant)[55]. Les mécanismes responsables de l'hypercapnie induite par l'oxygénation chez les patients souffrant de maladie pulmonaire obstructive chronique (COPD) ont également été révisés en 2012[56]. Les auteurs ont démontré que la PaO₂ durant la pré-oxygénation était inversement corrélée avec l'hypercapnie induite par l'oxygénothérapie chez les patients souffrant de COPD. Une corrélation inverse similaire n'était pas présente dans notre étude ; cependant, une tendance statistique ($r = -0,75$, $p = 0,06$) était présente et nécessite davantage d'investigations considérant que cette variable d'intérêt n'était pas incluse dans notre calcul de pouvoir statistique et taille d'échantillon. Les auteurs ont proposé quelques explications supplémentaires, incluant l'effet Haldane, pour justifier l'augmentation de la PaCO₂ en réponse à l'oxygène. L'effet Haldane représente la diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxyde de carbone (CO₂) proportionnellement à la PaO₂. Ce phénomène se produit au niveau des capillaires pulmonaires et représente une adaptation physiologique de l'organisme pour faciliter l'élimination du CO₂. Ainsi, le CO₂ est déplacé (augmentant la PaCO₂) lorsque la PaO₂ d'un patient augmente en réponse à une supplémentation en O₂[57]. Un autre phénomène s'ajoutant à la diminution de la stimulation respiratoire hypoxique et l'effet Haldane a été proposé par le groupe de chercheur. Une inégalité de la ventilation-perfusion pulmonaire (*Va/Q mismatch*) pourrait également contribuer à l'augmentation de la PaCO₂ chez les patients souffrant de COPD traité avec l'O₂. L'augmentation de la tension en O₂ au niveau alvéolaire inhiberait la réponse de vasoconstriction pulmonaire hypoxique dans les régions moins ventilées du poumon, secondairement à la COPD. La réponse de vasoconstriction pulmonaire hypoxique est un mécanisme de défense permettant de rediriger le sang vers les régions mieux oxygénées du poumon. Son inhibition, soit par la supplémentation en oxygène ou soit par les agents anesthésiques volatils, causerait une augmentation du *Va/Q mismatch* et une élévation de la PaCO₂ par l'augmentation de l'espace mort alvéolaire[58]. Le terme espace mort définit une région du système respiratoire ne participant pas aux échanges

gazeux. Un espace mort alvéolaire représente les alvéoles qui, malgré une ventilation adéquate, ne sont pas suffisamment perfusées et donc ne participent pas pleinement aux échanges[59]. En résumé, plusieurs mécanismes incluant l'abolition de la stimulation respiratoire hypoxique, l'effet Haldane et l'augmentation du V_a/Q mismatch contribuent à expliquer le phénomène d'apnée ou hypercapnie secondaire à l'oxygénothérapie. Cependant, les deux derniers mécanismes mentionnés ne peuvent expliquer la bradypnée/apnée observée dans notre étude, mais restent des facteurs plausibles pour expliquer l'hypercapnie associée.

Choix du protocole anesthésique

Dans cette étude, notre protocole anesthésique devait permettre de diminuer le temps de réveil afin de réduire les risques de complications dans la période post-opératoire. Cependant, les agents choisis et la dose administrée ont causé une hypoventilation et une hypoxémie importante avant la pré-oxygénation. La dose de 4 mg/kg d'alfaxalone a été choisie puisque des dosages plus élevés (6 et 8 mg/kg) sont associés avec des sédations/anesthésies de plus longue durée[60]. La dose de dexmédétomidine est similaire à celle proposée par Flecknell (0,125mg/kg) pour obtenir une anesthésie chirurgicale de 20-30 minutes lorsque combinée à la kétamine[61]. La dose de midazolam est faible et aurait pu être augmentée pour potentialiser et diminuer la dose des autres agents. La modification des dosages serait à investiguer davantage pour tenter de diminuer la dépression respiratoire. Puisque le but de l'expérimentation n'était pas de quantifier la sédation des lapins, ces derniers étaient considérés adéquatement sédatisés s'ils étaient en décubitus sternal avec leur tête au sol et s'ils ne réagissaient pas à la contention/transport sur la table d'examen. Ces points d'évaluation permettaient une classification rapide, simple et cliniquement pertinente. Par contre, la profondeur anesthésique atteinte aurait pu être objectivement quantifiée en utilisant une échelle de sédation semi-quantitative pour lapins domestiques[62]. Ceci aurait pu fournir plus d'informations sur la qualité de la sédation et permettre des comparaisons avec d'autres études passées ou futures. En considérant qu'aucune intubation n'a été tentée, mais que les lapins ont perdu leur réflexe de redressement, l'effet de ce protocole était décrit comme anesthésie légère, selon la définition de Franks et al.[63].

Importance de la supplémentation en oxygène

Tel que mentionné précédemment et démontré dans notre étude, les lapins sont à risque de développer une dépression respiratoire importante lorsque l'anesthésie chirurgicale est désirée[40]. Les risques de l'hypoxémie sont bien connus et comportent : arythmie cardiaque, vasoconstriction pulmonaire, diminution de la résistance vasculaire périphérique, acidose métabolique, relâche de cytokines pro-inflammatoires et possiblement la mort[1]. Puisque tous les individus étaient hypoxémiques dans les groupes 5 et 10 minutes avant la supplémentation en oxygène, il est fortement recommandé de supplémenter en oxygène un lapin anesthésié avec ce protocole. Cette recommandation est accompagnée d'une mise en garde sur le risque d'hypoventilation sévère engendré par l'abolition de la stimulation respiratoire hypoxique. Les effets délétères de l'acidose respiratoire ne peuvent être négligés : arythmie cardiaque, hyperkaliémie, diminution de la résistance vasculaire périphérique et augmentation de la pression intracrânienne[1]. Cependant, l'hypoxémie risque d'augmenter plus sévèrement le risque de complications comparativement à une courte période d'acidose respiratoire. En effet, une préparation adéquate et une connaissance du risque permettent de facilement gérer ce problème. Après l'installation d'un cathéter intraveineux pour ajuster la profondeur au besoin, la pose d'un dispositif supraglottic (V-Gel) ou d'un tube endotrachéal permettent de ventiler manuellement le patient et de rétablir la normocapnie. Dans l'éventualité d'une apnée soudaine, il est préférable d'intuber le lapin à l'aide d'un endoscope ou d'un V-Gel. Ce dernier est facile d'utilisation peu importe le niveau d'expérience de l'utilisateur et lorsque combiné à un capnographe, permet de contrôler la ventilation de manière fiable[43].

Pharmacocinétique et pharmacodynamique du flumazénil

L'investigation PK-PD du midazolam et flumazénil chez le lapin a permis de définir les paramètres nécessaires pour développer des dosages standardisés chez cette espèce. Par contre, les critères justifiant l'utilisation du flumazénil restent à déterminer. La pertinence clinique du flumazénil doit être considérée selon le contexte de son utilisation. Lorsque utilisées seules, les benzodiazépines ne causent qu'une sédation légère à modérée chez les petits animaux[1]. Les espèces exotiques domestiques comme le lapin et plusieurs espèces de reptiles et oiseaux, font exception car leur réponse aux benzodiazépines peut être plus importante[61]. L'espèce et l'impact sur l'état d'éveil sont donc à considérer avant d'antagoniser un agent sédatif. Par la suite, la combinaison du midazolam avec une autre classe d'agent sédatif peut avoir un effet synergique qui augmente l'effet sédatif et la dépression cardiorespiratoire des benzodiazépines[1]. Schroeder & Smith ont comparé l'utilisation du midazolam seul (2mg/kg IM) ou en combinaison avec le butorphanol (0,3mg/kg IM) et la buprénorphine (0,03mg/kg IM) chez 6 lapines adultes de Nouvelle-Zélande. L'administration des 3 agents seuls a causé une sédation légère de 30 à 60 minutes tandis que les combinaisons midazolam-butorphanol et midazolam-buprénorphine ont résulté en une sédation modérée de 60-90 minutes et profonde de 90-120 minutes, respectivement[64]. Ceci démontre bien l'effet additif et parfois synergique présent lorsqu'une benzodiazépine est combinée à un opioïde chez le lapin. Un effet additif est égal à la somme de l'effet seul de chaque agents combinés tandis que le synergisme décrit un effet supérieur à la somme des agents combinés[65]. Ce synergisme n'est malheureusement pas restreint aux effets bénéfiques (sédation, myorelaxation), mais il touche également la dépression cardiorespiratoire. Les combinaisons midazolam-buprénorphine et midazolam-butorphanol ont également causé une diminution marquée de la fréquence respiratoire (< 50rpm) et de la PaO₂ (< 75mmHg). Ceci démontre l'importance d'évaluer la combinaison d'agent avant de prendre une décision sur l'antagonisme d'une benzodiazépine. De plus, lors d'une prémédication avec plusieurs agents, le choix de l'agent à antagoniser n'est pas toujours simple. Ceci était déjà une question clinique que nous avons lors de l'élaboration de notre projet pilote. En effet, l'antagonisme de la dexmédétomidine a causé une diminution marquée du temps de réveil alors que l'ajout du flumazénil n'a eu aucun impact. Ceci est similaire à ce qui a été démontré dans une étude chez le cochon anesthésié avec tilétamine-zolazépam-xylazine-tramadol, où l'atipamézole, le flumazénil et la naloxone ont tous été utilisés seuls et dans chaque combinaison possible pour renverser les effets anesthésiques. Un score de réveil et le délai pour le retour de

certains réflexes et la position sternale étaient utilisés. Les combinaisons excluant l'atipamézole (ex. : flumazénil-naloxone) n'ont pas permis d'antagoniser efficacement le protocole utilisé. En comparaison, l'atipamézole seul ou en combinaison avec tous les agents a permis de significativement diminuer tous les paramètres mesurés[66]. Puisque les alpha-2 agonistes causent la sédation et l'altération cardiovasculaire la plus importante des agents de prémédication couramment utilisés, il est normal que leur antagonisme soit à prioriser pour favoriser un réveil rapide[1]. L'atipamézole reverse les effets sédatifs, cardiovasculaires, gastro-intestinaux et l'impact sur la thermorégulation des alpha-2 agonistes dans plusieurs espèces incluant le lapin[66, 67]. Il reste donc à définir les situations où l'ajout du flumazénil est cliniquement pertinent lorsqu'une combinaison d'agent est utilisée. Dans l'étude citée précédemment, l'ajout du flumazénil à l'atipamézole seul a pu réduire significativement certains paramètres (délai pour se lever et marcher), mais pas tous.

Le flumazénil antagonise autant la myorelaxation des benzodiazépines que leur effet sédatif et anxiolytique[68, 69]. Ceci mérite une réflexion car dans l'éventualité où un animal est adéquatement surveillé durant le réveil et que ses paramètres vitaux sont stables, est-il mieux de ne pas antagoniser l'effet anxiolytique/sédatif pour favoriser un réveil calme ? Selon les premières études précliniques sur le midazolam, il semblerait qu'une occupation des récepteurs de 60-90% soit nécessaire pour l'effet sédatif/hypnotique alors que seulement 20-30% d'occupation est suffisant pour causer l'effet anxiolytique[70]. En effet, une titration précise du flumazénil semble antagoniser l'effet hypnotique mais préserve l'effet anxiolytique du midazolam. Cette technique d'administration est celle utilisée chez l'humain et devrait être investiguée davantage. Un défi supplémentaire pour les patients vétérinaires sera de différencier l'effet anxiolytique de l'effet sédatif pour permettre une titration adéquate.

Les rapports d'effets secondaires avec l'utilisation du flumazénil doivent également être pris en compte pour s'assurer que le ratio risque-bénéfice soit calculé. Lorsqu'utilisé en médecine humaine pour antagoniser les effets de dépendance ou usage prolongé aux benzodiazépines, le flumazénil a été associé à des épisodes de crises épileptiformes et arrêts cardiaques. D'autres effets adverses rapportés chez l'humain sont des réactions au site d'injection, une vasodilatation cutanée, un

vertigo, de l'ataxie et une vision floue. Certains décès ont été rapportés lors de l'utilisation du flumazénil chez des patients ayant des comorbidités importantes (sans intoxications aux benzodiazépines). Aucun rapport associant l'administration du flumazénil à une mortalité n'existe pour l'instant en médecine vétérinaire. Cependant, après discussion avec des spécialistes travaillant quotidiennement avec des animaux exotiques, une suspicion clinique de complication suite à l'administration intraveineuse de flumazénil a été rapportée. Dans les cas de surdose accidentelle de benzodiazépine, le bénéfice du flumazénil dépasse clairement les risques supposés de son administration. Cependant, tous les facteurs incluant l'état du patient et le synergisme avec d'autres drogues doivent être pris en compte.

Les derniers éléments à considérer sont le risque associé à un réveil prolongé et les facteurs de risques reliés à l'espèce. Lors de la capture d'une espèce sauvage en condition de terrain, une sédation résiduelle pourrait être délétère sur les chances de survie de l'individu (prédation, noyade). En effet, plusieurs rapports de cas ont décrit des complications majeures avec des sédations prolongées[1]. De plus, tel que décrit précédemment, le lapin est une espèce à risque de complications respiratoires. Dans l'étude de Brodbelt, près de 64% des mortalités sont survenues dans la période post-opératoire, avec plus de 50% de ces mortalités dans le premier 6 heures[6]. Ceci supporte l'idée que les lapins recevant une benzodiazépine devraient être surveillés adéquatement durant la période post-opératoire immédiate. De plus, à cause de leur sensibilité à la dépression respiratoire et leur risque de pathologies pulmonaires sous-cliniques, un argument supplémentaire pourrait être fait en faveur de l'utilisation du flumazénil chez cette espèce.

Perspectives de recherche

Les travaux décrits dans ce mémoire constituent une base de recherche pour définir les meilleures pratiques lors de l'anesthésie des lapins. Cependant, plusieurs questionnements cliniques restent à élucider pour pouvoir bâtir des lignes directrices claires pour cette espèce.

En ce qui concerne le protocole anesthésique utilisé, l'investigation de l'impact de différentes combinaisons et dosages pourrait permettre de définir des protocoles anesthésiques injectables de courte durée causant moins de dépression cardiorespiratoire. En effet, une diminution de la dose de dexmédétomidine permettrait possiblement de diminuer la dépression respiratoire décrite au chapitre 2. Par la suite, l'évaluation de ces protocoles dans différents contextes cliniques (ie. études multicentriques) permettrait de quantifier leur effet sur le taux de mortalité peri-anesthésique dans

une population mixte de lapins. Par contre, avant de pouvoir appliquer un protocole similaire à grande échelle, son efficacité et son applicabilité doivent être améliorées. La dose d'alfaxalone décrite au chapitre 2 limite l'utilisation de ce protocole en clinique en raison du volume important d'injection. Pour éviter de diminuer la profondeur anesthésique de manière trop importante, il serait intéressant d'augmenter de la dose de midazolam et investiguer la dose minimale efficace d'alfaxalone pour atteindre un niveau de sédation prédéterminé. De plus, l'utilisation d'une échelle de sédation validée permettrait de quantifier l'effet sédatifs/anesthésiques de chaque combinaison de dosages. Un point important à adresser est la gestion analgésique lors de l'anesthésie du lapin. Outre les procédures non-invasives et diagnostiques, les lapins doivent être anesthésiés pour des procédures douloureuses (ie. ovariohystérectomie, castration, laparotomie). Pour ces procédures, l'inclusion d'un opioïde pourrait améliorer la sédation, permettre de diminuer le dosage des autres agents tout en améliorant l'analgésie du protocole anesthésique. Cependant, plusieurs rapports décrivent une dépression respiratoire importantes avec les opioïdes incluant la buprénorphine et le butorphanol chez le lapin, donc cet aspect devrait être pris en compte lors de l'élaboration du protocole anesthésique[71, 72]. Finalement, une comparaison avec un protocole similaire à base de kétamine pourrait répondre à la question initiale qui était à savoir si le remplacement de la kétamine par l'alfaxalone diminuerait le temps de réveil et améliorerait la qualité de ce dernier.

Pour l'administration d'oxygène, il est important de souligner que les bénéfices de son administration surpassent grandement les risques associés. Une approche ayant des objectifs cliniques préétablis (*Goal-Directed Therapy, GDT*) similaire au protocole ERAS serait une bonne piste de départ pour investiguer l'administration d'oxygène[73]. En effet, la recommandation ERAS en ce qui concerne la FiO_2 est de titrer son administration selon la saturation du patient. Ainsi, une FiO_2 adaptée est utilisée, diminuant les complications associées à l'administration d'oxygène. Puisque le système gastro-intestinal imposant du lapin se déplace crânialement avec la relaxation du diaphragme en anesthésie, l'impact de la FiO_2 sur les désordres de ventilation/perfusion pulmonaire (*V/Q mismatch*) pourrait être très intéressant à investiguer. En effet, une FiO_2 plus faible mais suffisante pour maintenir une saturation normale en oxygène favorise de meilleurs échanges gazeux chez le chien et pourrait potentiellement diminuer les complications respiratoires chez le lapin[74]. Finalement, il serait intéressant de voir si le phénomène d'apnée et hypoventilation reliée à l'administration d'oxygène est similaire avec tous les protocoles chez le lapin.

Notre investigation PK-PD du flumazénil et midazolam représente l'étape de base pour construire un algorithme clinique concernant leur utilisation. En effet, la détermination des paramètres PK suite à un bolus intraveineux de flumazénil ouvre la voie à l'investigation de plusieurs dosages, stratégies et voies d'administration de l'antagoniste. La prochaine étape serait de comparer les données PK-PD suite à une perfusion à débit constant ou de multiples bolus répétés dans le but de standardiser l'administration du flumazénil. Cette titration de l'antagoniste pourrait diminuer le risque de resédation mis en évidence au chapitre 3. Par la suite, l'évaluation de différents dosages selon la dose d'agoniste (ratio agoniste : antagoniste) permettrait de réduire l'échec de l'antagonisme lors de l'utilisation du flumazénil. L'étape finale serait de comparer différentes voies d'administration du flumazénil afin de définir la biodisponibilité de chacune d'entre elles comparativement à la voie intraveineuse. Puisqu'obtenir un accès intraveineux s'avère parfois difficile chez le lapin en raison de leur petite taille, l'élaboration d'un protocole intramusculaire et/ou sous-cutané pourrait supporter une utilisation clinique plus pratique.

Informations supplémentaires et réflexion

La publication d'articles scientifiques en anglais avant la rédaction de ce mémoire explique le bilinguisme retrouvé dans le présent ouvrage. La légende des figures ainsi que le tableau présenté en annexe ne peuvent être traduits en français car ces articles sont déjà soumis.

Puisque la dichotomisation des sexes n'était pas un objectif de l'article présenté au chapitre 2, la forte majorité de femelles comparativement aux mâles empêche toute comparaison entre les deux sous-populations. De plus, dans le même chapitre, une information supplémentaire a été ajoutée. L'hypothèse statistique nulle (H_0) était que la PaCO_2 du groupe oxygène serait la même que celle du groupe air médical (H_0 : oxygène = air médical). L'hypothèse alternative (H_1) était que la PaCO_2 du groupe oxygène serait plus élevée que celle du groupe air médical (H_1 : oxygène > air médical).

Dans l'article présenté au chapitre 3, les données non-paramétriques sont présentées avec leur médiane et étendue (donnée la plus petite et la plus grande de l'intervalle).

Mon projet de recherche m'a permis de développer plusieurs compétences utiles à ma pratique en tant qu'anesthésiologiste vétérinaire. Par exemple, le fait de consolider mes connaissances statistiques me permet maintenant de poser un regard critique sur les articles scientifiques que je consulte dans le cadre de la pratique d'une médecine factuelle. De plus, avant le début de mon

programme de maîtrise, je n'avais jamais travailler avec les lapins. L'apprivoisement de cette espèce m'a grandement aidé en clinique et en recherche car elle pose souvent un défi au niveau anesthésique. L'élaboration d'un projet PK-PD m'a forcé à approfondir mes connaissances en pharmacologie tout en me permettant de pratiquer mon esprit de synthèse en anglais. Ces deux points sont essentiels pour un anesthésiologiste vétérinaire qui se prépare pour son examen de certification (réussi !). Au final, la consolidation du programme de maîtrise et de résidence m'a appris à organiser mon emploi du temps de manière efficace, à gérer mon énergie entre recherche et clinique en plus de me sortir de ma zone de confort. Par contre, avec le recul, il y aurait quelques étapes ou projets que je gérerais différemment. En effet, ma progression durant l'écriture des manuscrits scientifiques était laborieuse par manque d'organisation et de motivation. En contrepartie, l'élaboration du protocole de recherche et la récolte des données ressemblaient au travail en clinique et se sont développées plus naturellement. Dans les deux cas, j'ai su m'améliorer d'un article à l'autre grâce à mon superviseur, Dr Pang, qui m'a enseigné une technique de travail plus efficace. Un autre défi que j'ai rencontré a été les révisions suite à l'évaluation par les pairs. Plusieurs de mes articles de résidence ou de maîtrise ont dû être réécrits en parties et l'un d'entre eux a nécessité une reprise de données sur le terrain. Maintenant que j'ai plus d'expérience, je comprends que ce processus est fréquent et bénéfique lors de la publication de manuscrits scientifiques, mais au départ cela a été dur sur le moral. Au travers des embûches, mon intérêt pour mes sujets de recherche reliés à l'anesthésie m'a permis d'entretenir ma motivation pour les mener à terme. Au final, la possibilité de relier mes trouvailles à l'amélioration de la pratique clinique de l'anesthésie vétérinaire reste le dessein ultime de mon programme de maîtrise.

Conclusion

La qualité de la médecine vétérinaire s'est améliorée significativement au courant des dernières années. Cette amélioration est une réponse à la demande grandissante et aux attentes de plus en plus élevées de la part des propriétaires. Le nombre de procédures sous anesthésie générale chez les animaux de compagnie, incluant les animaux exotiques, a également augmenté drastiquement. Ceci s'accompagne d'initiatives pour améliorer la qualité des soins péri-anesthésiques, surtout chez les espèces exotiques qui restent beaucoup plus à risque de complications et mortalités associées à l'anesthésie générale.

En se basant sur les protocoles ERAS, une démarche vétérinaire similaire pourrait voir le jour et ce mémoire apporte plusieurs informations nécessaires à cette approche chez le lapin. Les risques d'hypoxémie avec la plupart des protocoles anesthésiques utilisés chez cette espèce nécessitent une supplémentation en oxygène précoce, tel que démontré au chapitre 2. Une correction rapide de l'hypoxémie diminue grandement les risques de complications majeures, cependant, elle peut mener à une hypoventilation sévère. Cette réponse inattendue s'explique par l'abolition de la stimulation respiratoire hypoxique et la description de cette complication améliore la sensibilisation vétérinaire et permet une réponse adéquate.

Un autre aspect des lignes directrices ERAS est le retour rapide à la fonction normale après l'anesthésie générale. Le lapin est une des espèces pouvant bénéficier le plus de cette approche avec son taux de mortalité important dans la période post-opératoire immédiate. Le développement de protocoles anesthésiques de courte durée, à l'aide d'agents pouvant être antagonisés, permet d'élaborer des plans adaptés à ce risque augmenté. Les données PK-PD présentées dans ce mémoire ouvrent la porte à une utilisation plus judicieuse du flumazénil chez le lapin. Plusieurs étapes restent à entreprendre pour qu'une initiative comme ERAS voit le jour en médecine vétérinaire. Le leadership en anesthésiologie vétérinaire et des projets de recherches adaptés aux problématiques actuelles permettront d'atteindre cet objectif et améliorer la qualité de vie des animaux sous notre responsabilité.

Références

1. Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Green SA, Robertson SA, John W, Sons: **Veterinary anesthesia and analgesia : the fifth edition of Lumb and Jones**. In: *Anesthetic Risk and Informed Consent*. edn. Ames: Wiley Blackwell; 2015: 11-22.
2. Apfelbaum JL, Hagberg CA, Caplan RA, Blitt CD, Connis RT, Nickinovich DG, Hagberg CA: **Practice Guidelines for Management of the Difficult Airway: An Updated Report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Management of the Difficult Airway**. *Anesthesiology* 2013, **118**(2):251-270.
3. Apfelbaum JL, Hagberg CA, Caplan RA, Blitt CD, Connis RT, Nickinovich DG, Hagberg CA: **Practice Guidelines for Preoperative Fasting and the Use of Pharmacologic Agents to Reduce the Risk of Pulmonary Aspiration: Application to Healthy Patients Undergoing Elective Procedures: An Updated Report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Preoperative Fasting and the Use of Pharmacologic Agents to Reduce the Risk of Pulmonary Aspiration***. *Anesthesiology* 2017, **126**(3):376-393.
4. Fearon KC, Ljungqvist O, Von Meyenfeldt M, Revhaug A, Dejong CH, Lassen K, Nygren J, Hausel J, Soop M, Andersen J *et al*: **Enhanced recovery after surgery: a consensus review of clinical care for patients undergoing colonic resection**. *Clin Nutr* 2005, **24**(3):466-477.
5. Li G, Warner M, Lang BH, Huang L, Sun LS: **Epidemiology of anesthesia-related mortality in the United States, 1999-2005**. *Anesthesiology* 2009, **110**(4):759-765.
6. Brodbelt D: **Perioperative mortality in small animal anaesthesia**. *Vet J* 2009, **182**(2):152-161.
7. Kehlet H: **Multimodal approach to control postoperative pathophysiology and rehabilitation**. *Br J Anaesth* 1997, **78**(5):606-617.
8. Kehlet HM, T.: **Hospital stay of 2 days after open sigmoidectomy with a multimodal rehabilitation programme**. *Br J Surg* 1999, **86**:227-230.
9. Ljungqvist O, Scott M, Fearon KC: **Enhanced Recovery After Surgery: A Review**. *JAMA Surg* 2017, **152**(3):292-298.
10. Bontemps G: **Récupération rapide après chirurgie : situation actuelle en France**. *Anesthésie & Réanimation* 2015, **1**(5):401-408.
11. **About ERAS society** [<https://erassociety.org/>]
12. Spanjersberg WR, Reurings J, Keus F, van Laarhoven C: **Fast track surgery versus conventional recovery strategies for colorectal surgery**. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011(2).
13. Group EC: **The Impact of Enhanced Recovery Protocol Compliance on Elective Colorectal Cancer Resection: Results From an International Registry**. *Ann Surg* 2015, **261**(6):1153-1159.
14. Gustafsson UO, Opperstrup H, Thorell A, Nygren J, Ljungqvist O: **Adherence to the ERAS protocol is Associated with 5-Year Survival After Colorectal Cancer Surgery: A Retrospective Cohort Study**. *World J Surg* 2016, **40**(7):1741-1747.
15. Greco M, Capretti G, Beretta L, Gemma M, Pecorelli N, Braga M: **Enhanced recovery program in colorectal surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials**. *World J Surg* 2014, **38**(6):1531-1541.

16. Varadhan KK, Neal KR, Dejong CHC, Fearon KCH, Ljungqvist O, Lobo DN: **The enhanced recovery after surgery (ERAS) pathway for patients undergoing major elective open colorectal surgery: A meta-analysis of randomized controlled trials.** *Clinical Nutrition* 2010, **29**(4):434-440.
17. Leung V, Rousseau-Blass F, Beauchamp G, Pang DSJ: **ARRIVE has not ARRIVED: Support for the ARRIVE (Animal Research: Reporting of in vivo Experiments) guidelines does not improve the reporting quality of papers in animal welfare, analgesia or anesthesia.** *PLoS One* 2018, **13**(5):e0197882.
18. Ljungqvist O, Young-Fadok T, Demartines N: **The History of Enhanced Recovery After Surgery and the ERAS Society.** *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2017, **27**(9):860-862.
19. Scott MJ, Baldini G, Fearon KC, Feldheiser A, Feldman LS, Gan TJ, Ljungqvist O, Lobo DN, Rockall TA, Schricker T *et al*: **Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) for gastrointestinal surgery, part 1: pathophysiological considerations.** *Acta Anaesthesiol Scand* 2015, **59**(10):1212-1231.
20. Feldheiser A, Aziz O, Baldini G, Cox BP, Fearon KC, Feldman LS, Gan TJ, Kennedy RH, Ljungqvist O, Lobo DN *et al*: **Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) for gastrointestinal surgery, part 2: consensus statement for anaesthesia practice.** *Acta Anaesthesiol Scand* 2016, **60**(3):289-334.
21. Edmark L, Kostova-Aherdan K, Enlund M, Hedenstierna G: **Optimal Oxygen Concentration during Induction of General Anesthesia.** *Anesthesiology* 2003, **98**(1):28-33.
22. Magnusson L, Spahn DR: **New concepts of atelectasis during general anaesthesia.** *BJA: British Journal of Anaesthesia* 2003, **91**(1):61-72.
23. Nimmagadda U, Salem MR, Crystal GJ: **Preoxygenation: Physiologic Basis, Benefits, and Potential Risks.** *Anesthesia & Analgesia* 2017, **124**(2):507-517.
24. Benumof Jonathan L: **Preoxygenation : Best Method for Both Efficacy and Efficiency?** *Anesthesiology* 1999, **91**(3):603-603.
25. Gustafsson UO, Scott MJ, Schwenk W, Demartines N, Roulin D, Francis N, McNaught CE, Macfie J, Liberman AS, Soop M *et al*: **Guidelines for perioperative care in elective colonic surgery: Enhanced Recovery After Surgery (ERAS((R))) Society recommendations.** *World J Surg* 2013, **37**(2):259-284.
26. Pedziwiatr M, Mavrikis J, Witowski J, Adamos A, Major P, Nowakowski M, Budzynski A: **Current status of enhanced recovery after surgery (ERAS) protocol in gastrointestinal surgery.** *Med Oncol* 2018, **35**(6):95.
27. Bell BR, Bastien PE, Douketis JD, Thrombosis C: **Prevention of venous thromboembolism in the Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) setting: an evidence-based review.** *Can J Anaesth* 2015, **62**(2):194-202.
28. Bisch S, Nelson G, Altman A: **Impact of Nutrition on Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) in Gynecologic Oncology.** *Nutrients* 2019, **11**(5):1088.
29. Hasiuk MMM, Brown D, Cooney C, Gunn M, Pang DSJ: **Application of fast-track surgery principles to evaluate effects of atipamezole on recovery and analgesia following ovariohysterectomy in cats anesthetized with dexmedetomidine-ketamine-hydromorphone.** *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2015, **246**(6):645-653.

30. Bini G, Vettorato E, De Gennaro C, Corletto F: **A retrospective comparison of two analgesic strategies after uncomplicated tibial plateau levelling osteotomy in dogs.** *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 2018, **45**(4):557-565.
31. Grubb T, Sager J, Gaynor JS, Montgomery E, Parker JA, Shafford H, Tearney C: **2020 AAHA Anesthesia and Monitoring Guidelines for Dogs and Cats.** *J Am Anim Hosp Assoc* 2020, **56**(2):59-82.
32. Clark-Price S: **Inadvertent perianesthetic hypothermia in small animal patients.** *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 2015, **45**(5):983-994.
33. Noel-Morgan J, Muir WW: **Anesthesia-Associated Relative Hypovolemia: Mechanisms, Monitoring, and Treatment Considerations.** *Front Vet Sci* 2018, **5**:53-53.
34. Hay Kraus BL: **Efficacy of maropitant in preventing vomiting in dogs premedicated with hydromorphone.** *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 2013, **40**(1):28-34.
35. Mapara M, Thomas BS, Bhat KM: **Rabbit as an animal model for experimental research.** *Dent Res J (Isfahan)* 2012, **9**(1):111-118.
36. **Animal Wellbeing Report** [<https://www.pdsa.org.uk/get-involved/our-campaigns/pdsa-animal-wellbeing-report>]
37. **American Veterinary Medical Association** [<https://www.avma.org/resources-tools/reports-statistics/us-pet-ownership-statistics>]
38. Lee HW, Machin H, Adami C: **Peri-anaesthetic mortality and nonfatal gastrointestinal complications in pet rabbits: a retrospective study on 210 cases.** *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 2018, **45**(4):520-528.
39. Flecknell P: **Neuroleptanalgesia in the rabbit.** *Laboratory Animals* 1983, **17**(2):104-109.
40. Borkowski R, Karas AZ: **Sedation and anesthesia of pet rabbits.** *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 1999, **14**(1):44-49.
41. Bateman L, Ludders JW, Gleed RD, Erb HN: **Comparison between facemask and laryngeal mask airway in rabbits during isoflurane anesthesia.** *Vet Anaesth Analg* 2005, **32**(5):280-288.
42. Tran H, Puc M, Tran j-l, Rossi A, Hewitt C: **A method of endoscopic endotracheal intubation in rabbits.** *Laboratory animals* 2001, **35**:249-252.
43. Engbers S, Larkin A, Rousset N, Prebble M, Jonnalagadda M, Knight CG, Pang DSJ: **Comparison of a Supraglottic Airway Device (v-gel®) with Blind Orotracheal Intubation in Rabbits.** *Front Vet Sci* 2017, **4**:49-49.
44. DiGiacomo RF, Garlinghouse LE, Jr., Van Hoosier GL, Jr.: **Natural history of infection with Pasteurella multocida in rabbits.** *J Am Vet Med Assoc* 1983, **183**(11):1172-1175.
45. Benato L, Chesnel M, Eatwell K, Meredith A: **Arterial blood gas parameters in pet rabbits anaesthetized using a combination of fentanyl-fluanisone-midazolam-isoflurane.** *J Small Anim Pract* 2013, **54**(7):343-346.
46. Unoki T, Mizutani T, Toyooka H: **Effects of Expiratory Rib Cage Compression and/or Prone Position on Oxygenation and Ventilation in Mechanically Ventilated Rabbits with Induced Atelectasis.** *Respiratory Care* 2003, **48**(8):754.
47. Wenger S: **Anesthesia and Analgesia in Rabbits and Rodents.** *Journal of Exotic Pet Medicine* 2012, **21**(1):7-16.
48. Baumgartner C, Bollerhey M, Ebner J, Schuster T, Henke J, Erhardt W: **Effects of medetomidine-midazolam-fentanyl IV bolus injections and its reversal by specific antagonists on cardiovascular function in rabbits.** *Can J Vet Res* 2010, **74**(4):286-298.

49. Chow EP, Bennett RA, Whittington JK: **Total ear canal ablation and lateral bulla osteotomy for treatment of otitis externa and media in a rabbit.** *J Am Vet Med Assoc* 2011, **239**(2):228-232.
50. Rose JB, Vergneau-Grosset C, Steffey MA, Johnson EG, Chen VS, Mohr FC, Harvey C, Guzman DS-M: **Adrenalectomy and Nephrectomy in a Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) With Adrenocortical Carcinoma and Renal and Ureteral Transitional Cell Carcinoma.** *Journal of Exotic Pet Medicine* 2016, **25**(4):332-341.
51. Gaudy JH BS, Boitier JF, Ferracci F,: **Hypoxic ventilatory drive in the dog under althesin anaesthesia.** *Br J Anaesth* 1984, **56**:631-636.
52. Åsa F, Nigel C, Jon MA, Peter N, Kathreen ER: **Efficacy of a Portable Oxygen Concentrator with Pulsed Delivery for Treatment of Hypoxemia During Anesthesia of Wildlife.** *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2012, **43**(1):67-76.
53. Seaman GC, Ludders JW, Erb HN, Gleed RD: **Effects of low and high fractions of inspired oxygen on ventilation in ducks anesthetized with isoflurane.** *Am J Vet Res* 1994, **55**(3):395-398.
54. Mehta V, Vasu TS, Phillips B, Chung F: **Obstructive sleep apnea and oxygen therapy: a systematic review of the literature and meta-analysis.** *J Clin Sleep Med* 2013, **9**(3):271-279.
55. Block AJ, Hellard DW, Cicale MJ: **Snoring, nocturnal hypoxemia, and the effect of oxygen inhalation.** *Chest* 1987, **92**(3):411-417.
56. Abdo WF, Heunks LM: **Oxygen-induced hypercapnia in COPD: myths and facts.** *Crit Care* 2012, **16**(5):323.
57. Malte H, Lykkeboe G: **The Bohr/Haldane effect: a model-based uncovering of the full extent of its impact on O₂ delivery to and CO₂ removal from tissues.** *Journal of Applied Physiology* 2018, **125**(3):916-922.
58. Dunham-Snary KJ, Wu D, Sykes EA, Thakrar A, Parlow LRG, Mewburn JD, Parlow JL, Archer SL: **Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: From Molecular Mechanisms to Medicine.** *Chest* 2017, **151**(1):181-192.
59. Robertson HT: **Dead space: the physiology of wasted ventilation.** *European Respiratory Journal* 2015, **45**(6):1704.
60. Huynh M, Poumeyrol S, Pignon C, Le Teuff G, Zilberstein L: **Intramuscular administration of alfaxalone for sedation in rabbits.** *Vet Rec* 2015, **176**(10):255.
61. Flecknell PA: **Laboratory animal anaesthesia.** 2016.
62. Raekallio M, Ansah OB, Kuusela E, Vainio O: **Some factors influencing the level of clinical sedation induced by medetomidine in rabbits.** *J Vet Pharmacol Ther* 2002, **25**(1):39-42.
63. Franks NP: **General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal.** *Nat Rev Neurosci* 2008, **9**(5):370-386.
64. Schroeder CA, Smith LJ: **Respiratory rates and arterial blood-gas tensions in healthy rabbits given buprenorphine, butorphanol, midazolam, or their combinations.** *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011, **50**(2):205-211.
65. Riviere JE, Papich MG: **Veterinary pharmacology and therapeutics;** 2018.
66. Lu DZ, Fan HG, Kun M, Song ZL, Ming YS, Sheng J, Wang HB: **Antagonistic effect of atipamezole, flumazenil and naloxone following anaesthesia with xylazine, tramadol and tiletamine/zolazepam combinations in pigs.** *Vet Anaesth Analg* 2011, **38**(4):301-309.

67. Kim MS, Jeong SM, Park JH, Nam TC, Seo KM: **Reversal of medetomidine-ketamine combination anesthesia in rabbits by atipamezole.** *Exp Anim* 2004, **53**(5):423-428.
68. Brogden RN, Goa KL: **Flumazenil. A preliminary review of its benzodiazepine antagonist properties, intrinsic activity and therapeutic use.** *Drugs* 1988, **35**(4):448-467.
69. Ueoka N, Hikasa Y: **Antagonistic effects of atipamezole, flumazenil and 4-aminopyridine against anaesthesia with medetomidine, midazolam and ketamine combination in cats.** *J Feline Med Surg* 2008, **10**(1):47-54.
70. Amrein R, Hetzel W: **Pharmacology of Dormicum (midazolam) and Anexate (flumazenil).** *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1990, **92**:6-15; discussion 47.
71. Shafford HL, Schadt JC: **Respiratory and cardiovascular effects of buprenorphine in conscious rabbits.** *Vet Anaesth Analg* 2008, **35**(4):326-332.
72. Hedenqvist P, Orr HE, Roughan JV, Antunes LM, Flecknell PA: **Anaesthesia with ketamine/medetomidine in the rabbit: influence of route of administration and the effect of combination with butorphanol.** *Vet Anaesth Analg* 2002, **29**(1):14-19.
73. Lees N, Hamilton M, Rhodes A: **Clinical review: Goal-directed therapy in high risk surgical patients.** *Crit Care* 2009, **13**(5):231.
74. Staffieri F, Franchini D, Carella GL, Montanaro MG, Valentini V, Driessen B, Grasso S, Crovace A: **Computed tomographic analysis of the effects of two inspired oxygen concentrations on pulmonary aeration in anesthetized and mechanically ventilated dogs.** *Am J Vet Res* 2007, **68**(9):925-931.
75. Wagner MC, Hecker KG, Pang DSJ: **Sedation levels in dogs: a validation study.** *BMC Vet Res* 2017, **13**(1):110.

Annexe

Sedation scale

Posture	Normal	0
	Sedated but standing/sitting with head up	1
	Lying sternally, head up	2
	Lying sternally, head down	3
	Lying laterally, head up	4
	Lying laterally, head down	5
Palpebral reflex	Brisk	0
	Slow but with full corneal sweep	1
	Slow but with only partial corneal sweep	2
	Absent	3
Eye position	Central	0
	Rotated forwards/downwards but not obscured by third eyelid	1
	Rotated forwards/downwards and obscured by third eyelid	2
	Comment if nystagmus	N
Orbital tightening	Totally open/round	0
	Partially close (<50% of eye closure)	1
	Closed (>50% of eye closure)	2
General appearance/attitude	Awake and normal	0
	Tranquil	1
	Stuporous	2

Annexe 1. Échelle de sedation modifiée de Wagner et al.[75]