

Techniques de perfusion chez les rongeurs

Procédure normalisée de fonctionnement 301 (PNF-301)

Date d'entrée en vigueur : 21 septembre 2011	Révision : 12 novembre 2014 13 septembre 2017 16 novembre 2022	CBSA-11-81-08 CBSA-14-100-08 CBSA-17-117-08.7 CBSA-22-148-09.2
---	---	---

Objectif

Décrire les étapes de trois techniques de perfusion chez le rongeur : par gravitation, à l'aide d'une pompe et à la seringue.

Matériel

Matériel de base

- Hotte chimique
- Anesthésique approprié
- Bac à perfusion
- Plaque de polystyrène ou de paraffine
- Aiguilles hypodermiques (4) pour fixer l'animal
- Instruments de grosseur appropriée :
 - Ciseau (1X)
 - Pincés hémostatiques (2X)
 - Pince à dissection (1X)
- Canules rigides ou aiguilles de grosseur appropriée :
 - Souriceau : 27G à 30G
 - Souris : 25G
 - Rat : 20G à 22G
- Solutions à perfusion selon le protocole :
 - Saline physiologique (nettoyage)
 - Fixateur : formaline 10% / paraformaldéhyde 4%
- Contenant de récupération des liquides de perfusion (contenant pour déchets biomédicaux)

Matériel spécifique

Méthode par gravitation

- Bouteilles (2) pour les solutions de perfusion
- Support pour suspendre les bouteilles à environ un mètre du plan de travail



- Tubulures à perfusion (2) et rallonge si nécessaire



- Valve à 3 voies (2 entrées et 1 sortie) pour tubulure



Méthode avec pompe

- Pompe osmotique
- Tubulure (1)
- Contenants (2) pour les solutions à perfusion

Méthode à la seringue

- Seringues de grosseur appropriée (selon le volume injecté)

Documents

- PNF-211 Anesthésie des rongeurs
- PNF-013 Formation des utilisateurs de rongeurs en recherche

Généralités

- Les techniques de perfusion décrites dans cette PNF doivent être effectuées par du personnel qualifié. Une formation est obligatoire avant d'effectuer les manipulations décrites dans cette procédure (voir la **PNF-013 Formation des utilisateurs de rongeurs en recherche**).
- Les perfusions utilisant un fixateur doivent être effectuées dans une hotte chimique.
- La méthode de perfusion utilisée dépend des besoins associés au protocole ainsi qu'à l'expertise de chaque équipe de recherche.
- Si l'animal est décédé avant la perfusion, celle-ci peut très bien réussir mais devra être faite rapidement afin d'éviter la coagulation sanguine. Une pression supérieure peut être nécessaire (pompe ou réglage vers le haut de la potence pour bouteilles de soluté).
- L'animal doit être anesthésié très profondément avant de commencer les manipulations, selon la **PNF-211 Anesthésie des rongeurs**.

- Solutions fréquemment utilisées pour la perfusion

Rinçage : solution saline physiologique 0,9 % NaCl dans un tampon phosphate. Le pH idéal est de 7.5. Au besoin, de l'héparine (1 unité/mL) peut être ajoutée dans la solution de rinçage.

Fixation : formaline 10 % ou paraformaldéhyde 4 %. Le pH idéal est de 7.5.

- Le volume administré et le temps de perfusion peuvent être ajustés en fonction des besoins de l'expérimentation.
- Dans le cas de déchirure du cœur, il peut être nécessaire de pénétrer l'aorte avec la canule.

Méthodes / Processus

PRÉPARATION DU MATÉRIEL

Méthode par gravitation

1. Préparer votre surface et vos instruments de travail.
2. Installer la tubulure à perfusion sur les contenants. Il est important de bien identifier chacune des tubulures afin de bien distinguer celle utilisée pour le « rinçage » et celle utilisée pour la « fixation ».
3. Remplir les contenants de solution, l'un avec la solution de rinçage et l'autre avec le fixateur. Identifier les contenants. Accrocher les contenants en hauteur.
4. Fixer la tubulure sur la valve à 3 voies.
5. Fixer la canule (ou aiguille) à la sortie de la valve à 3 voies.
6. Rincer les tubulures en évacuant toutes les bulles d'air. Commencer par le fixateur. Une fois l'air sorti, orienter la valve pour laisser couler la saline. Quand l'air est éjecté de la tubulure « saline », fermer celle-ci avec la valve du set de perfusion.

Méthode à l'aide d'une pompe

1. Préparer votre surface et vos instruments de travail.
2. Remplir les contenants de solution, l'un avec la solution de rinçage et l'autre avec le fixateur. Identifier les contenants.
3. Fixer la canule ou l'aiguille au bout de la tubulure.
4. Préparer la tubulure en y faisant circuler le liquide approprié (celui qui sera utilisé au début de la perfusion) de façon à enlever l'air dans le tube.

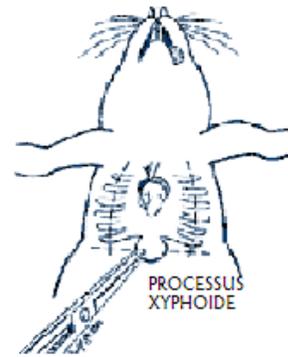
Méthode à la seringue

1. Préparer votre surface et vos instruments de travail.
2. Remplir les seringues avec les solutions utilisées pour la perfusion.
3. Bien identifier les seringues.

PRÉPARATION DE L'ANIMAL

Procédure identique pour toutes les techniques de perfusion

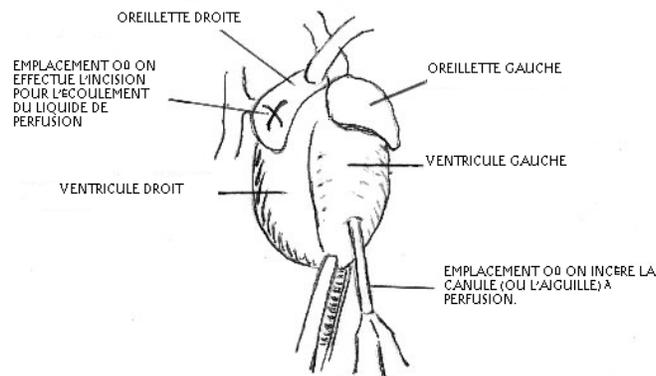
1. Anesthésier profondément l'animal (voir la **PNF-211 Anesthésie des rongeurs**).
2. Vérifier la profondeur d'anesthésie en pinçant les pattes arrière et ajuster si nécessaire. Idéalement, l'animal doit respirer lors de la perfusion.
3. À l'aide d'aiguilles hypodermiques, fixer l'animal à la plaque de perfusion par les 4 pattes bien écartées
4. Avec la pince à dissection, soulever la peau au niveau abdominal haut et l'entailler. Vous apercevrez alors le muscle.
5. Soulever le muscle avec la pince à dissection et y faire une petite incision.
6. Glisser le bout des ciseaux dans l'incision puis couper le muscle, vers le haut, jusqu'au début du sternum.
7. Soulever avec la pince le processus xiphoïde visible comme un point blanc au bas du sternum. Couper l'attache des muscles abdominaux sur le sternum et le bord inférieur des côtes le plus latéralement possible. Ainsi, l'abdomen est ouvert et on voit le diaphragme sur sa face inférieure.
8. Faire une incision dans le diaphragme du côté droit de l'animal. Faire progresser l'incision vers la gauche jusqu'à ce que le diaphragme soit complètement séparé de la cage thoracique. Faire attention de ne pas entailler le cœur. **Il faut faire assez vite à partir de ce moment, car la respiration ne se fait plus.**
9. Couper avec les ciseaux les côtes latéralement sur la droite et sur la gauche. Relever avec la pince le plastron costal et le détacher délicatement du péricarde en utilisant les ciseaux comme écarteurs. Ensuite, couper avec les ciseaux le plastron et l'enlever, ou simplement le replier en le maintenant à l'aide d'une pince hémostatique. Attention : si on remonte trop haut, on risque de couper les vaisseaux sous-claviers et de provoquer une hémorragie.



PERFUSION

Méthode par gravitation

1. Soulever le cœur pour bien en voir les différentes parties ; identifier le ventricule gauche et l'oreillette (atrium) droite.

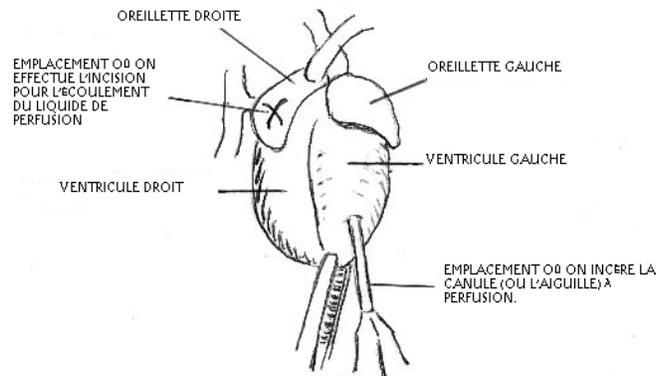


2. Saisir fermement le cœur dans la pince et insérer obliquement, de bas en haut, la canule mousse à travers la paroi du ventricule gauche.
3. Faire une petite incision au niveau de l'oreillette droite.
4. Ouvrir la valve et commencer la perfusion avec la saline. Vérifier que le liquide coule bien.
5. À ce moment, il est possible de maintenir manuellement la canule en place à l'intérieur du ventricule gauche jusqu'à la fin de la perfusion ou alors d'immobiliser la canule en la fixant au cœur à l'aide d'une pince hémostatique.
6. Fermer l'appareil à anesthésie (si applicable) et détacher les pattes antérieures.
7. Observer que le sang s'écoule par l'ouverture de l'oreillette droite; les viscères, la peau, le foie et les autres organes deviennent clairs.
8. Dès que le rinçage optimal est atteint, tourner la valve et faire couler le fixateur. Vérifier que celui-ci coule avec un bon débit et que la canule est toujours en place. La durée de la fixation dépend des besoins.
9. Lorsque votre temps de fixation est terminé, arrêter l'écoulement du fixateur.
10. Enlever la canule et faire les prélèvements nécessaires.

Entre chaque animal perfusé, ne pas oublier de faire passer la saline dans la tubulure afin d'y enlever le surplus de fixateur.

Méthode à l'aide d'une pompe

1. Soulever le cœur pour bien en voir les différentes parties ; identifier le ventricule gauche et l'oreillette (atrium) droite.

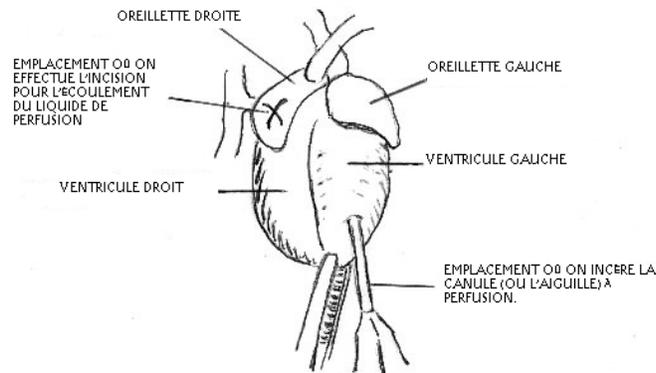


2. Saisir fermement le cœur dans la pince et insérer obliquement, de bas en haut, la canule mousse à travers la paroi du ventricule gauche.
3. Faire une petite incision au niveau de l'oreillette droite.
4. Démarrer la pompe au débit désiré.
5. À ce moment, il est possible de maintenir manuellement la canule en place à l'intérieur du ventricule gauche jusqu'à la fin de la perfusion ou alors d'immobiliser la canule en la fixant au cœur à l'aide d'une pince hémostatique.
6. Fermer l'appareil à anesthésie (si applicable) et détacher les pattes antérieures.
7. Observer que le sang s'écoule par l'ouverture de l'oreillette droite; les viscères, la peau blanche, le foie et les autres organes deviennent clairs.
8. Dès que le rinçage optimal est atteint, arrêter la pompe. Changer la tubulure de contenant (vers le fixateur) et redémarrer la pompe. Ajuster le débit si nécessaire. La durée de la fixation dépend des besoins.
9. Lorsque votre temps de fixation est terminé, arrêter la pompe.
10. Enlever la canule et faire les prélèvements nécessaires.

Entre chaque animal perfusé, ne pas oublier de faire passer la saline dans la tubulure afin d'y enlever le surplus de fixateur.

Méthode à la seringue

1. Soulever le cœur pour bien en voir les différentes parties : identifier le ventricule gauche et l'oreillette (atrium) droite.



2. Saisir fermement le cœur dans la pince et insérer obliquement, de bas en haut, l'aiguille de la seringue.
3. Faire une petite incision au niveau de l'oreillette droite.
4. Administrer le liquide au débit désiré, en appliquant sur le piston de la seringue une certaine force, mais sans exagérer.
5. Effectuer la même manœuvre pour le fixateur, si nécessaire.

NETTOYAGE

1. Récupérer les liquides de perfusion dans le contenant approprié.
2. Rincer et laver les instruments chirurgicaux, les surfaces de travail et autres équipements utilisés.
3. Rincer à l'eau les bouteilles, la tubulure et la canule.
4. Disposer du corps de l'animal de façon appropriée.

Révisée par :

Adjointe au doyen, responsable de l'animalerie :
Mme Fanny Longpré
Technicienne en santé animale :
Mme Nadia Desnoyers
Vétérinaire :
Dre Dorine Gilbert

Historique des mises à jour :

Version 4	16 novembre 2022	Alléger le texte dans les généralités.