



PNF M-19

Utilisation du système d'imagerie animale *in vivo* IVIS Lumina III LT

Révisée par : Geneviève L. Roy

Jean-François Daudelin et Bruno Prud'homme

Date : Décembre 2023

Version : 3.0

Approuvé par le Comité de Protection des Animaux du CRHMR

1. BUT / OBJECTIF

Le but de cette Procédure Normalisée de Fonctionnement (PNF) est de décrire les étapes à suivre lors d'imagerie animale chez les petits rongeurs avec le système d'imagerie *in vivo* (IVIS, *In Vivo Imaging System*) Lumina LT Series III situé dans l'Animalerie du Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (ACRHMR).

2. APPLICABLE À / RESPONSABILITÉS

Cette PNF est la responsabilité de tout le personnel qualifié de l'ACRHMR et des utilisateurs qui procèdent à l'imagerie *in vivo* de souris ou de rats à l'aide de l'IVIS. Ces derniers doivent lire, comprendre et appliquer cette PNF. Les membres du Comité de Protection des Animaux (CPA) et du comité des équipements doivent réviser et approuver cette PNF au moins aux 3 ans. Les coordonnateurs techniques aux infrastructures ainsi que la coordonnatrice de l'animalerie doivent s'assurer que le personnel et les utilisateurs appliquent cette PNF correctement.

3. INFORMATIONS

L'appareil IVIS Lumina LT Series III de PerkinElmer, situé dans la salle de procédure 411 de l'ACRHMR, offre un système d'imagerie animal pouvant être utilisé pour l'imagerie de fluorescence et de bioluminescence. Le système comprend une caméra CCD (*Charged Couple Device*) à haute résolution, une chambre d'imagerie thermorégulée et un système d'anesthésie intégré. Le logiciel Living Image®, inclus avec l'appareil, permet une automatisation de l'acquisition, ainsi que l'analyse des résultats.

La luminescence donne généralement un signal plus faible que la fluorescence, mais elle est plus sensible, car les animaux émettent peu de signal de bruit de fond de luminescence. Il est à noter que certaines diètes riches en chlorophylle peuvent augmenter l'autofluorescence des animaux autour de 700 nm et peuvent donc interférer avec la mesure de certains fluorochromes. Par



ailleurs, la présence de poils foncés peut nuire à l'acquisition et il sera probablement nécessaire de raser ou d'épiler ces animaux; les meilleurs résultats d'imagerie sont obtenus avec les souris nues. Pour la luminescence, il est important de déterminer préalablement le temps optimal pour effectuer la prise d'images suite à l'injection de la luciférine. Pour ce faire, effectuer une cinétique de mesure et choisir le temps qui correspond au plateau de la courbe de luminescence.

L'utilisation de l'appareil IVIS Lumina LT Series III est restreinte à l'imagerie de petits rongeurs seulement (souris et rats) qui ne proviennent pas de la salle de quarantaine ni du secteur de niveau de confinement 2 (salle 400). De plus, il est primordial que chaque nouvel utilisateur ait reçu une formation complète sur l'utilisation de l'appareil (ainsi que sur l'anesthésie générale) et possède un protocole d'expérimentation approuvé par le CPA, démontrant la pertinence de l'utilisation de cet appareil, avant de pouvoir l'utiliser.

4. DÉFINITIONS

ACRHMR :	Animalerie du Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont
CCD :	<i>Charged Couple Device</i> – Dispositif couplé chargé
CPA :	Comité de Protection des Animaux
EPI :	Équipement de Protection Individuelle
IVIS:	<i>In vivo Imaging System</i> – Système d'imagerie <i>in vivo</i>
PNF :	Procédure Normalisée de Fonctionnement
Utilisateur :	Membre d'une équipe de recherche utilisant les services de l'animalerie

5. EXEMPLAIRES / FORMULAIRES / ATTACHEMENTS

Le manuel d'instruction de cet appareil est disponible en format électronique sur le lecteur réseau P : *P:\Fichiers_commun CR\Appareils communs et PNF\Manuels instructions* ainsi que sur l'intranet et/ou extranet sous le lien *Enseignement, recherche et innovation > Recherche > Infrastructures > Plateaux techniques > Liste des appareils*.

Annexe I : Images du système d'imagerie animale *in vivo* Lumina III LT

Annexe II : Image de l'IVIS Acquisition Control Panel

Annexe III : Procédure de remplissage du réservoir d'isoflurane



Annexe IV : Carton d'identification «*Faire en dernier*»

Annexe V : Fiche d'utilisation simplifiée

6. MATÉRIEL / ÉQUIPEMENT

6.1 Autorisations/formations à obtenir.

- Protocole d'expérimentation animale valide et permettant l'utilisation de l'appareil;
- Attestation de formation sur l'utilisation de l'appareil;
- Attestation de formation sur l'anesthésie générale;
- Accès au système de réservation en ligne *MIDAS*;
- Accès au logiciel d'imagerie in vivo de l'appareil (Système d'imagerie IVIS, version anglaise seulement).

6.2 Équipements qui se trouvent dans la salle 411 de l'ACRHMR.

- Appareil d'imagerie animale (IVIS Lumina LT Series III, voir annexe I);
- Cylindres transparents et séparateurs de couleur noir (qui seront utilisés à l'intérieur de l'appareil sur le modulateur d'isoflurane);
- Vaporisateur à isoflurane à deux voies;
- Solution désinfectante Peroxigard (dilution 1 :40) ou tout autre solution recommandée et reconnue par l'ACRHMR pour son activité bactéricide, virucide et mycosique qui ne dégage pas d'odeurs et est non toxique (n'affecte pas le comportement des animaux);
- Débarbouillette;
- Carton plastifié « *Animaux imagés – Faire en dernier* »;
- Balance avec un petit contenant;
- Bouchons.

7. ÉTAPES / PROCÉDURES

7.1 Étapes à faire avant de débiter l'imagerie

- L'appareil IVIS doit être réservé via la plateforme MIDAS (<https://recherche-hmr.mid.as/>).
- Dans la pièce d'imagerie, enfiler l'Équipement de Protection Individuelle (EPI) tel qu'exigé (se référer à la PNF P-08).
- Démarrer l'ordinateur et ouvrir le logiciel *living image*  en utilisant votre nom d'utilisateur et le mot de passe approprié (faire la demande d'accès aux coordonnateurs techniques



aux infrastructures pour obtenir votre nom d'utilisateur et mot de passe pour l'ordinateur ainsi que le logiciel, à l'adresse infra.recherche.cemtl@ssss.gouv.qc.ca)

- Faire l'inspection de l'appareil d'imagerie (extérieur et intérieur) et nettoyer l'intérieur avec une débarbouillette imbibée de Peroxigard.
- Dans le IVIS Acquisition Control Panel (voir l'annexe II), cliquer sur *Initialize* pour mettre le système en marche et permettre à la caméra d'atteindre sa température. *Vous ne serez pas en mesure d'ouvrir la porte de l'appareil lors du processus d'initialisation, ce processus peut prendre plusieurs minutes.
- Pendant ce temps, désinfecter avec le Peroxigard les surfaces avoisinantes de l'appareil (table, boîte servant à l'anesthésie, balance et contenant pour la pesée des animaux) ainsi que les cylindres et les séparateurs pour réduire le plus possible les risques de contamination.
- Vérifier si le réservoir d'isoflurane est plein. Le remplir au besoin (voir l'annexe III).
- Lorsque l'initialisation est terminée, installer les cylindres et les séparateurs dans le modulateur d'isoflurane à l'intérieur de l'appareil.
 - *Attention, notre système permet d'imager jusqu'à 3 souris à la fois, il faut donc **s'assurer que les bouchons soient en place sur les voies du vaporisateur qui ne sont pas utilisées** (voir l'annexe I) et s'assurer que le plateau chauffant est fonctionnel.
- Dans le IVIS Acquisition control Panel (voir l'annexe II), choisir les paramètres d'imagerie puis mesurer le bruit de fond en luminescence/fluorescence en allant dans Acquisition, Background, mesure darkcharge.
- Il est aussi possible de prendre une photo afin de vérifier si le modulateur d'isoflurane est bien aligné et permettra d'avoir de meilleures images des animaux.

7.2 Procédures durant l'imagerie

- Il est possible d'imager jusqu'à 3 animaux en même temps, il faut donc préparer un maximum de 3 animaux à la fois
- Si les animaux doivent recevoir une substance pour l'expérience, peser les animaux, effectuer l'injection (p ex. 150 mg/kg de D-luciférine i.p., voir la PNF M-09 : Gavage et injection) puis attendre le temps préalablement déterminé comme étant nécessaire pour atteindre le pic d'émission maximale de luminescence.
- Procéder à l'anesthésie des animaux (voir la PNF M-07 : Anesthésie) et se référer à l'annexe I.
 1. Mettre la pompe d'évacuation de l'isoflurane en marche (A).
 2. Ouvrir la bonbonne d'oxygène (B) situé à gauche de l'appareil et mettre la valve verte Oxygen à ON (C).
 3. Mettre les animaux dans la chambre d'induction (D).
 4. Mettre la valve de l'*induction chamber* (E) à ON et ajuster le flow d'oxygène à 0,8 à 1,5L/min avec le régulateur (F) puis mettre l'isoflurane à 3 à 4% au niveau du régulateur (G).



- Une fois que les animaux sont bien anesthésiés, les transférer dans la chambre d'imagerie en maintenant l'anesthésie grâce au modulateur d'isoflurane. Pour ce faire :
 1. Ouvrir la valve *IVIS flow* (**H**) et fermer la valve *induction chamber* (**E**).
 2. Diminuer l'isoflurane à 2% au niveau du régulateur (**G**).
 3. Appliquer un gel ophtalmique stérile sur les yeux des animaux.
 4. Placer le museau de la souris dans le cylindre apposé au vaporisateur d'isoflurane (**I**) et placer l'animal de la façon la plus appropriée en fonction de la région à imager.
 5. Observer les animaux pendant une minute avant de fermer la porte afin de s'assurer que l'anesthésie des animaux est bien maintenue.
- Procéder à l'imagerie (**la durée maximale de séjour de l'animal à l'intérieur de l'appareil d'imagerie est de 30 minutes**)
 - Ajuster les paramètres de mesure dans l'*IVIS Acquisition control Panel* puis appuyer sur *Acquire* (Voir l'annexe II).
 - Sélectionner le mode d'imagerie (*Luminescent* ou *Fluorescent*) et cocher la case *Photograph* afin d'avoir une photo de l'animal qui sera superposée à l'image de luminescence/fluorescence
 - Il est possible de sélectionner *Auto* afin que le logiciel détermine automatiquement les paramètres optimaux d'acquisition ou d'ajuster manuellement les paramètres de temps d'exposition, de *Binning* et de *F/Stop*
 - Le temps d'exposition doit être entre 0,5 secondes et 5 minutes pour la luminescence.
 - Le *Binning* correspond à la taille des pixels, un petit *binning* donnera une plus faible sensibilité, mais une meilleure résolution, alors qu'un grand *binning* donnera une plus grande sensibilité, mais une plus faible résolution.
 - Le *F/Stop* correspond à la quantité de lumière qui arrive au détecteur, *F/1* correspond à une grande ouverture et est le paramètre par défaut pour la luminescence. *F/8* correspond à une petite ouverture et donne une meilleure résolution.
 - Il est aussi possible de spécifier une séquence d'imagerie avec différents paramètres qui sera effectuée automatiquement.
 - Entrer les informations (traitements, identification d'animaux, date, etc.) dans la boîte de dialogue d'identification des images (*Image Labels*) qui apparaîtra lors que l'acquisition.
 - Il est possible d'autoriser la sauvegarde automatique des images en spécifiant le lieu de sauvegarde ou d'enregistrer manuellement les images (en cliquant sur le bouton d'export des images ).
- À la suite de l'imagerie, fermer la valve de l'IVIS (**H**), retirer les animaux de l'appareil d'imagerie et les déposer dans leur cage d'origine et faire la surveillance selon la M-07 : Anesthésie.



- Ajouter à l'arrière du carton d'identification de cage, le carton plastifié «*Animaux imagés – Faire en dernier*» (voir l'annexe IV) pour que cette cage soit faite en dernier dans les ouvertures de cage.
- Répéter au besoin selon le nombre d'animaux à imager.

7.3 Étapes à faire après l'imagerie

- Lorsque l'imagerie est terminée, remettre le vaporisateur d'isoflurane (**G**) à OFF et **fermer la valve du cylindre d'oxygène (C)**. Ouvrir les valves de l'IVIS (**H**) et de l'*induction chamber* (**E**) puis purger le système à l'aide de la pompe. Attendre que toutes les jauges indiquent 0 puis fermer les valves (**H** et **E**), l'entrée d'oxygène (**B**) et la pompe d'évacuation (**A**).
- Retirer et nettoyer les cylindres ainsi que les séparateurs du modulateur d'isoflurane de l'appareil d'imagerie puis désinfecter l'intérieur avec le Peroxiguard 5 minutes avant de rincer avec de l'eau osmosée.
- Enregistrer vos images et en faire l'analyse.
 - Afin de mesurer le signal et d'être en mesure de comparer différentes images, il faut choisir l'option *Radiance* (photons) pour la luminescence ou *Radian Efficiency* pour la fluorescence. Il ne faut pas comparer les *counts* entre les images, car il s'agit d'une mesure non calibrée qui est influencée par les paramètres d'acquisition de l'image.
 - Il faut dessiner une ROI (*Region of interest*) autour des zones à mesurer puis cliquer sur mesure ROIs
 - Il est ensuite possible d'exporter ces données en fichier .txt
- Transférer vos données sur une clé USB
- Fermer le logiciel et éteindre l'ordinateur.
- Ramener les animaux dans leur salle d'hébergement lorsqu'ils sont pleinement réveillés et actifs. ***S'assurer d'avoir bien fermé la bonbonne d'oxygène avant de quitter la salle.**

Pour plus de détails sur toutes les options du IVIS Lumina LT Series III, veuillez consulter le manuel d'instruction situé sur le lecteur réseau P (P:\Fichiers_commun CR\Appareils communs et PNF\Manuels instructions), ainsi que sur l'intranet et/ou extranet sous le lien *Enseignement, recherche et innovation > Recherche > Infrastructures > Plateaux techniques > Liste des appareils*.

8. RÉFÉRENCES / PROCÉDURES CONNEXES

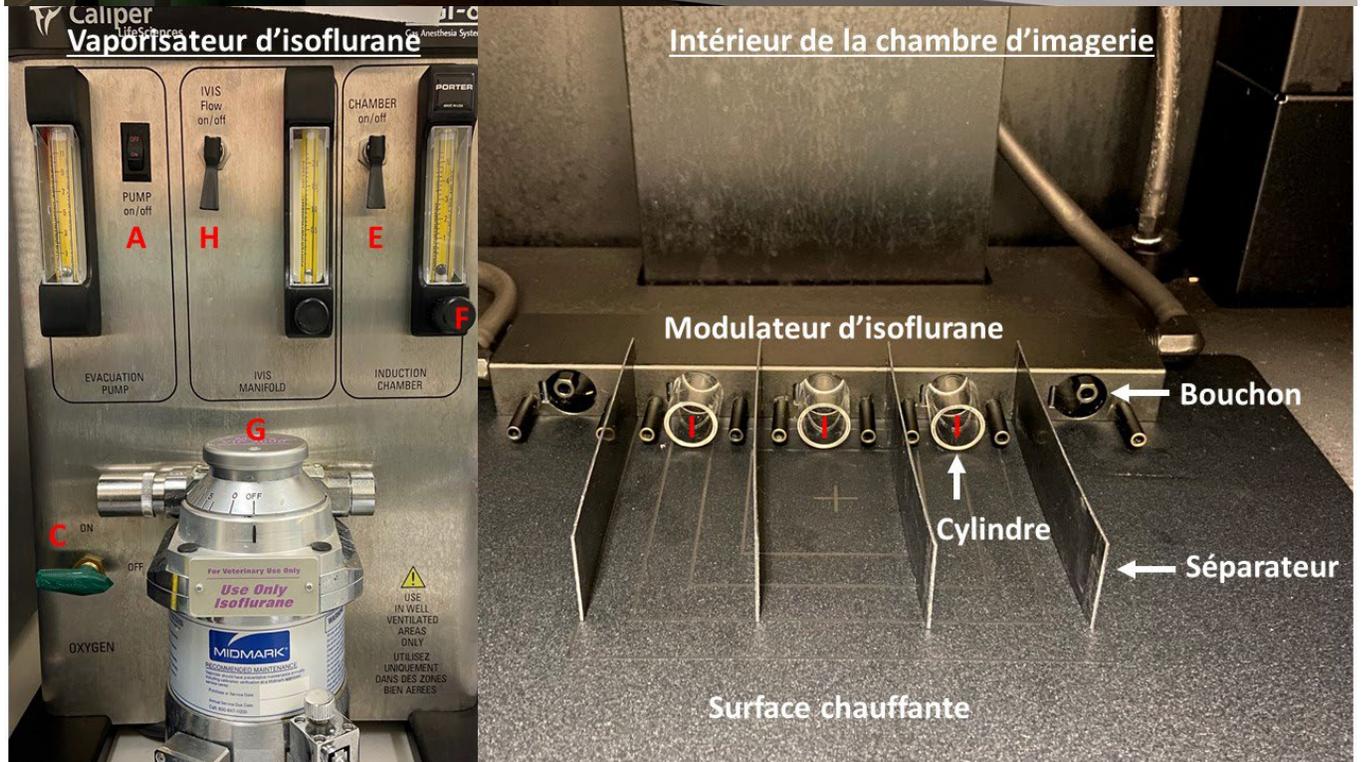
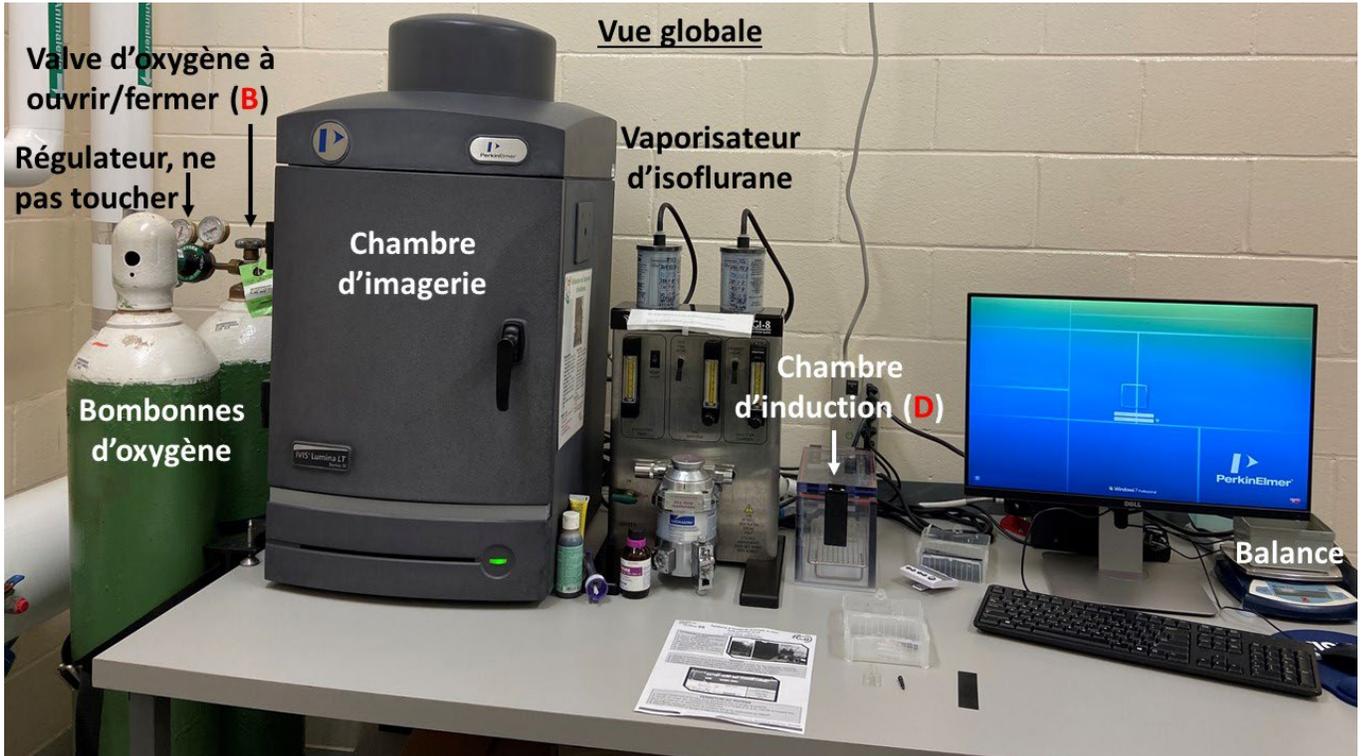
PNF M-07 : anesthésie des rongeurs

PNF M-09 : gavage et injection

PNF P-08 : habillage et circulation à l'intérieur de l'animalerie



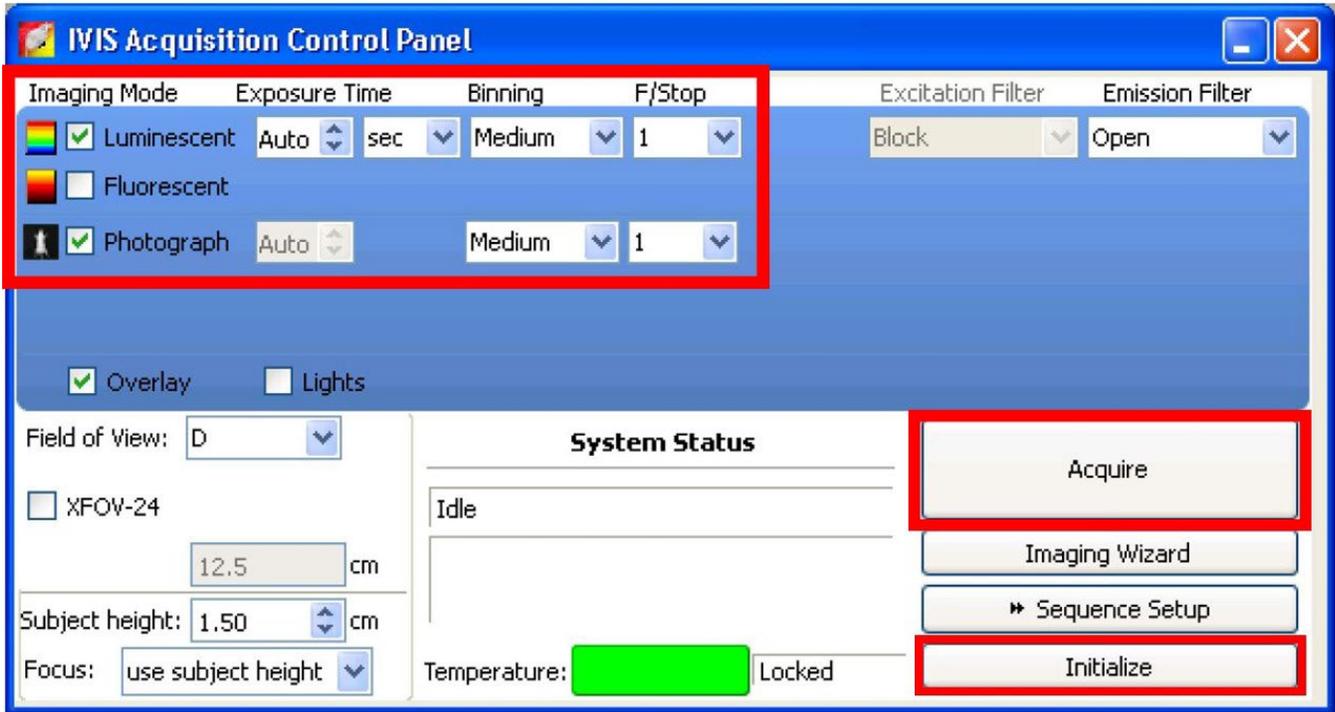
Annexe I : Images du système d'imagerie animale *in vivo* Lumina III LT



Légende : A, Pompe d'évacuation; B, Valve du cylindre d'oxygène; C, Valve d'oxygène; D, Chambre d'induction; E Valve de la chambre d'induction; F, Régulateur du flow d'oxygène; G, Régulateur du vaporisateur d'isoflurane; H, Valve de la chambre d'imagerie; I, sortie de l'isoflurane



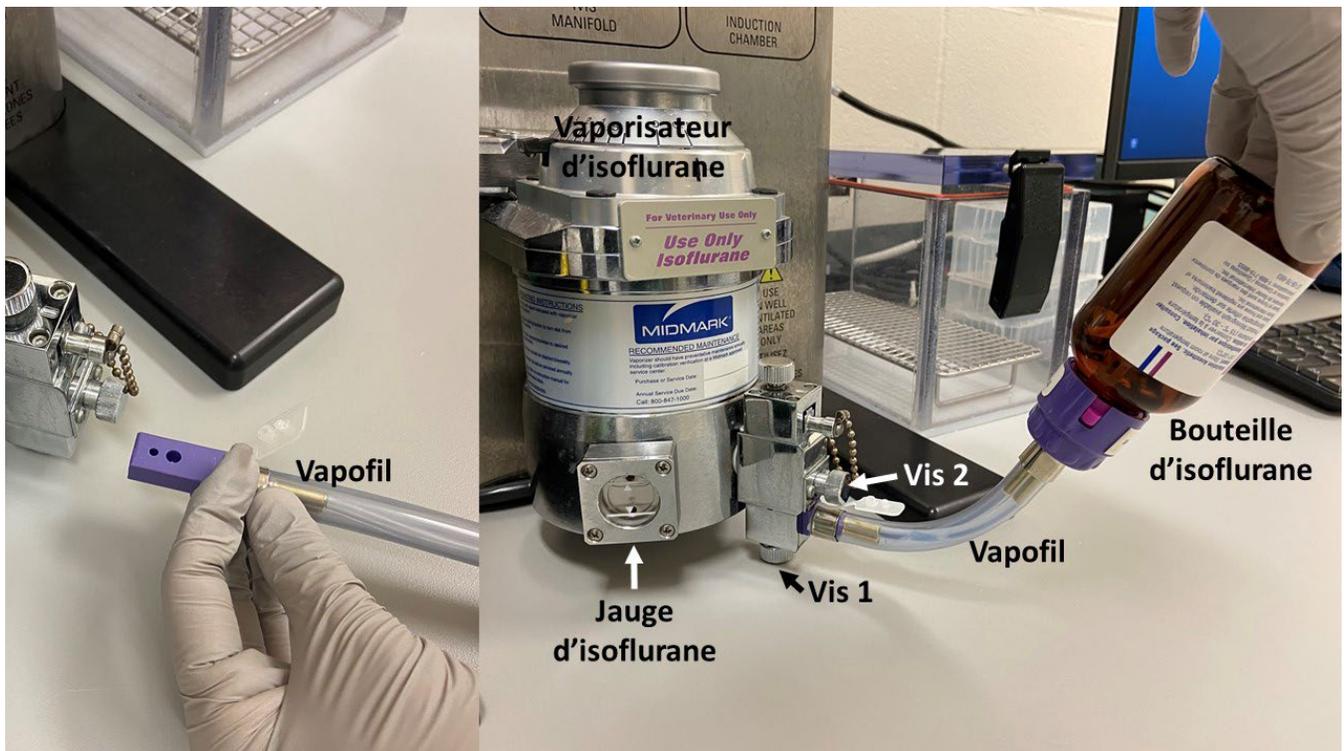
Annexe II : Image de l'IVIS Acquisition Control Panel





Annexe III : Procédure de remplissage du réservoir d'isoflurane

- 1- Ouvrir la Bouteille d'isoflurane et y installer le Vapofil
- 2- Insérer le Vapofil, avec les trous vers le haut, dans l'ouverture du vaporisateur d'isoflurane en maintenant la bouteille d'isoflurane à l'horizontale
- 3- Tourner la vis 1 afin de sécuriser le Vapofil en place puis ouvrir la vis 2 afin de permettre l'entrée de l'isoflurane dans le réservoir
- 4- Soulever la bouteille d'isoflurane jusqu'à ce que la jauge indique une quantité suffisante
- 5- Fermer la vis 2, baisser la bouteille et attendre quelques secondes
- 6- Tourner la vis 1 et retirer le Vapofil
- 7- Retirer le Vapofil de la bouteille et la refermer.



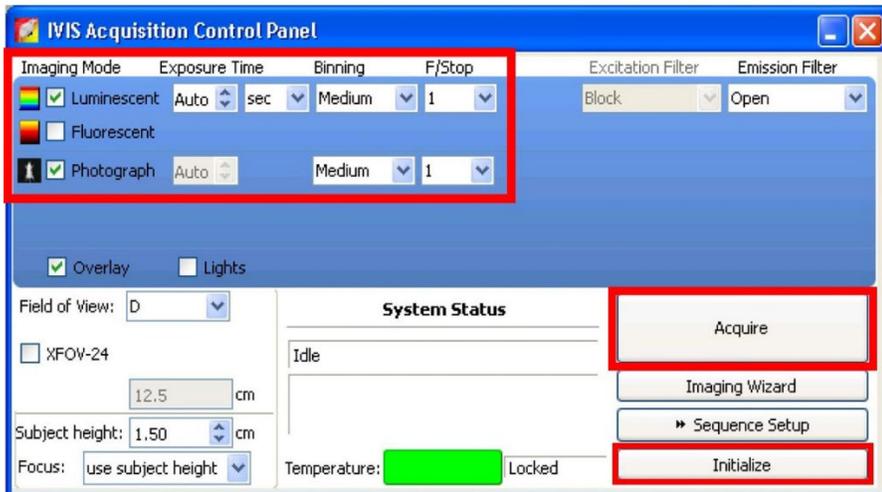
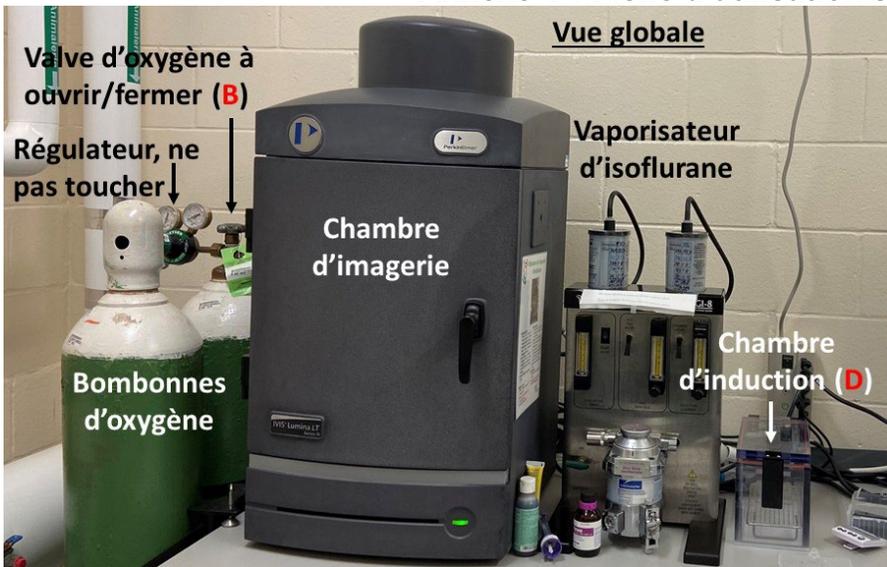


Annexe IV : Carton d'identification «Faire en dernier»

FAIRE EN DERNIER
Animaux imagés



Annexe V : Fiche d'utilisation simplifiée



OUVERTURE ET PRÉPARATION DU SYSTÈME

- 1 – Ouvrir l'ordinateur et le logiciel
- 2- Initialiser le système
- 3- Nettoyer les surfaces et accessoires au Peroxygard

IMAGERIE

- 1- Mettre la pompe d'évacuation en marche (A)
- 2- Ouvrir la bonbonne d'O₂ (B)
- 3- Mettre la valve d'O₂ à ON (C)
- 4- Induire l'anesthésie des animaux dans la chambre d'induction (D)
- 5- Valve d'induction à ON (E), O₂ à 2L/min (F), iso à 4% (G)
- 6- Transférer les animaux dans la chambre d'imagerie
- 7- Valve de l'IVIS flow (H) à ON, valve de l'induction (E) à OFF, iso à 2% (G)
- 8- Choisir les paramètres d'imagerie et d'exposition et procéder à l'imagerie
- 9- Fermer la valve de l'IVIS flow (H), transférer les animaux dans leur cage et les surveiller jusqu'au réveil

FERMETURE DU SYSTÈME

- 1- Fermer l'iso (G) et l'O₂ (B)
- 2- Ouvrir les valve (H et E) et purger le système (jauges à 0)
- 3- Fermer la pompe d'évacuation (A)
- 4- Désinfecter toutes les surfaces et accessoires au Peroxygard
- 5- Exporter vos données et fermer le logiciel ainsi que l'ordinateur



9. HISTORIQUE DES MODIFICATIONS

Date	Modifications	Version
2017-05-08	Création	1.0
2021-05-01	Modification par Paul Lemire	2.0
2023-09-07	Refonte de la PNF	3.0