

Direction des services vétérinaires	Procédure normalisée de fonctionnement
Objet : Chirurgie stéréotaxique chez les rongeurs	Numéro : C-3
Portée : Ceci est une directive de la Direction des services vétérinaires à l'intention des utilisateurs et du personnel des animaleries de l'Université Laval (campus et centres de recherche affiliés).	
Préparée par Stéphanie Caron <i>Technicienne en santé animale conformité, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 15 octobre 2012
Modifiée par Anne-Marie Catudal <i>Vétérinaire clinicienne, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 3 avril 2020
Révisée par Daphnée Veilleux-Lemieux, Geneviève Fortin Simard <i>Vétérinaires, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 21 avril 2020
But : Décrire les procédures de chirurgie stéréotaxique chez les rongeurs.	Version 3

## Généralités

- Plusieurs facteurs peuvent faire varier légèrement les coordonnées exactes des zones à l'étude et s'ils ne sont pas pris en compte, cela peut affecter négativement la qualité des résultats et nécessiter un plus grand nombre d'animaux. Avant de débuter un protocole, il est recommandé de prévoir quelques animaux de pratique afin de s'assurer que la bonne zone est bien visée, notamment lorsque :
  - de nouvelles lignées transgéniques sont utilisées;
  - des animaux de stades de vie différents sont utilisés;
  - une nouvelle zone du cerveau est visée avec laquelle l'équipe n'a pas d'expérience.
- La chirurgie doit être effectuée de manière aseptique (voir la PNF C-1 Chirurgie aseptique chez les rongeurs).
- Les procédures préopératoires, chirurgicales, postopératoires, d'anesthésie et d'analgésie appropriées doivent être appliquées.
- Il faut prévoir une seringue de fluides réchauffés (saline ou Lactate de Ringer (LRS)) pour asperger la peau incisée, contrôler les saignements et nettoyer le site chirurgical. L'utilisation fréquente de fluides froids peut contribuer à aggraver l'hypothermie des animaux.
- À l'aide d'un éclairage adéquat, il est possible, selon l'âge des animaux et la zone d'injection visée, d'identifier les repères anatomiques et de faire une injection directe sans ouverture de la peau chez les nouveau-nés. Ce raffinement permet d'éliminer les problèmes de déhiscence de plaie et de limiter les pertes d'animaux.

- Le cadre stéréotaxique doit être désinfecté en vaporisant un désinfectant sur un papier absorbant avant le début des chirurgies et entre chaque animal.
- Tout le matériel utilisé (cotons-tiges, gazes, fluides, etc.) et tous les instruments doivent être stérilisés à l'autoclave.
- Avant leur introduction dans le cerveau, les électrodes, canules et autres implants qui ne peuvent être autoclavés doivent être stérilisés à l'aide d'une méthode éprouvée comme le gaz d'oxyde d'éthylène ou par immersion dans une solution prévue à cet effet (ex. solutions de glutaraldéhyde ou d'acide peracétique). Le temps de stérilisation par immersion doit être respecté (habituellement plus de 6 heures) et les implants doivent ensuite être rincés à l'eau/saline stérile et être manipulés et entreposés de façon aseptique.
- Les trois conditions à respecter pour assurer le maintien à long terme d'un implant sont :
  - une technique stérile méticuleuse;
  - une préparation adéquate de la surface osseuse;
  - un ancrage sécuritaire du ciment à l'os et aux vis.

## Procédures

### Préparation de l'animal

- Peser l'animal.
- Administrer une dose d'analgésie systémique prévue au protocole.
- Anesthésier l'animal selon la procédure appropriée (voir la PNF A-1 Analgésie et anesthésie des rongeurs).
- Raser la tête et nettoyer avec un savon antiseptique.
- Infiltrer un anesthésique local (lidocaïne et bupivacaïne) au site d'incision et aux points d'appui de l'appareil stéréotaxique (i.e. conduits auditifs) selon la PNF A-1. Attendre 3 minutes avant d'installer les barres d'oreilles.
- Avant de commencer, vérifier la profondeur de l'anesthésie en pinçant la peau entre les orteils pour vérifier l'absence du réflexe de retrait.

Note : L'anesthésie doit être constante et profonde, compte tenu de la pression exercée sur le crâne par les points de fixation.

- Installer l'animal dans l'appareil stéréotaxique. Insérer les barres d'oreilles dans les conduits auditifs. Pour les procédures avec survie, des barres à pointe mousse doivent être utilisées. Pour les souris, des barres zygomatiques sont recommandées. Les barres à pointe fine sont permises pour les chirurgies sans survie (l'animal doit être euthanasié sans être réveillé).
- Remettre de l'onguent ophtalmique s'il a été retiré durant l'installation de l'animal.

- Préparer le site chirurgical selon la PNF C-1 Chirurgie aseptique chez les rongeurs.
- Changer de gants et les passer à l'alcool ou revêtir des gants stériles.

## Chirurgie

- Placer un champ opératoire stérile sur l'animal tout en laissant la tête dégagée. Respecter l'asepsie selon la PNF C-1 Chirurgie aseptique chez les rongeurs.
- Inciser de façon rostro-caudale la peau et le fascia couvrant le crâne.  
Note : Si des ciseaux sont utilisés, des ciseaux droits sont préférables. Toutefois, le scalpel est fortement recommandé pour les rats.
- Selon le site d'injection, ou si un implant doit être fixé au crâne, écarter le fascia de l'os à l'aide du scalpel et d'un coton-tige. Contrôler les saignements par compression/friction avec un coton-tige ou application de LRS.  
Note : Pour les rats, il est souvent nécessaire de rétracter la peau pour bien accéder à l'endroit ciblé sur le crâne. Quatre petites pinces Mosquito courbes peuvent être installées à chaque coin de la plaie en prenant soin de pincer le fascia et non la peau. Un écarteur de type « *colibri retractor* » peut également être utilisé. Pour les souris, il est généralement suffisant de repousser la peau latéralement à l'aide d'un coton-tige. Au besoin, un « *mouse eyelid retractor* » peut être utilisé.
- Maintenir la plaie humide tout au long de la procédure en l'aspergeant régulièrement de quelques gouttes de saline ou LRS.
- Pour les chirurgies de très longue durée, réadministre aux 3 heures le mélange de lidocaïne et de bupivacaïne sur le site et au niveau des barres d'oreilles, en faisant attention de ne pas dépasser la dose maximale toxique.

### Injection directe

- À l'aide d'un porte-aiguille, placer la mèche stérile dans la perceuse.
- Vérifier que le crâne est bien au niveau, en comparant la hauteur du bregma et du lambda.
- Localiser le bregma.
- Effectuer la craniotomie aux coordonnées stéréotaxiques appropriées en faisant attention de ne pas percer accidentellement la dure-mère.  
Note : Il est recommandé de marquer la position de la craniotomie à l'aide d'un crayon stérile.
- Utiliser des coton-tiges et du LRS pour arrêter les saignements. Au besoin, appliquer un gel hémostatique (ex. Gelfoam®).
- Retirer les débris osseux de la craniotomie à l'aide de pinces et/ou de coton-tiges imbibés de saline ou LRS. Percer la dure-mère sans endommager le cerveau à l'aide d'une aiguille 25G.

- Descendre lentement l'aiguille d'injection aux coordonnées appropriées (vitesse recommandée : 1 mm/minute).
- Effectuer l'injection en utilisant une vitesse et un volume adéquats selon l'espèce et la zone visée.
- Attendre de 3 à 5 minutes afin de permettre la diffusion du produit et retirer lentement l'aiguille.  
Note : Il est recommandé de boucher la craniotomie à l'aide de cire d'os.
- Rincer le site d'incision avec un peu de saline ou LRS.
- Fermer le site chirurgical de façon aseptique en installant un champ stérile tout autour afin de ne pas contaminer les sutures.

### **Préparation du crâne pour installation d'un implant**

- Pour maximiser l'adhérence du ciment, s'assurer que tout le fascia a été retiré et que tous les saignements ont cessé.  
Note : Il est recommandé de faire des sillons sur la surface du crâne à l'aide de la pointe d'un scalpel ou d'une aiguille, en évitant les sutures sagittales et coronales.
- Laver la surface osseuse avec de la saline ou du LRS et l'assécher avec un coton-tige.

### **Installation des vis d'ancrage**

- À l'aide d'un porte-aiguille, placer la mèche stérile dans la perceuse.
- Vérifier que le crâne est bien au niveau, en comparant la hauteur du bregma et du lambda.
- Percer les trous pour les vis, en utilisant une mèche de plus petit diamètre que celui des vis, et insérer les vis délicatement en ne dépassant pas 1 mm de profondeur. De 1 à 4 vis peuvent être utilisées pour offrir un support au ciment dentaire. Éviter de les placer trop près du site d'intérêt pour ne pas gêner l'introduction du guide-canule ou interférer avec l'enregistrement de l'électrode. Éviter de percer le crâne au niveau des jonctions osseuses, car les saignements seront plus importants.

Note : Les vis ne doivent pas traverser l'os complètement. Si cela arrive, retirer la vis et boucher le trou à l'aide de cire d'os.

## Craniotomie

- Si une craniotomie est requise, localiser le bregma.
- Effectuer la craniotomie aux coordonnées stéréotaxiques appropriées en faisant attention de ne pas percer accidentellement la dure-mère. Utiliser une mèche de taille appropriée selon le diamètre de la canule.

Note : Il est recommandé de marquer la position de la craniotomie à l'aide d'un crayon stérile.
- Retirer les débris osseux de la craniotomie à l'aide de pinces et/ou de cotons-tiges imbibés de saline ou de LRS et assécher le crâne avec un coton-tige. Percer la dure-mère sans endommager le cerveau à l'aide d'une aiguille 25G afin de faciliter l'insertion de fines structures (ex. micropipettes, canules, etc.).

## Implantation d'une canule

- Insérer la canule à l'aide du guide-canule (*cannula holder*); vitesse recommandée : 1 mm/minute.
- Appliquer une petite goutte de colle à tissu sur le crâne à la base de la canule, à l'aide d'une aiguille 27G. Attention de ne pas coller le guide-canule.
- Une fois la colle séchée, retirer délicatement le guide-canule en s'assurant que la canule ne bouge pas.

Note : Si la canule bouge sur le crâne, réappliquer une goutte de colle.
- Appliquer une mince couche assez liquide de ciment dentaire à l'aide d'une spatule ou d'un coton-tige stérile. S'assurer qu'elle couvre toute la superficie du crâne exposé et autour de la canule et des vis.
- Poursuivre l'application du ciment [pour former l'implant](#), en évitant de laisser des bulles d'air qui pourraient affaiblir la structure.
- Bloquer la canule avec une canule temporaire (*dummy*) lorsqu'elle n'est pas reliée à un système d'infusion (ex. : pompe osmotique).

Note : Il faut bloquer les canules doubles à l'aide d'un *dummy* double qui ne visse pas et le recouvrir d'un bouchon en plastique (*dust cap*).

## Implantation d'une électrode

- Insérer l'électrode avec l'appareil approprié selon le type d'électrode; vitesse recommandée : 1 mm/minute.
- Appliquer une mince couche assez liquide de ciment dentaire à l'aide d'une spatule ou d'un coton-tige stérile. S'assurer qu'elle couvre toute la superficie du crâne exposé et autour de l'électrode et des vis.
- Poursuivre l'application du ciment [pour former l'implant](#), en évitant de laisser des bulles d'air qui pourraient affaiblir la structure.

### Implantation d'une fibre optique

- Insérer la fibre optique avec l'appareil approprié; vitesse recommandée : 1 mm/minute.
- Appliquer une mince couche assez liquide de ciment dentaire à l'aide d'une spatule ou d'un coton-tige stérile. S'assurer qu'elle couvre toute la superficie du crâne exposé et autour de la fibre optique et des vis.
- Poursuivre l'application du ciment pour former l'implant, en dégageant suffisamment de la fibre optique pour assurer une bonne connexion et en évitant de laisser des bulles d'air qui pourraient affaiblir la structure.

### Installation d'une fenêtre crânienne SANS craniotomie

Note : Plutôt qu'effectuer une incision droite, un cercle de peau est retiré à l'aide d'un ciseau iris à l'endroit où la fenêtre sera posée. La préparation du crâne est identique à celle décrise précédemment. Les vis d'ancrage ne sont pas requises pour cette procédure.

- Appliquer du Metabond® transparent sur le crâne afin de recouvrir toute la surface osseuse exposée et s'assurer qu'il n'y a pas de bulles d'air.
- Déposer la fenêtre à l'endroit prévu avant que le ciment ne se solidifie (< 1 min) en s'assurant de ne pas créer de bulles d'air qui pourraient nuire à l'imagerie et à la solidité de l'implant.
- Appliquer le ciment dentaire autour de la fenêtre en plusieurs couches afin de former un petit rebord, en évitant de laisser des bulles d'air qui pourraient affaiblir la structure. Modeler à l'aide d'un bâton de bois afin de lisser le côté extérieur en contact avec la peau.

### Installation d'une fenêtre crânienne AVEC craniotomie

Note : Plutôt qu'effectuer une incision droite, un cercle de peau est retiré à l'aide d'un ciseau iris à l'endroit où la fenêtre sera posée. La préparation du crâne est identique à celle décrise précédemment. Les vis d'ancrage ne sont pas requises pour cette procédure.

- À l'aide d'un porte-aiguille, placer la mèche stérile dans la perceuse.
- Délimiter le pourtour de la craniotomie à l'aide de la perceuse en mettant peu de pression.
- Laver la surface osseuse avec de la saline ou du LRS et l'essuyer avec un coton-tige.
- Répéter les deux étapes précédentes jusqu'à ce que le fragment d'os soit mobile.
- Retirer délicatement le fragment à l'aide d'une pince en faisant attention de ne pas percer accidentellement la dure-mère.
- Utiliser des cotons-tiges et du LRS pour arrêter les saignements. Au besoin, appliquer un gel hémostatique (ex. Gelfoam®).
- Au besoin, retirer les débris osseux de la craniotomie à l'aide de pinces et/ou de cotons-tiges imbibés de saline ou de LRS et assécher le crâne avec un coton-tige.

- Placer la fenêtre sur le crâne pour boucher l'ouverture.
- Appliquer de la colle à tissu sur le crâne afin de recouvrir toute la surface osseuse exposée et laisser sécher.
- Appliquer le ciment dentaire autour de la fenêtre en plusieurs couches afin de former un petit rebord, en évitant de laisser des bulles d'air qui pourraient affaiblir la structure. Modeler à l'aide d'un bâton de bois afin de lisser le côté extérieur en contact avec la peau.

### Installation d'un ancrage fixe

- S'assurer de respecter les directives du fabricant, le cas échéant, et d'installer les vis d'ancrage aux bons endroits selon le modèle de l'implant.
- Descendre la plaque ou la tige de fixation à l'angle voulu sur la surface du crâne.
- Fixer la plaque ou la tige aux vis d'ancrage installées précédemment et au crâne en appliquant une mince couche de ciment dentaire assez liquide à l'aide d'une spatule ou d'un coton-tige stérile. S'assurer qu'elle couvre toute la superficie du crâne exposé et autour de l'implant et des vis.
- Poursuivre l'application du ciment pour former l'implant, en évitant de laisser des bulles d'air qui pourraient affaiblir la structure.

### **Modelage du ciment**

- Au besoin, remettre de l'onguent ophtalmique afin de protéger les yeux.
- Appliquer le ciment dentaire en minces couches pour prévenir des dommages thermiques au cerveau, au crâne et aux tissus environnants (le ciment dentaire dégage de la chaleur en se solidifiant). Attendre que le ciment soit complètement sec avant d'appliquer la couche suivante.

Note : Généralement, 3 couches de ciment sont requises, la première très mince et liquide puis les couches suivantes de plus en plus consistantes. Si des écarteurs sont utilisés, les retirer immédiatement après l'application de la 2<sup>e</sup> couche (avant que le ciment n'ait durci).

Deux techniques de modelage de la dernière couche de ciment peuvent être utilisées, soit par-dessus la peau ou monticule. Le site, le type d'implant et l'expérience du chirurgien peuvent influencer le choix de la technique.

- Faire très attention pour ne pas bouger la structure implantée pendant l'application, ou encore l'abîmer (ex. verser du ciment dans une canule).
- Au besoin, couper ou polir les bordures du ciment en contact avec la peau (les bordures doivent être lisses).
- Si l'incision était trop grande, suturer les extrémités rostrale et/ou caudale au besoin en installant un champ stérile tout autour afin de ne pas contaminer les sutures. Prendre soin de faire une incision plus petite lors de la prochaine chirurgie.

## Période postopératoire

- Avant que l'animal ne se réveille, couper la pointe des griffes des membres postérieurs avec un petit ciseau ou coupe-griffe.
- Si la chirurgie impliquait la pose d'un implant, reprendre le poids de l'animal et l'inscrire sur le carton de suivi postopératoire de la DSV à l'endroit indiqué (voir l'annexe 1 de la PNF C-1 Chirurgie aseptique chez les rongeurs).
- Suivre la procédure décrite dans la PNF C-1.
- Une fois l'animal éveillé, vérifier la présence du réflexe palpébral (clignement des paupières lorsque le coin de l'œil est délicatement touché avec un coton-tige). Si le réflexe est absent, appliquer un onguent ophtalmique trois fois par jour jusqu'à ce que le réflexe revienne.
- Pour les animaux ayant un implant, privilégier un type de cage avec grillage de métal plus haut afin de prévenir les blessures avec l'implant.
- Poursuivre l'analgésie postopératoire selon le protocole.
- Pour les animaux ayant un implant ou une fenêtre, mettre un carton de suivi d'implant stéréotaxique sur la cage et couper les griffes une fois par semaine.

## Références

Gardiner TM, Toth LA, *Stereotactic Surgery and Long-Term Maintenance of Cranial Implants in Research Animals*, 1999.

Fujita Y, Doi K, Harada D, Kamikawa S, *Modulation of physiological hemostasis by irrigation solution: comparison of various irrigation solutions using a mouse brain surface bleeding model*, J Neurosurg, 112(4):824-8, 2010.

McGill University, *SOP - Rodent Stereotaxic Surgery*, 2008.

Silasi G, Xiao D, Vanni MP, Chen ACN, Murphy TH, *Intact skull chronic windows for mesoscopic wide-field imaging in awake mice*, J Neurosci Methods. 2016; 267: 141–149.

University of British Columbia, *SOP - Aseptic Stereotaxic Surgery of the Rat*, 2012.

Ung K, Arenkiel BR, *Fiber-optic Implantation for Chronic Optogenetic Stimulation of Brain Tissue*, J. Vis. Exp. 2012.

U.S. Food and Drug Administration, FDA-Cleared Sterilants and High Level Disinfectants with General Claims for Processing Reusable Medical and Dental Devices, <https://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/ReprocessingofReusableMedicalDevices/ucm437347.htm>, page consultée en avril 2019.

Mises à jour de la PNF		
Version 2	31 août 2015	Clarifications du temps de trempage des instruments et du matériel.
Version 3	21 avril 2020	<p>Ajouts aux généralités.</p> <p>Clarification des méthodes de stérilisation par immersion pour les implants.</p> <p>Ajout de nombreuses précisions dans les procédures.</p> <p>Ajout de la pose d'électrode, de fibre optique, de fenêtre crânienne et d'un ancrage fixe.</p> <p>Précision des techniques de modelage du ciment.</p> <p>Ajout d'une prise de poids postopératoire lors de pose d'implant.</p> <p>Ajout du carton de suivi d'implant stéréotaxique.</p>