



Enregistré auprès du Comité National de Réflexion
Éthique sur l'Expérimentation Animale
Sous le numéro 54

Mont-Saint-Aignan, le 15 mars 2013

Monsieur Guillaume Gourcerol / St DERRÉY
Inserm U1073
U.F.R. Médecine et Pharmacie
22 boulevard Gambetta
76183 Rouen Cedex 1

Dossier suivi par Laurence Mateo
02 35 14 67 43
laurence.mateo@univ-rouen.fr

Monsieur,

Votre saisine « Modulation de la viscérosensibilité colique chez le rat par la stimulation électrique du système nerveux central : cartographie des structures corticales et sous corticales impliquées et études des réseaux neuronaux empruntés » enregistrée le 29 janvier 2013 sous le numéro CENOMEXA 0113-02 déposée devant le comité d'éthique a été examinée.

Après analyse :

- Votre demande a reçu un avis favorable et a le numéro d'agrément N/02-01-13/02/01-16 :
- Sans observation.
 - Avec observations pour toute soumission future (voir rapports en annexe).

Votre demande ne peut pas recevoir, pour le moment, un avis favorable mais nous vous suggérons de refaire une demande en tenant compte :

- Des observations de l'annexe 1.
- Des commentaires des rapporteurs, ci-joint.

Veuillez agréer, Monsieur, l'expression de mes sincères salutations.

Le Président du comité régional d'éthique
en expérimentation animale Normandie


Hubert Vaudry

N.B : Il est souhaitable de resoumettre un protocole type tous les 3 ans (dans le cas présent avant janvier 2016).

**Comité d'Ethique Normandie
en Matière d'Expérimentation Animale**



*Enregistré auprès du Comité National de Réflexion
Ethique sur l'Expérimentation Animale
Sous le numéro 54*

Mont-Saint-Aignan, March 15 2013

Monsieur Guillaume Gourcerol
Inserm U1073
U.F.R. Médecine et Pharmacie
22 boulevard Gambetta
76183 Rouen Cedex 1

*Dossier suivi par Laurence Matéo
02 35 14 67 43
laurence.mateo@univ-rouen.fr*

Dear Sir,

Your application entitled «*Modulation of Rat visceral sensitivity by central nervous system electrical stimulation*» was received on January 29, 2013, registered as CENOMEXA 0113-02 and examined by the Regional Ethical Committee.

After due deliberation:

Your request was favorably received and now has been approved with the following number N/02-01-13/02/01-16:

- Without further comments.
- With the annexed remarks which should be taken into consideration for future applications (see attached reports).

The committee was unable to receive favorably your application in its present form but suggests that it be resubmitted with the following modifications :

- The annexed remarks.
- The specific comments of the referees.

Yours faithfully,


Hubert Vaudry, *Président*

N.B: For protocols that continue for more than 3 years it is recommended to resubmit an application to the Ethical Committee (before January 2016).

*Président : Hubert VAUDRY
INSERM U982
Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine
Laboratoire International Associé Samuel de Champlain
Plate-Forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute-Normandie (PRIMACEN)
Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB)
Université de Rouen
76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France
Tél. . 02-35-14-66-24 - Fax : 02-35-14-69-46 - e-mail : hubert.vaudry@univ-rouen.fr*

Rapport d'expertise : CENOMEXA 0113-02

Titre du protocole : Modulation de la viscérosensibilité colique chez le rat par la stimulation électrique du système nerveux central : cartographie des structures corticales et sous corticales impliquées et des réseaux neuronaux empruntés.

Demandeur : GOURCEROL Guillaume

Rapport n° 1

Après examen de l'ensemble de la saisine déposée, plusieurs points sont à préciser:

Nous remercions le rapporteur d'avoir attiré notre attention sur ces différents points et nous apportons ci-après les révisions et réponses aux questions posées

I/ L'autorisation du demandeur n'est pas valable dans l'établissement concerné par le protocole.

Chaque autorisation d'expérimenter est attribuée au titre d'un établissement, vous devez donc modifier votre demande et préciser le nouvel établissement où vous effectuez vos expérimentations. Toutefois, si vous avez toujours une activité d'expérimentation animale dans un établissement agréé à Lille, le préciser.

Réponse

Le demandeur (Guillaume Gourcerol) a reçu l'autorisation d'expérimenter sur animaux vivants. Le numéro d'agrément est : 76-119

Les travaux expérimentaux incluant des actes de chirurgie seront réalisés en collaboration avec le docteur Serguei Fetissov qui possède l'autorisation d'expérimenter sur vertébrés n° : 76-108 et le docteur Stéphane Derrey, neurochirurgien

II/ L'agrément des locaux d'expérimentation : A76 450 05 a été autorisé le 08 avril 2004 ce qui le rend caduque car un agrément n'est valable que pour une durée de 5 ans (fin d'agrément 2009). Veuillez donc vérifier si le numéro d'agrément est toujours valable et surtout indiquer sa date de validité.

Réponse

Effectivement depuis le 26/08/09, le numéro d'agrément des locaux d'expérimentation a changé. Il est maintenant le suivant : B76 450 05

III/ Le nombre d'animaux n'est pas justifié, merci d'indiquer la cohérence entre le nombre d'animaux estimé à 300 dans le chapitre « espèces animales qui seront utilisées » puis à 200 dans le chapitre « justifier le choix et le nombre d'animaux » sachant que lors de votre étude vous indiquez 120 animaux utilisés.

Doit-on en conclure que ce type de protocole entraîne une grosse mortalité ?

Réponse

Le nombre d'animaux nécessaire a été corrigé et harmonisé à l'ensemble du document. On estime que 345 animaux seront nécessaires soit 165 animaux pour la phase 1 et 180 pour la phase 2. Dans la première phase, nous testerons l'impact de la stimulation de 11 cibles intracérébrales différentes sur la variation de la pression artérielle en réponse à un stimulus

nociceptif (distension colo-rectale). Pour chaque cible, 15 animaux sont nécessaires. Le taux de réussite de la visée d'une cible intracérébrale chez un petit animal est d'environ 70%. Ainsi sur les 15 animaux par cible, les données de 10 rats devraient être exploitables. Selon ces données, 160 rats seront donc nécessaires pour la phase I.

Pour la seconde phase, nous partons du principe qu'environ la moitié des cibles seront intéressantes. Le choix et le nombre de cibles intracérébrales retenues dépendront des résultats de la phase I. Pour 6 cibles, le nombre d'animaux devra être de $(6 \times 15) \times 2$ soit 180 rats. En effet pour chaque cible, 2 groupes devront être analysés : l'un ayant reçu du salin ($6 \times 15 = 90$) en intravésical et l'autre de l'acide acétique ($6 \times 15 = 90$).

Le taux de mortalité au cours de la procédure est quasi nul. Le nombre d'animaux se justifie uniquement par le nombre de cible à étudier et la taux d'échec lors du positionnement d'une électrode intracérébrale (30%).

IV/ L'ensemble des techniques utilisées ne sont pas décrites comme l'instillation intravésicale d'acide acétique, la technique d'implantation d'électrode en condition stéréotaxique qui, je suppose, fait appel à un acte chirurgical, ce qui implique que l'expérimentateur soit vétérinaire ou chirurgien ou, si ce n'est pas le cas, ait reçu une formation en chirurgie en plus de la formation de niveau 1.

Comme demandé dans le document de saisine il serait bon que le demandeur complète la saisine par « un rapport donnant une vision explicite du projet »

Réponse

La mise en place des électrodes intracérébrale sera faite en conditions stéréotaxiques. La méthodologie a été précisée dans le document (page 3, ligne 19-23). Des précisions ont aussi été apportées pour l'instillation intra-vésicale d'acide acétique (page 3, dernier paragraphe). Les travaux expérimentaux incluant des actes de chirurgie seront réalisés en collaboration avec le docteur Sergueï Fetissov qui possède l'autorisation d'expérimenter sur vertébrés n° : 76-108 et le docteur Stéphane Derrey, neurochirurgien

VI/ Pouvez vous préciser le dosage de l'*Inactine* concernant l'anesthésie et l'euthanasie.

Réponse

*Les posologies d'*Inactine* ont été précisées dans le document (page 3)*

*Pour l'anesthésie (page 3, ligne 16-17), il s'agira d'une injection intrapéritonéale (ip) de Thiobutabarbital sodique (200mg/kg ip, *Inactin*[®], Sigma-Aldrich, France). Cet anesthésique a été choisi pour sa longue durée d'action qui est supérieure à 3 heures, et pour le peu d'effet des barbituriques sur la modification d'expression de la protéine c-fos.*

*Pour l'approfondissement de l'anesthésie (page 3, ligne 29-30) avant l'injection intracardiaque : il s'agira d'une injection intrapéritonéale (ip) de Thiobutabarbital sodique (800mg/kg ip, *Inactin*[®], Sigma-Aldrich, France)*

VI/ L'estimation de la douleur ne peut être établie.

Réponse

Les animaux seront traités en fonction des directives européennes datant de septembre 2010 et paru au journal officiel de l'union européenne.

Le niveau de souffrance des animaux dans ce projet de recherche est faible et peut selon l'échelle de gravité être classé « sans réanimation ». La totalité des manipulations seront faites sous anesthésie générale sans réveil (page L276/76 du JO de l'union Européenne)

Rapport n° 2

Nous remercions le rapporteur d'avoir attiré notre attention sur ces différents points et nous apportons ci-après les révisions et réponses aux questions posées

Le document soumis au CENOMEXA s'intitule « Modulation de la viscérosensibilité colique chez le rat par la stimulation électrique du système nerveux central : cartographie des structures corticales et sous-corticales impliquées et études des réseaux neuronaux empruntés ». Il a été déposé par le Pr Gourcerol du laboratoire INSERMN U1073 qui possède l'autorisation individuelle d'expérimenter N°I-59 Lille-F1-04. Les expérimentations sont prévues pour être réalisées dans le bâtiment possédant le numéro d'agrément A76 450 05.

Les expérimentations mentionnées sur le document concernent deux études visant à cartographier les structures cérébrales impliquées dans la viscéro-sensibilité colique chez l'animal sain puis chez l'animal présentant une hypersensibilité digestive.

Plusieurs éléments manquent au document et ne permettent pas de se faire une opinion en toute connaissance de cause :

- D'un point de vue scientifique, il semble que pour réaliser une cartographie, il faille principalement enregistrer les structures cérébrales afin de voir si ces structures répondent à une stimulation périphérique. Il est difficile de comprendre comment les auteurs vont réaliser une cartographie stricto sensu en effectuant des stimulations, à moins que le but soit de diminuer ou d'augmenter la sensation douloureuse, dans ce cas cela doit être mentionné plus clairement, à l'instar du titre.

Réponse

- *Effectivement le but de ce travail est d'étudier l'impact de la stimulation cérébrale (structure corticale et sous cortical) sur la mesure de la pression artérielle en réponse à un stimulus nociceptif : la distension colo-rectale. La méthodologie a été précisée dans le document (page 3).*

OK

- *La remarque du rapporteur est pertinente concernant le terme « cartographie ». Nous pourrions sans doute réellement parler de cartographie si nous enregistrions au niveau central l'impact d'une stimulation périphérique comme le rapporteur le souligne dans son argumentaire. Pour cette raison, le titre du projet a été modifié : et le nouveau titre pourrait être si le rapporteur l'accepte: » Modulation de la viscérosensibilité colique chez le rat par la stimulation électrique du système nerveux central »*

Il semble en effet que ce titre soit plus approprié.

- Aucune information, hormis les structures visées, n'est donnée concernant la procédure d'implantations des électrodes dans les structures cérébrales. De plus, on ne sait pas si cela sera fait dans la même journée, ou avant (et combien de temps avant ?) l'évaluation de la sensibilité viscérale.

Réponse

- *L'ensemble de la méthodologie expérimentale a été précisée dans le document (page 3 et 4). Toute la procédure sera faite sous anesthésie générale sans réveil de l'animal et en un seul temps. La procédure totale comprendra : l'implantation des électrodes en conditions stéréotaxiques, les 2 phases de distension colo-rectale (en ON et OFF stimulation), l'étude de l'impact de la stimulation sur la pression artérielle en réponse à la distension colo-rectale, l'injection intravésicale d'acide acétique si elle a lieu et la fixation et l'extraction des tissus (cerveau et moelle épinière sacrée) après l'euthanasie de l'animal.*

OK

On comprend difficilement l'obligation d'utiliser un animal par structure. En effet, il est possible d'implanter plusieurs électrodes par animal et cela permettrait de réduire de manière importante le nombre d'animaux utilisés. Concernant ce nombre, il est tout d'abord mentionné l'utilisation de 300 rats puis de 200 rats un peu plus loin. Ceci nécessite d'être clarifié.

Réponse

Nous remercions le rapporteur pour cette remarque dont l'objectif principal est de réduire le nombre d'animaux utilisé. Néanmoins pour s'affranchir d'un maximum de biais, il ne faut sans doute pas proposer de stimulation multi-site. En effet, la seule implantation d'une électrode dans une cible intracérébrale produit un effet lésionnel qui est bien connu et que nous avons rapporté (Maltête D, Derrey S, et al.

Microsubthalamotomy : an immediate predictor of longterm subthalamic stimulation efficacy in Parkinson disease. Mov Disord. 2008, May 15 ;23(7) :1047-50.

L'interprétation des résultats de la stimulation serait délicate dès lors qu'une cible a déjà été implantée.

Il faut donc s'en tenir à un animal par cible. En revanche, chaque animal étant son propre témoin, le nombre d'animaux à planter peut être réduit. Le nombre total d'animaux a été précisé et expliqué. On estime que 345 animaux seront nécessaires pour ce travail.

Bien que ce nombre soit très important, il a été justifié par les auteurs.

Point mineurs :

- *En théorie, la perfusion intracardiaque doit débiter sur un animal anesthésié mais dont le cœur bat encore, ainsi la phrase « ... une dose létale d'Inactine sera injectée à l'animal et les cerveaux seront prélevés après une fixation des tissus par une injection de paraformaldéhyde intracardiaque » devient inappropriée.*

Réponse

- *Effectivement, l'injection intracardiaque pour être plus efficace doit se faire cœur battant. Ainsi, l'anesthésie sera approfondie avant l'injection pour éviter la moindre souffrance à l'animal.*

OK

- *Quelles doses d'Inactine seront utilisées pour anesthésier l'animal, puis pour l'euthanasier ?*

Réponse

- Pour approfondir l'anesthésie, une dose de 800 mg/kg sera utilisée en intrapéritonéal.
OK
- Les auteurs parlent de 12 structures cérébrales implantées, je n'en dénombre que 10 ou 11.

Réponse

- En effet le chiffre exact de cibles à planter sera de 11 (pour la première phase) et on estime que 6 cibles (les plus pertinentes lors de la phase I) seront implantées pour la phase II.
OK

Les 11 cibles seront :

1. thalamus sensitif,
2. locus coeruleus,
3. amygdale temporale,
4. noyau sous-thalamique,
5. zona incerta.
6. Insula postérieure,
7. Cortex pariétal associatif
8. Cortex cingulaire antérieur
9. Cortex entorhinal,
10. hippocampe
11. Cortex préfrontal dorso-latéral

- Les auteurs mentionnent en début de paragraphe trois grandes étapes ; dans le projet, ils n'en détaillent que deux.

Réponse

- Nous remercions le rapporteur de souligner cette erreur. En effet, 2 grandes étapes ou phases se dégagent dans ce travail. Ces 2 étapes ont été plus clairement définies dans le document joint.

OK

- Harmoniser le titre en Anglais avec le titre en Français qui semble coupé en deux.

Réponse

Le titre a été harmonisé dans les 2 langues et devient :

Titre français : « Modulation de la viscérosensibilité colique chez le rat par la stimulation électrique du système nerveux central »

Titre anglais : "Modulation of Rat visceral sensitivity by central nervous system electrical stimulation".

OK