

Numéro d'agrément du laboratoire	
Numéro de projet de la commission d'éthique	2020-124
Titre scientifique du projet	
Titre non-technique du projet	Étude des cellules souches dans les gliomes pédiatriques de haut-grade
Date d'autorisation du projet par la commission d'éthique	30/11/2020
Durée du projet (date de début et de fin)	5 ans (30.11.2020 – 30.11.2025)
Le projet fera l'objet d'une analyse rétrospective (oui/non) et dans quel délai	Oui dans 5 ans ou plus tôt si demandé par la commission
Mots Clés (maximum 10 mots / 100 caractères)	Gliome, pédiatrique, récurrences, cellules souches cancéreuses, zone sous-ventriculaire, migration.
Objectif du projet	<p>Recherche fondamentale : oui/non</p> <p>Recherches translationnelle ou appliquée : oui/non</p> <p>Test réglementaire et production de routine : oui/non</p> <p>Protection de l'environnement naturel dans l'intérêt de la santé ou du bien-être de l'homme ou de l'animal : oui/non</p> <p>Conservation des espèces : oui/non</p> <p>Enseignement supérieur ou formation : oui/non</p> <p>Enquête médico-légale : oui/non</p> <p>Maintien de colonies d'animaux génétiquement modifiés, non utilisés dans d'autres expériences : oui/non</p> <p>Maintien de colonies d'animaux génétiquement modifiés, non utilisés dans d'autres expériences : oui/non</p>
Décrivez les objectifs du projet (par exemple, les inconnues scientifiques ou les nécessités scientifiques ou cliniques concernées) (1000 caractères maximum)	<p>L'existence de cellules souches cancéreuses (CSCs) a été démontrée dans le glioblastome chez l'adulte et, plus récemment, dans les gliomes de haut-grade (HGGs) de l'enfant. Chez l'adulte, les CSCs sont capables de former une tumeur après injection dans le striatum de souris, puis d'envahir la zone sous-ventriculaire (ZSV). La migration des CSCs adultes est dépendante de la sécrétion de CXCL12 par la ZSV, qui agit sur le récepteur CXCR4 exprimé par les CSCs. Une fois dans la ZSV, les CSCs échappent à l'intervention chirurgicale et deviennent résistantes aux traitements, ce qui suggère qu'elles pourraient contribuer aux récurrences tumorales. En nous basant sur nos données préliminaires ainsi que sur nos résultats et observations précédemment obtenus avec des CSCs adultes, nous avons pour objectif de déterminer si les CSCs pédiatriques participent également aux récurrences tumorales des HGGs pédiatriques et d'identifier les voies de signalisation impliquées dans cette migration vers la ZSV.</p>

Quels sont les avantages potentiels susceptibles de découler de ce projet (quelles avancées de la la science pourraient-elles être attendues ou comment les humains, les animaux ou les plantes pourraient-ils bénéficier du projet)? (1000 caractères maximum)	Notre laboratoire a été le premier à démontrer cet envahissement préférentiel de la ZSV par les CSCs chez l'adulte. Ces cellules à distance de la masse tumorale initiale sont donc potentiellement épargnées par la résection chirurgicale. De plus, nous avons également identifié les CSCs présentes dans la ZSV comme étant plus résistantes à la radiothérapie. Ces phénomènes de migration et les mécanismes de résistance restent peu ou pas étudiés pour les HGGs pédiatriques. Rappelons que chez l'enfant, il existe deux formes de gliomes de haut grade : les HGGs proprement dit et le les gliomes infiltrant du tronc ou DIPG et qui n'existent pas en tant que tel chez l'adulte. Mieux comprendre les mécanismes par lesquels les CSC migrent et échappent aux thérapies nous permettra par la suite de les cibler plus efficacement. Ceci a d'autant plus d'importance sachant que les cellules ayant migrés dans la ZSV sont les cellules potentiellement responsables des récurrences quasi systématiquement observées dans les cas de HGG pédiatriques.
Quelles sont les espèces animales qui seront utilisées ?	<ul style="list-style-type: none"> • Mus Musculus Domesticus, Swiss Nude Mice (Crl:NU(Ico)-Foxn1nu, strain 620)
Quel est le nombre maximal d'animaux ?	294 souris
Dans le contexte de ce qui est fait aux animaux, quels sont <u>les effets négatifs attendus</u> sur les animaux, <u>le niveau de gravité</u> probable ou attendu et <u>le sort</u> des animaux?	Les expériences consisteront à injecter une quantité définie de cellules de HGGs (ou DIPGs) pédiatriques dans le striatum droit (ou le tronc cérébrale) de souris. Les premières expériences vont nous permettre de déterminer le temps nécessaire pour que les cellules forment une tumeur et migrent dans la ZSV. En effet, la croissance tumorale et la migration cellulaire varient selon le type cellulaire. Après ces temps respectifs, les souris seront sacrifiées. Parmi les effets négatifs que nous avons notés pour le GBM adulte lors de nos expériences précédentes, nous observons que lorsque la tumeur atteint une taille significative, ceci peut engendrer une augmentation de la pression intracrânienne. Dans ce cas, nous observons une diminution nette de l'activité motrice des souris qui restent alors prostrées dans un coin de la cage, tandis qu'on observe une augmentation de leur rythme respiratoire. Ceci s'accompagne aussi d'une perte de poids. Les souris seront monitorées de près et euthanasiées dès que l'on note une perte de poids rapide allant jusqu'à 20% ou qu'elles montrent des signes d'hypertension intracrânienne.
Application des 3Rs	
1. Remplacement (1000 caractères maximum)	Nous allons utiliser les études <i>in vitro</i> tant que possible avant de poursuivre nos expériences <i>in vivo</i> . De plus, si possible, nous allons utiliser des tests clonogéniques et des cultures 3D (en sphères) pour obtenir des informations dans un modèle plus proche de l' <i>in vivo</i> sans utiliser d'animaux.

Indiquez pourquoi des animaux doivent être utilisés et pourquoi des alternatives n'utilisant pas d'animaux ne peuvent être utilisées	Dans un premier temps, les CSCs pédiatriques seront caractérisées <i>in vitro</i> en culture cellulaire et nous réaliserons des tests fonctionnels <i>in vitro</i> pour confirmer leur caractère souche. Cependant, certains tests fonctionnels ne peuvent être réalisés que dans un modèle <i>in vivo</i> . En effet, la capacité des cellules à former une tumeur en présence d'un micro-environnement présent dans le tissu cérébral et la capacité de migration des CSCs dans une zone neurogénique spécifique ne peuvent être réalisés que dans un modèle <i>in vivo</i> de greffe orthotopique. Notons que plusieurs des phénomènes que nous souhaitons étudier peuvent être évalués chez les mêmes individus, ce qui réduit le nombre d'animaux nécessaires. Enfin, aucun marqueur de cellules initiatrices de GBM n'est actuellement connu, tant chez l'adulte que chez l'enfant. La seule et unique façon de confirmer l'identité d'une CSCs est d'étudier sa capacité à former une tumeur une fois injectée dans le cerveau de souris.
2. Réduction (1000 caractères maximum) Expliquez comment l'utilisation d'un nombre minimum d'animaux est garantie	Pour chaque expérience nous avons eu recours à des méthodes statistiques, tel que l'utilisation de G-power, afin de calculer un nombre précis d'animaux nécessaires, nous permettant de répondre aux différentes questions de notre projet. De plus, comme expliqué ci-dessus, nous planifions d'obtenir un maximum d'informations à partir des mêmes individus pour réduire un maximum le nombre d'animaux nécessaires pour notre étude. Finalement, notre laboratoire travaille avec ce modèle depuis plus de 10 ans. Notre équipe a donc l'expertise requise pour que ces expériences soient réalisées soigneusement, avec un minimum de perte d'animaux durant les interventions chirurgicales et une utilisation optimale des échantillons qui seront prélevés chez les animaux de nos expériences.
3. Raffinement (1000 caractères maximum) Expliquez le choix des espèces animales et pourquoi le(s) modèle(s) animal(aux) utilisé(s) sont les plus raffinés, eu égard aux objectifs scientifiques	Le modèle de greffe de GBM utilisé dans nos expériences <i>in vivo</i> a été développé et utilisé par notre équipe depuis près de 10 ans. Dans le cadre de ce dossier, nous utiliserons une seule espèce : les souris <i>Nude Crl:NU(lco)-Foxn1nu</i> . L'utilisation de cellules humaines de HGG pédiatriques et surtout de lignées primaires, plutôt que de cellules murines, nous permet d'être plus proches de la réalité. Par contre, cette approche nécessite l'utilisation de souris <i>Nude</i> , c'est-à-dire qui ne possèdent pas de système immunitaire entièrement fonctionnel pour ne pas provoquer de rejet de la greffe.
Expliquez les mesures qui seront prises pour minimiser les effets négatifs sur le bien-être des animaux (douleur, souffrance, inconfort ou dommages permanents).	Les animaux seront anesthésiés selon les normes recommandées (10/80 mg/Kg de Xylazine/Kétamine). De plus, nous prenons bien soin de monitorer les animaux avant l'intervention, pour être certain qu'ils sont bien endormis mais surtout qu'ils ne perçoivent plus la douleur. Ceci est vérifié en observant les réflexes suite au pincement des pattes arrières. Dès que l'animal est endormi, une crème ophtalmique (Fucithalmique) est appliquée pour protéger leurs yeux d'un éventuel assèchement. De plus, nous nous assurons que les souris maintiennent leur température corporelle en utilisant des coussins chauffants et des lampes chauffantes. Le poids des souris est monitoré et la perte de 20% du poids initial ainsi que l'observation du comportement sont des points limites qui nous indiquent si une souris doit être euthanasiée.