



HAL
open science

Development and validation of a cellular model to study the 18FES efficiency in PET imaging: application to ER mutated breast cancer

Chloé Jean, Alicia Chateau, Lucille Cartier, Stéphane Potteaux, Christian Garbar, Hélène Dumond, Yacine Merrouche, Sophie Pinel, Nicolas Etique, Dimitri Papathanassiou, et al.

► To cite this version:

Chloé Jean, Alicia Chateau, Lucille Cartier, Stéphane Potteaux, Christian Garbar, et al.. Development and validation of a cellular model to study the 18FES efficiency in PET imaging: application to ER mutated breast cancer. Journee Remoise des Jeunes Chercheurs en Sante, JRJCS 2023, Oct 2023, Reims, France. <hal-04242346>

HAL Id: hal-04242346

<https://hal.science/hal-04242346v1>

Submitted on 20 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Développement et validation d'un modèle cellulaire pour l'étude de la performance du 18FES en imagerie TEP: Application aux cancers mammaires ER mutés

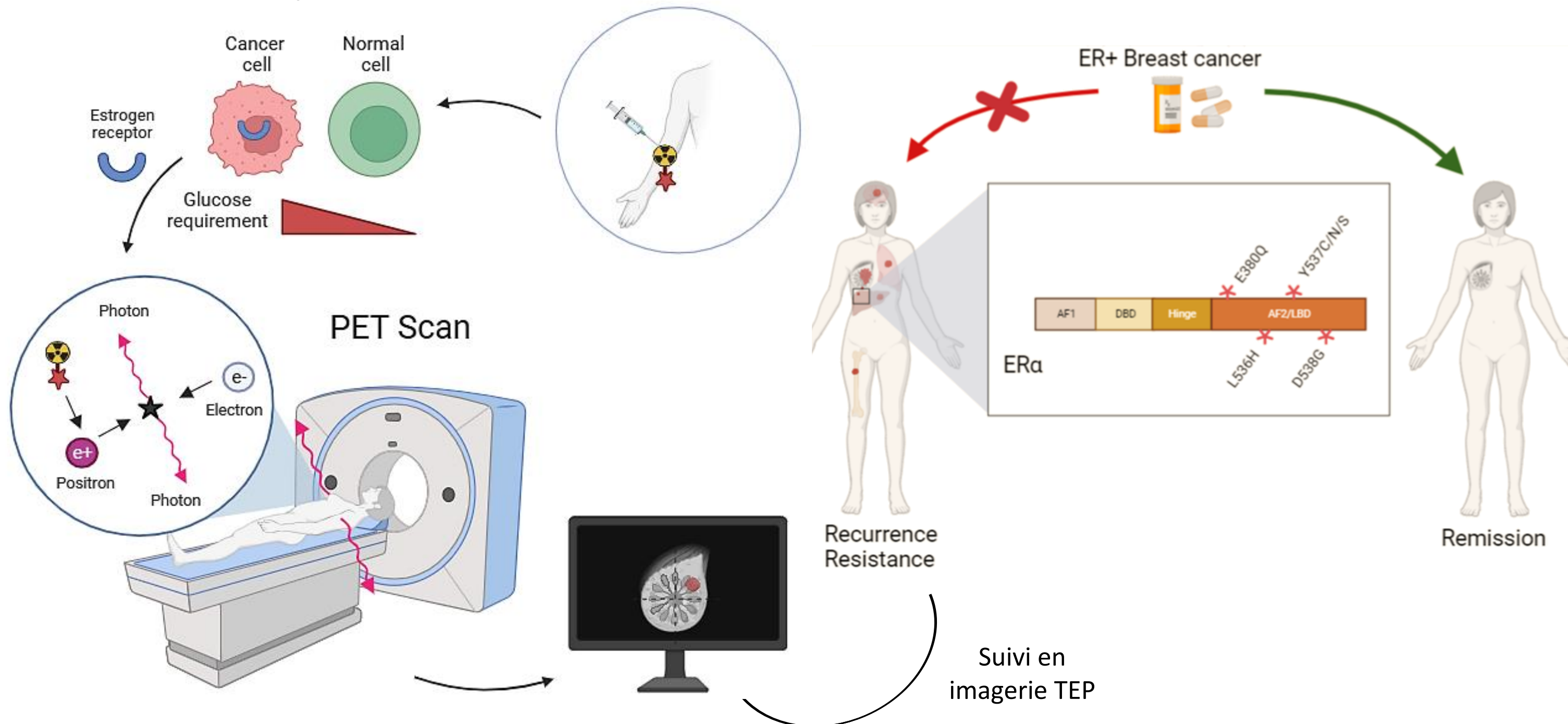
JEAN Chloé^{1,3}, CHATEAU Alicia⁵, CARTIER Lucille², POTTEAUX Stéphane^{2,4}, GARBAR Christian⁴, DUMOND Hélène⁵, MERROUCHE Yacine^{2,4}, PINEL Sophie⁵, ETIQUÉ Nicolas^{1*}, PAPATHANASSIOU Dimitri^{3*}, DEYV Jérôme^{1*}

1 - MEDyC CNRS UMR 7369, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, Reims, France 2 - EA7509, IRMAIC UFR de Pharmacie, Pôle Santé, Reims, France 3 - EA 3804, CRESTIC, Centre de Recherche en STIC, Reims, France 4 - Département de Recherche, Institut Godinot, Reims, France 5 - UMR 7039, Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), Nancy, France * supervision égale de ce travail



1 CONTEXTE

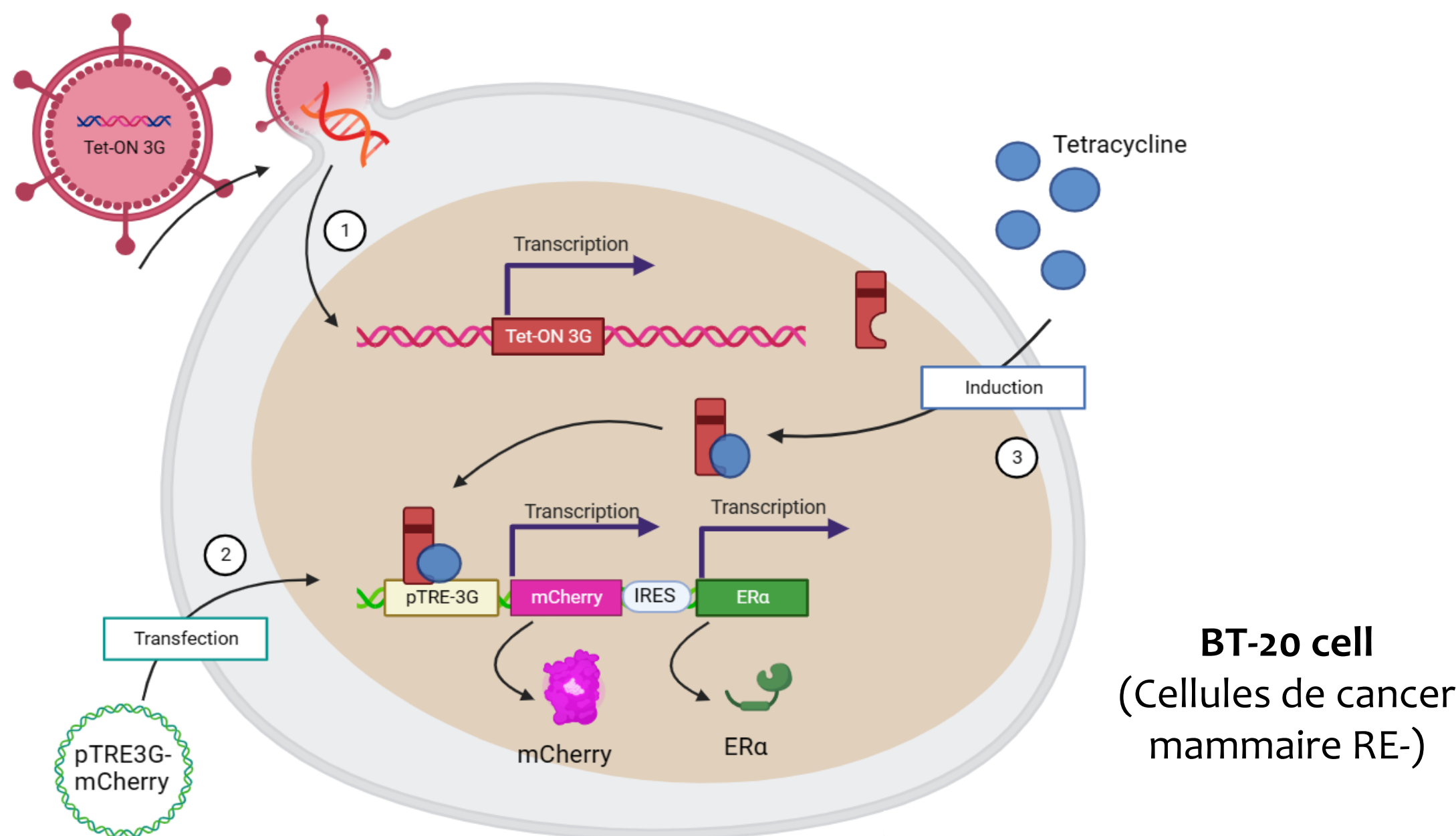
Le cancer du sein est le plus fréquent dans le monde et le plus mortel chez la femme en France. Le sous-type RE+ (Récepteur aux œstrogènes +) concerne 70% des cas de cancers mammaires et est associé avec le meilleur taux de survie à 5 ans. Cependant, lors d'une récurrence, ce taux chute (9 mois à 3 ans), et les cellules tumorales développent des mutations (10 à 50% des cas) conduisant à l'activation constitutive du récepteur aux œstrogènes alpha. La tomographie par émission de positrons (TEP) est largement utilisée pour le diagnostic et le suivi de la réponse au traitement. Le 18-fluorodéoxyglucose (18FDG) est un traceur analogue du glucose couramment utilisé lors de la détection de tumeur, mais incapable de rendre compte de son statut RE. L'utilisation du 18-fluoroœstrogène (18FES), un traceur analogue de l'œstrogène permettrait de solutionner ce problème ainsi que d'adapter la stratégie thérapeutique de la patiente. Néanmoins, sa capacité à se fixer aux mutants du RE reste non élucidée.



But: Etudier la capacité du 18FES à se lier aux différents mutant du RE (E380Q, L536H, Y537C/N/S et D538G) afin de préciser son utilisation dans le diagnostic et le suivi des cancers mammaires RE+.

2 MODELE

1. **Transduction** d'un vecteur (Tet-ON 3G) permettant l'expression stable de la protéine transactivateur Tet-ON 3G.
2. **Transfection stable** d'un vecteur (pTRE3G-mCherry) permettant l'expression du REα sauvage (WT) ou muté et codant pour une protéine rapporteuse fluorescente (mCherry).
3. **Induction** du système par ajout de tétracycline (ou doxycycline), qui en se liant sur la protéine Tet-ON 3G va activer la transcription des gènes codant pour les protéines d'intérêt (REα et mCherry).



3 RESULTATS

Figure 1 : Étude du caractère inductible de l'expression des variants du RE par RT-qPCR.

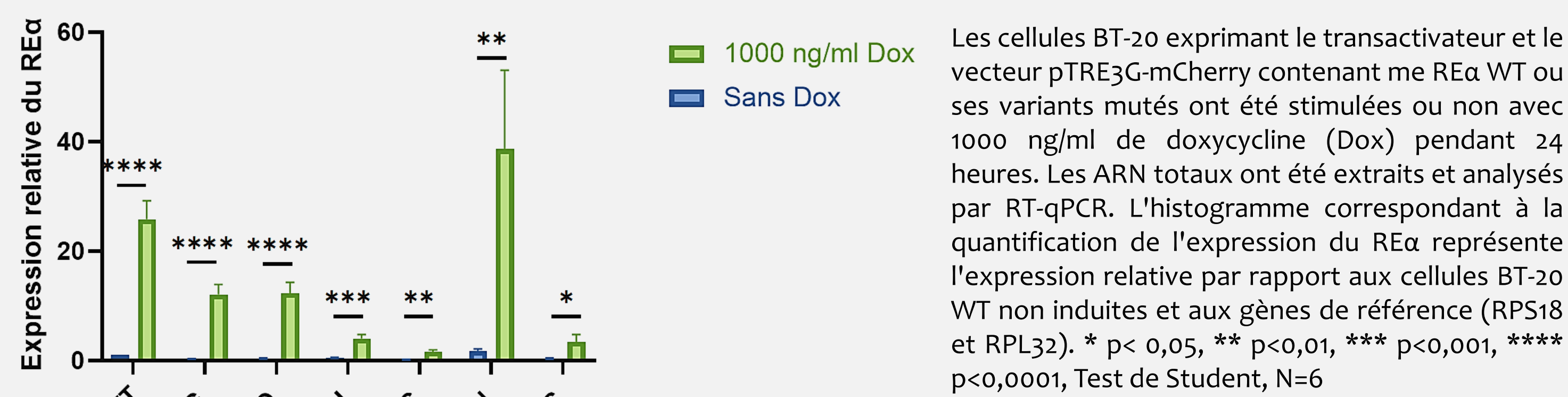


Figure 2 : Étude du caractère inductible de l'expression des variants du RE par immunoempreinte.

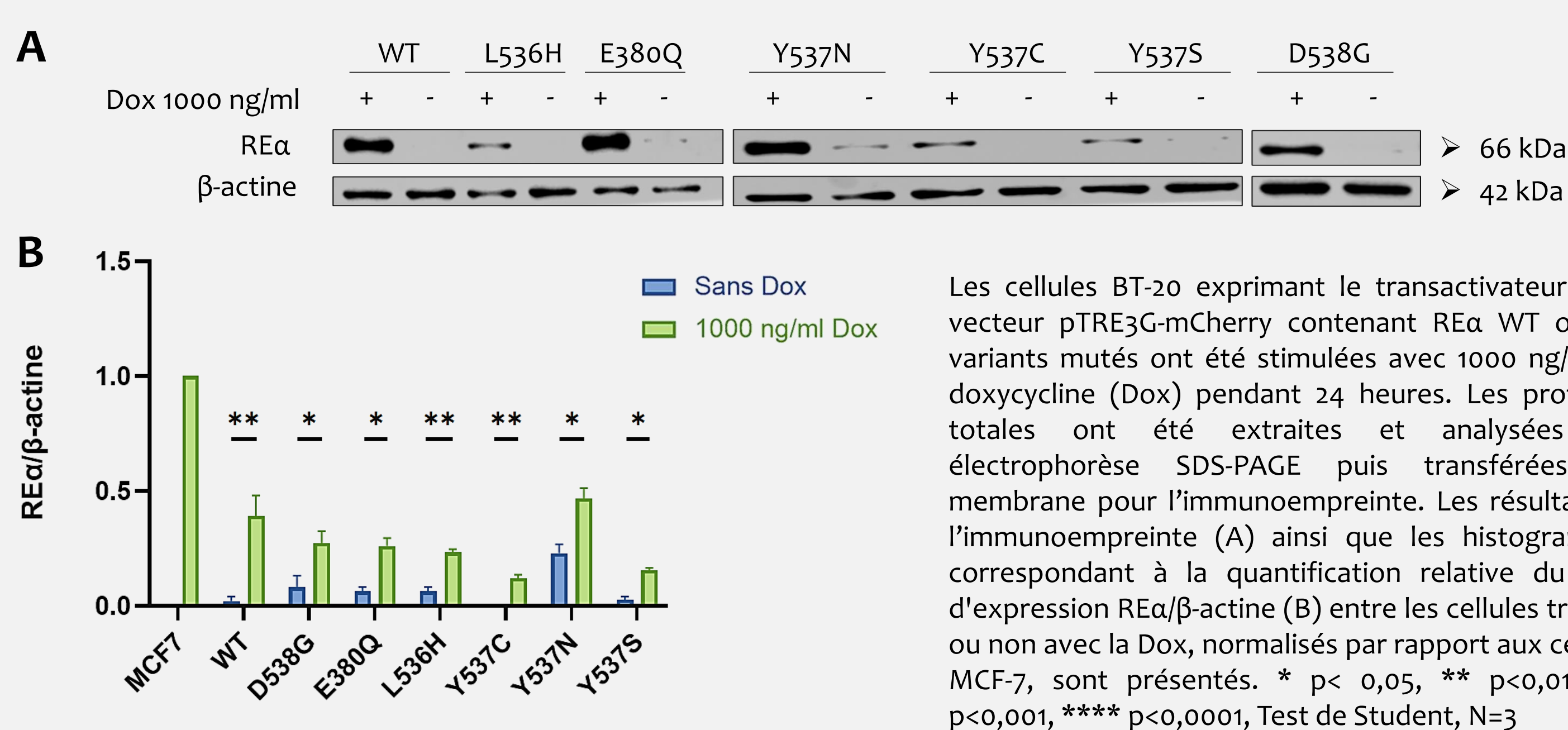
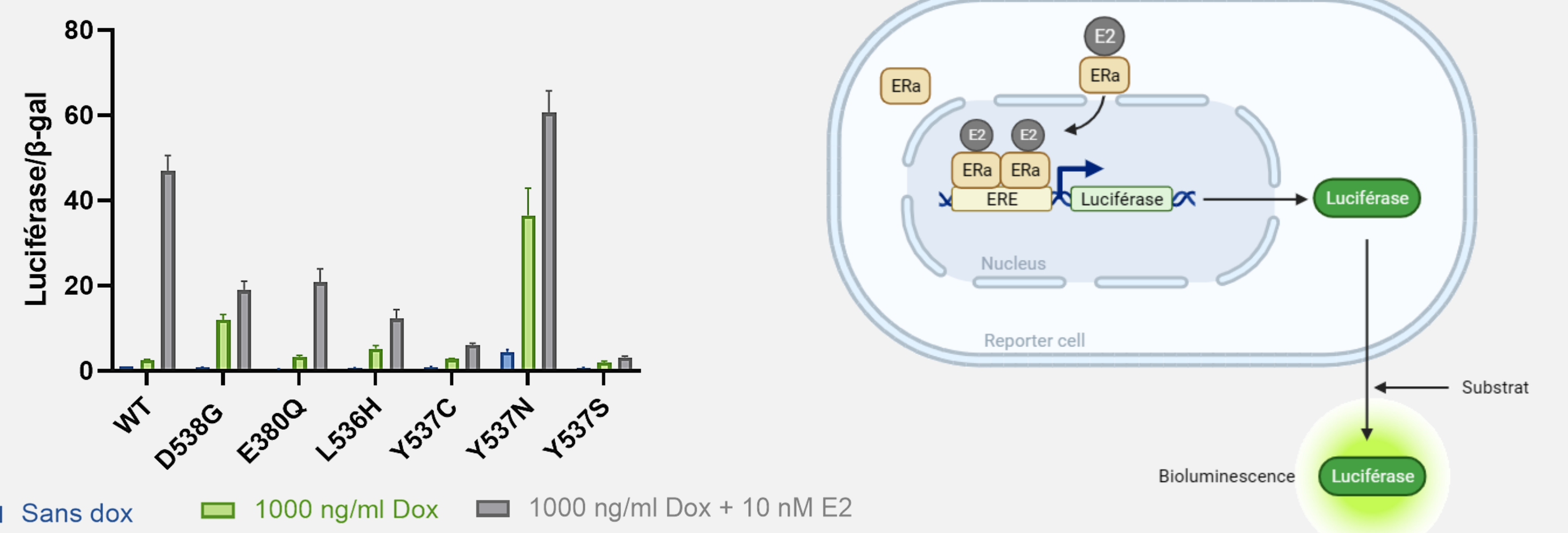
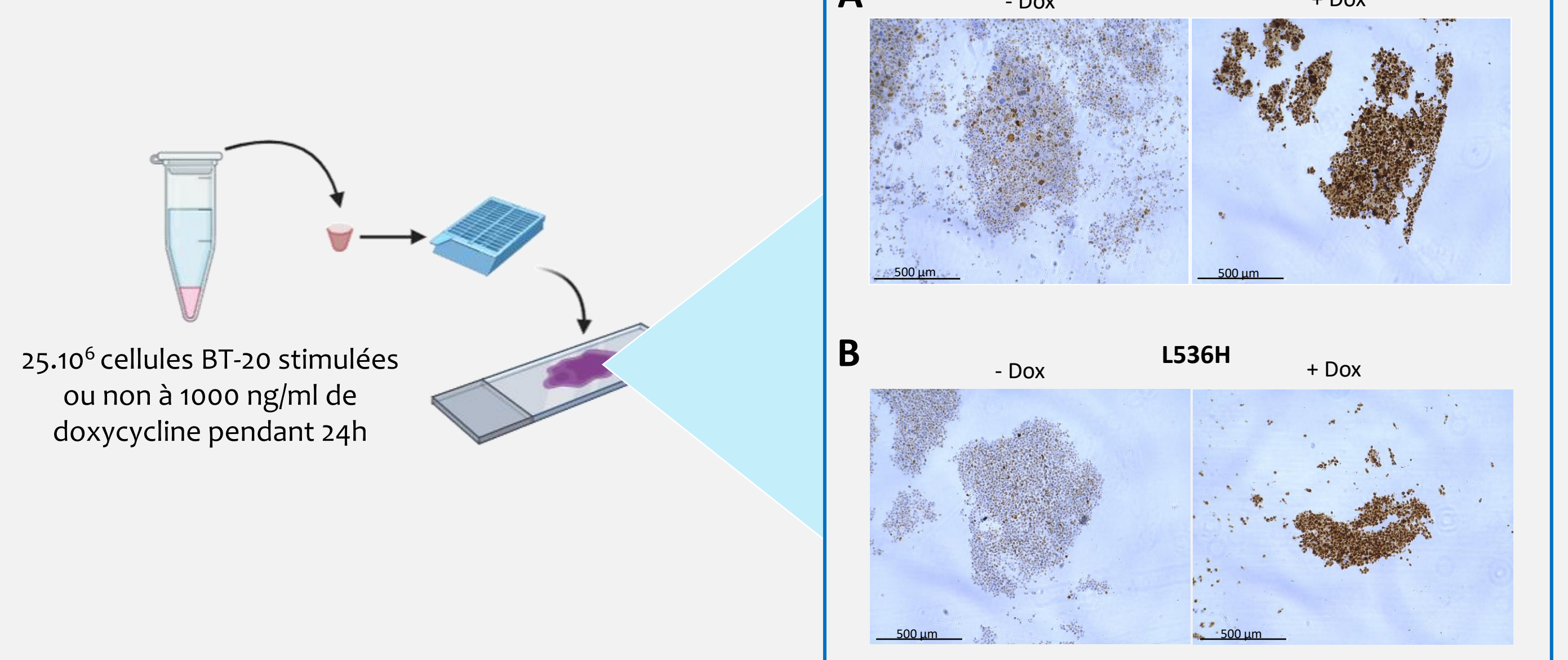


Figure 3 : Étude de la fonctionnalité des variants des récepteurs aux œstrogènes à l'aide d'un système de gène rapporteur.



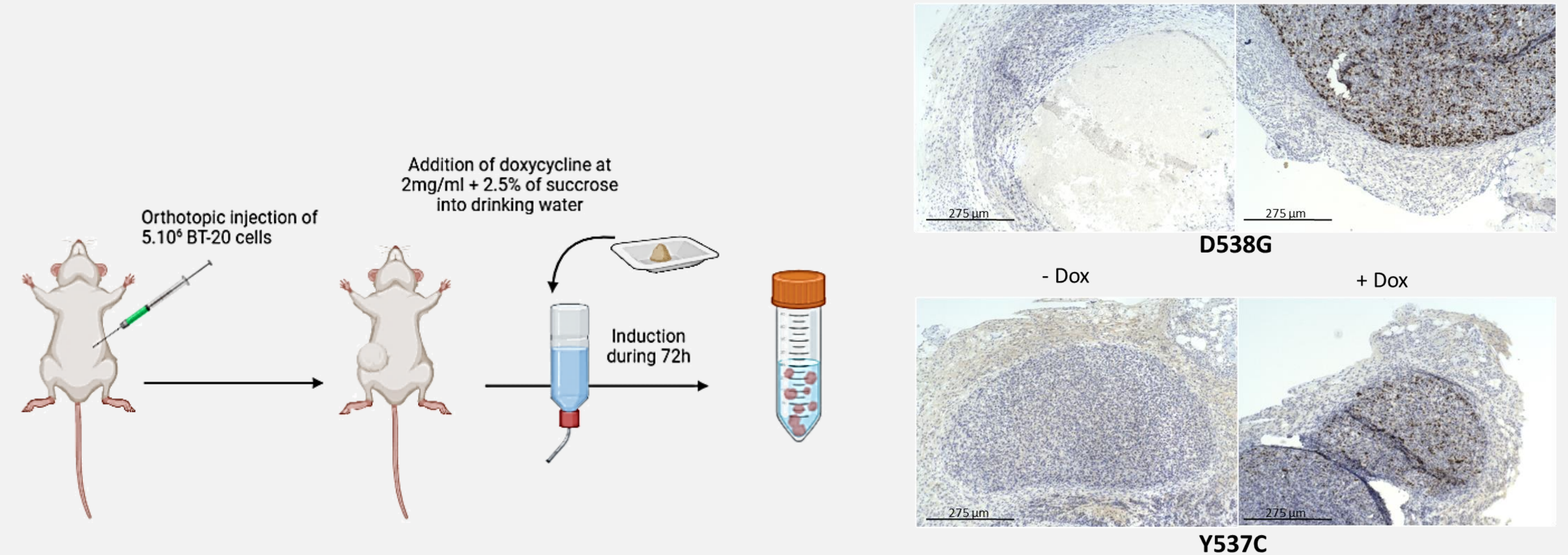
Les cellules BT-20 exprimant le transactivateur et le vecteur pTRE3G-mCherry contenant REα WT ou ses variants mutés ont été co-transfectées avec un plasmide contenant un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) en amont d'un gène codant pour une luciférase et un plasmide contenant le gène de la bêta-galactosidase. Les cellules ont été stimulées ou non avec 1000 ng/ml de doxycycline (Dox) pendant 24 heures et de l'œstrogène (10 nM) pendant 12 heures. Les protéines totales ont été extraites et mises en contact avec le substrat de la luciférase et de la bêta-galactosidase. La bioluminescence produite par la luciférase a été mesurée et normalisée par rapport à l'activité de la bêta-galactosidase, dont l'absorbance est mesurée à 420 nm. L'histogramme présente l'activité de la luciférase normalisée par rapport à l'activité de la bêta-galactosidase et par rapport à la lignée BT-20 WT non induites. N=2

Figure 4 : Etude du caractère inductible de l'expression du variant L536H du REα par immunohistochimie.



Des cellules BT-20 exprimant le transactivateur et le vecteur pTRE3G-mCherry contenant le REα WT ou le variant muté L536H ont été stimulées ou non par 1000 ng/ml de doxycycline pendant 24h. Les cellules ont ensuite été récupérées et centrifugées, puis les culots cellulaires ont été fixés avec du paraformaldéhyde 4% pendant 48h. Un immunomarquage anti-REα suivi d'une contre coloration HES a été effectuée (Dako Omnis Agilent). Les cellules exprimant le REα WT (A) et L536H (B) ont été observées et photographiées au microscope (Evos Thermofisher FI Auto 2).

Figure 5 : Etude du caractère inductible de l'expression des variants de l'ERα in vivo par immunohistochimie.



5 millions de cellules BT-20 exprimant le transactivateur et le vecteur pTRE3G-mCherry contenant l'ERα WT ou ses variants mutés ont été injectées de façon orthotopique dans le coussinet graisseux de souris SCID BALB/c (A). Après 15 jours de croissance tumorale, les cellules ont été stimulées par l'ajout de 2 mg/ml de doxycycline + 2.5% de sucrose dans l'eau de boissons des souris. Après 72h de stimulation, les souris sont euthanasiées et les tumeurs récupérées puis fixées dans du formol pendant 48h. Un immunomarquage anti-ERα suivi d'une contre coloration HES a été effectuée (Dako Omnis Agilent). Les tumeurs exprimant le REα D538G (B) et Y537C (C) ont été observées et photographiées au microscope (Evos Thermofisher FI Auto 2).

4 CONCLUSION

Nous avons démontré le caractère inductible de notre système Tet-ON avec 1000 ng/ml de doxycycline. Les tests initiaux ont validé l'expression inductible des variants d'ERα en utilisant la qPCR et le Western Blot. La fonctionnalité de notre protéine d'intérêt a été confirmée en utilisant une technique de gène rapporteur. Les expériences d'immunohistochimie sur culot cellulaire ont confirmé l'inductibilité du modèle et la localisation nucléaire du REα. Nous avons ensuite testé notre modèle in vivo avec divers variants en utilisant 2 mg/ml de doxycycline dans l'eau de boisson des souris pendant 72 heures. L'ensemble de ces données valident notre modèle, permettant son utilisation pour l'étude de l'affinité du 18FES pour les variants du RE en imagerie μTEP dans le cadre d'une collaboration avec Nancyclotep. Les résultats permettront de préciser l'intérêt du 18FES pour le diagnostic et le suivi thérapeutique des patientes atteintes de cancers hormonodépendants.

5 ET APRES?

