



HAL
open science

Mise au point d'un modèle pour l'étude du traceur 18-fluoro estradiol en imagerie μ TEP

Chloé Jean, Lucille Cartier, Christian Garbar, Clémence Fleury, Stéphane Potteaux, Maxence Mocquery Corre, Alicia Chateau, Nicolas Etique, Dimitri Papathanassiou, Jérôme Devy

► To cite this version:

Chloé Jean, Lucille Cartier, Christian Garbar, Clémence Fleury, Stéphane Potteaux, et al.. Mise au point d'un modèle pour l'étude du traceur 18-fluoro estradiol en imagerie μ TEP. Journée Rémoise des Jeunes Chercheurs en Santé (JRJCS), Oct 2022, Reims, France. hal-04755208

HAL Id: hal-04755208

<https://hal.science/hal-04755208v1>

Submitted on 27 Oct 2024

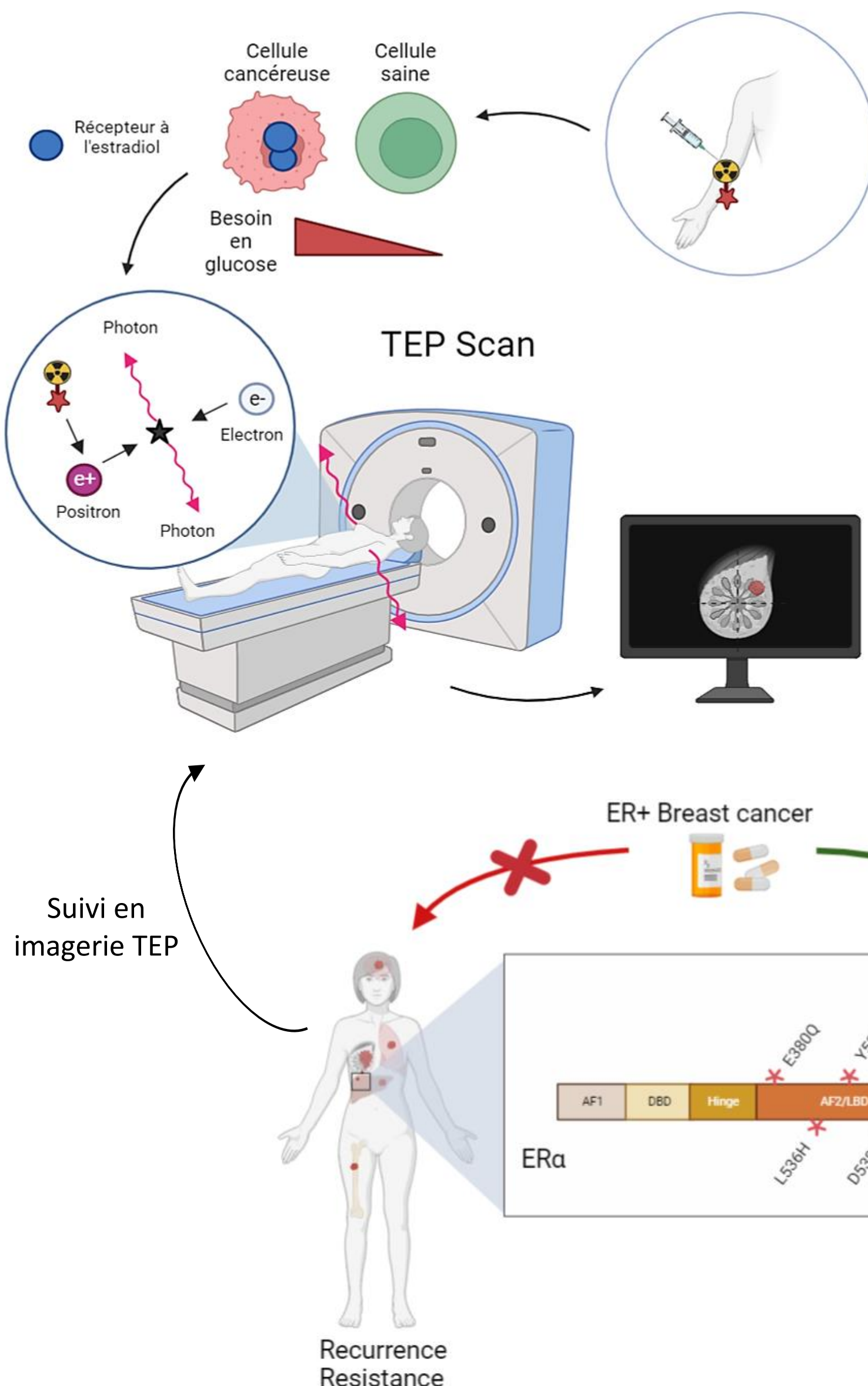
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Mise au point d'un modèle pour l'étude du traceur 18-fluoro-estradiol en imagerie μ TEP

JEAN Chloé^{1,3}, CARTIER Lucille², GARBAR Christian⁴, FLEURY Clémence², POTTEAUX Stéphane², MOCQUERY-CORRE Maxence¹, CHÂTEAU Alicia⁵, ETIQUÉ Nicolas^{1*}, PAPATHANASSIOU Dimitri^{3*}, DEVY Jérôme^{1*}

1 - MEDyC CNRS UMR 7369, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, Reims, France 2 - EA7509 - IRMAIC, Institut Godinot, Reims, France 3 - EA 3804, CRESTIC, Centre de Recherche en STIC, Reims, France 4 - EA 7319, Institut Godinot, Reims, France 5 - CRAN UMR 7039, Nancy, France * Supervision égale de ce travail



Le cancer mammaire constitue le cancer le plus fréquent dans le monde et le plus mortel chez la femme en France¹. Le sous-type ER+ (Estrogen Receptor +) représente 70 % des cancers du sein et est associé à la meilleure survie globale à 5 ans². Néanmoins, en cas de récurrence, cette durée chute (9 mois à 3 ans),¹ et les cellules tumorales développent des mutations d'activation constitutive du récepteur alpha aux œstrogènes dans 10 à 50% des cas.³

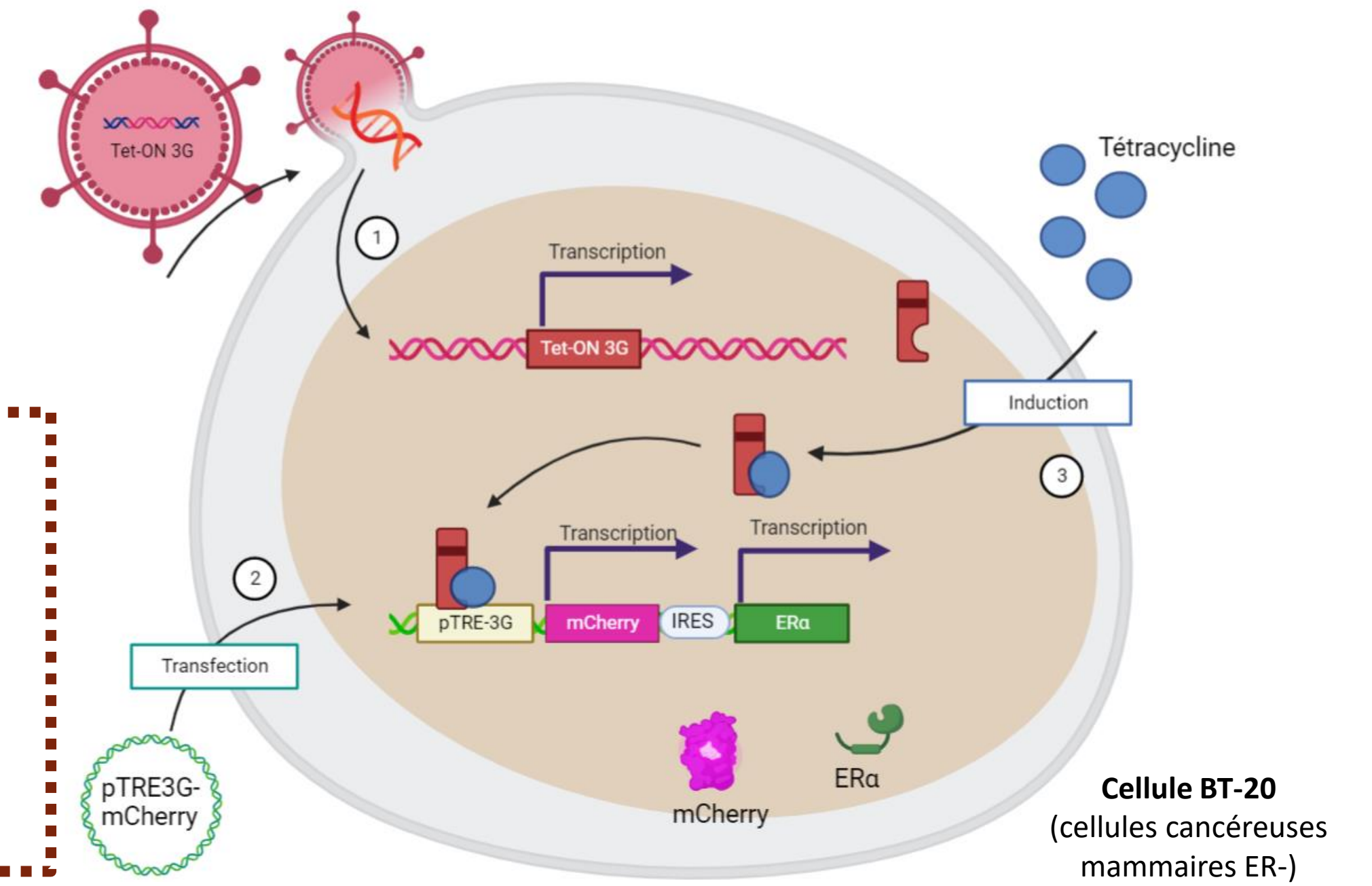
La tomographie par émission de positrons (TEP) est très utilisée pour le diagnostic et pour évaluer la réponse au traitement thérapeutique. Le radioisotope 18Fluorodéoxyglucose (18FDG) est un agent de contraste analogue du glucose couramment utilisé pour la détection des tumeurs, mais ne fournit pas d'informations sur la classification des tumeurs vis-à-vis du récepteur ER+. L'utilisation du 18Fluoroestradiol (18FES), un analogue de l'estradiol devrait permettre de fournir une réponse à cette problématique et de proposer une solution thérapeutique personnalisée. Cependant, sa capacité à lier les formes mutées du récepteur ER+ n'est à ce jour pas clairement déterminée.

OBJECTIF

Etudier la capacité du 18FES à lier, *in vivo*, les différentes formes mutées majoritaires de l'ER α (E380Q, L536H, Y537C/N/S et D538G) afin de déterminer son potentiel dans le diagnostic et le suivi des cancers du sein hormono-dépendants.

DE LA CREATION D'UN MODELE...

1. **Transduction** d'un vecteur (Tet-ON 3G) permettant l'expression stable de la protéine transactivatrice Tet-ON 3G.
2. **Transfection** stable d'un vecteur (pTRE3G-mCherry) permettant l'expression de l'ER α WT ou muté et d'un gène rapporteur codant une protéine fluorescente (mCherry)
3. **Induction** du système par ajout de tétracycline, qui en se liant à la protéine Tet-on 3G, va activer la transcription des gènes codant les protéines d'intérêt (ER α et mCherry).



... A L'IN VITRO...

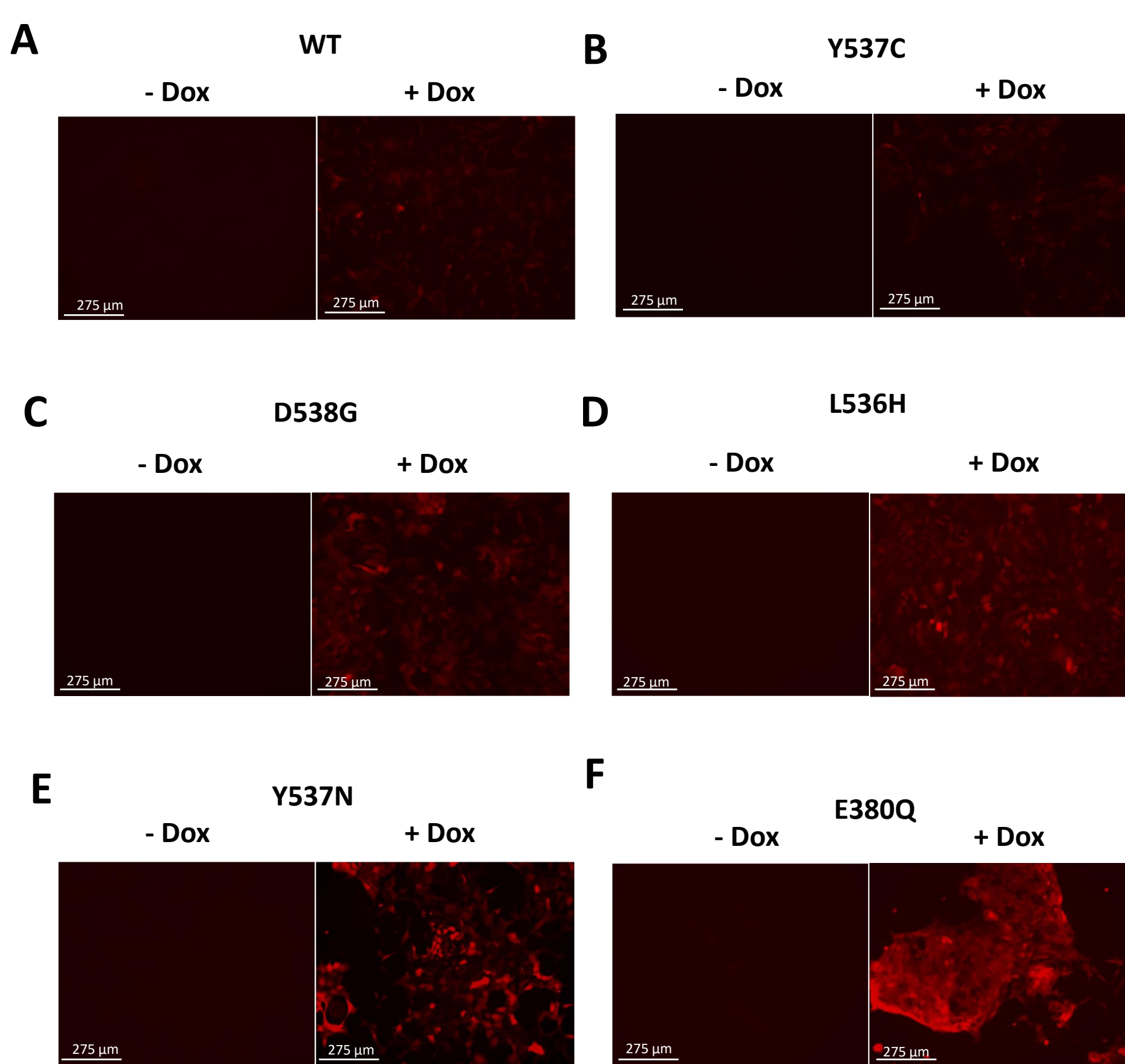


Figure 1 : Etude du caractère inducible de l'expression du gène rapporteur exprimant la mCherry par microscopie de fluorescence. Des cellules BT-20 exprimant le transactivateur et le vecteur pTRE3G-mCherry contenant l'ER α WT ou ses variants mutés ont été stimulées ou non par 1000 ng/ml de doxycycline pendant 24h. Les cellules exprimant l'ER α WT (A), Y537C (B), D538G (C), L536H (D), Y537N (E) et E380Q (F) ont été observées et photographiées au microscope à fluorescence (EvoS Thermofisher FI Auto 2).

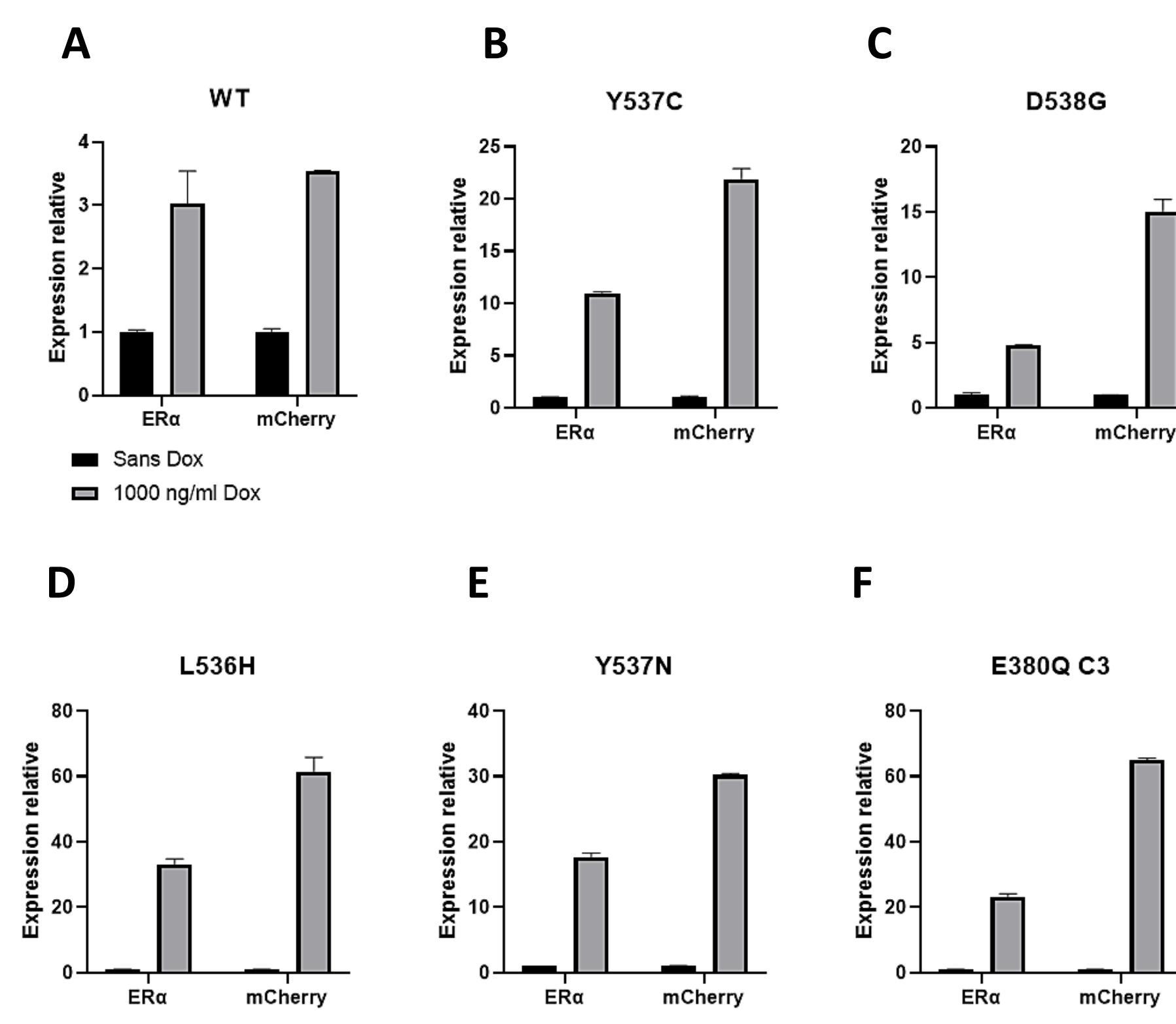


Figure 2 : Etude du caractère inducible de l'expression des variants de l'ER α et de la mCherry par RT-qPCR. Des cellules BT-20 exprimant le transactivateur et le vecteur pTRE3G-mCherry contenant l'ER α WT ou ses variants mutés ont été stimulées ou non par 1000 ng/ml de doxycycline pendant 24h. Les ARN totaux ont été extraits et analysés par RT-qPCR. Les histogrammes correspondant à la quantification de l'expression de l'ER α WT (A), Y537C (B), D538G (C), L536H (D), Y537N (E) et E380Q (F) et de la mCherry sont présentés et correspondent à l'expression relative par rapport aux gènes de référence (RPS18 et RPL32).

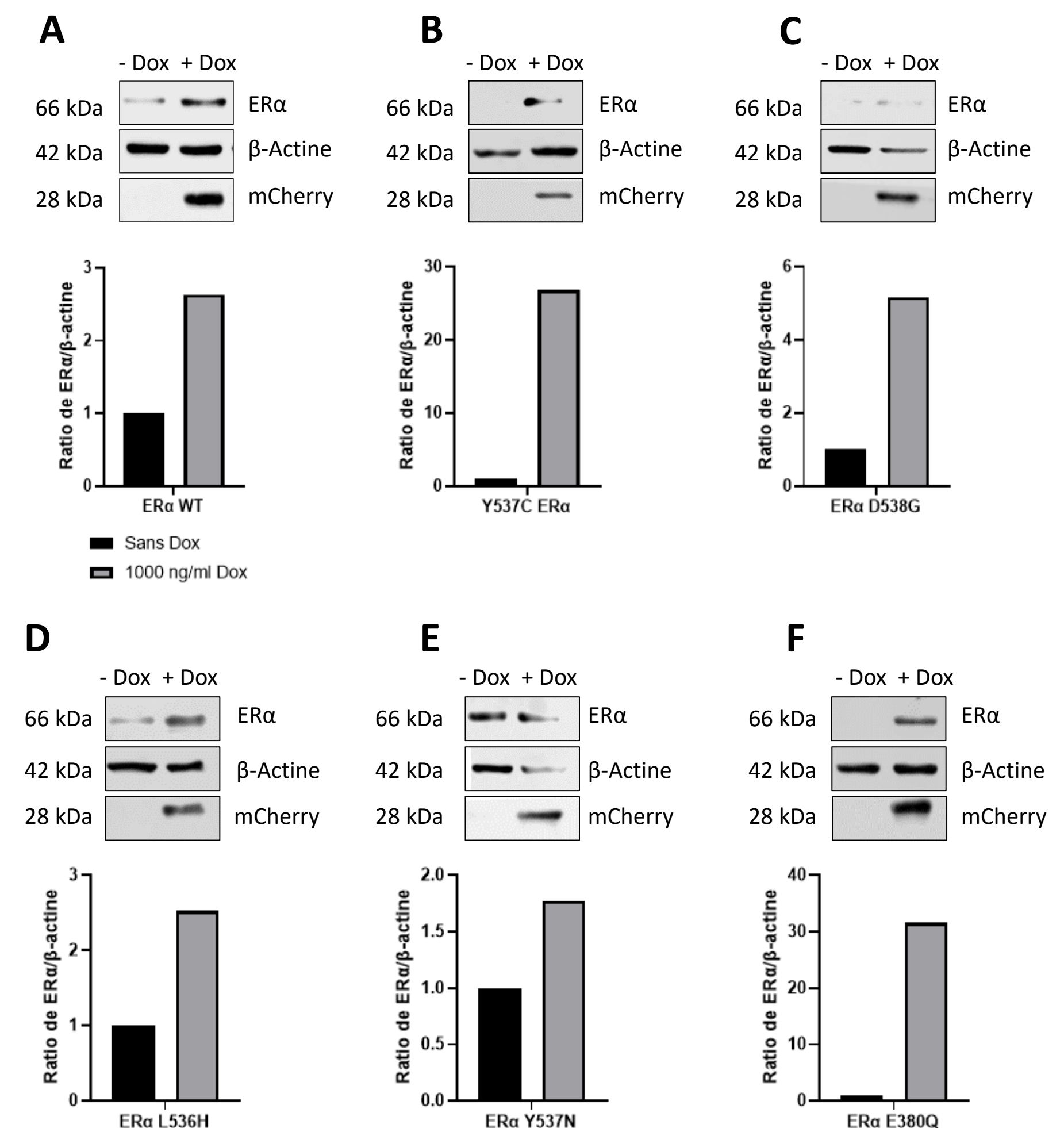


Figure 3 : Etude du caractère inducible de l'expression des variants de l'ER α et de la mCherry par immunoprinte (Western Blot). Des cellules BT-20 exprimant le transactivateur et le vecteur pTRE3G-mCherry contenant l'ER α WT ou ses variants mutés ont été stimulées ou non par 1000 ng/ml de doxycycline (Dox) pendant 24h. Les protéines totales ont été extraites et analysées par électrophorèse SDS-PAGE puis immunoprinte. Les résultats des immunoprintes ainsi que les histogrammes correspondant à la quantification relative du ratio d'expression ER α / β -Actine WT (A), Y537C (B), D538G (C), L536H (D), Y537N (E) et E380Q (F) entre les cellules traitées ou non à la Dox sont présentés (n=1).

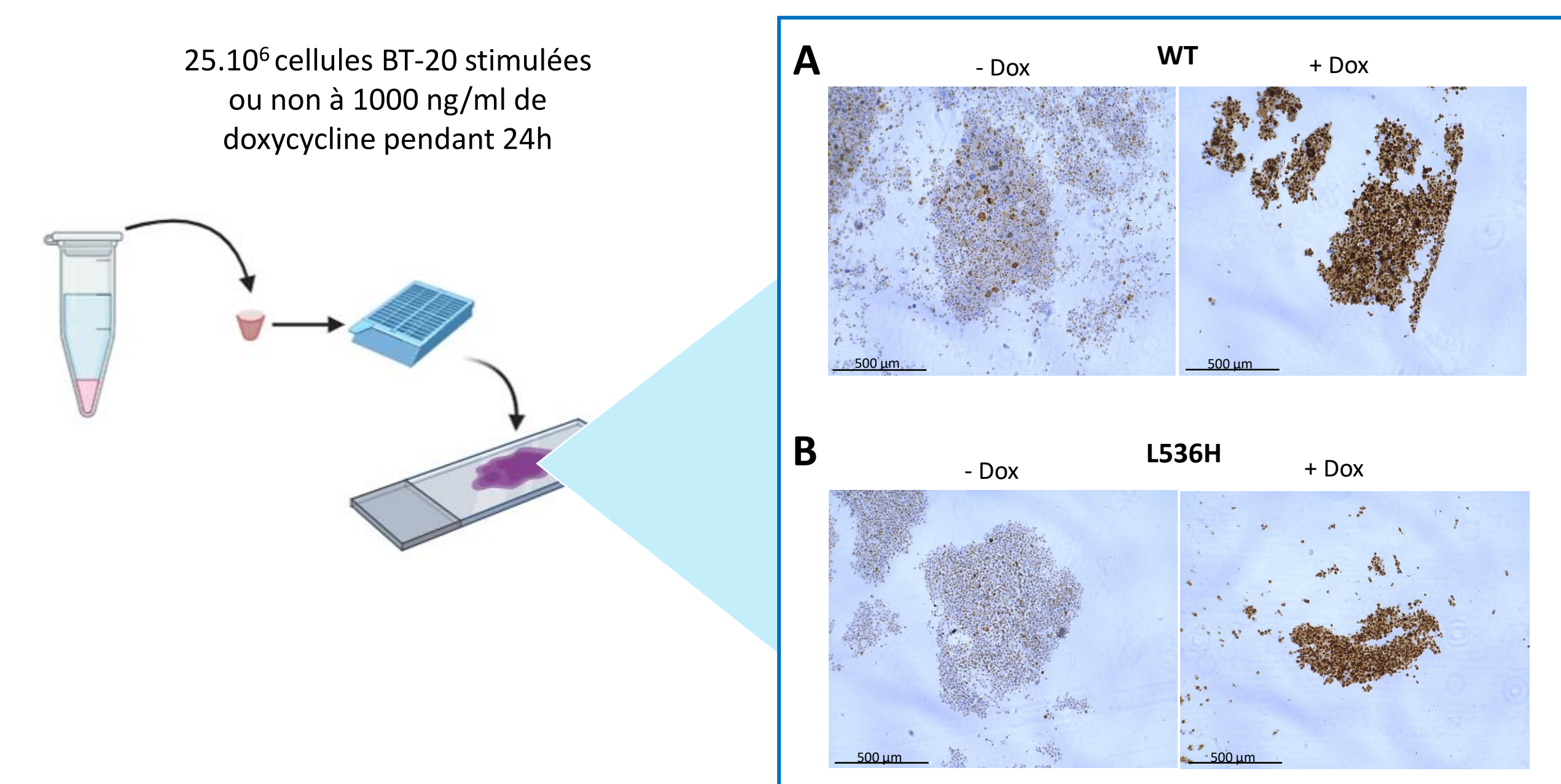


Figure 4 : Etude du caractère inducible de l'expression du variant L536H de l'ER α par immunohistochimie. Des cellules BT-20 exprimant le transactivateur et le vecteur pTRE3G-mCherry contenant l'ER α WT ou le variant muté L536H ont été stimulées ou non par 1000 ng/ml de doxycycline pendant 24h. Les cellules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

... A L'IN VIVO.

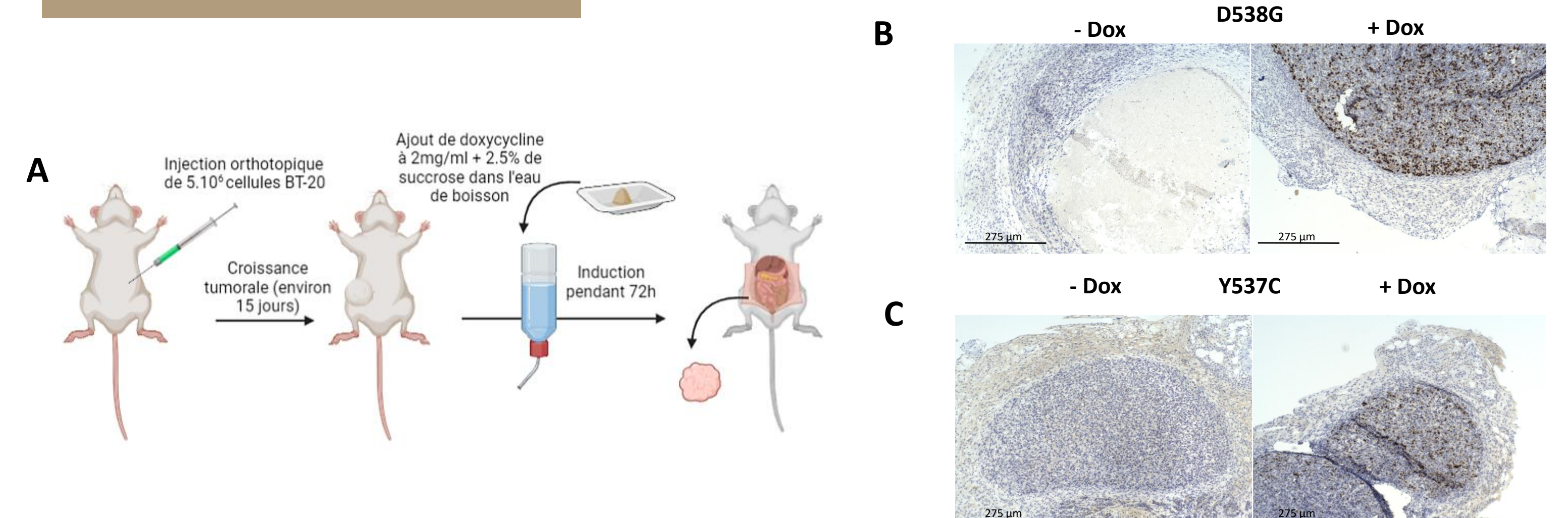


Figure 5 : Etude du caractère inducible de l'expression des variants de l'ER α *in vivo* par immunohistochimie. 5 millions de cellules BT-20 exprimant le transactivateur et le vecteur pTRE3G-mCherry contenant l'ER α WT ou ses variants mutés ont été injectées de façon orthotopique dans le coussinet graisseux 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 boisson des souris. Après 72h de stimulation, les souris sont euthanasiées et les tumeurs récupérées puis fixées dans du formol pendant 48h. Un immunomarquage anti-ER α suivi d'une contre coloration HES a été effectuée (Dako Omnis Agilent). Les tumeurs exprimant l'ER α D538G (B) et Y537C (C) ont été observées et photographiées au microscope (EvoS Thermofisher FI Auto 2).

CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de démontrer le caractère inducible de notre système Tet-ON pour l'ER α et ses différents variants étudiés dans les cellules BT-20. Après 24h de stimulation à 1000 ng/ml de doxycycline, nous avons tout d'abord validé la détection en microscopie à fluorescence du produit de notre gène rapporteur : la mCherry (Figure 1). Puis l'expression inducible des différents variants de l'ER α a été validée au niveau transcriptionnel par RT-qPCR (Figure 2), au niveau protéique par immunoprinte (Figure 3) et immunohistochimie (Figure 4).

Enfin, nous avons testé notre modèle *in vivo* pour certains variants, ce qui nous a permis de valider son inducibilité dans un modèle de coussinet graisseux orthotopique de xéno greffe où la doxycycline (2mg/ml) est ajoutée dans l'eau de boisson pendant 72h. Ce modèle sera prochainement utilisé dans le cadre d'une collaboration avec NancyTEP, pour étudier et quantifier la fixation du 18FES en imagerie μ TEP et pour préciser l'intérêt de son utilisation dans le diagnostic et le suivi des patientes atteintes de cancers mammaires hormono-dépendants.