

Imagerie par tomographie par émission de positons (TEP) dans un modèle murin du myélome multiple

Dorian Protzenko¹, Mariana Acorci¹, Catherine Maurel², Joëlle Gaschet^{2,4}, Michel Chérel^{2,3,4}, Latifa Rbah-Vidal^{1,2}

1) UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques - Université de Nantes, Nantes ; 2) CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes 3) UFR de médecine - Université de Nantes, Nantes ; 4) Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain

Introduction

- Le myélome multiple (MM) est une maladie de la moelle osseuse, caractérisée par la multiplication d'un plasmocyte anormal, empêchant alors le développement des autres lignées et provoquant divers symptômes (anémie, hémorragie, trouble du système nerveux). Avec une survie globale à 5 ans de 42%, le MM est un cancer de pronostic intermédiaire.
- PD-L1 (Programmed cell Death Ligand-1) est une protéine de surface jouant un rôle primordial dans la régulation de la réponse immunitaire, et d'échappement tumoral. Il est un marqueur d'intérêt et donc une cible de choix dans la thérapeutique du MM.
- La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une technique imagerie corps entier 3D non invasive utilisant des isotopes radioactifs émetteurs de positons β^+ (Cuivre-64, Fluor-18 ou Zirconium-89) et présentant d'excellentes performances diagnostiques en termes de sensibilité et de résolution.
- Nous cherchons ici à vérifier la pertinence de l'imagerie TEP en ciblant spécifiquement PD-L1,

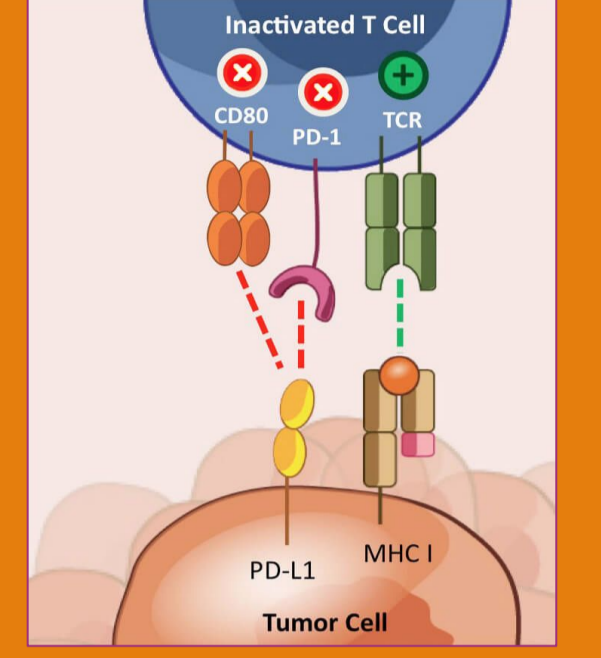


Figure 1: Action du récepteur PD-L1 dans l'inactivation des cellules T

Matériel et méthodes

I - Culture cellulaire

- Après décongélation d'une ampoule de 1×10^6 cellules, 2 flasques contenant chacune 500 000 cellules sont préparées. Elles contiennent chacune 10 mL d'un milieu de culture composé de RPMI 1640 (450 mL) (Gibco®) auquel il a été ajouté :
 - Sérum bovin foetal à 10% (50 mL) (Laboratoires PAA/GE Healthcare Europe GmbH)
 - Streptomycine/pénicilline (5 mL)
 - L-Glutamine (5 mL) (Gibco®)
 - Pyruvate de sodium à 10% (5mL)
- Les flasques sont ensuite placées dans une étuve à 37°C et avec 5% de CO₂.
- Lorsque les cellules arrivent à \pm 80% de confluence, le milieu de culture est retiré et les cellules sont décollées par simple tapotement : ce sont des cellules cancéreuses en suspension.
- Après centrifugation et élimination du milieu de culture, le culot cellulaire est récupéré et nous procédons à un ensemencement de nouveaux flasques par dédoublement.

II - Expression de PD-L1 par cytométrie de flux

a - Confirmation de l'expression de PD-L1

- Afin de confirmer l'expression de CD138 dans la lignée tumorale MOPC315.BM, les cellules ont été ensemencées dans une microplaque à 96 puits selon le schéma suivant (expérimentation réalisée en triplicates).
- Les cellules ont été incubées avec 50 μ L d'anticorps primaires anti-CD138 couplés avec de la phycoérythrine (Clone 281.2 ; 2 μ g/mL ; BD Biosciences) et 50 μ L d'anticorps isotype contrôle (Mouse IgG2 ; 2 μ g/mL) couplés avec 50 μ L d'anticorps secondaires couplés avec de la phycoérythrine (PE) (BD Biosciences). Les composés ont été dilués au 20e.
- Après le marquage, les cellules ont été transvasées dans des tubes en polystyrène et analysées au moyen d'un cytomètre de flux (BD FACSCalibur™, BD Biosciences).

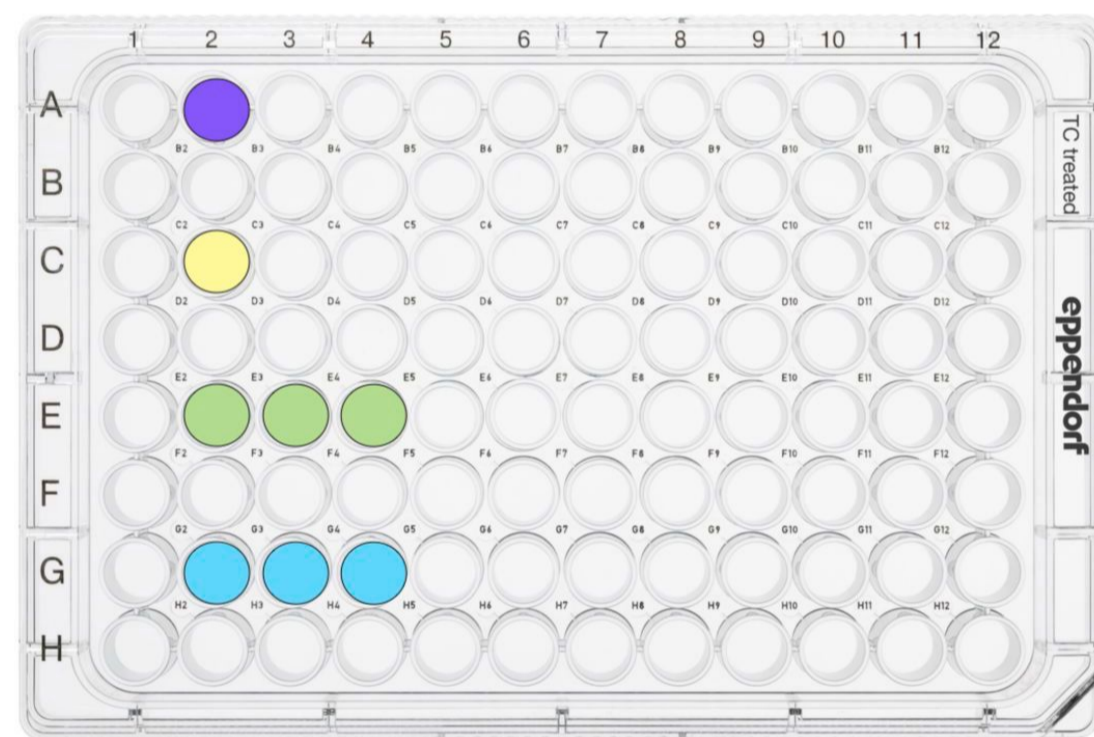


Figure 2: Représentation schématique de la disposition des cellules sur les plaques 96 puits et des dilutions d'anticorps pour la cytométrie de flux.

- Le contenu des puits est alors placé dans des tubes à Fac (fluorescence-activated cell sorting) avant d'être analysé par cette dernière.



Figure 3: Cytomètre de flux (BD FACSCalibur™)

III - Imagerie TEP

- Afin de visualiser la localisation de PD-L1 et de quantifier le signal, nous avons utilisé la technique d'imagerie TEP.
- Les expérimentations in vivo ont été réalisées sous l'autorisation CEEA.2013.2.
- Nous avons injecté des cellules MOPC315-BM, préalablement décongelées et entretenues, en sous cutané chez 14 souris Balb/c. Les injections ont été réalisées au niveau de l'épaule selon le schéma suivant :

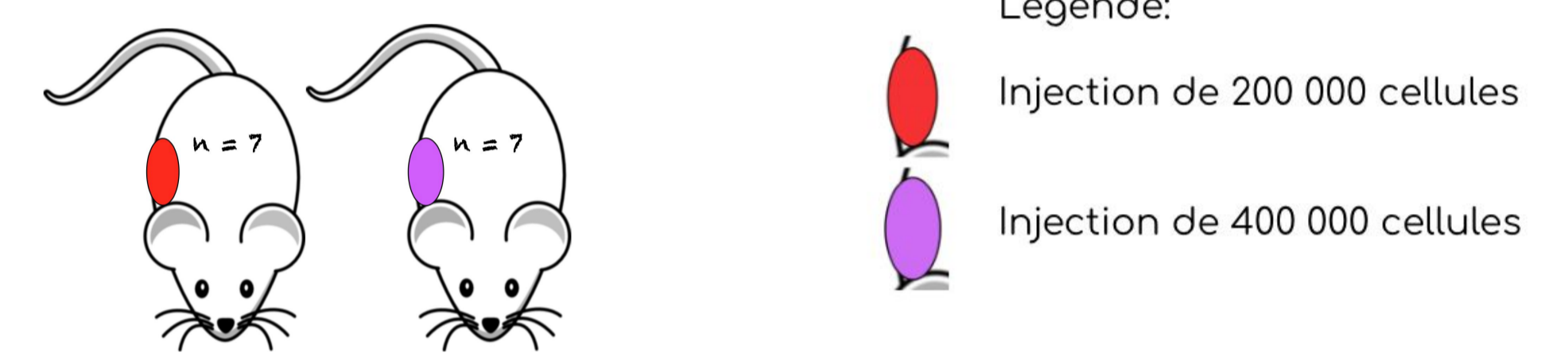


Figure 4: Représentation schématique du lieu et nombre de cellules de la lignée MOPC315-BM injectées chez 14 souris Balb/c.

A J15 post inoculation :

- injection de 5 MBq (0,1 mL) de anti-PD-L1 radiomarqué au 89Zr (émetteur β^+) par la veine caudale.
- à 24h ou 48h: anesthésie des souris à l'isoflurane (1,5%, 1L d'O₂/min)
- l'animal anesthésié est placé sur le lit de la TEP/CT (Inveon, (Siemens Preclinical Solutions))
- acquisition d'une image CT (80 kV, 500 mA, 320 ms)
- acquisition d'une image TEP en mode statique pendant 30 minutes
- après reconstruction les images sont analysées à l'aide du logiciel AMIDE®



Figure 5: Imageur TEP utilisé pour la manipulation (Inveon, (Siemens))

Résultats

I - Confirmation de l'expression de PD-L1 par cytométrie de flux

- La cytométrie de flux permet de fournir diverses informations sur les cellules. On y retrouve :
 - la taille relative (Forward Scatter - FSC)
 - la granularité relative ou complexité interne (SSC)
 - l'intensité relative de fluorescence (FL1 : marquage anticorps)
- La lignée MOPC315.BM exprime fortement l'antigène PD-L1 (Geo Mean : 9,46) par rapport à l'isotype contrôle. Il est donc possible d'utiliser PD-L1 en imagerie TEP.
- Le calcul du Geo Mean a été effectué par le logiciel sur la zone R1.

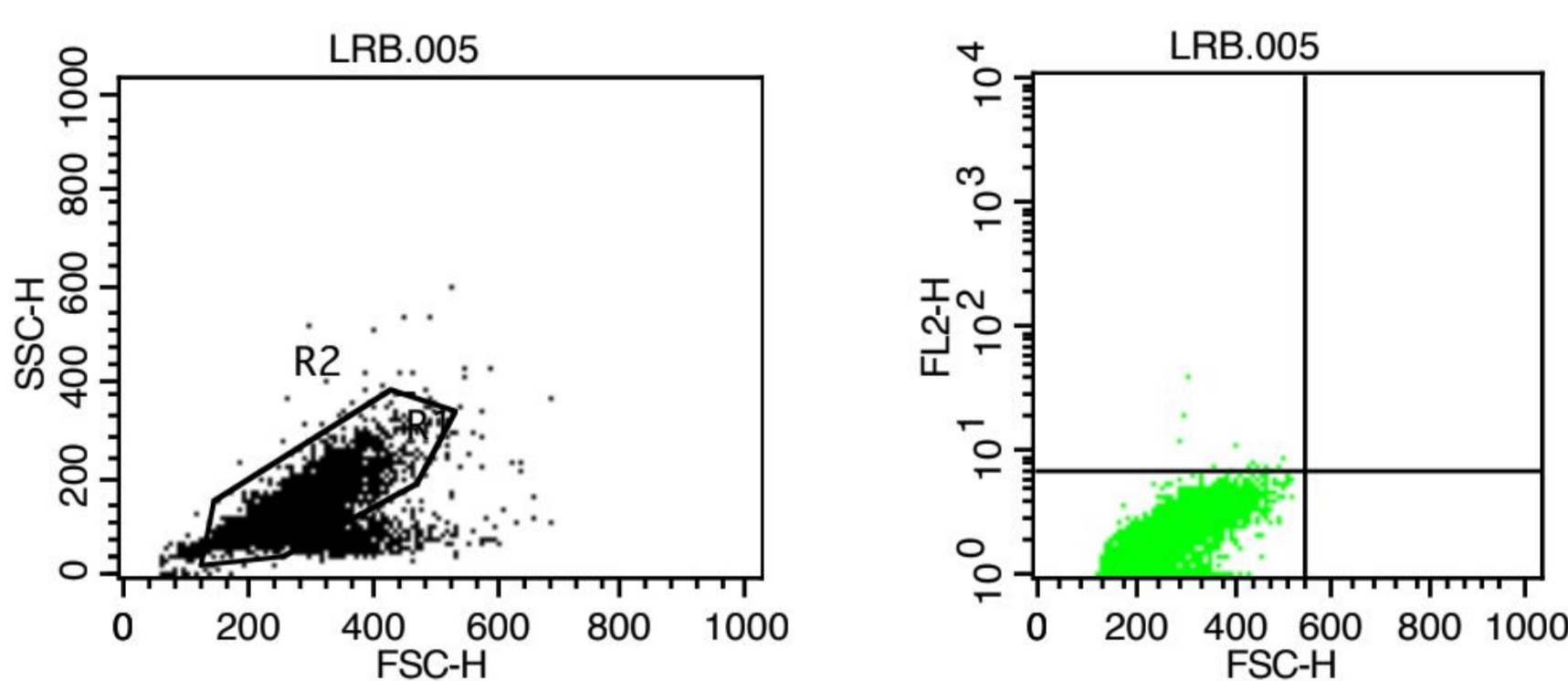


Figure 6: Cytogrammes obtenus par cytométrie de flux de la lignée cellulaire MOPC315.BM, marquée par l'isotype contrôle et par l'anticorps anti-PDL1.

Quad	% Gated	Y Geo Mean
UL	0.16	9.46
UR	0.00	***
LL	99.84	2.17
LR	0.00	***

II - Imagerie TEP

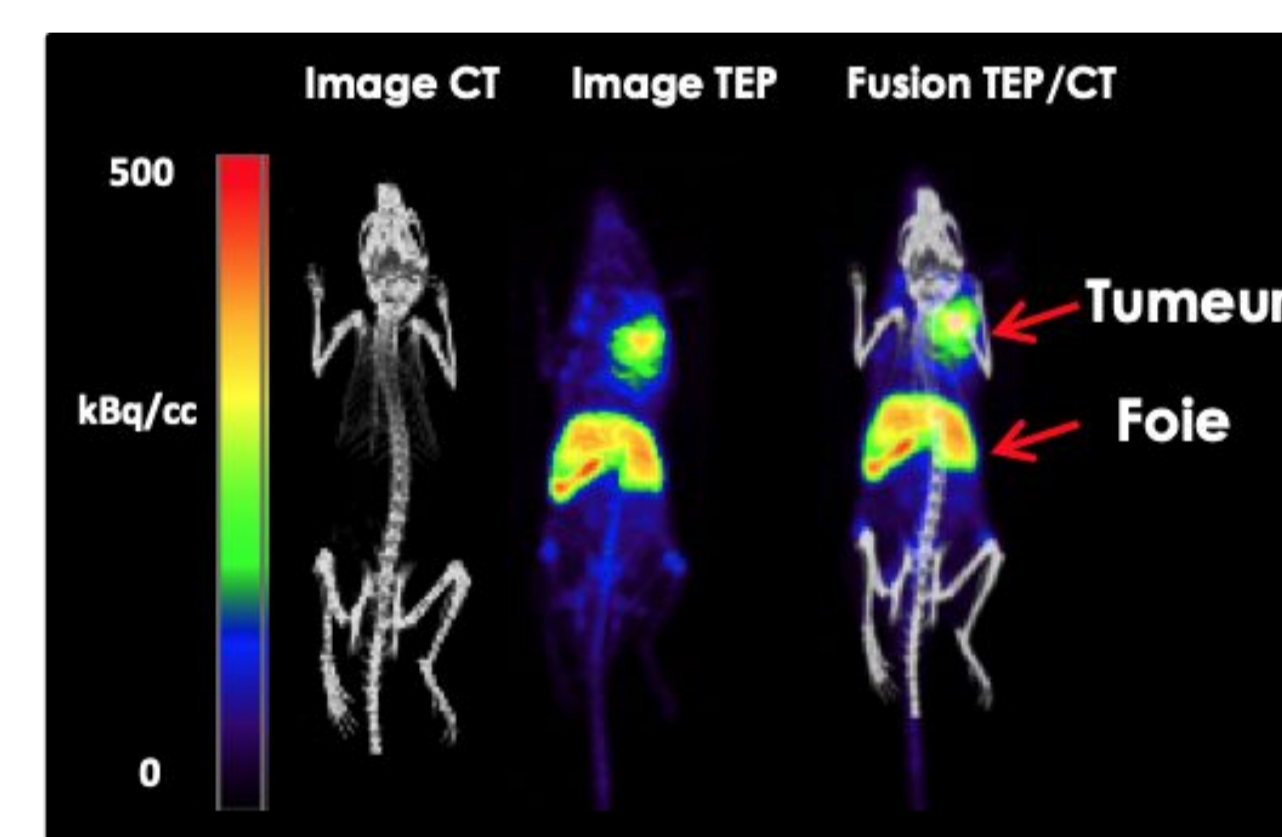
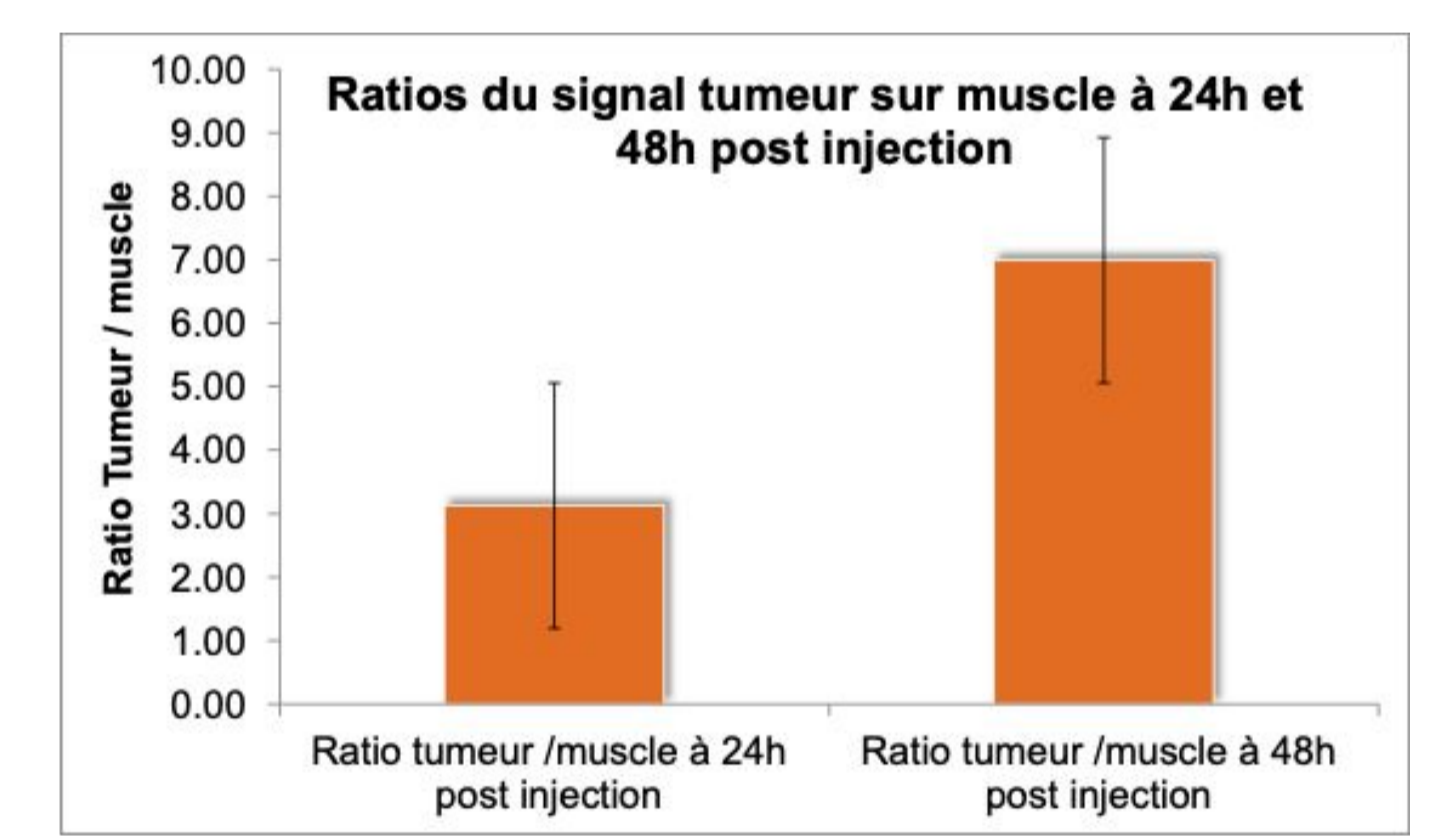


Figure 7: Imagerie TEP/CT d'une souris porteur d'une tumeur sur l'épaule droite 24h après injection du radiotracer (a), Quantification du signal (b)



- La fixation à 24h est déjà suffisante pour permettre une imagerie. Nous pouvons observer un ratio supérieur moyen à $3,13 \pm 1,91$.
- A 48h post injection le ratio tumeur sur muscle atteint $7 \pm 3,85$.
- Ces résultats montrent que la fixation du radiotracer est largement supérieure à celle dans les tissus non spécifiques (ex: muscle)
- On note aussi une fixation dans le foie témoignant d'un métabolisme hépatique.

Conclusions

Au cours de ce stage, nous avons vérifié que :

- PD-L1 en tant que marqueur, sur la lignée MOPC315.BM s'avère être une cible de choix pour de l'imagerie TEP mais aussi en tant que cible thérapeutique. Il serait intéressant d'utiliser PD-L1 dans un but théranostique, de par sa fixation très rapide et spécifique.
- Ce stage m'a beaucoup apporté d'un point de vue personnel et m'a permis de confirmer mon projet d'orientation et mon goût pour la recherche. Je remercie l'ensemble de l'équipe pour sa patience et sa pédagogie, et plus particulièrement Mme Rbah-Vidal.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. PD-L1 in cancer par AstraZeneca [en ligne] (<https://www.detectpd-1.com/urothelial-carcinoma/pd-1-testing.html>), mise en ligne le 16 octobre 2016, consulté le 15 juin 2018
2. Hofgaard PO et al. (2012) A Novel Mouse Model for Multiple Myeloma (MOPC315.BM) That Allows Noninvasive Spatiotemporal Detection of Osteolytic Disease. PLoS ONE 7(12).