



Radiosensibilisation en thérapie radionucléidique des tumeurs neuroendocrines

Mémoire

Samuel Adant

Maîtrise en médecine moléculaire - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

Radiosensibilisation en thérapie radionucléidique des tumeurs neuroendocrines

Mémoire

Samuel Adant

Sous la direction de :

Jean-Mathieu Beauregard, directeur de recherche

Girish M. Shah, codirecteur de recherche

Résumé

Les tumeurs neuroendocrines (TNEs) sont des maladies rares dont l'incidence augmente depuis le début des années 2000. Lorsque la maladie est métastatique, ce qui arrive dans plus de 20% des cas au diagnostic, peu d'options curatives s'offrent aux patients. La thérapie radionucléidique (PRRT) au ^{177}Lu -DOTA,Tyr3-octréotate (^{177}Lu -octréotate) dépendante des récepteurs de la somatostatine a récemment été démontrée plus efficace que le traitement de première ligne actuel, soit les analogues de la somatostatine. Or, les cas de rémission avec la PRRT restent très rares et peu d'agents ont actuellement été utilisés pour en améliorer l'efficacité. Pour l'heure, les traitements pour améliorer la PRRT dans les études cliniques sont principalement tournés vers la combinaison avec des doses thérapeutiques de chimiothérapie. Dans les études précliniques, de nombreuses avenues sont à l'essai que ce soit en augmentant la perfusion des tumeurs, l'internalisation de ^{177}Lu -octréotate, la létalité des dommages induits par la radioactivité ou en ajoutant un fardeau supplémentaire de dommage à l'ADN. Les inhibiteurs de la poly(ADP-ribose) polymérase (iPARP) interfèrent avec la réparation de l'ADN, principalement la réparation par excision de base. La combinaison d'un iPARP avec la PRRT dans un modèle de sphéroïdes de TNEs humaines bronchopulmonaires (NCI-H727) et pancréatiques (BON-1) a démontré que la combinaison ralentissait davantage la croissance que l'iPARP seul ou la PRRT seule pour les deux lignées cellulaires. Le témozolomide (TMZ) et le 5-fluorouracile (5-FU), deux agents de chimiothérapie couramment utilisés pour traiter les TNEs, ont possiblement un rôle plus vaste que la toxicité à l'ADN. En effet, en exposant les cellules BON-1 au TMZ et au 5-FU à des doses toxiques, mais non létales, une augmentation des récepteurs à la somatostatine et de l'internalisation du ^{177}Lu -octréotate a été observée. Donc, les traitements combinatoires pour potentialiser la PRRT, notamment les iPARPs et la chimiothérapie, pourraient permettre un meilleur traitement des TNEs.

Abstract

Neuroendocrine tumors (NETs) are rare diseases, the incidence of which has been increasing over the past 20 years. When the disease is metastatic, which happens in more than 20% of cases at diagnosis, few curative options are available for patients. Peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) via somatostatin receptors (SSTR) and ^{177}Lu -DOTA,Tyr3-octreotate (^{177}Lu -octreotate) has recently been shown to be more effective than the current first-line therapy, namely somatostatin analogues. However, cases of remission with PRRT remain very rare and few agents have currently been used to improve its effectiveness. At present, treatments to improve PRRT in clinical studies have mainly focused on combination with therapeutic doses of chemotherapy. In preclinical studies, many avenues are being tested whether by increasing tumor perfusion, internalization of ^{177}Lu -octreotate, lethality of radioactivity-induced damage or by adding an additional burden of DNA damage to the tumor. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors (PARPi) interfere with DNA repair, mainly altering base excision repair pathways. Combining PARPi with PRRT in a spheroid model of bronchopulmonary NETs (NCI-H727) and pancreatic NETs (BON-1) demonstrated that the combination slows growth more than PARPi alone or PRRT alone for both cell lines. Temozolomide (TMZ) and 5-fluorouracil (5-FU), two chemotherapeutic agents commonly used to treat NETs, may have a broader role than conventional cytotoxicity via DNA damage in NET therapy. Indeed, by exposing BON-1 cells to TMZ and 5-FU to toxic, but not lethal doses, an increase in somatostatin receptors and internalization of ^{177}Lu -octreotate was observed. Acting on various mechanisms to potentiate PRRT is possible with PARPis or chemotherapy. Having multiples targes for potentiation could be key for a better treatment of NETs.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Liste (Abréviation et figures).....	vii
Liste des abréviations :.....	vii
Liste des tableaux:	ix
Liste des figures:	x
Remerciements :	xi
Avant-propos	xii
Introduction.....	1
1. Les tumeurs neuroendocrines.....	1
1.1. Embryologie.....	1
1.2. Pathologie.....	1
1.3. Épidémiologie	2
1.4 Classification	2
1.5 Clinique.....	3
1.6. Traitement des tumeurs neuroendocrines :	4
2. La thérapie radionucléidique (PRRT)	6
2.1. Principes :.....	6
2.2 Traitement des TNEs	7
2.3 Limites	8
2.4 Type de dommages à l'ADN	9
2.5 Réparation des dommages à l'ADN après la PRRT	9
3. Potentialisation de la PRRT	11
3.1 Poly(ADP-ribose) polymérase.....	11
3.2 Chimiothérapie	13
Hypothèses :.....	15
Objectifs :	15
Chapitre 1 :.....	16
Combination treatments to enhance peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumours	16
Avant-propos	17
Résumé	18
Abstract	19
Chapitre 2 :.....	46
Potentialisation de la thérapie radionucléidique au ¹⁷⁷ Lu-octréotate des tumeurs neuroendocrines humaines par des inhibiteurs de PARP	46
1.Avant-Propos.....	47
2. Matériels et méthodes	48

3. Résultats.....	50
3.1. Internalisation du ¹⁷⁷ Lu-octréotate par les sphéroïdes BON-1 et NCI-H727.....	50
3.2. Potentialisation du ¹⁷⁷ Lu-octréotate par les iPARP dans les sphéroïdes BON-1.....	50
3.3 Potentialisation du ¹⁷⁷ Lu-octréotate par les iPARP dans les sphéroïdes H727	51
4. Conclusions.....	52
Chapitre 3 :.....	53
Augmentation par la chimiothérapie des récepteurs de la somatostatine 2 dans les tumeurs neuroendocrines.....	53
1. Avant-propos	54
2. Matériel et méthode.....	55
3. Résultats:.....	58
3.1. Étude de l'internalisation du ¹⁷⁷ Lu-octréotate:.....	58
3.2. Toxicité du TMZ et du 5-FU sur BON-1	60
3.3. Augmentation de l'ARNm du gène SSTR2 post-TMZ dans les cellules BON-1	61
3.4. Augmentation des récepteurs SSTR2 dans les cellules BON-1 après TMZ et 5-FU, mais absentes dans les cellules non-TNEs	61
3.5. Augmentation de l'internalisation du ¹⁷⁷ Lu-octréotate après TMZ	63
3.6. Mécanisme moléculaire régulant l'expression génique de SSTR2 en réponse au TMZ ...	64
4. Conclusions :.....	65
Discussion	66
Effet des iPARPs sur la thérapie au ¹⁷⁷ Lu-octréotate sur les sphéroïdes de TNEs.....	66
Effet du TMZ et du 5-FU sur l'expression de SSTR2 dans les TNEs	68
Conclusion et Perspective.....	71
Bibliographie.....	73

Liste (Abréviation et figures)

Liste des abréviations :

1,5-Dihydroxyisoquinoline : DHQ

5-Fluorouracil : 5-FU

¹⁸F-fluorodéoxyglucose : FDG

⁶⁸Ga-octréotate : ⁶⁸Ga-DOTA-octréotate

¹⁷⁷Lu-octréotate : ¹⁷⁷Lu-DOTA, Tyr³-octréotate

Acide désoxyribonucléique : ADN

Acide ribonucléique : ARN

Acide ribonucléique messenger : ARNm

Adénosine diphosphate : ADP

Analogue de la somatostatine : SSA

Capécitabine : CAP

Carcinome pulmonaire à petites cellules : SCLC

Cassure double brin à l'ADN : CDB

Clairance de la créatinine : ClCr

Déoxythymidine triphosphate : dTTP

Déoxyuridine triphosphate : dUTP

Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire : VEGF

Fluorodéoxyuridine monophosphate : FdUMP

Fluorodéoxyuridine triphosphate : FdUTP

Food and Drugs Administration : FDA

Grade 1 : G1

Grade 2 : G2

Human embryonic kidney 293 : HEK-1

Inhibiteur de la poly(ADP-ribose) polymérase : iPARP

Mammalian target of rapamycin : mTOR

Octréotide *long-acting release* : LAR

Oxygène(6)-méthylguanine : O6MeG

Poly(ADP-ribose) polymérase : PARP

Poly(ADP-ribose) polymérase-1 : PARP-1

Radicaux libres, «*reactive oxygen species*» : ROS

Récepteur de la somatostatine : SSTR

Récepteur de la somatostatine 2 : SSTR2

Réparation des mésappariements de l'ADN : MMR

Réparation de l'ADN par excision de base : BER

Réparation par jonction d'extrémités non-homologue : NHEJ

Réparation par recombinaison homologue : HRR

Streptozotocine : STZ

Témozolomide : TMZ

Thérapie radionucléidique via les récepteurs, «*peptide receptor radionuclide therapy*» : PRRT

Tomographie par émission de positron : PET

Tomographie par émission monophotonique : SPECT

Traitement combinatoire de la capécitabine et du témozolomide : CAPTEM

Tumeur neuroendocrine : TNE

Tumeur neuroendocrine pancréatique : TNEpanc

Liste des tableaux:

Chapitre 1 :

Table 1. Various combination strategies to improve the efficacy of PRRT of NETs.

Liste des figures:

Chapitre 1:

Figure 1. Pathways of action of somatostatin, somatostatin analogues, and radiolabelled somatostatin analogues.

Figure 2. Strategies to improve therapeutic efficacy of PRRT.

Figure 3. Clinical decision algorithm for the selection of patients to undergo combination therapy

Chapitre 2 :

Figure 2.1. Effet du iPARP sur l'internalisation du ¹⁷⁷Lu-octréotate dans les sphéroïdes

Figure 2.2 Effet du ¹⁷⁷Lu-octréotate et du iPARP sur la croissance des sphéroïdes BON-1.

Figure 2.3. Effet du ¹⁷⁷Lu-octréotate et du iPARP sur la croissance des sphéroïdes NCI-H727

Chapitre 3 :

Figure 3.1. Effet du TMZ sur la rétention du lutécium-177 provenant du ¹⁷⁷Lu-octréotate ou du ¹⁷⁷Lu-DTPA par les cellules BON-1 avec des doses élevées de radioactivité et de TMZ.

Figure 3.2 Effet du TMZ et de la dose de ¹⁷⁷Lu-octréotate sur l'internalisation du lutécium-177 provenant du ¹⁷⁷Lu-octréotate ou du ¹⁷⁷Lu-DTPA dans les cellules BON-1

Figure 3.3. Toxicité du TMZ et du 5-FU sur BON-1

Figure 3.4. Effet du TMZ sur l'expression de l'ARNm de SSTR1,2,3 et 5 dans les cellules BON-1 en fonction du temps

Figure 3.5. Effet du TMZ sur l'expression protéique de SSTR2 dans les cellules BON-1 en fonction du temps

Figure 3.6 Effet du 5-FU sur l'expression protéique de SSTR2 dans les cellules BON-1 en fonction du temps

Figure 3.7. Effet du TMZ sur l'expression protéique de SSTR2 dans les cellules HEK en fonction du temps

Figure 3.8. Effet de la dose de ¹⁷⁷Lu-octréotate et du TMZ sur l'internalisation du lutécium-177 par les cellules BON-1.

Figure 3.9. Effet du TMZ sur les marqueurs de CDB et les cyclines dans les cellules BON-1.

Remerciements :

Je tiens à remercier mes deux superviseurs de maîtrise. Leur passion et leur détermination m'ont beaucoup inspiré tout au long des travaux que j'ai effectués dans leur laboratoire. Je souligne aussi leur patience et leur support dans ce long processus d'écriture de mémoire.

À toute l'équipe du laboratoire, Nupur, Rashmi, Mihaela et Marine, vous avez été essentielles à la réalisation de ma maîtrise. C'est bien sûr par les longs moments d'enseignement et les réponses à toutes mes questions, mais je crois que c'est par les moments d'échange (autour d'un bon café) et de plaisir en votre compagnie que j'ai pu réussir mes travaux. Je vous en remercie.

Merci à mon amie Asma Babar sans qui je n'aurais peut-être pas osé me lancer dans l'aventure et qui, par nos parcours similaires, m'a motivé à terminer ce mémoire.

Un merci à mes parents qui m'ont supporté avec leur écoute et leur patience. Leurs bons repas m'ont permis de m'investir à cette recherche.

Et bien sûr, un immense merci à ma blonde, qui a eu le temps de devenir ma femme dans ce long processus. Elle qui a accepté de perdre des étés et des journées pour que j'effectue ma recherche et qui a toujours été une source de motivation. Ton support dans mes moments de doute m'a permis de me rendre à la ligne d'arrivée.

Avant-propos

Le mémoire qui est présenté inclut un article de revue de la littérature sur les thérapies utilisées en combinaison avec la thérapie radionucléidique via les récepteurs des tumeurs neuroendocrines. Il permet d'obtenir une vision globale des connaissances actuelles dans ce domaine. Le mémoire se poursuit par la suite avec la description de mes travaux réalisés au cours de ma maîtrise et une discussion qui porte sur les deux chapitres contenant mes données.

L'article a été soumis en février 2019, accepté en août 2019 et publié en septembre 2019. En tant que premier auteur, j'ai fait la revue de littérature, écrit les versions préliminaires et finales du manuscrit et dessiné les figures préliminaires. Les deux coauteurs sont mes deux directeurs de recherche Jean-Mathieu Beaugard et Girish M. Shah. Ils ont contribué à la révision et l'écriture des versions définitives du manuscrit.

Introduction

Les tumeurs neuroendocrines (TNEs) sont des cancers rares et généralement indolents, mais leur présentation métastatique au diagnostic les rend généralement incurables. Pour le moment, peu d'options de traitement sont disponibles une fois le stade métastatique atteint. La thérapie radionucléidique via les récepteurs (PRRT) au ^{177}Lu -DOTA,Tyr³-octréotate (^{177}Lu -octréotate) permet de ralentir la progression de la maladie à ce stade. Les travaux de cette maîtrise vont permettre de mieux comprendre les TNEs et la PRRT en explorant de nouvelles avenues pour potentialiser la PRRT et possiblement offrir des traitements curatifs.

1. Les tumeurs neuroendocrines

1.1. Embryologie

Les TNEs ont pour origine les cellules neuroendocrines diffuses du corps. Leur origine embryologique est encore une source de débat entre la crête neurale, le neuroectoderme et l'endoderme [1, 2]. Il est proposé que les cellules neuroendocrines digestives proviennent de l'endoderme puisqu'elles se différencieraient des mêmes cellules souches responsables de la formation complète du système digestif [3]. Une fois l'organogenèse complétée, ces cellules souches sont présentes dans les cryptes intestinales, ont une division cellulaire lente et peuvent devenir des cellules neuroendocrines selon la présence de certains facteurs de croissance [4]. Les cellules neuroendocrines pulmonaires semblent aussi prendre origine dans l'endoderme puisque les cellules épithéliales pulmonaires indifférenciées donnent naissance à l'ensemble des cellules du poumon, notamment les cellules neuroendocrines pulmonaires [5].

1.2. Pathologie

La première description pathologique des TNEs a été faite par Oberndorfer en 1907. Il les a nommés « Karzinoïde », car il y voyait des caractéristiques de carcinomes sans pour autant qu'elles en aient le comportement. Par leur croissance lente, Oberndorfer les considérait originellement comme bénignes pour ensuite réviser sa position lorsqu'il observa des métastases. Leurs origines embryologiques incertaines, leurs diversités et leur dispersion dans le corps ont complexifié leur nomenclature et leur caractérisation. Les caractéristiques de bases sont la présence de granules sécrétoires pouvant contenir des hormones et des peptides ce qu'il leur a valu le nom d'« amine precursor uptake and decarboxylase » ou APUD. Ces granules lient l'argent d'où une de leur ancienne nomenclature, argentophile. Les cellules sont petites avec un noyau rond ou ovale, des nucléoles discrets et une chromatine granuleuse. À l'immunohistochimie, elles sont généralement positives pour la synaptophysine et la chromogranine A [6].

La majorité des TNEs ont à leur surface une importante quantité de récepteurs de la somatostatine (SSTR). Il existe 5 membres dans la famille des SSTR et les TNEs expriment préférentiellement le

récepteur de la somatostatine 2 (SSTR2) à leur surface [7, 8]. Les SSTR2 ont pour action physiologique d'inhiber la sécrétion d'hormone et de ralentir la croissance cellulaire après la fixation de somatostatine à leur surface [9].

1.3. Épidémiologie

La majorité des TNEs se retrouve dans le système digestif, atteignant, par ordre décroissant, l'intestin grêle, le rectum, le pancréas, l'estomac et l'appendice. Le deuxième système le plus touché est l'arbre bronchopulmonaire avec 1,6 cas par 100 000 personnes-année [10].

Leur incidence continue de croître de manière significative chaque année passant de 1.09 à 6.98 par 100000 personnes-année de 1973 à 2012 aux États-Unis d'Amérique [10]. Ceci est principalement causé par l'utilisation plus fréquente de techniques d'imagerie toujours plus sensibles ce qui génère davantage de découvertes fortuites. Cependant, la connaissance plus grande des cliniciens pour cette entité et des facteurs environnementaux non identifiés pourraient aussi expliquer cette hausse. La survie à 5 ans pour une personne atteinte d'une TNE a tout de même augmenté parallèlement passant de 63% avant 2000 à 87% entre 2003 et 2012 [10]. Il reste que, lors du diagnostic, environ 20% des TNEs au Canada sont métastatiques et donc incurables. [11],

1.4 Classification

La plus récente classification des TNEs digestives par l'Organisation mondiale de la Santé date de 2010. L'Organisation mondiale de la Santé classe les TNEs digestives selon leur taux de prolifération représenté par l'index mitotique et le Ki-67. La classification se divise en trois grades : les G1 avec un index mitotique plus petit que 2 et un Ki-67 plus petit que 3%, les G2 avec un index mitotique entre 2 et 20 et un Ki-67 entre 3 et 20% et les G3 avec un index mitotique plus grand que 20 et un Ki-67 plus grand que 20%. Depuis 2017, les G3 se différencient en TNEs et carcinomes neuroendocriniens selon leur degré de différenciation morphologique. Les carcinomes neuroendocriniens bien que très indifférenciés doivent contenir une portion d'éléments spécifiques à l'histologie neuroendocrine d'au moins 30% de la tumeur. Si la proportion est de moins de 30%, la tumeur est classée comme un adénocarcinome neuroendocrinien mixte [6].

Dans sa dernière classification des néoplasies pulmonaires, l'Organisation mondiale de la Santé a regroupé pour la première fois les tumeurs carcinoïdes, les carcinomes pulmonaires neuroendocriniens à grande cellule et les carcinomes pulmonaires à petites cellules (SCLC) dans la catégorie des TNEs pulmonaires. Les tumeurs carcinoïdes se divisent en bas grade, les carcinoïdes typiques (index mitotique < 2 et nécrose absente), et en grade intermédiaire, les carcinoïdes atypiques (index mitotique entre 2 et 10 et nécrose focale ou absente). Les carcinomes pulmonaires neuroendocriniens à grande cellule et les SCLC représentent des carcinomes neuroendocriniens pulmonaires de haut grade et pauvrement différenciés [12].

Les TNEs se divisent aussi en fonction de leur capacité à sécréter des hormones. Elles sont classées en non fonctionnelles et fonctionnelles, ou sécrétantes, dans des proportions d'environ 80% et 20% respectivement [13].

1.5 Clinique

La majorité des TNEs n'est pas sécrétoire. Leur découverte est donc généralement fortuite lors d'exams de routine ou prescrit pour l'investigation d'autres pathologies. Sinon, les symptômes peuvent apparaître lorsque la maladie est plus avancée et qu'il y a des effets de masses, une dysfonction hépatique ou une diminution significative de l'état général.

Pour les patients avec TNEs fonctionnelles, la présentation initiale dans le système de santé est généralement secondaire à des symptômes hormonaux. Les syndromes hormonaux varient beaucoup selon la cellule d'origine [14]. Les TNEs sécrétant de l'insuline, de la gastrine et de la sérotonine sont les plus fréquentes avec des incidences de 1 à 3, 0.5 à 2 et 0.2 à 0.6 par 1 000 000 d'habitants respectivement [15]. Les TNEs provenant du petit intestin sécrètent presque exclusivement de la sérotonine ce qui occasionne le syndrome carcinoïde. Ce syndrome est dû principalement à la sécrétion de sérotonine, mais aussi d'autres substances vasoactives comme la bradykinine, la tachykinine et l'histamine. Il est caractérisé par des bouffées de chaleurs et rougeur au visage, des douleurs abdominales, de la diarrhée, des bronchospasmes et peut causer une atteinte fibrotique du cœur droit [16].

Pour confirmer le diagnostic de TNEs, il doit y avoir les critères pathologiques suivant sur une biopsie : la morphologie neuroendocrine et l'immunomarquage de la chromogranine A et de la synaptophysine. Pour faire un bilan d'extension complet, une tomodensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne est recommandée. Pour les grades 1 et 2, l'imagerie nucléaire est fortement recommandée pour mettre en évidence la présence des SSTR [17]. Cela permet de trouver les métastases manquées à la tomodensitométrie et peut même mettre en évidence l'origine des métastases de TNEs [18]. Parmi les techniques d'imagerie permettant de voir les SSTRs, la tomographie par émission de positron (PET) au ⁶⁸Ga-DOTA-octréotate (⁶⁸Ga-octréotate), le PET-DOTAte, est maintenant reconnu supérieur à la tomographie par émission monophotonique (SPECT) au ¹¹¹In-DTPA-octréotide, couramment appelé Ocréoscan, qui était utilisé depuis les années 1990 [19]. Pour les grades 3, le PET au ¹⁸F-fluorodéoxyglucose (18F-FDG) est plus efficace que le ⁶⁸Ga-octréotate pour compléter le bilan d'extension [20]. En effet, les G3 ont généralement perdu leur différenciation cellulaire et l'expression de SSTR en plus d'être métaboliquement plus actives et de consommer davantage de glucose.

Le pronostic vital dépend de l'étendue de la maladie, du site d'origine et du grade. Si la maladie est locale, régionale ou à distance, la survie médiane est approximativement de plus de 30 ans, de 10,2 ans ou de 12 mois respectivement. Pour une tumeur à distance, la survie médiane est

d'environ 20 mois pour une TNE pancréatique (TNEpanc) et de 6 mois pour une TNE pulmonaire. Les G1 et G2, sans considération au site d'origine, ont une survie médiane de 16,2 ans et 8,3 ans [10]. Les carcinomes neuroendocriniens pulmonaires et digestifs ont une survie médiane de 7,6 et 7,5 mois respectivement [21].

1.6. Traitement des tumeurs neuroendocrines :

Pour l'instant, le seul traitement permettant la rémission complète est l'exérèse totale de la tumeur. Or, au moment où la maladie est métastatique, la chirurgie à visée curative ne peut généralement pas être envisagée. Des traitements systémiques doivent alors être envisagés.

1.6.1 Analogue de la somatostatine

Les analogues de la somatostatine (SSAs) représentent pour l'instant la première ligne de traitement systémique lorsque la TNE présente des SSTRs. Les SSAs ont d'abord été utilisés pour diminuer les symptômes hormonaux liés aux TNEs, mais les études cliniques ont démontré que les patients sous SSA avaient une survie sans progression plus longue que les patients sans SSA. Dans l'étude PROMID, 85 patients avec une TNE de l'intestin moyen bien différenciée et métastatique ont été randomisés entre un placebo et 30mg d'octréotide *long-acting release* (LAR) à injection mensuelle. La survie médiane sans progression était de 14,6 mois dans le groupe traité au LAR et de 6 mois dans le groupe contrôle [22]. Dans l'étude CLARINET, 204 patients avec des TNEs d'origine principalement digestive ont reçu un placebo ou 120 mg de lanréotide, un autre SSA. Après les 27 mois de l'étude, la survie médiane sans progression n'était pas atteinte pour le groupe lanréotide et était de 18 mois pour le groupe placebo [23]. La prolongation de CLARINET a permis d'estimer la survie médiane sans progression du lanréotide à 32 mois et d'établir sa sécurité pour un traitement à long terme [24]. Puisqu'ils contrôlent bien les symptômes hormonaux, qu'ils ralentissent la progression naturelle de la maladie et qu'ils sont bien tolérés par les patients, les SSAs sont rapidement devenus la première ligne de traitement. Cependant, les SSAs ne permettent pas de réduire la taille des tumeurs et n'entraînent pas de rémission.

1.6.2. Chimiothérapie

La chimiothérapie demeure un sujet de débat dans l'algorithme de traitement des TNEs puisque les effets secondaires de ces dernières peuvent rapidement excéder leurs bénéfices, particulièrement lors du traitement des TNEs G1 ou G2. De plus, aucune étude de phase 3 de grande ampleur n'a encore été effectuée et aucun consensus n'existe pour déterminer le traitement de chimiothérapie préférable en première ligne. Le traitement à base de streptozocine (STZ) en combinaison avec du 5-fluorouracil (5-FU) est considérée comme le traitement traditionnel des G1 et G2, particulièrement pour les TNEpancs [25]. Cependant, le régime STZ+5-FU n'a pas démontré sa supériorité par rapport à des régimes différents comme STZ+doxorubicine, 5-FU+doxorubicine, doxorubicine seul, ou interféron seul [26]. Le témozolomide (TMZ), un dérivé oral de la dacarbazine, est de plus en plus utilisé puisqu'il a une formulation orale, il est toléré et son efficacité semble comparable au STZ [27].

Actuellement, la combinaison capécitabine, forme orale du 5-FU, et TMZ (CAPTEM) a démontré un taux de réponse (réponse partielle et stabilité de la maladie) supérieur au STZ+5-FU avec un taux entre 60 et 70% contre 25% sur les TNEpancs et les non-TNEpancs [28, 29]. Bien que les taux proviennent d'études distinctes, le CAPTEM semble démontrer une plus grande efficacité pour traiter les TNEs de bas grade que le STZ+5-FU. Le CAPTEM est généralement toléré par les patients et est pratique puisqu'il se donne complètement sous la forme orale, d'où l'intérêt croissant pour ce régime de traitement allant jusqu'à son utilisation en combinaison avec la PRRT [30].

1.6.2.1 Mécanisme d'action du témozolomide

Le TMZ est un agent alkylant qui crée principalement des dommages à l'ADN appelés oxygène(6)-méthylguanine (O6MeG). L'O6MeG peut être réparé directement par l'enzyme de réparation de l'ADN O(6)-méthylguanine méthyltransférase. En absence d'O(6)-méthylguanine méthyltransférase ou lorsqu'il y a une surabondance de O6MeG, la lésion persiste et sera jumelée à une thymine lors de la réplication [31]. Le couple O6MeG/T sera reconnu par les enzymes de la réparation des mésappariements (MMR) qui ne sélectionneront pas nécessairement le bon brin à réparer et remplaceront une thymine. Cela mène à une mutation de transition GC vers AT. De plus, comme il reste un mésappariement après le MMR, il y a un cycle perpétuel qui débute, nommé MMR futile. Ce MMR futile peut causer des affaissements de la fourche de réplication entraînant des cassures double brin à l'ADN (CDB). Les CDB créés par le TMZ seront principalement réparés par recombinaison homologue (HRR) et non par réparation par jonction d'extrémités non homologue (NHEJ) [32, 33].

1.6.2.2. Mécanisme d'action du 5-fluorouracile

Le 5-FU est un antimétabolite de l'uracile et sa principale action est d'inhiber l'enzyme thymidylate synthase, responsable de synthétiser la thymidine. Le 5-FU est toxique pour les cellules selon trois mécanismes, soit en inhibant la thymidylate synthase via le fluorodéoxyuridine monophosphate (FdUMP), en s'intégrant dans l'ADN via le métabolite fluorodéoxyuridine (FdUTP) ou en s'intégrant dans l'ARN via le fluorouridine triphosphate.

Le 5-FU est phosphorylé à son entrée dans la cellule en fluorodeoxyuridine puis transformé par l'enzyme thymidine kinase en FdUMP. Le FdUMP se lie de manière irréversible à la thymidylate synthase inhibant la synthèse de déoxythymidine monophosphate. L'épuisement secondaire des réserves de déoxythymidine triphosphate (dTTP) entraîne un déséquilibre des ratios de nucléotides qui a pour conséquence l'interruption de la réparation ou de la synthèse de l'ADN [34]. De plus, le déoxyuridine triphosphate (dUTP) non converti en dTTP et le FdUTP provenant de l'excès de FdUMP s'incorporent à l'ADN et créent des lésions toxiques. L'enzyme uracile ADN glycosylase est responsable de la réparation de ces lésions et déclenchera la réparation par excision de base (BER) [35]. Or, la réparation est futile puisque le ratio FdUTP/dTTP est encore très faible. La réparation incorporera donc encore des dUTP ou des FdUTP dans l'ADN. Les cycles répétés de réparation peuvent créer des CDB qui doivent être réparés par la HRR [36]. Finalement, le 5-FU peut aussi

s'incorporer dans l'ARN via le fluorouridine triphosphate [37]. La toxicité de l'intégration du 5-FU dans l'ARN est encore méconnue.

1.6.3. Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées actuellement approuvées par la *Food and Drugs Administration* (FDA) pour traiter les TNEpancs, soient l'everolimus et le sunitinib, se basent sur deux caractéristiques propres aux TNEs, : les mutations dans le réseau PI3K/AKT/mTOR et la grande vascularisation des TNEs.

La protéine *Mammalian target of rapamycin* (mTOR) est impliquée dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire [38]. Dans les TNEs, le réseau associé à mTOR est souvent touché par des mutations. Ces dernières sont présentes autant dans les formes familiales de TNEs (Multiple endocrine neoplasia-1, Neurofibromatose-1, Von Hippel-Lindau) [39-41] que les formes sporadiques [42]. Son implication dans les TNEs a été démontrée dans les essais cliniques RADIANT 3 et 4. En effet, l'everolimus, un inhibiteur de la protéine mTOR, a été démontré plus efficace qu'un placebo pour augmenter la survie médiane sans progression chez 401 patients avec TNEpancs et 302 patients avec des TNEs digestives ou pulmonaires [43-45].

Les TNEs sont généralement très vascularisées et la vascularisation a tendance à se désorganiser avec la malignité des TNEs [46]. Un des médiateurs les plus importants de la néovascularisation par angiogenèse, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), est présent en abondance dans les TNEs. Il serait associé à la tumorigenèse des TNEs et possiblement à leur transformation métastatique [47, 48]. Sur ce principe, le sunitinib malate, un inhibiteur des tyrosines kinases associées aux récepteurs du VEGF, a été testé dans une étude de phase 3 randomisée, à double insu de 171 patients avec des TNEs bien différenciés. Le sunitinib à 37,5 mg par jour a augmenté la survie médiane sans progression à 11,4 mois comparativement à 5,5 mois pour le placebo sans modifier la qualité de vie des patients et tout en étant sécuritaire [49].

2. La thérapie radionucléidique (PRRT)

2.1. Principes :

La PRRT consiste à coupler un isotope radioactif émettant des rayonnements alpha, bêta ou de conversion électronique à un peptide. Ce radiopeptide est ensuite injecté dans la circulation sanguine du patient et rejoint préférentiellement la surface de tumeurs ayant une expression anormalement élevée de récepteurs peptidiques. Les rayonnements peuvent alors atteindre les noyaux des cellules pour provoquer des dommages à l'ADN et entraîner la mort cellulaire. Présentement, l'application clinique de la PRRT est presque exclusivement concentrée sur le traitement des TNEs, mais le concept est applicable à toutes les tumeurs ayant un niveau élevé de récepteurs pouvant être ciblés.

Une majorité des TNEs présentent des SSTRs à leur surface. Cela a permis l'usage de SSA radiomarqués pour le diagnostic de ces tumeurs. Dans les années 1980, l'iode-123 couplé à un Tyr³-octréotide a été injecté chez des patients ayant différentes TNEs ce qui a permis de localiser des

tumeurs primaires ainsi que des métastases non diagnostiquées [50]. Ensuite, l'isotope indium-111 couplé à l'octréotide a remplacé l'iode-123. L'indium-111 émet deux rayonnements gamma de 172 et 245 keV qui s'imagent par SPECT. L'émission d'électron de Auger par l'indium-111 a donné une application thérapeutique au radioisotope, en plus d'être un outil diagnostique. Cependant, malgré des doses élevées de radioactivité, l'indium-111 ne permettait pas des réductions importantes de la charge tumorale et a rapidement été jugé inférieur aux émetteurs bêta développés quelques années plus tard, le yttrium-90 et le lutécium-177 [51]. Entre ces deux isotopes, le lutécium-177 a été préféré puisqu'il est moins toxique tout en ayant une efficacité comparable [52].

Le médicament radiopharmaceutique accepté par la FDA est le ^{177}Lu -octréotate sous le nom commercial Lutathera. L'octréotate est un SSA spécifique aux SSTR2 qui semble avoir un meilleur ratio tumeur/tissu sain que l'octréotide [53]. L'acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique (DOTA) agit comme double chélateur. Le lutécium-177 émet un rayonnement thérapeutique de type bêta à basse énergie (0.497MeV) qui a une pénétrance maximale d'environ 1,6 mm. Le lutécium-177 émet aussi un rayonnement gamma (200keV) qui permet d'imager la thérapie par SPECT et de quantifier les doses absorbées par les tumeurs et les différents organes. Le ^{177}Lu a une demi-vie de 6,5 jours ce qui permet son transport et son utilisation sur plusieurs jours après sa production en conservant une bonne activité spécifique et sans causer des déchets radioactifs sur une longue période.

Une fois dans le sang, le ^{177}Lu -octréotate se distribue dans les parties hydrophiles et se fixe sur les SSTR, principalement SSTR2. Son rayonnement bêta a une portée maximale de 2mm dans les tissus, permettant l'irradiation de la cellule ciblée et des cellules environnantes. En se fixant sur le récepteur, le ^{177}Lu -octreotate déclenche une cascade enzymatique entraînant l'internalisation du composé radiopharmaceutique via la bêta-arrestine [54]. Dans l'endosome, le pH s'acidifie et entraîne la séparation du ^{177}Lu -octréotate au SSTR. Par sa nature synthétique, l'octréotate n'est pas détruit par l'endopeptidase de l'endolysosome [55, 56]. La majorité du ^{177}Lu -octréotate semble rester dans la cellule, alors qu'une grande partie des SSTRs est recyclée à la surface [57]. La localisation du ^{177}Lu -octréotate après sa séparation du SSTR est inconnue. En recyclant les SSTRs, il est possible d'accumuler davantage de ^{177}Lu -octréotate lors des passages subséquents du radiotraceur dans le sang.

2.2 Traitement des TNEs

Tel que mentionné précédemment, la PRRT a été développée depuis les années 1980 à travers d'innombrables travaux de recherches. Ces travaux ont culminé par l'approbation de la PRRT par la FDA grâce à une étude de phase 3 randomisée et multicentrique. Dans cette étude, la PRRT au ^{177}Lu -octréotate a démontré une efficacité supérieure au LAR à haute dose. 229 patients avec des TNEs digestives ont été randomisés; 116 patients ont reçu chaque semaine pour 8 semaines 7,4GBq de ^{177}Lu -octréotate et 113 patients ont reçu 60mg de LAR en intramusculaire chaque mois. Le taux

de survie sans progression à 20 mois était de 65% dans le groupe ^{177}Lu -octréotate comparativement à 10.8% dans le groupe LAR. Le taux de réponse était de 18% avec 1 cas de réponse complète chez les patients traités au ^{177}Lu -octréotate comparativement à 3% de réponse pour les patients traités avec le SSA [58]. L'analyse subséquente de cette étude a aussi démontré que la PRRT améliorait la qualité de vie de manière significative et prolongée dans le temps [59].

2.3 Limites

La PRRT peut entraîner des effets secondaires significatifs principalement sur le rein et la moelle osseuse. La toxicité à long terme sur ces organes est importante à considérer puisque l'espérance de vie des patients avec TNE est généralement longue après le diagnostic et sera significativement allongée par les traitements de PRRT.

La toxicité rénale est due à l'importante quantité de radiation absorbée par le rein secondairement à la réabsorption tubulaire du radiotraceur. Le ^{177}Lu -octréotate a une excrétion rénale, mais le système de récepteur mégaline/cubuline en permet la réabsorption entraînant une accumulation dans le cortex rénal [60]. L'usage d'acides aminés chargés positivement, principalement la lysine et l'arginine, a réduit la réabsorption de ^{177}Lu -octréotate et donc la radiation absorbée par les reins rendant les effets secondaires tolérables [61]. Dans une étude rétrospective examinant 323 patients traités au ^{177}Lu -octréotate suivis sur une période d'un à trois ans après leurs traitements, seul un patient a eu une baisse aiguë et transitoire de sa clairance de la créatinine (CICr) et aucun patient n'a eu de baisse de CICr supérieur à 20% par an [62]. Une étude de cohorte de 74 patients traités au ^{177}Lu -octréotate sans administration d'acides aminés suivis sur 21 n'a pas mis en évidence de toxicité rénale sur le long terme même si une légère diminution de la CICr est observée dans le temps [63]. Dans ces deux études, l'hypertension, le diabète, un âge supérieur à 70 ans et une dose totale supérieure à 22,2 GBq ne sont pas des facteurs de risque pouvant entraîner une perte significative de CICr par an [62, 63]. Un des seuls facteurs prédisant une détérioration statistiquement significative de la fonction rénale est une CICr abaissée ou une valeur de créatinine sérique élevée avant traitement [64]. La dose limite actuelle aux reins de 23 Gy, empruntée à la radiothérapie externe, n'est peut-être pas applicable à la PRRT au ^{177}Lu -octréotate chez les patients avec des reins sains. De plus, il y a une grande variabilité interindividuelle de l'irradiation rénale par dose de ^{177}Lu -octréotate injectée qui, lorsqu'elle est calculée par dosimétrie, permet de délivrer de plus grande dose de radioactivité aux tumeurs sans dépasser le seuil de 23 Gy aux reins [65].

La toxicité à la moelle osseuse demeure limitante et difficile à contourner. Actuellement, la dose maximale absorbée à la moelle osseuse est de 2 Gy. Ce seuil sécuritaire a été établi en se basant sur la toxicité des traitements à l'iode-123 pour le cancer de la thyroïde. En général, la moelle osseuse accumule une dose entre 1,6 et 2 Gy en 4 cycles de traitement de PRRT. Un des facteurs impliqués dans la toxicité à la moelle osseuse est le temps de résidence du ^{177}Lu -octréotate dans le corps, critère qui peut être affecté par la taille de la tumeur et la fonction rénale [66, 67]. Le nombre de

globules blancs abaissé et l'âge supérieur à 70 ans semblent pour leur part être prédicteurs de myélotoxicité [67, 68]. En général, la PRRT cause des effets secondaires aigus de sévérité modérée et généralement réversibles [64, 66, 67]. Dans deux études de cohorte sur 203 et 274 patients présentant des TNEs gastroentéropancréatiques avec un suivi médian de 31 mois et 29 mois, les taux de dysfonction myéloïde incluant les syndromes myélodysplasiques, myéloprolifératifs, les leucémies aiguës et des anomalies hématologiques graves persistant plus de 6 mois étaient de 1,4% et de 4% par étude [68, 69]. En comparant avec une population saine, le risque relatif de développer une dysfonction myéloïde après avoir reçu de la PRRT est estimé à 2,7 [69]. Ainsi, la toxicité à la moelle osseuse est surtout aiguë et affecte une minorité de patients à long terme. Il faut tout de même être prudent lors de la combinaison d'autres agents ayant une toxicité hématologique avec le ¹⁷⁷Lu-octréotate.

La plus grande limitation reste la composante biologique propre à chaque TNE, soit l'expression de SSTR. S'il n'y a pas de captation supérieure à l'expression du foie ou de la rate à l'Octéoscan ou au PET-DOTATate, la TNE ne pourra pas être traitée avec la PRRT.

2.4 Type de dommages à l'ADN

L'électron émis par le lutécium-177 a un faible transfert d'énergie linéique. Donc, les deux tiers des dommages qui seront causés par le lutécium seront le résultat de l'ionisation de l'eau et de la création subséquente de radicaux libres (ROS) [70]. Ces ROS peuvent causer des cassures de l'ADN simple brin, des CDB, des sites abasiques et l'oxydation de purine ou de pyrimidine. Les dommages causés par les ROS issus de la radioactivité sont généralement plus néfastes que les ROS endogènes. En effet, les ROS issus de la radioactivité forment davantage d'amas de lésions. Chaque amas contient entre deux et cinq lésions, les amas de cinq lésions étant plus rares que les amas de deux lésions. Ces amas rendent la réparation difficile, voire impossible, ce qui génère des erreurs menant à davantage de CDB et d'évènements mutagènes [71]. Le pic d'apparition des CDB causés par le ¹⁷⁷Lu-octréotate est souvent retardé ce qui peut s'expliquer partiellement par l'échec initial des mécanismes de réparation de l'ADN [72-74].

2.5 Réparation des dommages à l'ADN après la PRRT

La réparation de l'ADN secondairement aux dommages causés spécifiquement par la PRRT a peu été étudiée. Or, les mécanismes de réparation des dommages oxydatifs et des CDB sont connus et sont les plus utilisés par les cellules après la PRRT.

2.5.1 Réparation par excision de bases

La BER est très sollicitée puisqu'elle répare les dommages oxydatifs. Le BER se décline en deux formes : la réparation court ou long segment. Les deux mécanismes débutent par la reconnaissance d'un dommage à une base par un ADN glycosylase spécifique à chaque type de lésion potentielle [75]. Il y a ensuite excision de cette base, ce qui forme un site abasique. Le site abasique est ensuite

clivé par une endonucléase résultant à un dommage à l'ADN simple brin [76]. À ce moment, chaque forme a ses médiateurs uniques [77]. La BER court segment synthétisera uniquement le nucléotide manquant avec la polymérase bêta et liera le bris à l'ADN simple brin résiduel avec les protéines X-ray repair cross-complementing protein 1 et ADN ligase. La BER long segment utilise les polymérases delta ou epsilon qui continueront la synthèse nucléotidique au-delà du site abasique créé ce qui génère un brin d'ADN surnuméraire. Après 2 à 10 nucléotides, l'élongation cessera, le brin d'ADN surnuméraire sera clivé et ensuite les extrémités nouvellement synthétisées du segment seront liées à l'ADN mère par une ligase. La BER court segment est la forme de BER la plus utilisée. Le choix entre une forme ou une autre dépend, entre autres, de la glycosylase initiale et du type de cellule [78].

2.5.2 Réparation des dommages aux doubles-brins de l'ADN

Plusieurs mécanismes existent pour effectuer la réparation des CDBs causées directement par la radiation ou indirectement à la suite d'erreurs lors de la BER. Il y a deux mécanismes prépondérants : la réparation par NHEJ et par HRR.

La NHEJ est le mécanisme de réparation des CDB par défaut. Il est présent à travers l'ensemble du cycle cellulaire. Ce sont les protéines Ku70 et Ku80 qui reconnaissent la CDB le plus rapidement et permettent le recrutement des protéines de NHEJ, comme DNA-PKC. Les protéines de la NHEJ vont tronquer les deux extrémités de l'ADN scindées par l'irradiation pour ensuite les lier ensemble [79]. Il y a donc une perte de matériel génétique. La NHEJ est toujours présente, rapide et efficace, mais peut créer davantage d'évènements mutagènes que la HRR.

La HRR permet de réparer les CDBs principalement lorsque la cellule possède une chromatide sœur, soit dans les phases S ou G2 du cycle cellulaire. En effet, la HRR a besoin d'une séquence d'ADN homologue qui sert de guide pour assurer la réparation sans erreur d'une CDB. Un premier complexe composé de Mre11-Rad50-Nbs1 permet la préparation de brin d'ADN simple brin qui servent à trouver l'homologie et à envahir la chromatide sœur à partir des extrémités scindées d'ADN. Il y a ensuite une cascade enzymatique, incluant entre autres BRCA1, BRCA2 et RAD51, qui permettra d'assurer la HRR.

Autant la NHEJ que la HRR vont être associées à une réponse cellulaire initiale médiée par les protéines *ataxia-telangectasia mutated* et *ataxia and Rad3-related*. Ces kinases phosphorylent des cibles importantes pour assurer une réparation de l'ADN adéquate, notamment le variant d'histone H2AX, p53 et les kinases de points de contrôle du cycle cellulaire CHK1 et CHK2. La phosphorylation de H2AX (γH2AX), un marqueur de CDB, permet l'ouverture de la chromatine et crée une plateforme pour le recrutement d'autres partenaires nécessaires à la réparation de l'ADN. La phosphorylation de p53 et de CHK1 ou CHK2 permet de freiner la progression dans le cycle cellulaire et, si les dommages sont trop importants, d'entraîner la mort cellulaire.

3. Potentialisation de la PRRT

D'innombrables avenues sont possibles pour améliorer les traitements de PRRT. Comme pour les traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie externe, les combinaisons de deux ou plusieurs approches pour éliminer un cancer sont à explorer pour la PRRT. Des molécules pour augmenter la perfusion des tumeurs et la délivrance du ^{177}Lu -octréotate, pour augmenter le nombre de SSTRs ou pour augmenter la toxicité des dommages à l'ADN induit par la radioactivité permettraient d'augmenter l'efficacité de la PRRT pour les TNEs.

De plus, comme la PRRT reste un traitement récent dans les TNEs avec une trentaine d'années d'études et seulement deux ans d'approbations par la FDA, l'optimisation de la technique elle-même est aussi à considérer. Des améliorations de la voie d'administration, du type de radioisotope, du ligand aux SSTRs, de la dosimétrie, des combinaisons de radioisotopes ou des méthodes de radioprotection pour la moelle osseuse ou les reins pourraient permettre d'augmenter l'efficacité de la PRRT.

3.1 Poly(ADP-ribose) polymérase

3.1.1 Famille des PARP

La grande famille des poly(adénosine-diphosphate(ADP)-ribose) polymérase (PARP) regroupe 17 protéines qui possèdent un domaine catalytique similaire pouvant transformer la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) en ADP-ribose pour le lier à l'ADN ou des protéines. La protéine poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP-1) est le membre de la famille le plus abondant et, avec PARP-2 et PARP-5a/b, elles sont les seules de la famille à pouvoir créer des polymères d'ADP-ribose [80]. PARP-1 est une protéine nucléaire ubiquitaire impliquée dans plusieurs processus biologiques notamment la réparation des dommages à l'ADN, le remodelage de la chromatine, l'inflammation et la mitose [81-83].

3.1.2 Rôle de PARP-1 dans la réparation de l'ADN

Dans les cellules de mammifères, PARP-1 est parmi les premières protéines à se lier à différents types de dommages à l'ADN [81]. En ce sens, PARP-1 est présente dans presque tous les mécanismes de réparation de l'ADN dans la cellule eucaryote, telles que la BER, la réparation par excision de nucléotides, la HRR et une version alternative de la NHEJ [84]. Son rôle est particulièrement étudié dans la BER secondairement à son implication clinique dans les cancers du sein et des ovaires mutés dans les gènes BRCA. Dans la BER, PARP-1 a pour rôle de reconnaître les dommages à l'ADN simple brin [85] et de recruter les protéines initiatrices de la réparation [86].

3.1.3 Action des inhibiteurs de PARP

3.1.3.1. Principe

Le principe fondateur pour l'utilisation d'inhibiteur de PARP (iPARP) en traitement oncologique est la létalité synthétique. Ainsi, dans une tumeur ayant un ou des mécanismes de réparation de l'ADN

intrinsèquement déficients, bloquer l'action d'un mécanisme de réparation compensatoire peut entraîner la mort cellulaire. Initialement, ce sont des travaux menés sur des lignées cellulaires ayant les gènes BRCA mutés qui ont mis en évidence l'efficacité des iPARPs. Ces derniers ont été ensuite approuvés par la FDA pour le traitement des cancers ovariens avec mutation des gènes BRCA [87, 88]. Les iPARP, en bloquant principalement la BER, ne permettent pas la réparation de dommages simples à l'ADN causant des CDBs. Les gènes BRCA1 et 2 étant impliqués dans la HRR, leur inactivation force la cellule à réparer les CDBs par la NHEJ ou à s'orienter vers une mort cellulaire si la charge de dommage est trop importante.

Les iPARP entravent la BER en bloquant l'activité enzymatique de PARP-1 limitant ainsi le recrutement des protéines initiatrices de la BER. Cependant, les mécanismes d'action des iPARP pour entraver la réparation de l'ADN se sont étendus [89]. Tout d'abord, les iPARP peuvent séquestrer PARP-1 sur les brins d'ADN endommagés limitant l'espace disponible aux autres protéines nécessaires à la réparation. Ensuite, les iPARP peuvent aussi inhiber l'activité enzymatique des PARP-1 impliqué dans d'autres mécanismes de réparation de l'ADN, principalement la version alternative de la NHEJ. Malgré toutes ces entraves au fonctionnement de PARP-1 qui occasionnent notamment des CDB, les cellules saines peuvent généralement faire les réparations à l'ADN et éviter l'apoptose.

Les iPARP sensibilisent les cellules aux dommages à l'ADN. Un traitement non létal peut le devenir en combinaison avec les iPARP. L'équilibre fragile entre la réparation des dommages et la survie cellulaire s'oriente généralement vers la mort cellulaire lorsqu'un iPARP est combiné à un agent toxique comme la chimiothérapie ou la radiothérapie [90, 91].

3.1.3.2. Dans les TNEs

Dans le cas des TNEs, il n'y a pas a priori de mutation germinale dans les gènes BRCA. Cependant, la PRRT est une source exogène de dommage à l'ADN simple brin et double brin. En créant d'innombrables dommages à l'ADN simple brin via les ROS et en inhibant leur réparation, il y a une augmentation de la quantité totale de CDB dans les cellules tumorales ce qui est hautement toxique.

Les iPARPs ont déjà été utilisés dans des modèles cellulaires de TNEs. L'iPARP a eu un effet synergétique avec le TMZ pour le traitement de cellules de TNE pulmonaires (NCI-H727) et de TNEpancs (BON-1) [92]. Pour la PRRT, Nonnekens *et al.* a démontré que les iPARP peuvent stimuler la mort cellulaire causée par le ¹⁷⁷Lu-octréotate dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome (U2OS) transfectée avec le gène de SSTR2. Chez des patients ayant une TNE traitée par PRRT, ils ont aussi observé l'accumulation de dommages à l'ADN dans les échantillons *ex vivo* traités avec des iPARP [72]. Cullinane *et al.* a utilisé un modèle *in vivo* de cellules murines de tumeur pancréatique exocrine qui exprime les SSTRs et a pu démontrer l'efficacité de la combinaison iPARP + ¹⁷⁷Lu-octréotate par rapport à chacun des traitements seuls [93]. Ces résultats indiquent un potentiel intéressant pour la

thérapie combinée, mais il y a peu de données sur l'efficacité de la combinaison iPARP + PRRT sur des TNEs humaines.

3.2 Chimiothérapie

3.2.1 Combinaison

Il y a présentement plusieurs projets de recherches combinant des traitements de chimiothérapies conventionnelles avec la PRRT. Les principes de cette combinaison sont de rendre les TNEs plus sensibles à la radiation ou encore d'ajouter une charge supplémentaire de lésions à l'ADN.

Les chimiothérapies actuellement étudiées en clinique sont celles ayant démontré une efficacité dans le traitement des TNEs, soit le 5-FU et le TMZ. La capécitabine, la forme orale du 5-FU, a d'abord été étudiée et a démontré une efficacité, particulièrement pour les tumeurs métaboliquement actives [94, 95]. La combinaison CAPTEM a ensuite été privilégiée et a été démontrée sécuritaire même chez des patients avec TNEs G1-G2 [96, 97]. En plus d'être sécuritaire, la combinaison CAPTEM-PRRT semble offrir des taux de réponse plus élevés que la PRRT seule et sur une plus longue durée [30]. Bien qu'elle reste sécuritaire et efficace, le CAPTEM-PRRT n'a pas encore été étudié dans une étude de phase III et la toxicité hématologique de la combinaison est à surveiller [98, 99].

3.2.2 Augmentation des récepteurs de la somatostatine

La chimiothérapie pourrait aussi être utilisée pour améliorer la PRRT, mais d'une tout autre manière que la cytotoxicité. Il a été observé que certains agents de chimiothérapie augmentent l'expression des SSTRs ou augmentent l'internalisation de radiotraceurs. Par ce principe, pour une dose équivalente de radiotraceurs, une tumeur traitée préalablement par la chimiothérapie recevrait davantage de radiation.

Les premiers signaux viennent d'études précliniques. Des lignées cellulaires de néoplasies pancréatiques exprimant les SSTRs ont été traitées à la gemcitabine. La première étude a démontré une modification de l'expression des SSTRs [100]. L'étude subséquente a démontré une augmentation de l'internalisation du radiotraceur, un arrêt du cycle cellulaire et une augmentation de l'apoptose dans les cellules d'adénocarcinome pancréatiques et de TNEs pulmonaires prétraitées à la gemcitabine et ensuite exposées au ¹⁷⁷Lu-octréotate [101].

Les observations cliniques sont mieux catégoriques. Quelques cas sont rapportés où, après un traitement de chimiothérapie au 5-FU, une augmentation de la captation de ⁶⁸Ga-octréotate a été observée [102]. Alors que dans une série de 10 patients traités par CAPTEM, aucune augmentation de la captation de radiotraceur n'a été observée sur une période 15 jours [103]. Il reste néanmoins que la chimiothérapie conventionnelle semble avoir un effet sur la régulation de l'expression de SSTR2, particulièrement chez les TNEs ayant une expression faible de SSTR2 [104]. Les mécanismes moléculaires liant l'effet des agents de chimiothérapies à l'augmentation de SSTR2 ne sont pas connus. D'autres agents pouvant causer des effets similaires à la chimiothérapie dans les

cellules, la radiation ou les modificateurs épigénétiques, ont démontré une augmentation de l'ARN messager de SSTR2 [105-107]. En comprenant davantage la relation entre les dommages à l'ADN causés par la chimiothérapie et l'expression de SSTR2, la chimiothérapie pourrait être mieux utilisée pour le traitement des TNEs en combinaison avec la PRRT.

Hypothèses :

L'effet thérapeutique de la PRRT peut être potentialisé de multiples manières notamment en augmentant la létalité des dommages à l'ADN causés par le ^{177}Lu -octréotate ou en augmentation l'internalisation du radiotracteur.

Objectifs :

- 1) Explorer les différentes stratégies de traitement combiné pouvant potentialiser la PRRT
- 2) Potentialiser le traitement de PRRT par les iPARPs dans un modèle 3D *in vitro*
- 3) Induire une augmentation de l'expression de SSTR2 dans des lignées cellulaires de TNEs avec des traitements de témozolomide et de 5-fluorouracil

Chapitre 1 :

Combination treatments to enhance peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumours

Authors : Samuel Adant^{1,2}, Girish M. Shah², Jean-Mathieu Beaugard¹.

Affiliation : ¹Department of Radiology and Nuclear Medicine and Cancer Research Center, Université Laval, Quebec City, Canada; Department of Medical Imaging and Oncology Branch of CHU de Québec Research Center, CHU de Québec – Université Laval, Quebec City, Canada. ²Laboratory for Skin Cancer Research, CHU de Québec – Université Laval Research Center (CHUL site), Quebec City, Canada.

Corresponding author:

Jean-Mathieu Beaugard, M.D., M.Sc., FRCPC

Nuclear Medicine, CHU de Québec – Université Laval

11 côte du Palais

Quebec City (QC)

G1R 2J6

Canada

email: jean-mathieu.beaugard@chuq.qc.ca

phone: +1-418-525-4444, ext. 15455

fax: +1-855-420-5871

Avant-propos

Voici un article de revue de la littérature sur les modalités de traitement combinatoire pour améliorer la thérapie radionucléidique accepté avec révision par les pairs par l'European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.

J'ai fait la recherche des articles, l'écriture de l'article, le brouillon des figures. Mes deux superviseurs de stages ont participé aux étapes de révision du manuscrit avec moi. Émilie Dubois, graphiste scientifique, a créé les versions finales des figures 1 et 2.

Adant S, Shah GM, Beauregard JM. Combination treatments to enhance peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2020;47(4):907-921. doi:10.1007/s00259-019-04499-x

Résumé

L'incidence des tumeurs neuroendocrines (TNEs) est en croissance constante dans les dernières années, mais les options thérapeutiques curatives sont limitées, car le diagnostic est souvent porté lorsque la maladie est métastatique. La thérapie radionucléidique via les récepteurs ou *peptide receptor radionuclide therapy* (PRRT) est l'une des approches les plus prometteuses pour traiter les TNEs métastatiques puisqu'elle a une toxicité relativement faible et une administration ciblée de la radioactivité grâce aux récepteurs de la somatostatine. Cependant, les traitements actuels de PRRT sont palliatifs plutôt que curatifs étant donné la limitation imposée par la toxicité aux organes non ciblés et sensibles, comme le rein et la moelle osseuse. Il est donc nécessaire d'améliorer la PRRT pour les TNEs notamment par des traitements combinatoires pour augmenter les effets de la radiothérapie interne en épargnant les organes non ciblés. Dans cette revue, nous mettons en lumière les stratégies existantes et potentielles pour améliorer le traitement des TNEs par la PRRT au ^{177}Lu -octréotate. Ces stratégies pourraient aussi s'appliquer à d'autres thérapies utilisant les radionucléides. Ces stratégies incluent la co-administration de médicaments pour augmenter la captation du radiopeptide soit par l'augmentation de la perfusion tumorale ou par l'augmentation de la densité de récepteurs à la surface tumorale. Alternativement, d'autres stratégies portent sur la potentialisation de l'effet biologique induit par les dommages à l'ADN causés par la radiation ou sur l'augmentation de la quantité de dommages à l'ADN dans les cellules tumorales pour amplifier la toxicité de la PRRT. Nous proposons également un algorithme de décision clinique pour identifier quels patients atteints d'une TNE bénéficieraient le plus des différentes stratégies proposées. Considérant que la PRRT est maintenant approuvée dans la majorité des pays occidentaux comme un standard de traitement pour les patients atteints de TNEs, les stratégies pour améliorer la PRRT pourraient être rapidement transposées en clinique.

Abstract

The incidence of neuroendocrine tumors (NETs) is increasing but curative therapeutic options are limited because diagnosis is often delayed until the tumor has metastasized. Peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) is among the most effective therapeutic options for metastatic NETs because of targeted delivery of radioactivity to the tumor via the somatostatin receptor (SSTR) and relatively low systemic toxicity. However, current PRRT regimens result in palliation rather than cure, and higher doses of PRRT that might achieve remission would also be too toxic to the patients. Therefore, there is a need to improve PRRT of NETs by combining it with other agents to achieve maximum benefits from the internal radiation therapy, while sparing non-target organs from radiation toxicity. Here we review various current and potential combination strategies to improve ¹⁷⁷Lu-octreotate-based PRRT of NET, some of which could also apply to other radionuclide therapies. These strategies include co-administered drugs that improve delivery of the radiopharmaceutical via increased tumor perfusion or through increased SSTR density at tumor surface. Other strategies are aimed at enhancing the biological effects of the radiation-induced DNA damage in tumor cells, or generating additional DNA damage burden to effectively increase the cytotoxicity of PRRT. We also propose a clinical decision algorithm for stratifying NET patients for their eligibility to receive either direct or combination therapy with PRRT. Considering that PRRT and many of these combination agents are used for treating NET and other cancer patients, our proposed strategies to improve the efficacy of PRRT could be rapidly translated into the clinic.

Keywords: Neuroendocrine tumors, peptide receptor radionuclide therapy, ¹⁷⁷Lu-octreotate, ¹⁷⁷Lu-DOTATate somatostatin receptor, radiosensitization, receptor upregulation, tumor perfusion, DNA damage.

Introduction

Neuroendocrine tumours (NETs) are a heterogeneous group of rare tumours that arise from the diffuse neuroendocrine cells throughout the body, but occur more frequently in the gastroenteropancreatic and lung tissues [1]. NETs present a wide range of clinical presentations depending on their origin from among 15 or more types of precursor NET cells, and the hormones and bioactive substances they secrete, which determine their functioning or non-functioning status [2]. Unlike most other cancers, there has been a constant increase in the incidence of NETs over the last decades, reaching 5.86 and 6.98 new cases per 100,000 population in Canada and in the USA, respectively [3, 4]. While surgery is a curative option, it is not available for about 60% of NET patients either presenting with or developing metastases during follow-up [3]. Since NETs often overexpress somatostatin receptors (SSTRs), the first-line treatment consists in the administration of longacting somatostatin analogues (SSAs) which have been shown to prolong progression-free survival with long-lasting control of hormonal symptoms and growth inhibition of NET in phase 3 randomized clinical trials [5, 6]. Conventional chemotherapy is better suited for more aggressive NETs, such as those of grade 3, and neuroendocrine carcinoma [7], but it has a limited efficacy against the majority of NETs, which are welldifferentiated tumours [8, 9]. Some biotherapies, such as everolimus and sunitinib, are now established treatments against pancreatic NETs, but yield modest objective response rates [10, 11]. The peptide receptor radionuclide therapy (PRRT), a systemic targeted radionuclide therapy utilizing radiolabelled SSAs, has been developed as a palliative treatment for NETs over the last three decades [12, 13].

Peptide receptor radionuclide therapy

The cellular target of PRRT is SSTR, a member of the G protein–coupled family of receptors, and has five subtypes (SSTR 1–5), of which SSTR2 is overexpressed by the majority of NETs [14]. In normal and NET cells, a transient binding by somatostatin to the extracellular N-terminal domain of the SSTR results in G protein phosphorylation events at the intracellular C-terminal domain of the receptor (Fig. 1) [15]. This leads to the inhibition of various cAMP- or calcium channel– mediated downstream events that suppress various cellular responses including hormonal secretion and growth of NET cells [16]. Somatostatin-bound receptors are internalized through the β -arrestin pathway, and the free intracellular SSTR is either degraded or recycled back to the plasma membrane [17] (Fig. 1). Unlike somatostatin, the SSAs such as octreotide or lanreotide resist the proteolytic degradation from endosomal proteases [17, 18], remain longer in the systemic circulation, and can undergo repeated cycles of engagement with SSTRs [19] (Fig. 1).

SSAs, mostly octreotide and octreotide derivatives, have been labelled with various radionuclides for molecular imaging and PRRT of NETs [20]. ^{111}In -DTPA-octreotide has been used for both imaging and therapy, while ^{90}Y -DOTA,DPhe1,Tyr3]octreotide (a.k.a. ^{90}Y -DOTATOC) and

[¹⁷⁷LuDOTA0,Tyr3]octreotate (a.k.a. ¹⁷⁷Lu-octreotate or ¹⁷⁷LuDOTATATE) have been the most studied PRRT radiopharmaceuticals [21]. Among these, ¹⁷⁷Lu-octreotate has become the preferred PRRT agent, because ¹⁷⁷Lu emits medium-energy (177–498 keV) β particles having an average penetration of 0.25 mm or about 125 cells deep (and maximum penetration of ~ 2 mm), which is associated with a higher efficacy than Auger electron–emitting ¹¹¹In-DTPA-octreotide, and low toxicity than ⁹⁰Y-octreotide, which releases more penetrating β particles. Further, the low abundance of medium-energy γ photons (208 keV) of ¹⁷⁷Lu facilitates post-therapy imaging and dosimetry. The emitted particles cause radiation-induced DNA strand breaks and indirect reactive oxygen–mediated DNA damage, both of which need to be repaired for survival of cancer cells (Fig. 1). If not repaired, DNA damage can lead to apoptosis or senescence of the PRRT-treated cancer cells. The toxic effect of radiation emanating from ¹⁷⁷Lu starts from the moment it binds to the SSTR on plasma membrane and continues throughout the process of the degradation of the peptide components of ¹⁷⁷Lu-octreotate in lysosomes and endosomes (Fig. 1). As such, the radionuclide liberated from the peptide and receptor could continue to accumulate in the cell and cause toxic radiation damage for several days until it decays or is eliminated from the cell (Fig. 1), similar to what has been shown for ¹¹¹In in the cells treated with ¹¹¹In-DTPAoctreotide [22]

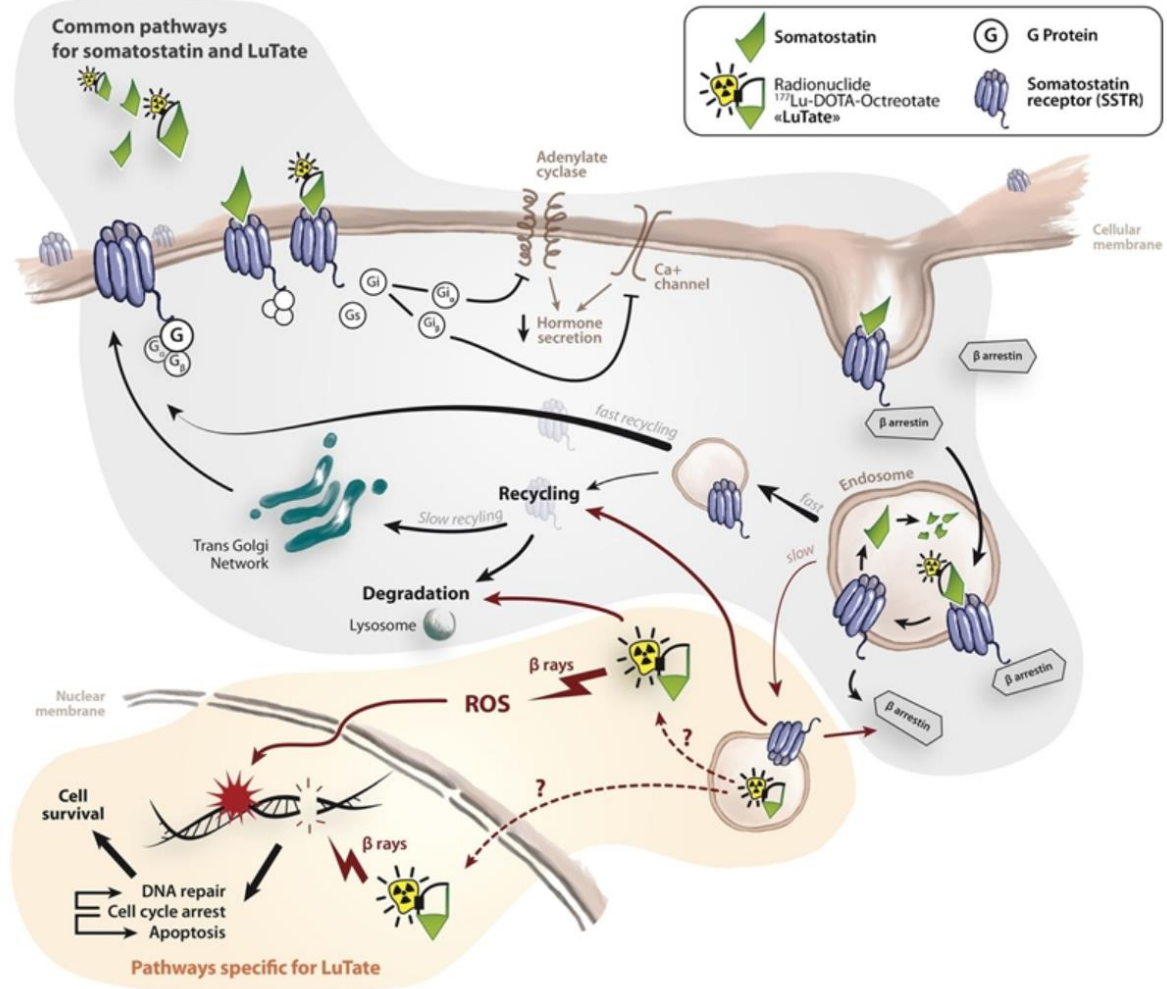


Fig. 1. Pathways of action of somatostatin, somatostatin analogues, and radiolabelled somatostatin analogues. Somatostatin or ¹⁷⁷Lu-octreotate binds to somatostatin receptors (SSTRs) on the neuroendocrine tumour (NET) cell surface. Upon binding, SSTR is activated and G proteins will dissociate into α and $\beta\gamma$ subunits. $G\alpha$ will inhibit adenylyl cyclase involved in cAMP production and $G\beta\gamma$ will inhibit Ca^{2+} channel resulting in inhibition of hormone secretion. After binding, G protein kinases will phosphorylate the SSTR, which allows binding of β -arrestin and subsequent endocytosis of the somatostatin-coupled receptors. In the early endosomes, the somatostatin will be rapidly degraded by peptidases, β arrestin will be released, and receptors will now be free either to be recycled rapidly to the surface or slowly through the trans-Golgi network or to be degraded by lysosomal enzymes. Somatostatin analogues, such as octreotide and its derivatives, will resist degradation by peptidases. The dissociation from β -arrestin will therefore be delayed. Once dissociated, the receptors are again free to be recycled or degraded. On the other hand, the analogue can be found in the lysosome or the nucleus. Radiolabelled analogues will emit radiation wherever they are. In the trajectory of the radiation, reactive oxygen species (ROS) will be created. ROS and the radiation itself will induce DNA damage, such as DNA single-strand or double-

strand breaks. These breaks will inhibit the progression in cell cycle. If the DNA damage levels are low, the cell will repair its DNA, cell cycle will resume, and the cell will survive. If the damage is too high, the cell will undergo apoptosis

In a randomized-controlled phase 3 trial, ¹⁷⁷Lu-octreotate PRRT has proven its efficacy in treating SSTR2-expressing midgut NET with longer progression-free survival (PFS) and improved quality of life as compared with long-acting octreotide [23, 24]. PRRT efficacy figures also appear favourable when compared with those obtained with chemotherapy and biotherapies, such as tyrosine kinase and mTOR inhibitors [25, 26]. Despite ¹⁷⁷Lu-octreotate PRRT clearly being one of the most successful targeted therapies for NETs so far, complete remissions are anecdotal and a risk of significant toxicity remains an obstacle for administration of higher radioactivity to all patients [24, 27, 28]. Also, many patients with NET are currently ineligible to PRRT because they do not meet the current clinical criterion which is to have an uptake greater than that of the liver on SSTR imaging (¹¹¹Inoctreotide scintigraphy or PET/CT with ⁶⁸Ga-labelled SSA). Other patients are excluded because they have a high-grade NET (e.g. grade 3, Ki-67 > 20%), which is associated with a poorer prognosis. Therefore, many approaches are being explored to improve therapeutic effects of PRRT, including in those patients with a lower tumour uptake or higher-grade NET. Some of these approaches, such as use of α -emitting radionuclides, combination of radionuclides, radiolabelled somatostatin antagonists, and dosimetry-based personalized regimes, have recently been described or reviewed [29–33]. Here, we review different combination treatments that could enhance efficacy of ¹⁷⁷Lu-octreotate PRRT for treatment of NET. These approaches are broadly divided in three categories, namely the improved tumour perfusion, SSTR upregulation, and radiosensitization (Table 1 and Fig. 2).

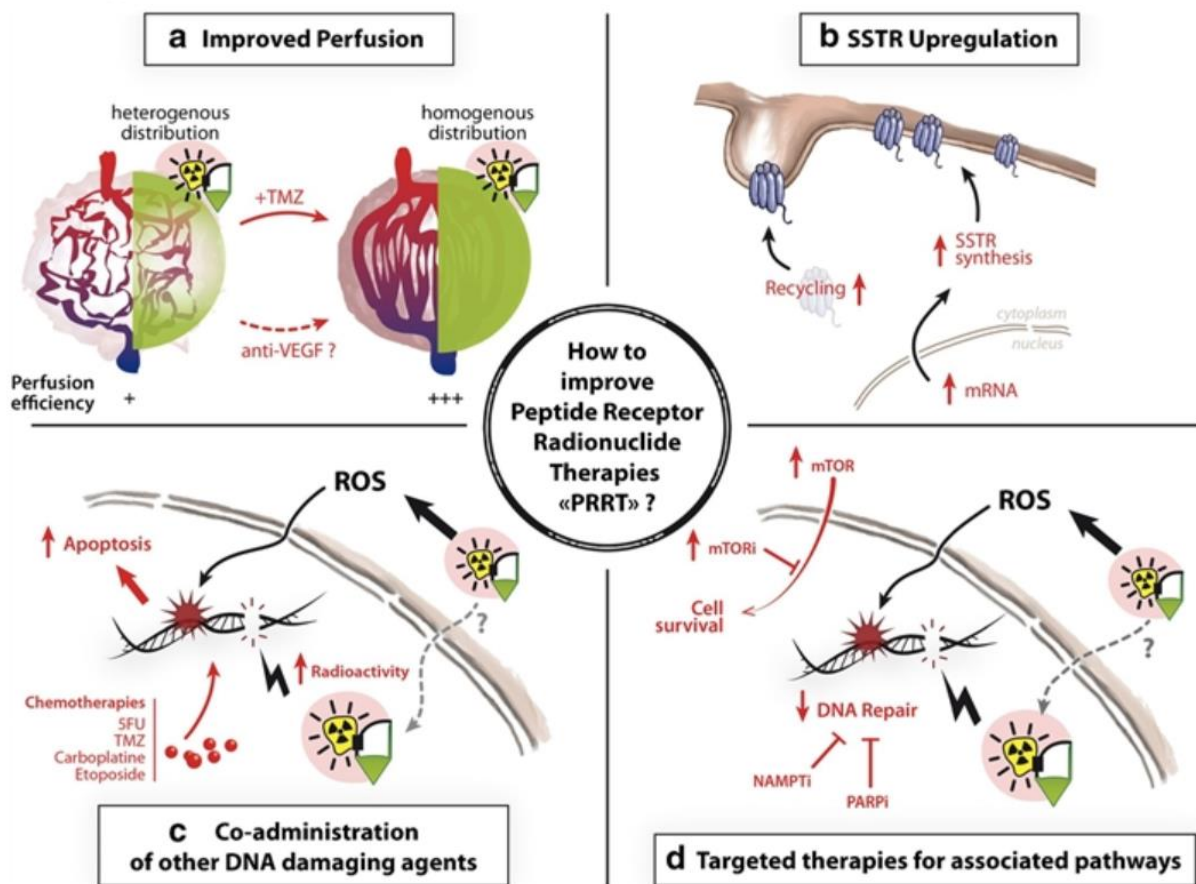


Fig. 2 Strategies to improve therapeutic efficacy of PRRT. (a) Improving tumour perfusion: Immature and disorganized vasculature in NET results in heterogeneous and inefficient delivery of ^{177}Lu -octreotate. After treatment with TMZ or with anti-vascular endothelial growth factor (αVEGF), perfusion is improved or vasculature matures, respectively, allowing homogenous and optimal distribution of ^{177}Lu -octreotate, along with improved oxygenation in all parts of the tumour. (b) Upregulation of SSTR: Drugs can induce synthesis or stabilization of SSTR mRNA resulting in a total increase in SSTR mRNA. Drugs can induce the translation of SSTR mRNA resulting into more SSTR being synthesized. Drugs can also increase the recycling of SSTR to the plasma membrane. (c) Radiosensitization with other DNA damaging agents: ^{177}Lu -octreotate in combination with a cytotoxic agent creates an excessive amount of DNA damage that overwhelms the DNA repair pathways and promotes cell death. (d) Radiosensitization with targeted therapies: mTOR inhibitors can sensitize NET to ^{177}Lu -octreotate by blocking a proliferation and survival pathway. Nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitors can sensitize NET to ^{177}Lu -octreotate by blocking NAD recycling disrupting either DNA repair or aerobic respiration. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors (PARPi) can sensitize NET by blocking selected pathways of DNA repair

Combination strategies to improve PRRT

Improving tumour perfusion

NETs are known to be hypervascular, but tend to gradually lose their high microvascular density as they become more aggressive [67]. The profile of blood vessels changes from the highly organized network in grade 1 NET to unbranched and plump vessels in grade 3 NET [68] (Fig. 2(a)). This is because the new blood vessels synthesized in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) secreted by the tumour are highly disorganized, deprived of pericytes, and leaky. The leakage of blood from these fragile vessels combined with poor drainage of lymph and stiffening of the extracellular matrix in and around the tumour enhances pressure in the interstitial space (reviewed in [69, 70]). Eventually, the equalization of pressure inside and outside the blood vessels prevents the extravasation of nutrients, oxygen, and drugs from the blood. The resultant tumour hypoxia triggers the secretion of more proangiogenic factors and formation of more fragile blood vessels creating a vicious cycle of additional constraints in the delivery of drug to all the tumour cells. Moreover, the hypoxic tumour cells also enter a quiescent state and develop drug resistance. Improved delivery of ¹⁷⁷Lu-octreotate via better tumour perfusion can increase the uptake and thus the absorbed dose and efficacy of the treatment for the same administered radioactivity (Fig. 2(a) and Table 1).

It has been observed that the anti-angiogenic drugs, which prevent neovascularization, could allow tumour vasculature to mature and become more efficient at the delivery of drugs, as well as radiopharmaceuticals. In parallel, the better tumour perfusion would also improve the delivery of oxygen, which per se is a potent radiosensitizer [71]. The anti-angiogenic agent sunitinib, an inhibitor of multiple tyrosine kinase receptors, has been approved for pancreatic NET therapy by the FDA [10] and has been shown to potentiate external beam radiotherapy (EBRT) in preclinical models and in a phase 2 clinical trial of patients with oligometastases from any primary sites, the head and neck being the most common [72]. The mTOR inhibitor everolimus has also been approved by the FDA for treating NETs. While its efficacy is primarily attributed to its anti-proliferative properties, which will be detailed later, everolimus also has an anti-angiogenic effect [73]. Recently, results from a study in 33 patients with pancreatic NET with liver metastases showed that everolimus induced increased tumour blood volume, which was attributed to improved tumour perfusion [35]. Interestingly, de Jong's group used MRI imaging to show that the co-administration of alkylating agent temozolomide (TMZ) improved tumour perfusion and efficacy of the PRRT in NCI-H69 tumour-bearing animals [34].

Therefore, in future clinical trials, monitoring of parameters indicative of tumour perfusion, such as quantification of oxygenation, blood volume to the tumour, or VEGF and hypoxia induced factor blood levels could provide additional mechanistic insight supporting combination therapy of these drugs with PRRT. Thus, the use of chemotherapeutic or antiangiogenic drugs to improve the delivery of ¹⁷⁷Lu-octreotate and oxygen to NETs is a promising potentiating strategy for PRRT that could be rapidly translated into the clinic with these already approved drugs.

SSTR upregulation

One of the principal determinants of the therapeutic effect of ¹⁷⁷Lu-octreotate is the presence of SSTR2 in tumours [74]. For a given level of SSTR, increasing administered activity of ¹⁷⁷Lu-octreotate may not result in proportionally higher tumour uptake due to saturation of SSTR, which would decrease the tumour-to-organ absorbed dose ratio, and thus the therapeutic index [75]. Conversely, increasing the expression of SSTR2 by the NET cells could result in a more effective therapy at equal or lower administered activities of ¹⁷⁷Lu-octreotate, with limited additional risk of toxicity. Here, we discuss a variety of drugs, as well as radiation, which have been shown to upregulate expression of SSTR in NETs (Fig. 2(b) and Table 1) and which are candidates for potentiation of ¹⁷⁷Lu-octreotate PRRT.

Hormones, growth factors, and somatostatin analogues

Many studies have shown the upregulation of SSTR2 levels in the brain, pancreas, ovaries, and liver cells treated with hormones and growth factors, such as β -estradiol, gastrin, epidermal growth factor, follicle-stimulating hormone, insulin, and growth hormone [76–79]. Oestrogen has been shown to upregulate transcription of SSTR2 in breast cancer, which led to better characterization of the promoter regions of SSTR2 gene [80–82], and this phenomenon could potentially be exploited for improved expression of SSTR2 in NETs with other agents, especially considering the reported presence of oestrogen receptors in some gastroenteropancreatic (GEP) and pulmonary NETs [83, 84] (Fig. 2(b)). Interestingly, SSA therapy itself has been shown to upregulate SSTR in different models. For example, the SSTR2 upregulation was shown after chronic exposure to SSA in pituitary cells [85], and an increased uptake of octreotide was shown in vivo in a rat model of pancreatic AR42J cells [36]. The upregulation of SSTR2 by octreotide alone or in combination with decitabine, trichostatin, or AT-101 was also seen in different human prostate cancer cell lines [86, 87].

In fact, many NET patients are prescribed long-acting SSAs for symptomatic control or cytostatic effect, and current protocols require long-acting SSAs to be stopped for 3–4 weeks prior to administration of PRRT, to avoid possible saturation of SSTR. However, in two clinical studies including 35 and 12 NET patients with stable disease, the continuous treatment with long-acting SSA did not reduce—or sometimes even increased—the uptake of ⁶⁸Ga-octreotate in tumours, but significantly reduced its uptake in the liver and spleen [37, 38]. This enhanced tumour-to-background ratio was suggested to be due to SSTR2 upregulation in NET and a possible saturation of SSTRs in healthy tissues. Desensitization and downregulation of SSTR could also contribute to decrease the uptake in the latter. With a better understanding of the kinetics and mechanisms of SSTR regulation and trafficking by SSAs, the timing and dosage of the latter could be optimized so that PRRT administration would coincide with the peak of SSTR upregulation in tumours and/or SSTR downregulation/saturation in healthy tissues, i.e. the best tumour-to-organ uptake ratio. In summary, many of the above-described SSTR level-altering agents, more specifically long-acting SSAs, which

tend to be well tolerated by the patients, could be useful as combination therapy to enhance efficacy of PRRT.

Epigenetic drugs

Epigenetic drugs that alter the expression of genes have already been shown to alter the expression of SSTR in different cellular and animal models of NET and other cancers. In different NET cells (BON-1, QGP-1, and KRJ-1) and in PC3 prostate cancer cells, DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) and three histone deacetylase inhibitors (HDACi), such as tacedinaline, romidepsin, and valproic acid, were shown to upregulate SSTR2 expression

and increase the uptake of radiolabelled octreotide; and in BON-1 cells, the combination of decitabine and tacedinaline synergistically upregulated SSTR2 expression [44–47]. An increased SSTR2 expression in response to valproic acid was exploited for intracellular delivery of lethal doses of SSA-linked camptothecin and improved cell killing in BON1 cells and xenograft model [47]. Thus, the combination with epigenetic drugs is a promising approach to improve PRRT with a growing body of preclinical evidence of induced SSTR upregulation. However, the clinical translation of this approach will need to be made carefully as epigenetic drugs have a broad range of effects on transcription, and their side effects are frequent.

Chemotherapy

Many common chemotherapeutic agents have been shown to modulate the expression of SSTR. 5-Fluorouracil (5-FU), camptothecin, cisplatin, mitomycin C, and doxorubicin were shown to reduce the uptake of radiolabelled SSAs in four different pancreatic adenocarcinoma–derived cell lines. In contrast, gemcitabine, a nucleoside analogue which inhibits ribonucleotide reductase and induces cell death, caused an increase in the uptake of ¹¹¹In-DOTA-Ianreotide after a period of recovery [48]. Gemcitabine for 4 days also increased the specific uptake of ¹⁷⁷Lu-octreotate in vitro in Capan-2 (human adenocarcinoma), AR42J (rat pancreatic cancer), and NCI-H69 (human pulmonary NET) cells after a recovery period of 4 days and increased the toxicity of ¹⁷⁷Lu-octreotate in Capan-2 cells [49]. In a patient with metastatic rectal NET treated with capecitabine (CAP, a 5-FU precursor) and TMZ, an increased tumour expression of SSTR2 has been observed on ⁶⁸Ga-octreotate PET/CT [88]. However, a preclinical study in NCI-H69 cells did not reveal the upregulation of SSTR2 by TMZ [34], and a comparative double-arm clinical study in 20 patients with GEP-NET suggested that pretreatment with CAP and TMZ did not significantly increase the uptake of ¹⁷⁷Lu-octreotate [89]. Thus, the kinetics of SSTR upregulation in NET by different chemotherapeutics needs to be carefully calibrated to exploit this option for potentiation of PRRT. Further, the dosing and length of chemotherapy used for this purpose should be minimized to avoid synergistic toxicity.

MicroRNAs

The microRNA or miRNA are known to control gene expression. In non-NET cancers, the levels of miR-185 were shown to be inversely correlated with the expression of SSTR2 in 20 patients with growth hormone-secreting pituitary adenoma; and miR-185 mimics or inhibitors could directly downregulate or upregulate, respectively, SSTR2 expression *in vitro* in rat pituitary adenoma GH3 cells [90]. Thus, miRNA-level manipulations have the potential to upregulate SSTR, but there is a need to demonstrate the feasibility of this approach in NET models.

Radiation

Radiation has been shown to upregulate SSTR2 and increase radiolabelled SSA uptake [39, 42, 43, 91–93]. Oddstig et al. noted an increase in SSTR2 mRNA levels following external beam radiation therapy (EBRT) of NCI-H69 cells [43], suggesting a molecular response following irradiation that leads to the increased expression. Dalmo et al. recently showed that pretreatment with a low activity of ¹⁷⁷Lu-octreotate enhances the efficacy of a subsequent higher therapeutic activity of ¹⁷⁷Lu-octreotate in a midgut NET (GOT1) xenograft model [41]. The mechanism of this priming effect was not linked to an increased expression of SSTR2 mRNA, although intratumoural uptake of ¹⁷⁷Lu-octreotate was significantly increased, suggesting that this effect could be mediated by other pathways of increased intracellular accumulation of ¹⁷⁷Lu-octreotate, such as increased SSTR recycling. Interestingly, the increased uptake of radiolabelled SSA was also looked at spatially as there was a heterogeneous SSTR2 expression. The same xenograft model was treated with ¹⁷⁷Lu-octreotate and an increased uptake was seen 7 days post-treatment not only in the central region of the tumour that received most of the injected activity per gram (%IA/g) and thus, most of the absorbed dose, but also in peripheral regions which received half of %IA/g and absorbed dose relative to the central region [40]. The heterogeneous ¹⁷⁷Lu-octreotate uptake within the tumour seemed linked to the difference in proliferation rate as demonstrated by Ki-67 staining, which was highly expressed in the peripheral region, where the uptake was lower. The molecular mechanisms of SSTR2 regulation by radiation are still unclear, but the accumulating evidence of the phenomenon in preclinical models makes radiation a prime candidate for clinical evaluation.

Radiosensitization

PRRT being an internal radiotherapy, drugs that are used for potentiating EBRT can be considered first-line candidates to potentiate PRRT. However, not all radiosensitization strategies used in EBRT may be equally effective in PRRT because NET biology is different from that of cancers commonly treated with EBRT—most NETs exhibiting a more indolent behaviour—and because of the differences in the delivery of radiation between PRRT (low rate and continuous) and EBRT (high rate and fractionated). Two strategies have been used in clinical trials to increase the radiosensitivity of NET to PRRT: DNA-damaging chemotherapeutics and targeted biotherapies (Fig. 2(c, d), respectively, and Table 1).

Chemotherapy

Chemotherapeutics have been used successfully for decades as radiosensitizers in EBRT [94]. A few clinical studies have examined their effectiveness as radiosensitizers for PRRT (Fig. 2(c)). The firsts of these to be studied clinically were 5-FU and its oral prodrug CAP. 5-FU, an anti-metabolite of DNA synthesis which inhibits thymidine synthase, is known to be a potent radiosensitizer for EBRT [95]. Three groups have used this rationale to co-administer 5-FU or CAP to NET patients treated with PRRT [50–52, 96]. In a retrospective study of 68 NET patients treated with 5-FU (200 mg/m²/24 h) starting 4 days prior to ¹⁷⁷Lu-octreotate administration and continuing the infusion for 3 weeks thereafter, a group from Melbourne showed that 68% of patients with previously progressive disease had a stabilization of their disease or a partial response, while the combination was well tolerated [53]. They suggested that the combination was more effective in ¹⁸F-fluorodeoxyglucose (FDG)-avid NETs, thought to represent more aggressive or rapidly proliferating NETs [54]. The results from two randomized clinical trials of PRRT with or without CAP currently underway in Italy (NCT02736448, NCT02736500) will provide more information as to the suitability of this approach to enhance PRRT.

More recently, another Australian group evaluated the combination of four cycles of 7.9GBq ¹⁷⁷Lu-octreotate with CAP and TMZ (a.k.a. CAPTEM) in 30 patients with grade 1 or 2 pancreatic NETs. These studies showed that combining ¹⁷⁷Lu-octreotate with 1500 mg/m² of CAP for 14 days starting 5 days before each cycle along with 200 mg/m² of TMZ for the last 5 days of CAP appears as safe as ¹⁷⁷Lu-octreotate alone in the short and long terms [55, 56]. After a 4-year follow-up, the combination therapy achieved a complete remission rate of 13% in pancreatic NETs, which is substantially better than previous results of PRRT alone in this NET patient subpopulation [26, 57]. A multicentre phase 2 randomized clinical trial is currently comparing the efficacy of PRRT versus CAP + TMZ or a combination of the three (NCT02358356). In Bison's animal study, TMZ by itself potentiated ¹⁷⁷Lu-octreotate by radiosensitizing the tumours and also by increasing perfusion to the tumour [34], as detailed above. In yet another preclinical study, the combination of carboplatin, a DNA cross-linking agent, and etoposide, an inhibitor of the DNA topoisomerase II, with ¹⁷⁷Lu-octreotate exhibited a longer period of tumour control in a mouse model of human small cell lung cancer (NCI-H69) and prolonged survival of the animals, which also translated into a clinical response in one patient with pulmonary NET [58]. Although peptide receptor chemoradionuclide therapy is promising and is being studied in multicentre clinical trials, there is a need to identify the specific subpopulation of NETs that will benefit the most from this combination as compared with PRRT alone.

Targeted therapies

Molecularly targeted drugs that improve the tumour perfusion and the radiopharmaceutical delivery, as described above, are also candidates for radiosensitizing NET cells to ¹⁷⁷Lu-octreotate therapy (Fig. 2(d) and Table 1). Everolimus has a direct radiosensitization mechanism through its inhibition of the mammalian (or mechanistic) target of rapamycin (mTOR) that regulates cell growth and

proliferation in NETs. Since both PRRT and everolimus have been proven effective as monotherapies against NET [11], their combination was tested by two groups. Two animal studies conducted by the Rotterdam group showed the surprising results that everolimus induced metastases and reduced the efficacy of 177Lu-octreotate when used in combination in their rat model of pancreatic tumour cell line CA20948 [59, 60]. They hypothesized that the suppressive effect of everolimus on the immune system could partly explain the increased metastases. However, this observation has been made in only one animal model derived from a non-human NET cell line, and no clinical data is available to support that everolimus promotes metastatic progression in patients. In an Australian phase 1 study (NETTLE) in 16 patients, the combination of everolimus and PRRT appeared well tolerated. The maximum dose of everolimus was 7.5 mg/day and the median follow-up was 34 months [61].

The inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase (PARPi) are being used in the clinic for the therapy of BRCA-mutant ovarian cancers to target PARP1 and other members of the PARP family involved in DNA repair pathways [97, 98]. Recent preclinical studies show that PARPi sensitize different NET cells and U2OS sarcoma cells expressing SSTR2 to 177Lu-octreotate [63, 64]. Both the studies showed that the inhibition of PARP lead to a greater accumulation of DNA damage after 177Lu-octreotate treatment as seen with markers such as 53BP1 or γ H2AX, which in turn increase apoptosis. A nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitor depletes cells in nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) [99], which is essential in energy metabolism, DNA repair, gene expression, and stress response [100], and was shown to block tumour growth and to potentiate the effect of 177Lu-octreotate in a midgut NET cell line (GOT1) [62]. The target of NAMPT, NAD, is the substrate for PARP, making the results from these studies consistent and highlighting NAD metabolism as an important target for radiosensitization of NET in patients. Indeed, this is especially relevant for those who suffer from the carcinoid syndrome, as serotonin and NAD are both derived from tryptophan, which is consumed by serotonin overproduction. This could further lower intracellular and blood NAD levels [101]. While both NAMPT and PARP inhibitors are promising as radiosensitizers, they are both potentially hematotoxic [102, 103]. Therefore, their combination with PRRT should be attempted prudently in early clinical studies.

Another study showed that sonidegib that targets the Hedgehog pathway, which is implicated in gene regulation of proliferation, migration, and invasion, extended the progression-free survival in a rat model of midgut NET (GOT1 xenografts) when combined with 177Lu-octreotate [65]. With the advantage of specificity of targeted drugs to a given pathway, it would be interesting to combine PRRT with more than one targeted drug. For example, since the combination of sonidegib with 177Lu-octreotate activates the mTOR pathway [65], adding an mTOR inhibitor such as everolimus could further enhance the therapeutic response in this model.

Multiple combination

While each of the three broad categories of combination treatments described above could individually enhance PRRT, a combination of agents derived from two different proposed approaches could synergistically enhance PRRT without increasing toxicity. In fact, Jin et al. demonstrated that a combination of the radiosensitizer 5-FU with epigenetics drugs tacedinaline or decitabine can upregulate SSTR2 and radiosensitize the NET cells [66]. Interestingly, this study also revealed that each of these agents alone acted as both a radiosensitizer and an SSTR-upregulating agent. Moreover, the upregulation of SSTR2 by these agents varied with initial SSTR levels expressed by each cell line. For example, nonexpresser QGP1 had no induction of SSTR2, while low expresser BON-1 cells had robust upregulation and medium to high expresser (NCI-H727 and GOT1) had mild upregulation of SSTR2. On the other hand, Fueger et al. had observed the downregulation of SSTR2 by 5-FU in different cancer cell models [48]. These opposing effects on SSTR2 upregulation could be explained by different timing of assessment of SSTR2 status, or due to inherent differences in NET versus other cell models. Nonetheless, these studies also highlight the need to select patients with lower initial levels of SSTR, as they will benefit the most from SSTR upregulation strategies.

A clinical algorithm for selecting patients for PRRT-enhancing combinations

Here, we propose a strategy to streamline NET patients who could benefit from combination-augmented PRRT (Fig. 3). Currently, the eligibility of NET patients to receive PRRT is largely based on radiolabelled SSA uptake on SSTR imaging, and those patients with poor tumour uptake (i.e. lower than liver uptake) are being denied PRRT. Our review highlights that some of the patients may become eligible for PRRT if a combination therapy results in a significantly increased tumour uptake. As a first step, an initial 68Ga-SSA PET/CT could be used to determine the tumour uptake, and a strategy to enhance PRRT delivery would be attempted in patients with a low-uptake NET. Currently, no tool can reliably predict which NET would respond better to increased perfusion versus SSTR2 upregulation. Since the fast-growing tumours e.g. high FDG uptake or Ki-67) generally have a more disrupted vasculature, they would be good candidates to a perfusion-enhancing strategy. On the other hand, slowgrowing tumours (e.g. low FDG uptake or Ki-67), which are expected to have normal vasculature, should be subjected to SSTR-upregulating agents first. The success of increased perfusion or SSTR upregulation should be verified with a repeat 68Ga-SSA PET/CT re-assessing eligibility to PRRT.

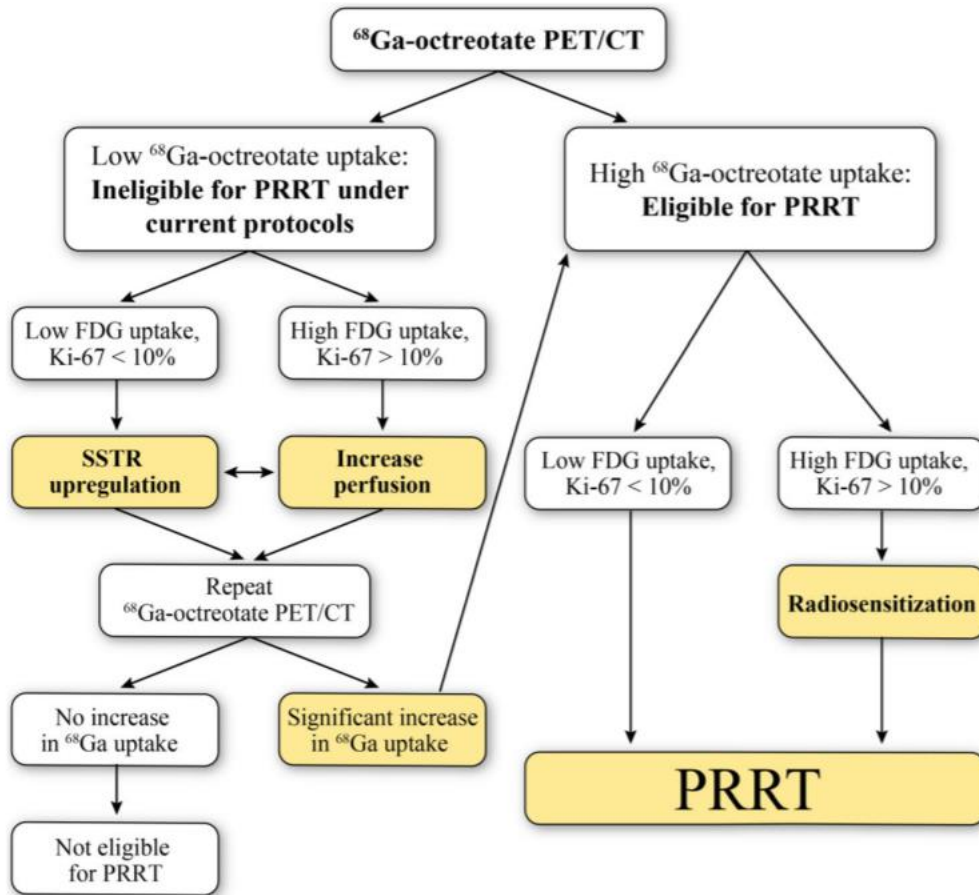


Fig. 3 Clinical decision algorithm for the selection of patients to undergo combination therapy

Thereafter, the patients with slow-growing tumours (e.g. low FDG uptake or Ki-67) could be subjected to PRRT alone, as they appear less likely to derive significant added benefits versus the increased risk of toxicity of a radiosensitizing combination. On the other hand, the patients with faster growing tumours (e.g. high FDG uptake or Ki-67) may have a favourable benefit-risk balance regarding the application of a radiosensitization strategy along with PRRT, since these tumours are more sensitive to chemotherapeutics and potential side effects would be more acceptable in the setting of a more aggressive NET conferring a worse prognosis.

Apart from tumour uptake and grading, novel analyses of circulating RNA transcripts and gene cluster, which have been shown to predict response to PRRT with a high accuracy (using a so-called PRRT predictive quotient derived from NET transcriptome and grade), could potentially help selecting the most appropriate combination treatments and monitoring their efficacy [104]. It is even possible that genomic signatures predictive of response to specific combination strategies exist, but they need to be identified and validated in conjunction with PRRT for future application to select eligible patients.

Among different combination strategies to improve PRRT that we have described, the ones which are most likely to reach the clinic in the near future are those already studied in clinical trials, such as the radiosensitizing agents CAP and TMZ. The combination of PRRT with PARPi is also likely to be prioritized based on promising preclinical results and the fact that PARPi is already approved by the FDA for other malignancies. Among the perfusion-enhancing agents, sunitinib, the anti-VEGF already approved for pancreatic NET, needs to be examined for its capacity to increase the delivery of ¹⁷⁷Lu-octreotate in patients. SSTR upregulators, such as radiation (e.g. priming PRRT or EBRT) and epigenetics drugs, which have shown benefits in multiple preclinical studies, should be excellent candidates for clinical translation.

Conclusion

PRRT is currently one of the most effective palliative treatments for inoperable NETs. Combining PRRT with synergistic drugs that have ideally minimally overlapping toxicities could potentiate PRRT through several mechanisms such as increased tumour perfusion, SSTR upregulation, and radiosensitization. Moreover, a combination of multiple PRRT potentiators could be used, in a personalized fashion, to achieve the highest likelihood of therapeutic benefits for patients suffering from NET. These PRRT-enhancing approaches could be considered for other, nonNET cancers that have the potential to overexpress SSTR. Finally, some could be directly relevant to other radionuclide therapies, such as the rapidly emerging prostate specific membrane antigen radioligand therapy of prostate cancer (i.e. perfusion-increasing, radiosensitization) or inspire analogous strategies (i.e. target upregulation via hormonal manipulations, irradiation, or other drugs).

Tables

Table 1. Various combination strategies to improve the efficacy of PRRT of NETs.

Class	Mechanism of action	Agent	Stage of research and cells/models/patients	Key results	References
Increasing tumour perfusion					
Alkylating agents	DNA damage by alkylating or methylating DNA purines	Temozolomide (TMZ)	Animal model: Xenograft of NCI-H69 human small cell lung cancer (SCLC) on NMRI nu/nu mice	- $\uparrow k_{trans}$ value 13 days after continuous TMZ treatment	[34]
mTOR inhibitor	Inhibition of mTORC1 protein complex leading to inhibition of growth and proliferation and the release of inhibition of apoptosis	Everolimus	Clinical: 33 patients with liver metastases from pancreatic NET of grade 1 or 2	- \uparrow blood volume on perfusion CT	[35]
SSTR Upregulation					
Somatostatin analogue	Activation of the somatostatin receptor	Octreotide	Animal model: Xenograft of rat pancreatic tumour AR42J on CB17 scid mice	- Short-acting somatostatin analogue reduces SSTR2 mRNA levels <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> - Long-acting repeatable SSA increased the binding of radiolabelled SSA <i>in vivo</i>	[36]
		Lanreotide or Octreotide	Clinical: -35 patients with metastatic NET under LA-SSA -12 patients with metastatic NET starting LA-SSA treatment	- \downarrow SUVmax of ^{68}Ga -octreotate in healthy tissue after LA-SSA treatment - \uparrow SUVmax of ^{68}Ga -octreotate in majority of cancerous lesions after LA-SSA treatment	[37, 38]
Radiolabelled somatostatin analogue	Indirect and direct damage to DNA and cellular content	^{177}Lu -octreotate	Animal model: Xenograft of human midgut NET GOT1 on BALB/c nude mice	After ^{177}Lu -octreotate treatment: - \uparrow uptake of ^{111}In -octreotate	[36, 40]
				After priming with ^{177}Lu -octreotate: - \uparrow uptake of ^{177}Lu -octreotate - \uparrow tumour progression-free survival	[41]

Irradiation	Indirect and direct damage to DNA and cellular content	External beam radiation therapy	Cell cultures: NCI-H69 (SCLC)	- ↑ uptake of ¹⁷⁷ Lu-octreotate - ↑ SSTR2 mRNA in irradiated SCLC	[42, 43]
Epigenetic drugs	Inhibition of DNA methyltransferase, which increases gene expression	Azacitidine/ Decitabine	Cell cultures: - human pancreatic NET BON-1, - human prostate cancer PC3, - human pancreatic NET QGP-1	- ↑ SSTR2 mRNA - ↑ SSTR2 protein levels - ↑ uptake of ⁶⁸ Ga-octreotate in cells	[44, 45]
			Animal model: Xenograft of BON-1 and PC3 on Nude-Foxn1nu mice	- ↑ immunohistologic staining of SSTR2 - ↑ tumour to background ratio of ⁶⁸ Ga-octreotate uptake	
	Inhibitor of histone deacetylase which increases gene expression	Tacedinaline	Cell cultures (monolayer): BON-1, PC3 and QGP-1	- ↑ SSTR2 mRNA - ↑ SSTR2 protein levels - ↑ uptake of ⁶⁸ Ga-octreotate	[44]
		Romidepsin	Cell cultures (monolayer): BON-1, PC3 and QGP-1	- ↑ uptake of ⁶⁸ Ga-octreotate	[44]
		Valproic acid	Cell cultures : Human midgut NET KRJ-1, BON-1 and QGP-1, GOT1	- ↑ SSTR2 mRNA in BON-1 and KRJ-1 - ↓ SSTR2 mRNA in QGP-1 - No effect on SSTR2 mRNA in GOT1 - ↑ uptake of ⁶⁸ Ga-octreotate, except GOT1 - ↑ toxicity of camptotecin-SST on BON-1	[44-47]
Animal model: Xenograft of BON-1 on nude mice	- ↑ efficacy of camptotecin-SST		[47]		
Antimetabolite	Analog of the pyrimidine, cytidine, which disrupts DNA synthesis	Gemcitabine	Cell cultures: - Human pancreatic adenocarcinoma cell lines BxPC-3, Panc-1, Capan-1, and ASPC-1 - CAPAN-2, BON-1 and H69	- ↑ uptake of radioligand after 4 days of treatment - ↑ efficacy of ¹⁷⁷ Lu-octreotate in CAPAN-2 cells	[48, 49]
Radiosensitization					
Antimetabolite	Inhibition of thymidylate synthase and direct incorporation in DNA	5-fluorouracil (5-FU) or	Clinical – phase 2: 33 patients with metastatic NET Clinical – phase 2:	- Well tolerated - Tumour control in 94% of patients - 1 complete remission	[50-54]

	disrupting replication and translation	capecitabine (CAP)	52 patients with FDG-avid NET	- Improved quality of life	
Alkylating agents	DNA damage by alkylating or methylating DNA purines	TMZ	Animal model: Xenograft of NCI-H69 on NMRI nu/nu mice	- ↑ progression-free and overall survival compared to ¹⁷⁷ Lu-octreotate alone	[34]
Combination of an anti-metabolite and an alkylating agent	Combination of the above two	5-FU+TMZ	Clinical – phase 2: 30 patients with grade 1 or 2 pancreatic NET with 4 years follow-up Clinical – 5-year toxicity 65 patients with aggressive GEP NET	- Well tolerated - 13% (4/30) of complete remission - 100% of clinical response (CR, PR,SD) - Progression-free survival of 48 months	[55-57][30, 98, 108]
Combination of a DNA cross-linker and inhibitor of DNA topoisomerase	Carboplatin: Crosslinks DNA disrupting its replication, transcription or its repair Etoposide: Inhibits the unwinding of DNA during replication leading to DNA double strand break	Carboplatin + etoposide	Animal model: Xenograft of NCI-H69 on BALB/c nude mice Clinical case report: patient with relapsing SCLC	- ↑ progression-free survival and overall survival compared to ¹⁷⁷ Lu-octreotate alone - Clinical case of major response	[58]
mTOR inhibitor	Inhibition of mTORC1 protein complex leading to inhibition of growth and proliferation and the release of inhibition of apoptosis	Everolimus	Animal models: - Xenograft of CA20948 on Lewis rat - Xenograft with NCI-H69 on NMRI Nu/Nu mice	- ↑ tumour metastatic burden in CA20948 model treated with everolimus, with or without ¹⁷⁷ Lju-octreotate	[59,60]
			Clinical phase 1: 16 patients with gastroenteropancreatic NET	- 7.5mg is highest tolerable dose of everolimus - 44% overall response rate - 80% response rate in 5 patients with pancreatic NET	[61]
NAMPT inhibitor	Inhibition of the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide	GMX1778	Animal model: Xenograft of GOT1 on BALB/c nude mice	- ↑ progression-free survival compared to ¹⁷⁷ Lu-octreotate alone and complete remission with high-dose - No effect on SSTR2	[62]

PARP inhibitor	Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase protein family, which is implicated in DNA repair	Olaparib	Cell cultures: Human osteosarcoma U2OS transfected with SSTR2 Ex vivo: Pancreatic NET tissue from patients	- No cell proliferation with PARPi and ¹⁷⁷ Lu-octreotate - Accumulation of DNA damage in ex vivo NET - ↑ apoptosis	[63]
		DHQ, PJ34 and Veliparib	Cell cultures (monolayer and spheroids): BON-1 and human bronchopulmonary NET NCI-H727	- ↑ cell cycle arrest and cell death - ↑ cytotoxicity of ¹⁷⁷ Lu-octreotate	[64]
Hedgehog inhibitor	Binding and inhibition of smoothed protein blocking downstream pathway of Hedgehog agonist, which inhibits proliferation, migration, invasion	Sonidegib	Animal model: Xenograft of GOT1 on BALB/c nude mice	- ↑ progression-free survival compared to ¹⁷⁷ Lu-octreotate alone	[65]
Combined strategies					
Epigenetic + Antimetabolite	Inhibitor of DNA methyltransferase; Inhibition of thymidylate synthase	5-FU, Tacedaline and Decitabine	Cell cultures: BON-1, NCI-H727, GOT1 and QGP-1	- ↑ DNA damage and cell death post EBRT in BON-1 and QGP-1. - ↑ SSTR2 protein in all cells, except QGP-1 - ↑ uptake of ⁶⁸ Ga-octreotate in BON-1 and NCI-H727	[66]

References

1. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO classification of tumours of the digestive system: World Health Organization; 2010.
2. Kidd M, Modlin IM, Bodei L, Drozdov I. Decoding the molecular and mutational ambiguities of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasm pathobiology. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015;1:131–53. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2014.12.008>.
3. Hallet J, Law CH, Cukier M, Saskin R, Liu N, Singh S. Exploring the rising incidence of neuroendocrine tumors: a population-based analysis of epidemiology, metastatic presentation, and outcomes. *Cancer*. 2015;121:589–97. <https://doi.org/10.1002/cncr.29099>.
4. Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, et al. Trends in the incidence, prevalence, and survival outcomes in patients with neuroendocrine tumors in the United States. *JAMA Oncol*. 2017. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0589>.
5. Rinke A, Muller HH, Schade-Brittinger C, Klose KJ, Barth P, Wied M, et al. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. *J Clin Oncol*. 2009;27:4656–63. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.8510>.
6. Caplin ME, Pavel M, Cwikla JB, Phan AT, Raderer M, Sedlackova E, et al. Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2014;371:224–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1316158>.
7. Sorbye H, Welin S, Langer SW, Vestermark LW, Holt N, Osterlund P, et al. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. *Ann Oncol: Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013;24:152–60. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds276>.
8. Wong MH, Chan DL, Lee A, Li BT, Lumba S, Clarke SJ, et al. Systematic review and meta-analysis on the role of chemotherapy in advanced and metastatic neuroendocrine tumor (NET). *PLoS One*. 2016;11:e0158140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158140>.
9. Lamarca A, Elliott E, Barriuso J, Backen A, McNamara MG, Hubner R, et al. Chemotherapy for advanced non-pancreatic well-differentiated neuroendocrine tumours of the gastrointestinal tract, a systematic review and meta-analysis: a lost cause? *Cancer Treat Rev*. 2016;44:26–41. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.01.005>.
10. Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, et al. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2011;364:501–13. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003825>.
11. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, et al. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2011;364:514–23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1009290>.
12. Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Breeman WA, Kooij PP, Oei HY, et al. Somatostatin receptor scintigraphy with [111In-DTPA-D-Phe1]- and [123I-Tyr3]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med*. 1993;20:716–31.
13. Werner RA, Weich A, Kircher M, Solnes LB, Javadi MS, Higuchi T, et al. The theranostic promise for neuroendocrine tumors in the late 2010s - where do we stand, where do we go? *Theranostics*. 2018;8:6088–100. <https://doi.org/10.7150/thno.30357>.
14. Zamora V, Cabanne A, Salanova R, Bestani C, Domenichini E, Marmissolle F, et al. Immunohistochemical expression of somatostatin receptors in digestive endocrine tumours. *Dig Liver Dis*. 2010;42:220–5. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2009.07.018>.

15. Cambiaghi V, Vitali E, Morone D, Peverelli E, Spada A, Mantovani G, et al. Identification of human somatostatin receptor 2 domains involved in internalization and signaling in QGP-1 pancreatic neuroendocrine tumor cell line. *Endocrine*. 2017;56: 146–57. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1026-2>.
16. Pyronnet S, Bousquet C, Najib S, Azar R, Laklai H, Susini C. Antitumor effects of somatostatin. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;286:230–7. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.02.002>.
17. Zhao P, Canals M, Murphy JE, Klingler D, Eriksson EM, Pelayo JC, et al. Agonist-biased trafficking of somatostatin receptor 2A in enteric neurons. *J Biol Chem*. 2013;288:25689–700. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.496414>.
18. Roosterman D, Kempkes C, Cottrell GS, Padilla BE, Bunnett NW, Turck CW, et al. Endothelin-converting enzyme-1 degrades internalized somatostatin-14. *Endocrinology*. 2008;149:2200–7. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1628>.
19. Koenig JA, Kaur R, Dodgeon I, Edwardson JM, Humphrey PP. Fates of endocytosed somatostatin sst2 receptors and associated agonists. *Biochem J*. 1998;336(Pt 2):291–8.
20. Kolby L, Wangberg B, Ahlman H, Tisell LE, Fjalling M, Forssell-Aronsson E, et al. Somatostatin receptor subtypes, octreotide scintigraphy, and clinical response to octreotide treatment in patients with neuroendocrine tumors. *World J Surg*. 1998;22:679–83.
21. Brabander T, Teunissen JJ, Van Eijck CH, Franssen GJ, Feelders RA, de Herder WW, et al. Peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016;30:103–14. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.10.005>. 918 *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2020) 47:907–921
22. Wang M, Caruano AL, Lewis MR, Meyer LA, VanderWaal RP, Anderson CJ. Subcellular localization of radiolabeled somatostatin analogues: implications for targeted radiotherapy of cancer. *Cancer Res*. 2003;63:6864–9.
23. Strosberg J, Wolin E, Chasen B, Kulke M, Bushnell D, Caplin M, et al. Health-related quality of life in patients with progressive midgut neuroendocrine tumors treated with (177)Lu-Dotatate in the phase III NETTER-1 trial. *J Clin Oncol*. 2018;36:2578–84. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.5865>.
24. Strosberg J, El-Haddad G, Wolin E, Hendifar A, Yao J, Chasen B, et al. Phase 3 trial of 177Lu-Dotatate for midgut neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2017;376:125–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607427>.
25. Kim S-J, Pak K, Koo P, Kwak J, Chang S. The efficacy of 177Lu-labelled peptide receptor radionuclide therapy in patients with neuroendocrine tumours: a meta-analysis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015:1–7. <https://doi.org/10.1007/s00259-015-3155-x>.
26. Kwekkeboom DJ, de Herder WW, Kam BL, van Eijck CH, van Essen M, Kooij PP, et al. Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [177 Lu-DOTA 0,Tyr3]octreotate: toxicity, efficacy, and survival. *J Clin Oncol*. 2008;26:2124–30. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.2553>.
27. Bodei L, Kidd M, Paganelli G, Grana CM, Drozdov I, Cremonesi M, et al. Long-term tolerability of PRRT in 807 patients with neuroendocrine tumours: the value and limitations of clinical factors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42:5–19. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2893-5>.
28. Bergsma H, Lom KV, Konijnenberg M, Kam B, Teunissen J, Herder W, et al. Therapy-related hematological malignancies after peptide receptor radionuclide therapy with 177Lu-DOTAOctreotate: incidence, course & predicting factors in patients with GEP-NETs. *J Nucl Med: Off Publ, Soc Nucl Med*. 2017. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.189712>.

29. Navalkisoor S, Grossman A. Targeted alpha particle therapy for neuroendocrine tumours: the next generation of peptide receptor radionuclide therapy. *Neuroendocrinology*. 2019;108:256–64. <https://doi.org/10.1159/000494760>.
30. Radojewski P, Dumont R, Marincek N, Brunner P, Macke HR, Muller-Brand J, et al. Towards tailored radiopeptide therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42:1231–7. <https://doi.org/10.1007/s00259-015-3030-9>.
31. Fani M, Nicolas GP, Wild D. Somatostatin receptor antagonists for imaging and therapy. *J Nucl Med: Off Publ, Soc Nucl Med*. 2017;58:61S–6S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.186783>.
32. Del Prete M, Buteau FA, Arsenault F, Saighi N, Bouchard LO, Beaulieu A, et al. Personalized (177)Lu-octreotate peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumours: initial results from the P-PRRT trial. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2019;46: 728–42. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4209-7>.
33. Sundlov A, Sjogreen-Gleisner K, Svensson J, Ljungberg M, Olsson T, Bernhardt P, et al. Individualised 177Lu-DOTATATE treatment of neuroendocrine tumours based on kidney dosimetry. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00259-017-3678-4>.
34. Bison SM, Haeck JC, Bol K, Koelewijn SJ, Groen HC, Melis M, et al. Optimization of combined temozolomide and peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) in mice after multimodality molecular imaging studies. *EJNMMI Res*. 2015;5:62. <https://doi.org/10.1186/s13550-015-0142-y>.
35. D'Onofrio M, Cingarlini S, Ortolani S, Crosara S, DER R, Vallerio P, et al. Perfusion CT changes in liver metastases from pancreatic neuroendocrine tumors during everolimus treatment. *Anticancer Res*. 2017;37:1305–11. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11448>.
36. Froidevaux S, Hintermann E, Torok M, Macke HR, Beglinger C, Eberle AN. Differential regulation of somatostatin receptor type 2 (sst 2) expression in AR4-2J tumor cells implanted into mice during octreotide treatment. *Cancer Res*. 1999;59:3652–7.
37. Haug AR, Rominger A, Mustafa M, Auernhammer C, Goke B, Schmidt GP, et al. Treatment with octreotide does not reduce tumor uptake of (68)Ga-DOTATATE as measured by PET/CT in patients with neuroendocrine tumors. *J Nucl Med: Off Publ, Soc Nucl Med*. 2011;52:1679–83. <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.089276>.
38. Cherk MH, Kong G, Hicks RJ, Hofman MS. Changes in biodistribution on (68)Ga-DOTA-Octreotate PET/CT after long acting somatostatin analogue therapy in neuroendocrine tumour patients may result in pseudoprogression. *Cancer Imaging*. 2018;18:3. <https://doi.org/10.1186/s40644-018-0136-x>.
39. Bernhardt P, Oddstig J, Kolby L, Nilsson O, Ahlman H, Forssell-Aronsson E. Effects of treatment with (177)Lu-DOTA-Tyr(3)-octreotate on uptake of subsequent injection in carcinoid-bearing nude mice. *Cancer Biother Radiopharm*. 2007;22:644–53. <https://doi.org/10.1089/cbr.2007.333>.
40. Oddstig J, Bernhardt P, Lizana H, Nilsson O, Ahlman H, Kolby L, et al. Inhomogeneous activity distribution of 177Lu-DOTA0-Tyr3-octreotate and effects on somatostatin receptor expression in human carcinoid GOT1 tumors in nude mice. *Tumour Biol*. 2012;33:229–39. <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0268-0>.
41. Dalmo J, Spetz J, Montelius M, Langen B, Arvidsson Y, Johansson H, et al. Priming increases the anti-tumor effect and therapeutic window of 177Lu-octreotate in nude mice bearing human small intestine neuroendocrine tumor GOT1. *EJNMMI Res*. 2017;7:6. <https://doi.org/10.1186/s13550-016-0247-y>.
42. Oddstig J, Bernhardt P, Nilsson O, Ahlman H, Forssell-Aronsson E. Radiation-induced up-regulation of somatostatin receptor expression in small cell lung cancer in vitro. *Nucl Med Biol*. 2006;33: 841–6. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2006.07.010>.

43. Oddstig J, Bernhardt P, Nilsson O, Ahlman H, Forssell-Aronsson E. Radiation induces up-regulation of somatostatin receptors 1, 2, and 5 in small cell lung cancer in vitro also at low absorbed doses. *Cancer Biother Radiopharm.* 2011;26:759–65. <https://doi.org/10.1089/cbr.2010.0921>.
44. Taelman VF, Radojewski P, Marincek N, Ben-Shlomo A, Grotzky A, Olariu CI, et al. Upregulation of key molecules for targeted imaging and therapy. *J Nucl Med: Off Publ, Soc Nucl Med.* 2016;57:1805–10. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.165092>.
45. Veenstra MJ, van Koetsveld PM, Dogan F, Farrell WE, Feelders RA, Lamberts SW, et al. Epidrug-induced upregulation of functional somatostatin type 2 receptors in human pancreatic neuroendocrine tumor cells. *Oncotarget.* 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9462>.
46. Arvidsson Y, Johanson V, Pfragner R, Wangberg B, Nilsson O. Cytotoxic effects of valproic acid on neuroendocrine tumour cells. *Neuroendocrinology.* 2016;103:578–91. <https://doi.org/10.1159/000441849>.
47. Sun L, Qian Q, Sun G, Mackey LV, Fuselier JA, Coy DH, et al. Valproic acid induces NET cell growth arrest and enhances tumor suppression of the receptor-targeted peptide-drug conjugate via activating somatostatin receptor type II. *J Drug Target.* 2016;24:169–77. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1066794>.
48. Fueger BJ, Hamilton G, Raderer M, Pangerl T, Traub T, Angelberger P, et al. Effects of chemotherapeutic agents on expression of somatostatin receptors in pancreatic tumor cells. *J Nucl Med: Off Publ, Soc Nucl Med.* 2001;42:1856–62.
49. Nayak TK, Atcher RW, Prossnitz ER, Norenberg JP. Enhancement of somatostatin-receptor-targeted (177)Lu-[DOTA(0)-Tyr(3)]-octreotide therapy by gemcitabine pretreatment-mediated receptor uptake, up-regulation and cell cycle modulation. *Nucl Med Biol.* 2008;35:673–8. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2008.05.003>.
50. van Essen M, Krenning EP, Kam BL, de Herder WW, van Aken MO, Kwekkeboom DJ. Report on short-term side effects of Eur J Nucl Med Mol Imaging (2020) 47:907–921 919 treatments with 177Lu-octreotate in combination with capecitabine in seven patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2008;35:743–8. <https://doi.org/10.1007/s00259-007-0688-7>.
51. Hubble D, Kong G, Michael M, Johnson V, Ramdave S, Hicks RJ. 177Lu-octreotate, alone or with radiosensitising chemotherapy, is safe in neuroendocrine tumour patients previously treated with high-activity 111In-octreotide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010;37:1869–75. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1483-4>.
52. Claringbold PG, Brayshaw PA, Price RA, Turner JH. Phase II study of radiolabeled peptide 177Lu-octreotate and capecitabine therapy of progressive disseminated neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2011;38:302–11. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1631-x>.
53. Kong G, Thompson M, Collins M, Herschtal A, Hofman MS, Johnston V, et al. Assessment of predictors of response and long-term survival of patients with neuroendocrine tumour treated with peptide receptor chemoradionuclide therapy (PRCRT). *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2014;41:1831–44. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2788-5>.
54. Kashyap R, Hofman MS, Michael M, Kong G, Akhurst T, Eu P, et al. Favourable outcomes of (177)Lu-octreotate peptide receptor chemoradionuclide therapy in patients with FDG-avid neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2015;42:176–85. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2906-4>.
55. Claringbold PG, Price RA, Turner JH. Phase I-II study of radiolabeled peptide 177Lu-octreotate in combination with capecitabine and temozolomide in advanced low-grade neuroendocrine tumors. *Cancer Biother Radiopharm.* 2012;27:561–9. <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1276>.

56. Kesavan M, Claringbold PG, Turner JH. Hematological toxicity of combined ¹⁷⁷Lu-octreotate radiopeptide chemotherapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in long-term follow-up. *Neuroendocrinology*. 2014;99:108–17. <https://doi.org/10.1159/000362558>.
57. Claringbold PG, Turner JH. Pancreatic neuroendocrine tumor control: durable objective response to combination ¹⁷⁷Lu-octreotatecapecitabine-temozolomide radiopeptide chemotherapy. *Neuroendocrinology*. 2016;103:432–9. <https://doi.org/10.1159/000434723>.
58. Lewin J, Cullinane C, Akhurst T, Waldeck K, Watkins DN, Rao A, et al. Peptide receptor chemoradionuclide therapy in small cell carcinoma: from bench to bedside. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42:25–32. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2888-2>.
59. Pool SE, Bison S, Koelewijn SJ, van der Graaf LM, Melis M, Krenning EP, et al. mTOR inhibitor RAD001 promotes metastasis in a rat model of pancreatic neuroendocrine cancer. *Cancer Res*. 2013;73:12–8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2089>.
60. Bison SM, Pool SE, Koelewijn SJ, van der Graaf LM, Groen HC, Melis M, et al. Peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) with [(¹⁷⁷Lu-DOTA(0),Tyr(3))]octreotate in combination with RAD001 treatment: further investigations on tumor metastasis and response in the rat pancreatic CA20948 tumor model. *EJNMMI Res*. 2014;4:21. <https://doi.org/10.1186/s13550-014-0021-y>.
61. Claringbold PG, Turner JH. NeuroEndocrine Tumor Therapy with Lutetium-177-octreotate and Everolimus (NETTLE): a phase I study. *Cancer Biother Radiopharm*. 2015;30:261–9. <https://doi.org/10.1089/cbr.2015.1876>.
62. Elf AK, Bernhardt P, Hofving T, Arvidsson Y, Forssell-Aronsson E, Wangberg B, et al. NAMPT inhibitor GMX1778 enhances the efficacy of ¹⁷⁷Lu-DOTATATE treatment of neuroendocrine tumors. *J Nucl Med: Off Publ, Soc Nucl Med*. 2016. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.177584>.
63. Nonnekens J, van Kranenburg M, Beerens CE, Suker M, Doukas M, van Eijck CH, et al. Potentiation of peptide receptor radionuclide therapy by the PARP inhibitor olaparib. *Theranostics*. 2016;6:1821–32. <https://doi.org/10.7150/thno.15311>.
64. Purohit NK, Shah RG, Adant S, Hoepfner M, Shah GM, Beauregard JM. Potentiation of (¹⁷⁷Lu)-octreotate peptide receptor radionuclide therapy of human neuroendocrine tumor cells by PARP inhibitor. *Oncotarget*. 2018;9:24693–706. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25266>.
65. Spetz J, Langen B, Rudqvist N, Parris TZ, Helou K, Nilsson O, et al. Hedgehog inhibitor sonidegib potentiates ¹⁷⁷Lu-octreotate therapy of GOT1 human small intestine neuroendocrine tumors in nude mice. *BMC Cancer*. 2017;17:528. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3524-x>.
66. Jin XF, Auernhammer CJ, Ilhan H, Lindner S, Nolting S, Maurer J, et al. Combination of 5-fluorouracil with epigenetic modifiers induces radiosensitization, somatostatin receptor 2 expression and radioligand binding in neuroendocrine tumor cells in vitro. *J Nucl Med: Off Publ, Soc Nucl Med*. 2019. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.224048>.
67. Cavalcanti E, Ignazzi A, De Michele F, Caruso ML. PDGFRalpha expression as a novel therapeutic marker in well-differentiated neuroendocrine tumors. *Cancer Biol Ther*. 2019;20:423–30. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1529114>.
68. Yazdani S, Kasajima A, Tamaki K, Nakamura Y, Fujishima F, Ohtsuka H, et al. Angiogenesis and vascular maturation in neuroendocrine tumors. *Hum Pathol*. 2014;45:866–74. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.09.024>.
69. Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol*. 2013;31:2205–18. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.3653>.
70. Viallard C, Larrivee B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>.

71. Stepien K, Ostrowski RP, Matyja E. Hyperbaric oxygen as an adjunctive therapy in treatment of malignancies, including brain tumours. *Med Oncol*. 2016;33:101. <https://doi.org/10.1007/s12032-016-0814-0>.
72. Kleibeuker EA, Ten Hooven MA, Verheul HM, Slotman BJ, Thijssen VL. Combining radiotherapy with sunitinib: lessons (to be) learned. *Angiogenesis*. 2015;18:385–95. <https://doi.org/10.1007/s10456-015-9476-3>.
73. Villaume K, Blanc M, Gouysse G, Walter T, Couderc C, Nejjari M, et al. VEGF secretion by neuroendocrine tumor cells is inhibited by octreotide and by inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Neuroendocrinology*. 2010;91:268–78. <https://doi.org/10.1159/000289569>.
74. Kratochwil C, Stefanova M, Mavriopoulou E, Holland-Letz T, Dimitrakopoulou-Strauss A, Afshar-Oromieh A, et al. SUV of [68Ga]DOTATOC-PET/CT predicts response probability of PRRT in neuroendocrine tumors. *Mol Imaging Biol: MIB: Off Publ Acad Mol Imaging*. 2015;17:313–8. <https://doi.org/10.1007/s11307-014-0795-3>.
75. Ilan E, Sandstrom M, Wassberg C, Sundin A, Garske-Roman U, Eriksson B, et al. Dose response of pancreatic neuroendocrine tumors treated with peptide receptor radionuclide therapy using 177Lu-DOTATATE. *J Nucl Med: Off Publ, Soc Nucl Med*. 2015;56:177–82. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.148437>.
76. Slama A, Videau C, Kordon C, Epelbaum J. Estradiol regulation of somatostatin receptors in the arcuate nucleus of the female rat. *Neuroendocrinology*. 1992;56:240–5.
77. Vidal C, Rauly I, Zeggari M, Delesque N, Esteve JP, Saint-Laurent N, et al. Up-regulation of somatostatin receptors by epidermal growth factor and gastrin in pancreatic cancer cells. *Mol Pharmacol*. 1994;46:97–104. *920 Eur J Nucl Med Mol Imaging (2020)* 47:907–921
78. Riaz H, Dong P, Shahzad M, Yang L. Constitutive and folliclestimulating hormone-induced action of somatostatin receptor-2 on regulation of apoptosis and steroidogenesis in bovine granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;141:150–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.02.001>.
79. Nelson LE, Sheridan MA. Insulin and growth hormone stimulate somatostatin receptor (SSTR) expression by inducing transcription of SSTR mRNAs and by upregulating cell surface SSTRs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291:R163–9. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00754.2005>.
80. Kimura N, Takamatsu N, Yaoita Y, Osamura RY, Kimura N. Identification of transcriptional regulatory elements in the human somatostatin receptor sst2 promoter and regions including estrogen response element half-site for estrogen activation. *J Mol Endocrinol*. 2008;40:75–91. <https://doi.org/10.1677/JME-07-0108>.
81. Pscherer A, Dorflinger U, Kirfel J, Gawlas K, Ruschoff J, Buettner R, et al. The helix-loop-helix transcription factor SEF-2 regulates the activity of a novel initiator element in the promoter of the human somatostatin receptor II gene. *EMBO J*. 1996;15:6680–90.
82. Xu Y, Berelowitz M, Bruno JF. Characterization of the promoter region of the human somatostatin receptor subtype 2 gene and localization of sequences required for estrogen-responsiveness. *Mol Cell Endocrinol*. 1998;139:71–7.
83. Zimmermann N, Lazar-Karsten P, Keck T, Billmann F, Schmid S, Brabant G, et al. Expression pattern of CDX2, estrogen and progesterone receptors in primary gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and metastases. *Anticancer Res*. 2016;36:921–4.
84. Sica G, Wagner PL, Altorki N, Port J, Lee PC, Vazquez MF, et al. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in primary pulmonary neuroendocrine tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132:1889–95. <https://doi.org/10.1043/1543-2165-132.12.1889>.

85. Presky DH, Schonbrunn A. Somatostatin pretreatment increases the number of somatostatin receptors in GH4C1 pituitary cells and does not reduce cellular responsiveness to somatostatin. *J Biol Chem.* 1988;263:714–21.
86. Liu Z, Marquez M, Nilsson S, Holmberg AR. Incubation with somatostatin, 5-aza decitabine and trichostatin up-regulates somatostatin receptor expression in prostate cancer cells. *Oncol Rep.* 2008;20:151–4.
87. Degirmenci M, Erdogan AP, Bulut G, Atmaca H, Uzunoglu S, Karaca B, et al. Octreotide in combination with AT-101 induces cytotoxicity and apoptosis through up-regulation of somatostatin receptors 2 and 5 in DU-145 prostate cancer cells. *Tumour Biol.* 2016;37:4939–44. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4331-0>.
88. Basu S, Ostwal V. Observation on enhanced avidity on somatostatin receptor targeted 68Ga-DOTATATE PET-CT following therapy with everolimus and capecitabine-temozolamide: is redifferentiation akin phenomenon a reality in neuroendocrine tumors? *Nucl Med Commun.* 2016;37:669–71. <https://doi.org/10.1097/MNM.0000000000000507>.
89. Thakral P, Sen I, Pant V, Gupta SK, Dureja S, Kumari J, et al. Dosimetric analysis of patients with gastro entero pancreatic neuroendocrine tumors (NETs) treated with PRCRT (peptide receptor chemo radionuclide therapy) using Lu-177 DOTATATE and capecitabine/temozolomide (CAP/TEM). *Br J Radiol.* 2018;91: 20170172. <https://doi.org/10.1259/bjr.20170172>.
90. Fan X, Mao Z, He D, Liao C, Jiang X, Lei N, et al. Expression of somatostatin receptor subtype 2 in growth hormone-secreting pituitary adenoma and the regulation of miR-185. *J Endocrinol Investig.* 2015;38:1117–28. <https://doi.org/10.1007/s40618-015-0306-7>.
91. Melis M, Forrer F, Capello A, Bijster M, Bernard BF, Reubi JC, et al. Up-regulation of somatostatin receptor density on rat CA20948 tumors escaped from low dose [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate therapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2007;51:324–33.
92. Behe MKS, Pqsken M, Gross M, Alfke H, Keil B, et al. Irradiation-induced upregulation of somatostatin and gastrin receptors in vitro and in vivo. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004;31:S237–8.
93. Capello A, Krenning E, Bernard B, Reubi JC, Breeman W, de Jong M. 111In-labelled somatostatin analogues in a rat tumour model: somatostatin receptor status and effects of peptide receptor radionuclide therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2005;32:1288–95. <https://doi.org/10.1007/s00259-005-1877-x>.
94. Driessen CM, de Boer JP, Gelderblom H, Rasch CR, de Jong MA, Verbist BM, et al. Induction chemotherapy with docetaxel/cisplatin/5-fluorouracil followed by randomization to two cisplatinbased concomitant chemoradiotherapy schedules in patients with locally advanced head and neck cancer (CONDOR study) (Dutch Head and Neck Society 08-01): a randomized phase II study. *Eur J Cancer.* 2016;52:77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.09.024>.
95. Rich TA, Shepard RC, Mosley ST. Four decades of continuing innovation with fluorouracil: current and future approaches to fluorouracil chemoradiation therapy. *J Clin Oncol.* 2004;22: 2214–32. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.08.009>.
96. Kong G, Johnston V, Ramdave S, Lau E, Rischin D, Hicks RJ. High-administered activity In-111 octreotide therapy with concomitant radiosensitizing 5FU chemotherapy for treatment of neuroendocrine tumors: preliminary experience. *Cancer Biother Radiopharm.* 2009;24:527–33. <https://doi.org/10.1089/cbr.2009.0644>.
97. Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18:610–21. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.53>.

98. Gupte R, Liu Z, Kraus WL. PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes Dev.* 2017;31:101–26. <https://doi.org/10.1101/gad.291518.116>.
99. Watson M, Roulston A, Belec L, Billot X, Marcellus R, Bedard D, et al. The small molecule GMX1778 is a potent inhibitor of NAD⁺ biosynthesis: strategy for enhanced therapy in nicotinic acid phosphoribosyltransferase 1-deficient tumors. *Mol Cell Biol.* 2009;29:5872–88. <https://doi.org/10.1128/MCB.00112-09>.
100. Yaku K, Okabe K, Hikosaka K, Nakagawa T. NAD metabolism in cancer therapeutics. *Front Oncol.* 2018;8:622. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00622>.
101. Shah GM, Shah RG, Veillette H, Kirkland JB, Pasiaka JL, Warner RR. Biochemical assessment of niacin deficiency among carcinoid cancer patients. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:2307–14. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.00268.x>.
102. LaFargue CJ, Dal Molin GZ, Sood AK, Coleman RL. Exploring and comparing adverse events between PARP inhibitors. *Lancet Oncol.* 2019;20:e15–28. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30786-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30786-1).
103. Hovstadius P, Larsson R, Jonsson E, Skov T, Kissmeyer AM, Krasilnikoff K, et al. A phase I study of CHS 828 in patients with solid tumor malignancy. *Clin Cancer Res.* 2002;8:2843–50.
104. Bodei L, Kidd MS, Singh A, van der Zwan WA, Severi S, Drozdov IA, et al. PRRT genomic signature in blood for prediction of (177)Lu-octreotate efficacy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2018;45:1155–69. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-3967-6>.

Chapitre 2 :

Potentialisation de la thérapie radionucléidique au ^{177}Lu -
octréotate des tumeurs neuroendocrines humaines par des
inhibiteurs de PARP

1. Avant-Propos

Les travaux préliminaires que j'ai effectués aux laboratoires au début de ma maîtrise ont permis à l'équipe du laboratoire d'écrire un article scientifique original. Cet article a été publié dans la revue Oncotarget en mai 2018.

Purohit NK, Shah RG, **Adant S**, Hoepfner M, Shah GM, Beauregard JM. Potentiation of ¹⁷⁷Lu-octreotate peptide receptor radionuclide therapy of human neuroendocrine tumor cells by PARP inhibitor. Oncotarget. 2018 May 15;9(37):24693-24706. doi: 10.18632/oncotarget.25266.

2. Matériels et méthodes

Réactifs

Les réactifs utilisés ont été achetés de Sigma. Les produits reliés à la culture cellulaire ont été achetés de Life Technology. Le substrat immobilisé western chemiluminescent HRP (WBKLS0500) vient de Millipore. L'inhibiteur de PARP, 1,5-dihydroxyisoquinoline (DHQ), provient de Sigma.

Agents radiopharmaceutiques

Le radiomarquage du ^{177}Lu -octroïate a été fait tel que décrit précédemment [109] et a été utilisé pour des traitements cliniques de PRRT et pour les expériences. $^{177}\text{LuCl}_3$ a été obtenu d'IDB Holland BV, et le [DOTA⁰,Tyr³]-octroïate a été généreusement fourni par l'Erasmus Medical Center (Rotterdam, Pays-Bas). La pureté radiochimique du ^{177}Lu -octroïate était >97%, et l'activité spécifique variait entre 22,015 à 85,100 MBq/ μmole .

Culture cellulaire

BON-1 est une lignée cellulaire de TNE pancréatique établie d'une tumeur carcinoïde pancréatique humaine qui a été maintenue telle que décrite dans la référence suivante [110]. NCI-H727 est une lignée cellulaire de TNE bronchopulmonaire (CRL-5815) obtenue et entretenue selon les protocoles de l'ATCC.

Croissance des sphéroïdes

Les sphéroïdes de BON-1 et NCI-H727 ont été développés selon le protocole décrit précédemment [111]. Après six jours, lorsque les sphéroïdes atteignaient entre 300 et 400 μm de diamètre, ils ont été traités avec 2.75 MBq de ^{177}Lu -octroïate/ml de milieu de culture ou un placebo et ce en présence ou non d'un iPARP pour une durée de cinq jours. Au cinquième jour, le milieu de culture a été changé et la croissance a été observée encore pour 10 jours avec une exposition continue à l'iPARP dans les groupes concernés. Les images des sphéroïdes ont été prises tous les jours à un grossissement de 20X avec le microscope Zeiss Axiovert 200. Le volume des sphéroïdes a été calculé par la formule $V = 0.5 \times \text{longueur} \times \text{largeur}^2$ à partir des dimensions mesurées sur les photos en utilisant le logiciel Axio Vision 4.9.1. La croissance moyenne a été calculée de manière relative au volume des sphéroïdes au début de traitement (Jour 0) et en utilisant la moyenne du volume de 6 sphéroïdes par groupe de traitement. Pour les analyses de captation de radioactivité, six à 12 sphéroïdes ont été combinés en fonction du groupe de traitement.

Mesure de la captation de ^{177}Lu -octroïate

6 à 12 sphéroïdes ont été collectés, mis sur un filtre en fibre de verre Millipore au maillage de 0,7 μm sous vide et lavés à deux reprises au PBS. Les sphéroïdes ont ensuite été mis dans un vial avec du

liquide de scintillation. L'activité radioactive a été mesurée dans un compteur à scintillation liquide (Coulter). La captation de ^{177}Lu -octréotate est présentée en Bq/mm^3 de sphéroïdes.

Analyses statistiques

Tous les graphiques et les analyses statistiques ont été faits en utilisant le programme Excel (Microsoft corporation). Les comparaisons ont été faites en utilisant le test de Student et les tests étaient significatifs lorsque la valeur P était < 0.05 .

3. Résultats

3.1. Internalisation du ^{177}Lu -octréotate par les sphéroïdes BON-1 et NCI-H727

Étant donné que les sphéroïdes n'ont jamais été utilisés comme modèle pour étudier la PRRT, nous voulions nous assurer qu'il y avait internalisation du ^{177}Lu -octréotate. De plus, nous voulions différencier les mécanismes d'action qui pourraient expliquer l'efficacité de la combinaison ^{177}Lu -octréotate avec un iPARP. Les sphéroïdes BON-1 et H727 ont une émission de rayonnement bêta plus élevée que le bruit de fond relié à la captation et à l'internalisation du ^{177}Lu -octréotate. De plus, l'iPARP DHQ n'affecte pas significativement l'internalisation du radiotracer, et ce pour les deux lignées cellulaires, bien qu'il y ait une tendance à une augmentation de l'internalisation dans la lignée NCI-H727 (Fig 2.1).

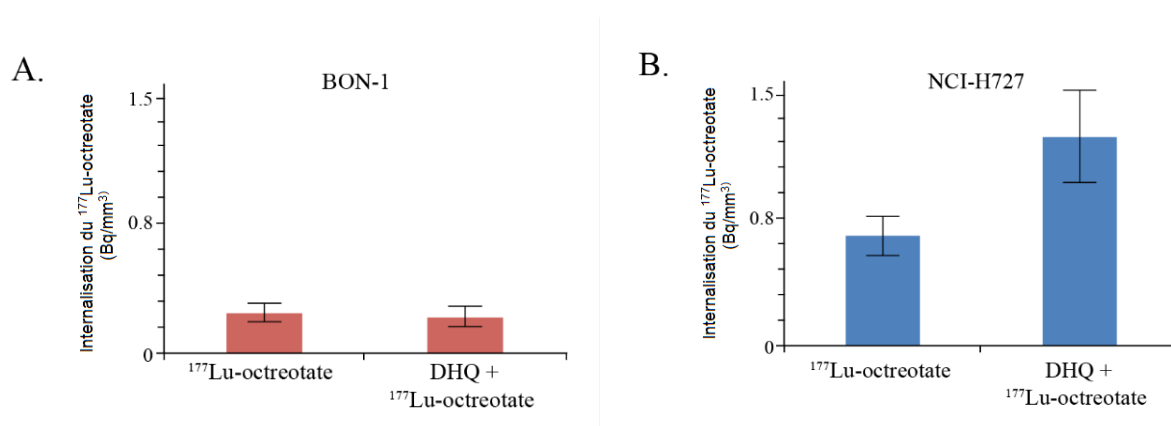


Figure 2.1. Effet du iPARP sur l'internalisation du ^{177}Lu -octréotate dans les sphéroïdes. Internalisation du ^{177}Lu -octréotate par les sphéroïdes traités par 2.75 MBq de ^{177}Lu -octréotate/ml pour 5 jours en présence ou en absence de l'iPARP, DHQ (a) BON-1 (b) NCI-H727. 6 à 12 sphéroïdes par groupe. Les barres représentent la moyenne \pm la déviation standard des Bq/mm³.

3.2. Potentialisation du ^{177}Lu -octréotate par les iPARP dans les sphéroïdes BON-1

Les sphéroïdes BON-1 ont eu une période de croissance de 15 jours. Les sphéroïdes non traités ont augmenté leur volume de 16 fois leur taille originale comparativement aux sphéroïdes traités au ^{177}Lu -octréotate, au iPARP ou à la combinaison qui ont eu augmenté de 11, 5 et 1.9 fois respectivement (Fig 2.2). À partir du 5^{ème} jour, la croissance a cessé pour les sphéroïdes recevant le traitement combiné. La différence de croissance des sphéroïdes traités au ^{177}Lu -octréotate et au iPARP est devenue significative au 8^{ème} jour par rapport aux sphéroïdes traités avec un des deux traitements.

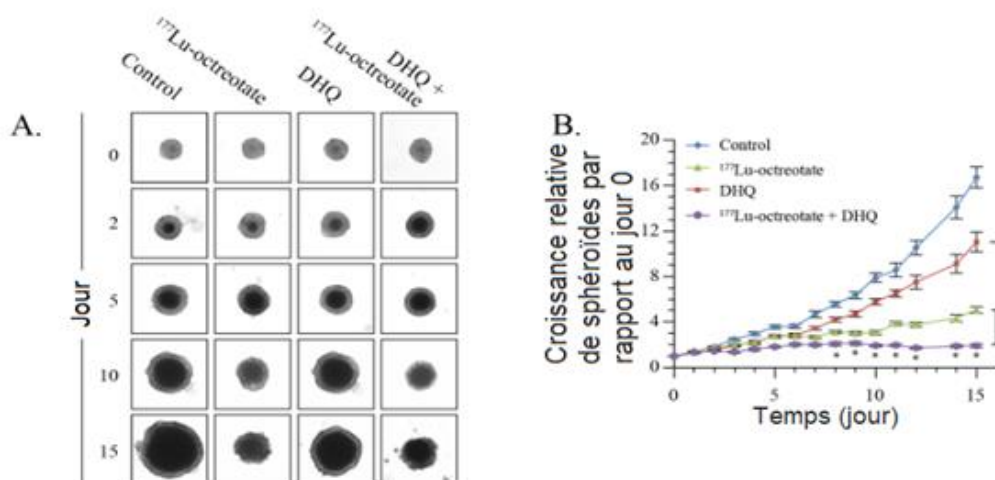


Figure 2.2 : Effet du ¹⁷⁷Lu-octréotate et du iPARP sur la croissance des sphéroïdes BON-1. A) Image représentative de 12 à 24 sphéroïdes à travers le temps et en fonction des traitements reçus. Le noyau noir et les zones grises périphériques représentent respectivement les parties mortes et viables des sphéroïdes. (B) Chaque point représente l'augmentation relative du volume moyen de 12 à 24 sphéroïdes issus de deux expériences indépendantes \pm déviation standard par rapport au volume au jour 0. * indique que tous les points de données sont significativement différents entre les groupes de traitement DHQ seul et ¹⁷⁷Lu-octréotate + DHQ ainsi qu'entre les groupes de traitement ¹⁷⁷Lu-octréotate et ¹⁷⁷Lu-octréotate + DHQ l'un de l'autre à partir du jour 8 avec des valeurs $p \leq 0,01$. À partir du jour 4, les trois groupes traitements sont significativement différents du groupe contrôle.

3.3 Potentialisation du ¹⁷⁷Lu-octréotate par les iPARP dans les sphéroïdes H727

De manière similaire, après 15 jours de traitements sur des sphéroïdes NCI-H727, la combinaison ¹⁷⁷Lu-octréotate et iPARP a davantage inhibé la croissance de sphéroïdes que les traitements individuels. Les sphéroïdes non traités ont augmenté leur volume de 16 fois par rapport à leur taille originale, alors que les sphéroïdes traités au ¹⁷⁷Lu-octréotate, à l'iPARP ou à la combinaison ont eu une augmentation de 3.5, 4.6 et 2.8 fois respectivement (Fig 2.3). La combinaison n'a pas complètement arrêté la croissance des sphéroïdes. La différence de croissance des sphéroïdes traités au ¹⁷⁷Lu-octréotate et à l'iPARP est devenue significative au 11^{ième} jour par rapport aux sphéroïdes traités avec un seul traitement. La croissance des sphéroïdes NCI-H727 a davantage été affectée que les sphéroïdes BON-1 par une dose équivalente d'iPARP.

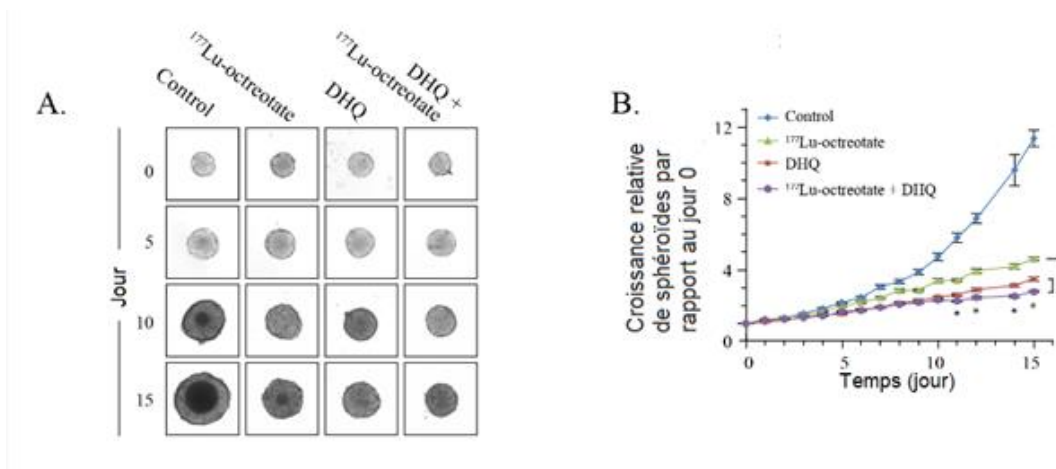


Figure 2.3. Effet du ¹⁷⁷Lu-octréotate et du iPARP sur la croissance des sphéroïdes NCI-H727

A) Image représentative de 12 à 24 sphéroïdes à travers le temps et en fonction des traitements reçus. Le noyau noir et les zones grises périphériques représentent respectivement les parties mortes et viables des sphéroïdes. (B) Chaque point représente l'augmentation relative du volume moyen de 12 à 24 sphéroïdes issus de deux expériences indépendantes \pm déviation standard par rapport au volume au jour 0. * indique que tous les points de données sont significativement différents entre les groupes de traitement DHQ seul et ¹⁷⁷Lu-octréotate + DHQ ainsi qu'entre les groupes de traitement ¹⁷⁷Lu-octréotate et ¹⁷⁷Lu-octréotate + DHQ l'un de l'autre à partir du jour 8 avec des valeurs $p \leq 0,01$. À partir du jour 7, les trois groupes traitements sont significativement différents du groupe contrôle.

4. Conclusions

Les différentes expériences sur les sphéroïdes ont permis de déterminer l'efficacité du iPARP pour potentialiser les effets du ¹⁷⁷Lu-octréotate sur la croissance cellulaire de deux lignées cellulaires de TNEs. En l'absence d'effet du iPARP sur l'internalisation du ¹⁷⁷Lu-octréotate, l'efficacité du traitement combinatoire est probablement due à l'augmentation des dommages à l'ADN menant à l'apoptose induite par le blocage de la réparation des dommages à l'ADN. Il est aussi noté que la lignée cellulaire NCI-H727 a une sensibilité accrue au iPARP. Les résultats seront discutés plus en profondeur au chapitre 4.

Chapitre 3 :

Augmentation par la chimiothérapie des récepteurs de la somatostatine 2 dans les tumeurs neuroendocrines

1. Avant-propos

Dans les recherches préliminaires et avec la lecture des études sur la régulation du gène *SSTR2*, notre équipe a observé que la chimiothérapie pouvait réguler l'expression de *SSTR2*. La fin de mes travaux de maitrise a donc porté sur la standardisation de protocole de laboratoire pour minimiser la toxicité des chimiothérapies tout en conservant une augmentation des *SSTR2* et de l'internalisation de ¹⁷⁷Lu-octréotate et sur la recherche d'hypothèses expliquant ce mécanisme.

Les travaux préliminaires débutés lors de cette maitrise ont permis l'écriture d'un article scientifique paru dans la revue *Cancers* le 10 janvier 2021.

Shah RG, Merlin MA, **Adant S**, Zine-Eddine F, Beauregard JM, Shah GM. Chemotherapy-Induced Upregulation of Somatostatin Receptor-2 Increases the Uptake and Efficacy of ¹⁷⁷Lu-DOTA-Octreotate in Neuroendocrine Tumor Cells. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 10;13(2):232. doi: 10.3390/cancers13020232.

2. Matériel et méthode

Réactifs

Les réactifs utilisés ont été achetés de Sigma. Les produits reliés à la culture cellulaire ont été achetés de Life Technology. Le substrat immobilon western chemiluminescent HRP (WBKLS0500) vient de Millipore.

Agents radiopharmaceutiques

Le radiomarquage du ^{177}Lu -octréotate a été fait tel que décrit précédemment [109] et a été utilisé pour des traitements cliniques de PRRT et pour les expériences. $^{177}\text{LuCl}_3$ a été obtenu de IDB Holland BV, et le $[\text{DOTA}^0, \text{Tyr}^3]$ -octréotate a été généreusement fourni par l'Erasmus Medical Center (Rotterdam, Pays-Bas). La pureté radiochimique du ^{177}Lu -octréotate était >97%, et l'activité spécifique variait entre 22,015 to 85,100 MBq/ μmole . Le ^{177}Lu -DTPA a été préparé en mélangeant du $^{177}\text{LuCl}_3$ avec le DTPA pour un ratio 1:3 à température pièce.

Culture cellulaire

BON-1 est une lignée cellulaire de TNE pancréatique établie d'une tumeur carcinoïde pancréatique humaine qui a été maintenue telle que décrite [110]. Les cellules humaines HEK-293 ont été cultivées dans un milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de fœtus bovin et 1% de pénicilline/streptomycine.

Mesure de l'internalisation du ^{177}Lu -octréotate

Des monocouches de cellules cultivées dans des plaques de six puits ont été incubés avec le ^{177}Lu -octréotate pendant 3h. Les cellules ont été lavées deux fois au PBS, ont été trypsinisées durant 5 minutes et 500 μl de milieu de culture a été ajouté. La suspension cellulaire a été centrifugée. Le surnageant représente la radioactivité libre qui n'a pas été lavée par le PBS et la radioactivité liée à des SSTRs membranaires séparés des cellules lors de la trypsinisation. Ce surnageant a été collecté dans un vial avec du liquide de scintillation. Par la suite, 500 μl de PBS avec de l'acide acétique à pH 5 a été ajouté pour suspendre les cellules radioactives. Cette suspension a été incubée 5 minutes à 37°C pour permettre la dissociation complète du ^{177}Lu -octréotate lié aux SSTRs membranaires sans briser l'intégrité de la membrane cellulaire et donc garder le ^{177}Lu -octréotate internalisé intact. Après l'incubation, la suspension a été centrifugée et le surnageant contenant du ^{177}Lu -octréotate extracellulaire a été ajouté au vial précédent. Ce vial contenait donc l'ensemble de la radioactivité qui était originellement lié à la membrane cellulaire sur les SSTR non internalisés. Le culot a été suspendu à nouveau dans 500 μl de PBS et a été ajouté à un second vial avec du liquide de scintillation. Ce vial contenait donc l'ensemble de la radioactivité internalisée dans les cellules. L'activité radioactive a été mesurée dans un compteur à scintillation liquide (Coulter).

Toxicité du TMZ et 5-FU

20 000 cellules BON-1 ont étéensemencées par puits de plaques à 24 puits. 6 puits ont été exposés par dose croissante de TMZ ou de 5-FU (0,01 à 100µM) pour 24h. Chaque condition avait 4 échantillons à collecter au jour 2, 4, 6 ou 9 après l'exposition au TMZ ou 5-FU. La viabilité cellulaire a ensuite été déterminée au bleu de trypan.

Viabilité cellulaire au bleu de trypan

Les cellules BON-1 ont été traitées au 5-FU, TMZ, ¹⁷⁷Lu-octréotate ou ¹⁷⁷Lu-DTPA tel que décrit ci-haut. 4 à 6 duplicatas par modalité de traitement ou par temps ont été utilisés. Au moment spécifié, les cellules ont été trypsinisées 5 min avec la trypsine 0.1% puis suspendues dans du milieu de culture DMEM-F12. Une suspension unicellulaire a été faite duquel un volume a été retiré et mélangé avec un volume égal de 0.4% de bleu de trypan (GIBCO) pour compter les cellules vivantes qui n'ont pas intégré le colorant.

qRT-PCR pour SSTR1 à SSTR5

100 000 cellules BON-1 ont étéensemencées et deux jours plus tard la moitié ont été traitées 24 heures par 10 µM de TMZ. Chaque jour, trois à six puits ont été récoltés en retirant le milieu et en ajoutant du tryzol. Les échantillons ont été conservés à -30°C. Le lysat cellulaire a ensuite été remis au service de biologie du centre de recherche du CHUL pour réaliser un qRT-PCR des gènes SSTR 1 à 5. Les 5 gènes de SSTR ont été exprimés en rapport avec deux gènes « domestiques », GAPDH ou G6PD.

Immunobuvardage

100 000 cellules BON-1 ou HEK-1 ont étéensemencées sur des plaques à 6 puits. Les cellules HEK-1 ont été traitées avec 30, 100 ou 300 µM de TMZ pendant 24h. Chaque condition était en triplicata ou à 6 échantillons pour avoir assez de protéines. Les cellules traitées au TMZ ou 5-FU ont été délicatement raclées dans du PBS froid, centrifugées, suspendues dans un tampon 1X Laemmli SDS-PAGE et soniquées pour préparer un extrait de protéines pour le SDS-PAGE et ce à chaque jour pour former un échantillon de protéines par condition. 10-20 µg de protéines, déterminé par test de Bradford, pour chaque condition de traitement ont été mis dans un gel SDS-PAGE de gradient variant entre 6 et 15%, transférés sur une membrane de nitrocellulose et sondés avec les anticorps. L'immunomarquage de β-actine ou la teinture de la membrane au Ponceau S ont été utilisés pour les contrôles de volume.

Anticorps

Les anticorps suivants ont été utilisés selon les dilutions spécifiées : SSTR2 (1 :1000, Abcam), cycline B1 (1 :2500, Neomarker), cycline E (1 :200, Neomarker), γ H2AX (1:1,000, Millipore), Rad51 (1 :500, Santacruz) et β -actin (1:20,000, Sigma).

Analyses statistiques

Tous les graphiques et les analyses statistiques ont été faits en utilisant le programme Excel (Microsoft corporation). Les comparaisons ont été faites en utilisant le test de Student et les tests étaient significatifs lorsque la valeur P était < 0.05 . L'analyse par ANOVA, deux facteurs a été effectué par le logiciel Origin (OriginLab Corporation) et les tests étaient significatifs lorsque la valeur P était < 0.05 .

3. Résultats:

3.1. Étude de l'internalisation du ^{177}Lu -octréotate:

Le ^{177}Lu -octréotate a la propriété de se lier aux SSTR2 et ensuite d'être internalisé dans la cellule. Pour étudier la spécificité de la liaison du ^{177}Lu -octréotate sur le SSTR, le ^{177}Lu -octréotate est comparé au ^{177}Lu -DTPA. Ce dernier permet de solubiliser le lutécium-177 sans lui permettre de se fixer au SSTR ou de pénétrer dans les cellules.

3.7MBq de ^{177}Lu -octréotate et de Lu-DTPA a été ajouté pour 3h au milieu de culture de cellules traitées ou non au TMZ 100 μM durant 24h. Le milieu radioactif a été retiré, les puits ont été lavés deux fois au PBS, les cellules ont été trypsinisées pour 5 minutes et 500 μl de milieu a été ajouté pour suspendre les cellules. 250 μl de suspension unicellulaire a été mis dans un vial à compteur bêta avec 5ml de liquide de scintillation. Le vial contenait l'ensemble de la radioactivité autant à l'extérieur qu'à l'intérieur des cellules. Il y avait environ 30 000 cellules par vial lorsqu'elles étaient traitées par 100 μM TMZ et 500 000 cellules par vial lorsqu'elles n'étaient pas traitées. Cette technique ne distingue pas la rétention de lutécium-177 intracellulaire de la rétention extracellulaire. Elle a tout de même permis de détecter une augmentation de la rétention secondaire au TMZ, mais ce résultat était teinté de beaucoup de liaison non spécifique du lutécium-177 et de bruit de fond.

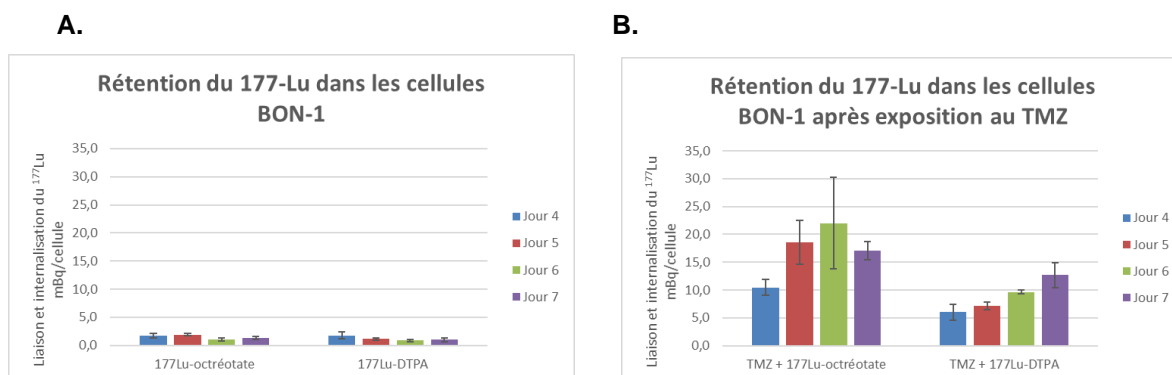


Fig. 3.1 Effet du TMZ sur la rétention du lutécium-177 provenant du ^{177}Lu -octréotate ou du ^{177}Lu -DTPA par les cellules BON-1 avec des doses élevées de radioactivité et de TMZ.

Rétention du lutécium-177 suivant une exposition à 3.7 MBq de ^{177}Lu -octréotate ou de ^{177}Lu -DTPA pour 3h, entre le jour 4 et 7 post-TMZ, **A.** par les cellules BON-1, **B.** par les cellules BON-1 traitées 24h au jour 0 avec 100 μM de TMZ. Toutes les valeurs de radioactivité sont corrigées pour la demi-vie en fonction du jour 7. Les résultats sont la moyenne des trois échantillons et les barres d'erreurs représentent la déviation standard.

En effet, le traitement de 100 μM de TMZ a multiplié d'un facteur 10 la rétention du ^{177}Lu -octréotate par cellule. Cependant, la liaison non spécifique du ^{177}Lu -DTPA est similaire à celui du ^{177}Lu -octréotate dans les cellules non traitées ce qui pourrait cacher la rétention réelle de ^{177}Lu dans les cellules non traitées et sous-estimer l'effet du TMZ (Fig 3.1A). De plus, l'émission de radioactivité par

les cellules traitées au TMZ et exposées au ^{177}Lu -DTPA augmente chaque jour (Fig 3.1B), ce qui est en corrélation inverse avec le nombre de cellules dans les vials (données non présentées). Il y a donc une quantité de radioactivité fixe et non spécifique dans ces conditions expérimentales qui cache un possible phénomène biologique.

Pour réduire ce bruit de fond, la dose de radioactivité a été diminuée à 0.37 MBq et des étapes de lavages ont été ajoutées. En plus du lavage au PBS et de la trypsinisation, 500 μl de cellules en suspension a été centrifugé. Par la suite, 500 μl de PBS avec de l'acide acétique à pH 5 a été ajouté pour resuspendre les cellules radioactives. Cette suspension a été incubée 5 minutes à 37°C pour permettre la dissociation par un mécanisme différent de la trypsine du ^{177}Lu -octroétate lié au SSTR membranaire sans briser l'intégrité de la membrane cellulaire et donc garder le ^{177}Lu -octroétate internalisé intact [112]. Après l'incubation, la suspension a été centrifugée et le surnageant contenant du ^{177}Lu -octroétate extracellulaire a été ajouté au vial précédent. Ce vial contenant les surnageants contenait donc l'ensemble de la radioactivité non internalisée, soit libre ou liée à la membrane cellulaire via les SSTR non-internalisés. Le culot a été suspendu à nouveau dans 500 μl de PBS et a été ajouté à un second vial avec du liquide de scintillation. Ce second vial contenait l'ensemble de la radioactivité internalisée dans les cellules. Il y avait environ 100 000 cellules par vial lorsqu'elles étaient traitées par 30 μM TMZ et 500 000 cellules par vial lorsqu'elles n'étaient pas traitées.

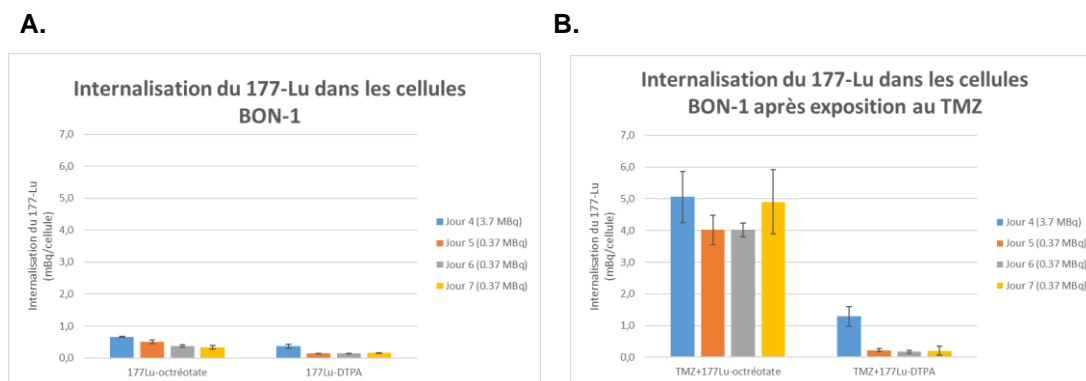


Fig 3.2. Effet du TMZ et de la dose de ^{177}Lu -octroétate sur l'internalisation du lutécium-177 provenant du ^{177}Lu -octroétate ou du ^{177}Lu -DTPA dans les cellules BON-1. Internalisation du lutécium-177 suivant une exposition à 3.7 MBq ou 0.37MBq de ^{177}Lu -octroétate ou de ^{177}Lu -DTPA pour 3h, entre le jour 4 et 7 post-TMZ, **A.** dans les cellules BON-1, **B.** dans les cellules BON-1 traitées 24h au jour 0 avec 30 μM de TMZ. Toutes les valeurs de radioactivité sont corrigées pour la demi-vie en fonction du jour 7. Les résultats sont la moyenne des trois échantillons et les barres d'erreurs représentent la déviation standard.

Nous notons encore l'augmentation d'environ un facteur 10 de l'internalisation du lutécium-177 lors de l'ajout de TMZ. Les quantités de radioactivité sont différentes entre les figures 3.1 et 3.2, car seulement la quantité de radioactivité située à l'intérieur est représentée dans la figure 3.2. Une

diminution de 10 fois la dose de radioactivité entre le jour 4 et le jour 5 a diminué significativement la liaison non-spécifique du ^{177}Lu -DTPA sans pour autant diminuer la liaison spécifique du ^{177}Lu -octroétate ce qui est particulièrement notable sur les cellules traitées au TMZ (Fig 3.2B). Donc, les étapes de lavage additionnelles et la séparation de la portion internalisée du ^{177}Lu a permis de bien différencier la spécificité du ^{177}Lu -octroétate par rapport au ^{177}Lu -DTPA ce qui permettra de mieux apprécier l'effet du TMZ sur l'internalisation du ^{177}Lu -octroétate via les SSTRs.

3.2. Toxicité du TMZ et du 5-FU sur BON-1

En condition expérimentale, le TMZ n'est pas toxique jusqu'à 1 μM , mais ralentit la croissance des cellules BON-1 à 10 μM et est cytostatique ou cytocide à 100 μM . Au jour 6, la croissance n'était pas altérée significativement avec 0,01 et 1 μM de TMZ. Pour les BON-1 traités à 10 μM , il y a une réduction de la croissance par rapport aux cellules non traitées de 58% au 6^{ème} jour. À 100 μM , il y a 40% moins de cellules que lors du jour du traitement (Fig. 3.3A). Une concentration de 10 μM est donc préférable, car il y a un effet biologique du TMZ sur les cellules, sans causer un mort cellulaire trop importante.

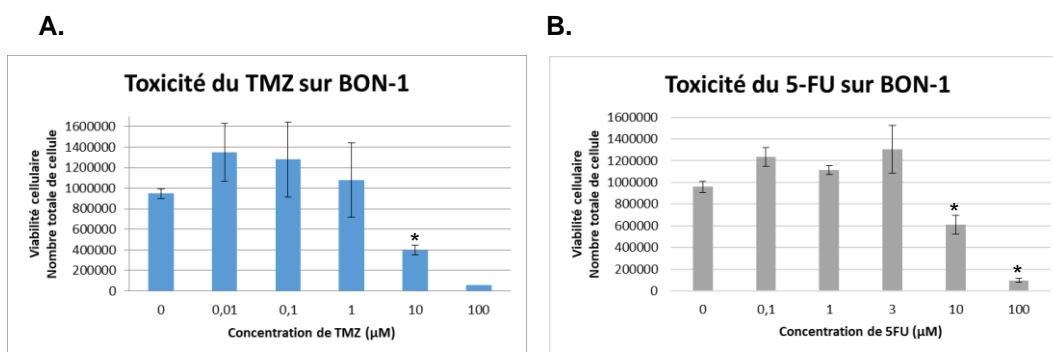


Fig 3.3. Toxicité du TMZ et du 5-FU sur les cellules BON-1. Viabilité cellulaire déterminée par comptage manuel avec bleu de trypan des cellules BON-1 exposées 24h à des doses croissantes de **A.** TMZ après 6 jours de croissance et **B.** de 5-FU après 9 jours de croissance. Chaque résultat est la moyenne de 4 échantillons, sauf à la concentration de 100 μM de TMZ où il y a eu de la contamination et seulement 1 échantillon a été compté. La barre d'erreur représente la déviation standard. * représente une différence significative au test de Student avec les cellules non-traitées avec une valeur $p < 0,05$.

5-FU diminue la croissance cellulaire à partir de 10 μM et ne modifie pas la croissance sous 3 μM . Au jour 9, des concentrations de 0,3 à 3 μM de 5-FU n'altèrent pas significativement la croissance de BON-1. La différence en nombre de cellules totales entre les cellules non traitées et celles traitées avec 10 et 100 μM de 5FU est de 37% et 90%. À 100 μM , le nombre de cellules est encore supérieur au jour 9 par rapport au jour du début du traitement (Fig. 3.3B) ce qui témoigne que le traitement est davantage cytostatique que cytocide. Une concentration de 10 μM est préférable pour le 5-FU.

3.3. Augmentation de l'ARNm du gène SSTR2 post-TMZ dans les cellules BON-1

L'ARNm du gène SSTR2 augmente à partir du jour 3 après un traitement de 10 μ M de TMZ pendant 24 heures et reste significativement supérieur aux cellules non traitées jusqu'au jour 6. Les ARNm des autres SSTR ne sont pas modulés par le traitement de TMZ. Donc, 2 à 3 jours après l'exposition des cellules BON-1 à du TMZ à 10 μ M, la cellule a une réponse au niveau de l'expression génique résultant notamment à l'augmentation de l'expression du gène SSTR2, mais pas des autres gènes de la famille des SSTR.

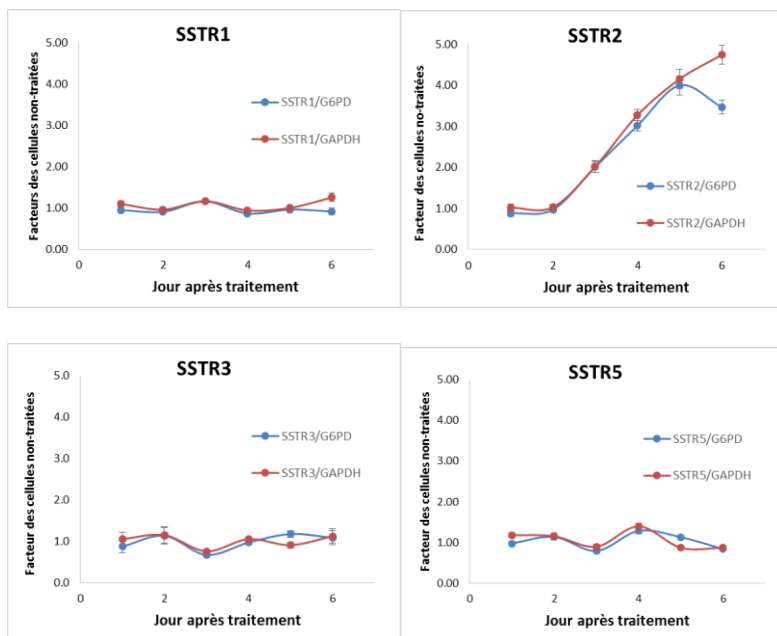


Fig. 3.4 Effet du TMZ sur l'expression de l'ARNm de SSTR1, 2, 3 et 5 dans les cellules BON-1 en fonction du temps. L'ARNm des SSTR est présenté selon le rapport entre les cellules traitées avec 10 μ M de TMZ et celles non traitées et présenté en rapport avec l'expression de deux gènes de contrôles, G6PD et GAPDH. 1 signifie qu'il n'y a pas de différence entre les cellules traitées et non traitées. SSTR4 n'est pas présenté puisqu'il n'y a aucune expression du gène SSTR4.

3.4. Augmentation des récepteurs SSTR2 dans les cellules BON-1 après TMZ et 5-FU, mais absentes dans les cellules non-TNEs

Les expériences préliminaires ont démontré que l'exposition à l'agent chimiothérapeutique pour 24h créait la même augmentation de SSTR2 au niveau protéique tout en étant moins toxique qu'une exposition prolongée pour toute la durée de l'expérience. De plus, il a été noté qu'une concentration non toxique de 1 μ M n'induit pas l'augmentation d'expression de SSTR2. À la concentration de 10 μ M, qui a été retenu pour sa toxicité moindre, l'augmentation de SSTR2 a été notée (Fig. 3.5). Tout comme pour nos résultats préliminaires, l'augmentation débute vers le troisième jour après 24 h de

TMZ et atteint un maximum au cinquième jour. L'augmentation est transitoire puisque les niveaux de SSTR2 redeviennent pratiquement normaux au septième ou huitième jour.

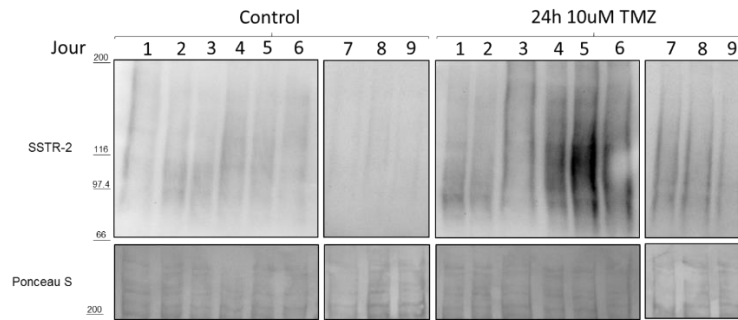


Fig. 3.5 Effet du TMZ sur l'expression protéique de SSTR2 dans les cellules BON-1 en fonction du temps. Immunobuvardage représentant SSTR2 dans les cellules BON-1 traitées ou non au TMZ durant 24h avec Ponceau S comme contrôle de charge.

Comme pour le TMZ, le 5-FU augmente l'expression de la protéines SSTR2 lorsqu'il atteint des concentrations toxiques, soit 10 μ M, dans les cellules BON-1 (Fig. 3.6). L'augmentation est visible à partir du jour 4 et est plus importante au jour 6.

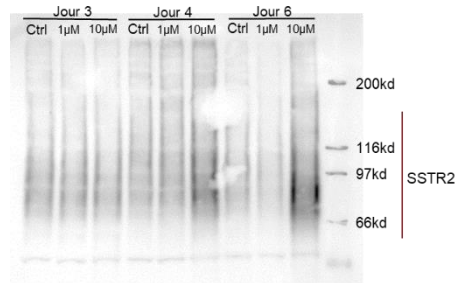


Fig. 3.6 Effet du 5-FU sur l'expression protéique de SSTR2 dans les cellules BON-1 en fonction du temps. Immunobuvardage représentant SSTR2 dans les cellules BON-1 traitées ou non au 5FU durant 24h.

L'augmentation de l'expression protéique de SSTR2 n'est pas influencée par le TMZ dans les cellules HEK (Fig 3.7). En effet, aux jours 4, 5 et 6, où l'expression de SSTR2 était la plus élevée chez BON-1, le niveau d'expression de la protéine SSTR2 est nul à toutes les concentrations utilisées. L'anticorps est fonctionnel, car le contrôle positif émet un signal. Ainsi, le TMZ n'induit pas et n'augmente pas l'expression du SSTR2 dans les cellules HEK qui n'expriment pas le SSTR2 constitutivement.

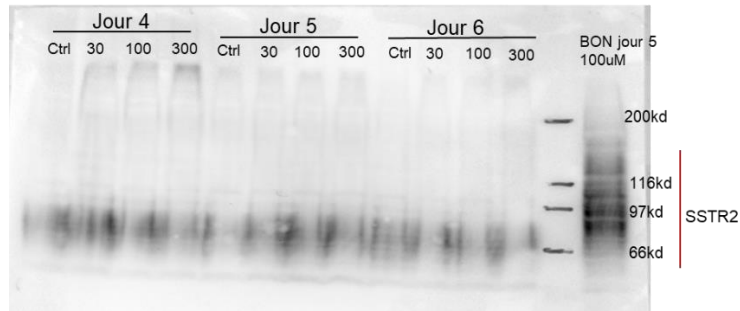


Fig. 3.7 Effet du TMZ sur l'expression protéique de SSTR2 dans les cellules HEK en fonction du temps. Immunobuvardage représentant SSTR2 dans les cellules HEK traitées ou non au TMZ durant 24h avec un contrôle positif pour SSTR2, soit l'échantillon protéique de BON-1 cinq jours après une exposition à 100 μ M de TMZ.

3.5. Augmentation de l'internalisation du ^{177}Lu -octréotate après TMZ

Le prétraitement pendant 24 h avec 10 μ M de TMZ augmente l'internalisation du ^{177}Lu -octréotate et une dose de 3,7MBq de ^{177}Lu -octréotate semble s'approcher du point de saturation des SSTRs à la surface des cellules BON-1 (Fig. 3.8). Le nombre de cellules en moyenne dans le groupe traité est de 350 000 par vial et de 450 000 par vial dans le groupe non traité. Le nombre de désintégrations par cellule dans les groupes ^{177}Lu -DTPA est constant entre les deux groupes et négligeable par rapport aux groupes ^{177}Lu -octréotate (données non-présentées). Dans les deux groupes ^{177}Lu -octréotate, l'internalisation est dépendante de la dose de ^{177}Lu -octréotate donnée. Plus il y a de ^{177}Lu -octréotate, plus l'internalisation est importante. La relation n'est pas tout à fait linéaire et semble démontrer un effet de saturation à 3,7 MBq. Une cellule traitée pendant 24 h avec 10 μ M de TMZ internalisera autant de radioactivité avec 0,11MBq de ^{177}Lu -octréotate qu'une cellule non traitée avec 3,7MBq de ^{177}Lu -octréotate. À une dose de 0,37MBq, une cellule traitée avec 10 μ M de TMZ internalisera 6.3 fois plus de ^{177}Lu -octréotate qu'une cellule non traitée.

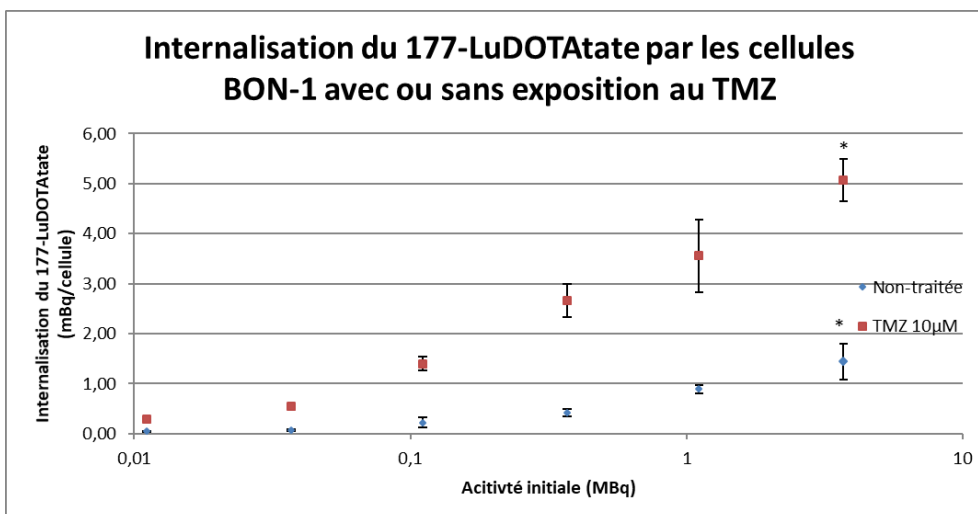


Fig 3.8. Effet de la dose de ^{177}Lu -octréotate et du TMZ sur l'internalisation du lutécium-177 par les cellules BON-1. Un groupe de cellules BON-1 n'a pas été traité et l'autre a été exposé à 10 μM de TMZ durant 24 h. Après 5 jours de croissance, les deux groupes sont exposés à des doses croissantes de ^{177}Lu -octréotate. L'axe de l'abscisse est présenté en échelle logarithmique. Chaque résultat est la moyenne de trois échantillons et les barres d'erreurs représentent la déviation standard. * signifie une différence statistiquement significative avec $p < 0.05$ entre la condition non-traitée et TMZ déterminée par méthode ANOVA deux facteurs

3.6. Mécanisme moléculaire régulant l'expression génique de SSTR2 en réponse au TMZ

La réponse aux CDBs précède ou coïncide avec l'apparition de l'ARNm de SSTR2 et l'expression protéique de SSTR2 (Fig. 3.9). Dans les lysats cellulaires de cellules BON-1 traitées à 10 μM de TMZ, deux marqueurs de CDB, le variant d'histone H2aX phosphorylé et RAD51, sont augmentés au jour 2 et 3 dans les cellules traitées respectivement. De plus, une augmentation de la cycline B1, liée à un arrêt du cycle cellulaire en G2/M, est notée du jour 3 à 5. Les dommages à l'ADN semblent réparés au jour 4-5 et l'élévation de la cycline B1 s'estompe au jour 6.

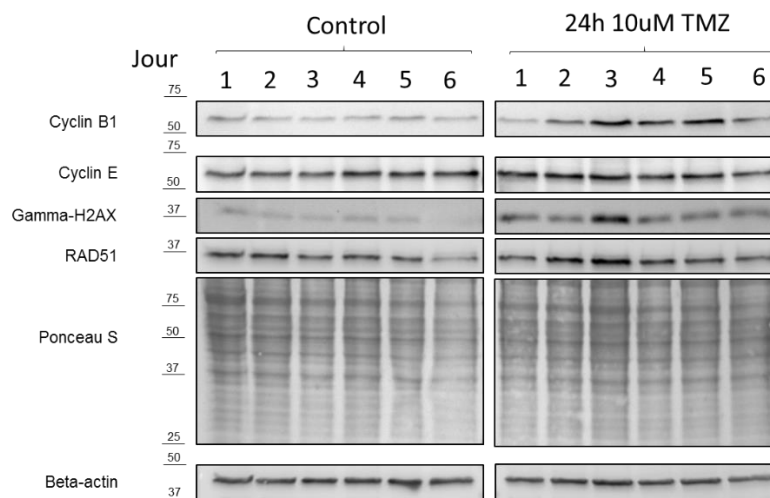


Fig. 3.9. Effet du TMZ sur les marqueurs de CDB et les cyclines dans les cellules BON-1. Immunobuvardage représentant des paramètres du cycle cellulaire et de marqueurs de dommages à l'ADN double-brin obtenu à partir des cellules BON-1 traitées ou non au TMZ durant 24h avec Ponceau S et beta-actin comme contrôle de charge.

4. Conclusions :

Ces expériences préliminaires ont permis de standardiser une technique pour évaluer l'internalisation du ^{177}Lu -octréotate de manière plus précise. Elles ont aussi mis en évidence une augmentation de l'expression de SSTR2 provoquée par l'exposition à deux agents chimiothérapeutiques, le TMZ et le 5-FU. Des doses minimalement toxiques semblent nécessaires pour causer l'augmentation d'expression de SSTR2, mais seulement dans les cellules ayant une expression préalable de SSTR2. L'augmentation de SSTR2 par le TMZ se traduit par une augmentation de l'internalisation du ^{177}Lu -octréotate dans les cellules BON-1. Une réponse transcriptionnelle secondairement à la chimiothérapie est observée dans les cellules BON-1 avec une augmentation de l'ARNm. Le mécanisme associé à cet effet est encore inconnu, mais il pourrait y avoir un lien entre les dommages à l'ADN, les CDB et le cycle cellulaire. Les résultats seront discutés plus en profondeur au chapitre suivant.

Discussion

Les travaux de cette maîtrise visaient à déterminer de nouvelles approches combinatoires pour potentialiser la PRRT. Les objectifs ultimes sont de donner accès à la PRRT à plus de patients souffrant de TNE et d'augmenter l'efficacité du traitement pour les patients éligibles à la PRRT afin d'obtenir des rémissions.

La revue de la littérature a permis de cerner la vaste étendue des possibilités qui ont été testées et d'identifier des stratégies qui mériteraient d'être étudiées. Les trois stratégies qui ont été retenues visent à maximiser le traitement actuel. En effet, en augmentant la perfusion tumorale, la distribution du radiotracer dans la tumeur est optimisée. Donc, pour une dose fixe de radiotracer, il devrait y avoir une captation plus grande. Le principe est sensiblement le même pour l'augmentation des SSTR. La dernière stratégie potentialise les dommages à l'ADN causés par les rayonnements bêta, soit en altérant les mécanismes de réparation de l'ADN ou en saturant les cellules tumorales avec des dommages à l'ADN. Cette distinction entre deux grands principes de potentialisation de la PRRT nous a permis d'émettre une suggestion de guide thérapeutique visant à offrir la PRRT à plus de patients et à potentialiser la PRRT chez les patients éligibles avec les critères actuels. Finalement, cette revue de la littérature nous a positionnés pour étudier l'usage des iPARPs de manière concomitante à la PRRT et des traitements de chimiothérapie pour augmenter l'expression du SSTR2 par les cellules de TNEs.

Effet des iPARPs sur la thérapie au ¹⁷⁷Lu-octréotate sur les sphéroïdes de TNEs

Actuellement, la principale technique utilisée en clinique pour radiosensibiliser les TNEs consiste à ajouter des agents chimiothérapeutiques, principalement la combinaison CAPTEM. Bien que le CAPTEM soit généralement bien toléré [96, 113], il reste un risque notable d'effets secondaires hématologiques particulièrement lors de la combinaison CAPTEM + PRRT [99]. Cet élément est d'autant plus important pour les TNEs G1 et G2 à croissances lentes et causant peu de symptômes. Puisque la chimiothérapie conventionnelle agit sur le principe de prolifération cellulaire rapide, soumettre les patients avec TNEs G1 à ces traitements pourrait être difficile à tolérer sans bénéfice sur la survie. Le principe utilisé avec les iPARPs est de potentialiser le dommage causé par la PRRT. Ainsi, en entravant les multiples mécanismes de réparation de l'ADN avec les iPARPs, chaque dommage à l'ADN causé par le lutécium-177 sera plus létal. Le risque de toxicité de la combinaison iPARP-PRRT est théoriquement moindre que la combinaison CAPTEM-PRRT puisque l'iPARP est moins toxique pour les tissus sains recevant peu de radioactivité. C'est ce qui nous a amenés à étudier cette combinaison.

Dans notre modèle de sphéroïde, nous avons pu confirmer que la combinaison iPARP-PRRT était plus toxique dans les cellules dérivées de TNEs humaines pancréatiques et pulmonaires,

nommément BON-1 et NCI-H727 que la PRRT ou l'iPARP seul. Les travaux subséquents du laboratoire ont permis de mettre en évidence les mécanismes expliquant l'effet additif du iPARP et de la PRRT, soit l'augmentation des CDBs, l'arrêt du cycle cellulaire en S/G2 et l'induction de l'apoptose [114]. L'augmentation des CDBs par la combinaison iPARP et ¹⁷⁷Lu-octréotate a été démontrée par deux autres groupes autant dans un modèle animal qu'*ex vivo* [72, 93]. L'étude de Purohit et al se distingue notamment en complétant la chaîne du dommage à l'ADN jusqu'à l'apoptose, et ce dans deux lignées cellulaires de TNEs humaines plutôt que dans des cellules humaines transfectées du gène SSTR2 ou encore des cellules murines. Comme le démontre aussi l'étude de Cullinane, les cellules BON-1 ont une expression faible de SSTR2 [93]. Selon notre étude, il serait tout de même envisageable de traiter les cellules BON-1 avec la combinaison pour obtenir des résultats intéressants. Il faudra donc déterminer à travers des études cliniques quel est le seuil d'internalisation qui est jugé trop faible ce qui dirigerait davantage les patients vers des stratégies d'augmentation de la perfusion ou du nombre de SSTR2 plutôt que de radiosensibilisation. Le seuil pourrait être plus bas qu'anticipé ce qui permettrait d'offrir la PRRT à plus de patients avec des réponses plus prononcées.

Le modèle de sphéroïdes a été utilisé, car il permet de mieux représenter un modèle cellulaire *in vivo* dans des conditions *in vitro*. En effet, les sphéroïdes vont acquérir une conformation tridimensionnelle ce qui affecte la distribution de l'oxygène, des nutriments, du ¹⁷⁷Lu-octréotate et des iPARPs [115]. Aucune étude n'a été trouvée pour le moment utilisant les sphéroïdes dans un contexte de PRRT. Les techniques reliées à l'exposition des sphéroïdes à la radioactivité et la mesure de cette dernière ont donc été mises en place en laboratoire.

Nous avons pu démontrer que les sphéroïdes avaient une captation de radioactivité qui n'était pas affectée par les iPARPs, mais qui était supérieure au bruit de fond ou aux sphéroïdes non traités. Dans les expériences subséquentes à faire, l'usage de ¹⁷⁷Lu-DTPA aurait permis de mieux distinguer la captation spécifique liée au processus d'internalisation du ¹⁷⁷Lu-octréotate de sa liaison non spécifique aux sphéroïdes. Un autre élément qui aurait approfondi nos connaissances mécanistiques aurait été d'imager avec précision la distribution dans les sphéroïdes du ¹⁷⁷Lu-octréotate par des principes d'autoradiographie. En effet, il est possible de fixer les sphéroïdes dans des blocs de paraffines pour faire des coupes histologiques et ensuite étudier autant la distribution du radiotracer en autoradiographie ou les SSTRs avec de l'immunohistochimie. La distribution du radiotracer à l'intérieur des tumeurs est peu connue, mais la distribution hétérogène du radiotracer est reconnue comme un facteur de mauvais pronostic [116, 117]. Puisque le rayonnement bêta du lutécium-177 a une pénétrance d'environ 2 mm et que les sphéroïdes avaient au maximum 0.7 mm de diamètre, la distribution dans le sphéroïde a peu d'importance. Cependant, dans une tumeur de plusieurs millimètres ou centimètres, la distribution pourrait affecter le traitement. Ce modèle de sphéroïde pourrait permettre d'étudier comment le radiotracer se distribue et si certains traitements peuvent permettre au radiotracer d'avoir une distribution intratumorale plus homogène.

La grande sensibilité des sphéroïdes NCI-H727 au iPARP a été remarquée. Initialement, les iPARPs ont été utilisés en clinique sur le principe de létalité synthétique dans les cancers du sein ou ovarien avec les gènes BRCA1 ou 2 mutants. Le même principe pourrait expliquer la létalité des iPARPs via une mutation faux sens du gène BRCA rapporté dans les cellules NCI-H727 [118]. Les cellules NCI-H727 ont aussi une possible mutation de p53 [119, 120]. De ce contexte, la combinaison iPARP+¹⁷⁷Lu-octréotate est demeurée supérieure à l'iPARP seul. Donc, la combinaison pourrait être efficace autant dans des TNEs non mutées que mutées pour BRCA1 ou p53. De plus, si ces mutations sont intrinsèques à la carcinogenèse de TNEs bronchopulmonaires comme NCI-H727, elle pourrait permettre l'usage des iPARPs pour la thérapie des TNEs mutées comme dans les cancers du sein ou ovariens mutants.

Effet du TMZ et du 5-FU sur l'expression de SSTR2 dans les TNEs

Pour le moment, les stratégies permettant d'augmenter l'expression de SSTR2 ne sont pas en essai clinique. Cependant, le TMZ et le 5-FU, utilisés pour radiosensibiliser les TNEs, ont aussi la caractéristique d'augmenter l'expression de SSTR2 dans certaines études précliniques [121].

Mes travaux ont d'abord porté sur la standardisation du protocole pour étudier l'internalisation du lutécium-177. Pour créer un modèle où deux traitements non létaux sont utilisés pour obtenir un effet additif ou synergique toxique, des quantités moindres de radioactivités ont été utilisées. En voulant minimiser la quantité de radioactivité utilisée, la technique pour quantifier la radioactivité a été modifiée afin qu'elle soit plus précise. Des étapes de lavages ont été ajoutées, dont une étape de lavage dans une solution acide à 37°C pour dissocier le ¹⁷⁷Lu-octréotate des SSTRs et ainsi permettre la différenciation entre la radioactivité internalisée de celle liée au SSTR, mais encore à la surface cellulaire. Dans la même optique d'utiliser des doses minimalement toxiques pour limiter les effets secondaires, des doses exponentielles de TMZ et de 5-FU ont été testées sur les cellules BON-1. La présence ou non d'augmentation de protéines de SSTR2 était aussi évaluée. La dose de 10 µM a été retenue autant avec le 5-FU que le TMZ, car il s'agit de la plus petite dose permettant une réponse transcriptionnelle pour SSTR2. Comme 10 µM était aussi la plus petite dose testée avec un effet sur la croissance cellulaire, il semble qu'une toxicité cellulaire est nécessaire afin d'obtenir une augmentation de la transcription de SSTR2.

Chacun de ces agents avait été écarté pour son possible rôle de régulateur de SSTR2 à la suite de deux études [100, 122]. Il est fort possible que, dans ces deux études, le temps où l'expression maximale de SSTR était atteinte n'a pas été trouvé ou exploité. Dans l'étude de Fueger et al, seules les cellules traitées au gemcitabine ont été réincubées 4 jours ce qui a démontré la réversibilité de la diminution des sites de hautes affinités pour les SSA et une augmentation significative des sites de hautes affinités. À ce moment, Fueger et al avait choisi le gemcitabine pour son profil clinique supérieur au 5-FU. Or, actuellement, le 5-FU ou sa forme orale la capécitabine est le traitement de TNEs digestives plus avancées. Il est possible que l'augmentation de SSTR2 par le 5-FU n'ait pas

été identifié puisqu'il n'y a pas eu de réincubation tout simplement. Il est aussi possible que les TNEs et les adénocarcinomes pancréatiques aient une réponse biologique différente au 5-FU. Dans l'étude de Bison, l'expression des SSTR2 a seulement été observée au jour 0, 15 et 28 sur les xénogreffes de cellules de cancers à petites cellules H69 [122]. Si les cinétiques sont similaires d'une lignée cellulaire à l'autre, l'augmentation des SSTR2 est plus précoce qu'au jour 15. Pour les études futures sur l'augmentation des SSTR2, il semble essentiel de tester quotidiennement l'expression de SSTR2 pour déterminer le moment du zénith et la durée d'un possible plateau. Ce travail fastidieux n'aurait probablement pas à être repris régulièrement, car la cinétique d'expression de SSTR2 chez les cellules BON-1 était reproductible d'une expérience à l'autre [104].

Bien que les deux agents chimiothérapeutiques ont des mécanismes d'action différents, un alkylant TMZ et un antimétabolite 5-FU, les deux ont des finalités communes soit de causer des CDBs et un arrêt du cycle cellulaire. En effet, le TMZ et le 5-FU sont reconnus pour créer des CDBs à la suite de plusieurs tentatives infructueuses de réparation de lésions à l'ADN [123, 124]. Dans les cellules BON-1 traitées au TMZ, il semble y avoir une cascade d'évènements qui s'amorce par l'apparition des marqueurs de CDB (γ H2AX, RAD 51), puis d'arrêt du cycle cellulaire (cycline B1), suivie d'une augmentation de l'ARNm de SSTR2 et finalement d'une augmentation de la protéine SSTR2. Il s'agit pour le moment d'une observation, mais elle n'est pas isolée puisqu'une augmentation de l'ARNm de SSTR2 a aussi été remarquée dans les cellules H69 secondairement à une irradiation externe qui crée aussi des CDBs [105]. De nombreux effecteurs entre le dommage à l'ADN et l'augmentation protéique de SSTR2 sont encore à déterminer afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse. Le TMZ et le 5-FU partagent également un effet sur le remodelage de la chromatine [125, 126]. Puisque de nombreuses drogues épigénétiques augmentent l'expression de SSTR2 autant au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique [106, 107, 127], l'augmentation observée de SSTR2 pourrait être due à ces actions. Cependant, avec la cinétique des CDBs qui coïncident avec l'augmentation de l'ARNm suivi de l'augmentation de protéine SSTR2, l'hypothèse de la réponse aux dommages à l'ADN semble plus probable.

Bien que le TMZ a principalement été utilisé dans nos expériences, le 5-FU a semblé avoir un effet très similaire. D'ailleurs, Jin et al ont récemment démontré que le 5-FU augmente l'expression protéique de SSTR2 et l'internalisation de ⁶⁸Ga-octréotate dans des lignées cellulaires de TNEs pancréatiques (BON-1), intestinaux (GOT-1) et pulmonaires (NCI-H727) [104]. La régulation des SSTR2 par les dommages à l'ADN semble donc être un concept généralisable à la majorité des TNEs. Dans cette étude, l'augmentation la plus robuste du niveau de SSTR2 est observée dans les cellules BON-1 qui ont un faible niveau initial de SSTR2. Les cellules avec une forte expression de SSTR2 ont possiblement un potentiel limité d'optimisation avec cette stratégie. Cependant, ce résultat reste encourageant, car les tumeurs avec une faible expression de SSTR2 pourraient devenir éligibles à la PRRT.

Il est aussi intéressant de noter que le TMZ n'a pas induit l'expression de SSTR2 dans les cellules HEK qui n'expriment pas intrinsèquement de SSTR2. Donc, le risque d'augmenter l'internalisation de ¹⁷⁷Lu-octréotate dans les tissus sains sans expression de SSTR2 semble faible ce qui pourrait se généraliser à une toxicité globale faible.

Ces observations ont aussi une implication directe sur les études cliniques présentement en cours visant à potentialiser la PRRT par le TMZ ou le 5-FU. Plusieurs protocoles existent pour administrer la chimiothérapie avec la PRRT. Certains alternent entre des cycles de PRRT et de chimiothérapie qui sont distancés de plusieurs semaines [128] et d'autres les utilisent en concomitance soit en débutant la chimiothérapie quelques jours avant la PRRT ou le jour de la PRRT [94, 129]. Dans le premier protocole, comme l'augmentation de SSTR2 par la chimiothérapie est présumée de courtes durées, il y a peu de chances que la PRRT soit donnée dans un moment où l'expression est maximale augmentée. Dans le dernier scénario, la chimiothérapie n'a possiblement pas pu exercer son plein potentiel le jour même. Un modèle où le traitement est donné quelques jours avant la PRRT serait préférable selon notre hypothèse. Dans une étude cas-témoin de 20 patients, un traitement de CAP 9 jours avant la PRRT n'a pas augmenté la captation de ¹⁷⁷Lu-octréotate [103]. Pour clarifier la question en clinique, une option serait de faire des PET sériés au ⁶⁸Ga-octréotate après un traitement de TMZ ou de 5-FU/CAP. L'expression maximale *in vivo* des SSTRs serait alors mise en évidence ce qui représenterait la fenêtre idéale pour donner la PRRT.

Conclusion et Perspective

La PRRT est un traitement très prometteur pour les TNEs exprimant des SSTRs. Pour permettre à un plus grand nombre de patients atteints de TNEs d'avoir une rémission ou d'être admissible à la PRRT, plusieurs stratégies (augmenter la perfusion, augmenter les SSTRs, radiosensibiliser les TNEs) impliquant des traitements combinatoires sont à notre disposition et ont été révisées dans notre revue de la littérature.

Les deux stratégies étudiées dans mon mémoire, soit la radiosensibilisation par les iPARPs et l'augmentation des SSTR2 par la chimiothérapie, seraient a priori utilisées en parallèle dues au potentiel très toxique de la trithérapie. Il reste qu'en augmentant les SSTR2, une TNE à faible expression pourrait être traitée par PRRT. De plus, si l'augmentation est durable dans le temps, les effets secondaires de la chimiothérapie pourraient s'être estompés et permettre un traitement subséquent par des iPARPs.

Avec 3 études précliniques sur les TNEs et l'usage courant des iPARPs pour le traitement des cancers ovariens ou du sein mutés dans les gènes BRCA1 ou 2, les iPARPs pourraient être rapidement utilisés à l'intérieur d'essais cliniques pour potentialiser la PRRT. Pour diminuer la toxicité hématologique causée par la PRRT et les iPARPs, il serait préférable que les iPARPs soient donnés 2 à 3 jours après la PRRT. Ainsi, les dommages à l'ADN causés par la PRRT sur les cellules de la moelle osseuse sont généralement réparés, mais la grande quantité de ¹⁷⁷Lu-octréotate accumulée au niveau des tumeurs bénéficierait d'être potentialisée par les iPARPs.

Deux grandes avenues se dessinent pour la suite des travaux. Tout d'abord, de nombreuses études mettent en lumière une augmentation de l'expression des SSTRs. Or, les mécanismes fondamentaux restent nébuleux. Si des facteurs de transcriptions, des modifications épigénétiques ou encore des effecteurs de la réparation de l'ADN étaient démontrés comme pouvant agir directement sur la régulation de l'expression des SSTRs, il serait possible d'utiliser des traitements existants agissant sur ces médiateurs ou encore développer des traitements ciblés sur cette voie de signalisation. Les pistes sont déjà semées entre les dommages à l'ADN et l'augmentation des SSTR2.

Par la suite, pour se rapprocher des modèles cliniques, il faut tester les hypothèses sur des modèles animaux. Des modèles de souris BALB-c nues avec des tumeurs sous-cutanées de BON-1 et NCI-H727 sont présentement en développement au laboratoire. Les cellules BON-1 et NCI-H727 ont été transfectées avec le gène de la luciférase. Leur croissance pourra donc être suivie grâce à la bioluminescence. J'ai pu mettre en place ce modèle et il y a croissance des cellules BON-luc (image 1) et H727-luc. Le générateur de ⁶⁸Ga-octréotate et le PET/CT pour animal n'étant pas encore disponibles au moment de ma maîtrise, les études sur de plus grandes séries d'animaux et avec des traitements n'ont pas été entreprises. Ces modèles permettront très prochainement d'étudier l'efficacité et la sécurité des traitements combinatoires *in vivo*.

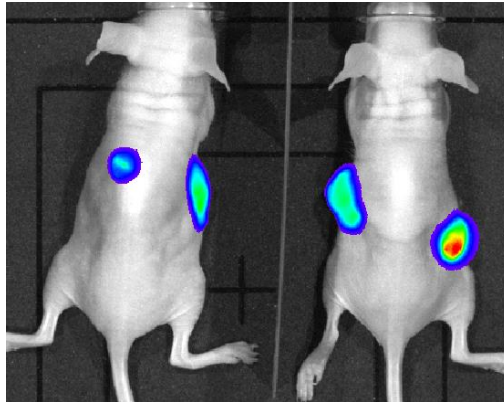


Image 5.1. Tumeurs sous-cutanées formées de cellules BON1-luc après 5 semaines de croissance sur des souris BALB-c nude détectées grâce à l'expression de lumière secondairement une injection de luciférine-D

Bien que démontré ici pour la potentialisation de la PRRT pour les TNEs, des stratégies similaires, soient pour potentialiser les dommages à l'ADN ou pour augmenter l'expression de récepteurs, pourraient améliorer l'ensemble des radiothérapies ciblées. Le cancer de la prostate métastatique résistant à la castration et réfractaire aux traitements conventionnels semble à la croisée des chemins avec les études cliniques en cours portant autant sur des traitements d'iPARP que des traitements par radioligand via l'antigène membranaire spécifique de la prostate qui est surexprimé sur la prostate, le ^{177}Lu -PSMA [130, 131].

Bibliographie

1. Rosai, J., *The origin of neuroendocrine tumors and the neural crest saga*. Mod Pathol, 2011. **24 Suppl 2**: p. S53-7.
2. Oronsky, B., et al., *Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas*. Neoplasia, 2017. **19**(12): p. 991-1002.
3. Montuenga, L.M., et al., *The diffuse endocrine system: from embryogenesis to carcinogenesis*. Prog Histochem Cytochem, 2003. **38**(2): p. 155-272.
4. Qi, Z. and Y.G. Chen, *Regulation of intestinal stem cell fate specification*. Sci China Life Sci, 2015. **58**(6): p. 570-8.
5. Miskovic, J., et al., *Co-expression of TTF-1 and neuroendocrine markers in the human fetal lung and pulmonary neuroendocrine tumors*. Acta Histochem, 2015. **117**(4-5): p. 451-9.
6. Bosman, F.T., et al., *WHO Classification of Tumors of the Digestive System*. Vol. 417. 2009.
7. Zamora, V., et al., *Immunohistochemical expression of somatostatin receptors in digestive endocrine tumours*. Dig Liver Dis, 2010. **42**(3): p. 220-5.
8. Reubi, J.C., et al., *Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands*. Eur J Nucl Med, 2001. **28**(7): p. 836-46.
9. Mazziotti, G., et al., *Somatostatin analogs in the treatment of neuroendocrine tumors: current and emerging aspects*. Expert Opin Pharmacother, 2017. **18**(16): p. 1679-1689.
10. Dasari, A., et al., *Trends in the incidence, prevalence, and survival outcomes in patients with neuroendocrine tumors in the united states*. JAMA Oncology, 2017. **3**(10): p. 1335-1342.
11. Hallet, J., et al., *Exploring the rising incidence of neuroendocrine tumors: a population-based analysis of epidemiology, metastatic presentation, and outcomes*. Cancer, 2015. **121**(4): p. 589-97.
12. Travis, W.D., et al., *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart / edited by William D. Travis, Elisabeth Brambilla, Allen P. Burke, Alexander Marx, Andrew G. Nicholson*. World Health Organization classification of tumours, 4th edition ; seventh. 2015, France: Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2015. 412.
13. Halperin, D.M., et al., *Frequency of carcinoid syndrome at neuroendocrine tumour diagnosis: a population-based study*. Lancet Oncol, 2017. **18**(4): p. 525-534.
14. Kidd, M., et al., *Decoding the Molecular and Mutational Ambiguities of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasm Pathobiology*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2015. **1**(2): p. 131-153.
15. Zandee, W.T., et al., *Effect of hormone secretory syndromes on neuroendocrine tumor prognosis*. Endocr Relat Cancer, 2017. **24**(7): p. R261-R274.
16. Hassan, S.A., et al., *Carcinoid heart disease*. Heart, 2017. **103**(19): p. 1488-1495.
17. Singh, S., et al., *Diagnosis and management of gastrointestinal neuroendocrine tumors: An evidence-based Canadian consensus*. Cancer Treat Rev, 2016. **47**: p. 32-45.
18. Kazmierczak, P.M., et al., *The added value of (68)Ga-DOTA-TATE-PET to contrast-enhanced CT for primary site detection in CUP of neuroendocrine origin*. Eur Radiol, 2017. **27**(4): p. 1676-1684.
19. Schreiter, N.F., et al., *Searching for primaries in patients with neuroendocrine tumors (NET) of unknown primary and clinically suspected NET: Evaluation of Ga-68 DOTATOC PET/CT and In-111 DTPA octreotide SPECT/CT*. Radiol Oncol, 2014. **48**(4): p. 339-47.

20. Zhang, P., et al., *Clinical and Prognostic Value of PET/CT Imaging with Combination of (68)Ga-DOTATATE and (18)F-FDG in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms*. Contrast Media Mol Imaging, 2018. **2018**: p. 2340389.
21. Dasari, A., et al., *Comparative study of lung and extrapulmonary poorly differentiated neuroendocrine carcinomas: A SEER database analysis of 162,983 cases*. Cancer, 2018. **124**(4): p. 807-815.
22. Rinke, A., et al., *Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group*. J Clin Oncol, 2009. **27**(28): p. 4656-63.
23. Caplin, M.E., et al., *Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors*. N Engl J Med, 2014. **371**(3): p. 224-33.
24. Caplin, M.E., et al., *Anti-tumour effects of lanreotide for pancreatic and intestinal neuroendocrine tumours: the CLARINET open-label extension study*. Endocr Relat Cancer, 2016. **23**(3): p. 191-9.
25. Broder, L.E. and S.K. Carter, *Pancreatic islet cell carcinoma. II. Results of therapy with streptozotocin in 52 patients*. Ann Intern Med, 1973. **79**(1): p. 108-18.
26. Wong, M.H., et al., *Systematic Review and Meta-Analysis on the Role of Chemotherapy in Advanced and Metastatic Neuroendocrine Tumor (NET)*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0158140.
27. Ekeblad, S., et al., *Temozolomide as monotherapy is effective in treatment of advanced malignant neuroendocrine tumors*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(10): p. 2986-91.
28. Strosberg, J.R., et al., *First-line chemotherapy with capecitabine and temozolomide in patients with metastatic pancreatic endocrine carcinomas*. Cancer, 2011. **117**(2): p. 268-75.
29. Ramirez, R.A., et al., *The Role of Capecitabine/Temozolomide in Metastatic Neuroendocrine Tumors*. Oncologist, 2016. **21**(6): p. 671-5.
30. Claringbold, P.G. and J.H. Turner, *Pancreatic Neuroendocrine Tumor Control: Durable Objective Response to Combination 177Lu-Octreotate-Capecitabine-Temozolomide Radiopeptide Chemotherapy*. Neuroendocrinology, 2016. **103**(5): p. 432-9.
31. Toorchen, D. and M.D. Topal, *Mechanisms of chemical mutagenesis and carcinogenesis: effects on DNA replication of methylation at the O6-guanine position of dGTP*. Carcinogenesis, 1983. **4**(12): p. 1591-7.
32. Quiros, S., W.P. Roos, and B. Kaina, *Rad51 and BRCA2--New molecular targets for sensitizing glioma cells to alkylating anticancer drugs*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27183.
33. Roos, W.P., et al., *Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(1): p. 72-86.
34. Grogan, B.C., et al., *Effect of the thymidylate synthase inhibitors on dUTP and TTP pool levels and the activities of DNA repair glycosylases on uracil and 5-fluorouracil in DNA*. Biochemistry, 2011. **50**(5): p. 618-27.
35. Wyatt, M.D. and D.M. Wilson, 3rd, *Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(5): p. 788-99.
36. Huehls, A.M., et al., *Genomically Incorporated 5-Fluorouracil that Escapes UNG-Initiated Base Excision Repair Blocks DNA Replication and Activates Homologous Recombination*. Mol Pharmacol, 2016. **89**(1): p. 53-62.
37. Zhao, X. and Y.T. Yu, *Incorporation of 5-fluorouracil into U2 snRNA blocks pseudouridylation and pre-mRNA splicing in vivo*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(2): p. 550-8.

38. Tian, T., X. Li, and J. Zhang, *mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(3).
39. Pieterman, C.R., et al., *Thoracic and duodenopancreatic neuroendocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1: natural history and function of menin in tumorigenesis*. *Endocr Relat Cancer*, 2014. **21**(3): p. R121-42.
40. Relles, D., et al., *Periampullary and duodenal neoplasms in neurofibromatosis type 1: two cases and an updated 20-year review of the literature yielding 76 cases*. *J Gastrointest Surg*, 2010. **14**(6): p. 1052-61.
41. Blansfield, J.A., et al., *Clinical, genetic and radiographic analysis of 108 patients with von Hippel-Lindau disease (VHL) manifested by pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNETs)*. *Surgery*, 2007. **142**(6): p. 814-8; discussion 818 e1-2.
42. Scarpa, A., et al., *Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours*. *Nature*, 2017. **543**(7643): p. 65-71.
43. Yao, J.C., et al., *Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(6): p. 514-23.
44. Yao, J.C., et al., *Everolimus for the Treatment of Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Overall Survival and Circulating Biomarkers From the Randomized, Phase III RADIANT-3 Study*. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(32): p. 3906-3913.
45. Fazio, N., et al., *Everolimus in advanced, progressive, well-differentiated, non-functional neuroendocrine tumors: RADIANT-4 lung subgroup analysis*. *Cancer Sci*, 2018. **109**(1): p. 174-181.
46. Yazdani, S., et al., *Angiogenesis and vascular maturation in neuroendocrine tumors*. *Hum Pathol*, 2014. **45**(4): p. 866-74.
47. Cigrovski Berkovic, M., et al., *High VEGF serum values are associated with locoregional spread of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs)*. *Mol Cell Endocrinol*, 2016. **425**: p. 61-8.
48. La Rosa, S., et al., *Localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in digestive endocrine tumors: correlation with microvessel density and clinicopathologic features*. *Hum Pathol*, 2003. **34**(1): p. 18-27.
49. Raymond, E., et al., *Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(6): p. 501-13.
50. Krenning, E.P., et al., *LOCALISATION OF ENDOCRINE-RELATED TUMOURS WITH RADIOIODINATED ANALOGUE OF SOMATOSTATIN*. *The Lancet*, 1989. **333**(8632): p. 242-244.
51. Bomanji, J.B. and N.D. Papathanasiou, *(1)(1)(1)In-DTPA(0)-octreotide (Octreoscan), (1)(3)(1)I-MIBG and other agents for radionuclide therapy of NETs*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2012. **39 Suppl 1**: p. S113-25.
52. Brabander, T., et al., *Peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumours*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2016. **30**(1): p. 103-14.
53. Wehrmann, C., et al., *Results of individual patient dosimetry in peptide receptor radionuclide therapy with 177Lu DOTA-TATE and 177Lu DOTA-NOC*. *Cancer Biother Radiopharm*, 2007. **22**(3): p. 406-16.
54. Cambiaghi, V., et al., *Identification of human somatostatin receptor 2 domains involved in internalization and signaling in QGP-1 pancreatic neuroendocrine tumor cell line*. *Endocrine*, 2017. **56**(1): p. 146-157.
55. Roosterman, D., et al., *Endothelin-converting enzyme-1 degrades internalized somatostatin-14*. *Endocrinology*, 2008. **149**(5): p. 2200-7.
56. Zhao, P., et al., *Agonist-biased trafficking of somatostatin receptor 2A in enteric neurons*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(36): p. 25689-700.

57. Koenig, J.A., et al., *Fates of endocytosed somatostatin sst2 receptors and associated agonists*. *Biochem J*, 1998. **336 (Pt 2)**: p. 291-8.
58. Strosberg, J., et al., *Phase 3 Trial of (177)Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors*. *N Engl J Med*, 2017. **376(2)**: p. 125-135.
59. Strosberg, J., et al., *Health-Related Quality of Life in Patients With Progressive Midgut Neuroendocrine Tumors Treated With (177)Lu-Dotatate in the Phase III NETTER-1 Trial*. *J Clin Oncol*, 2018. **36(25)**: p. 2578-2584.
60. de Jong, M., et al., *Megalyn is essential for renal proximal tubule reabsorption of (111)In-DTPA-octreotide*. *J Nucl Med*, 2005. **46(10)**: p. 1696-700.
61. Rolleman, E.J., et al., *Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2003. **30(1)**: p. 9-15.
62. Bergsma, H., et al., *Nephrotoxicity after PRRT with (177)Lu-DOTA-octreotate*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2016. **43(10)**: p. 1802-11.
63. Sabet, A., et al., *Accurate assessment of long-term nephrotoxicity after peptide receptor radionuclide therapy with (177)Lu-octreotate*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2014. **41(3)**: p. 505-10.
64. Gupta, S.K., S. Singla, and C. Bal, *Renal and hematological toxicity in patients of neuroendocrine tumors after peptide receptor radionuclide therapy with 177Lu-DOTATATE*. *Cancer Biother Radiopharm*, 2012. **27(9)**: p. 593-9.
65. Del Prete, M., et al., *Personalized (177)Lu-octreotate peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumours: initial results from the P-PRRT trial*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2019. **46(3)**: p. 728-742.
66. Svensson, J., et al., *Renal function affects absorbed dose to the kidneys and haematological toxicity during (1)(7)(7)Lu-DOTATATE treatment*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2015. **42(6)**: p. 947-55.
67. Bergsma, H., et al., *Subacute haematotoxicity after PRRT with (177)Lu-DOTA-octreotate: prognostic factors, incidence and course*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2016. **43(3)**: p. 453-63.
68. Sabet, A., et al., *Long-term hematotoxicity after peptide receptor radionuclide therapy with 177Lu-octreotate*. *J Nucl Med*, 2013. **54(11)**: p. 1857-61.
69. Bergsma, H., et al., *Persistent Hematologic Dysfunction after Peptide Receptor Radionuclide Therapy with (177)Lu-DOTATATE: Incidence, Course, and Predicting Factors in Patients with Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors*. *J Nucl Med*, 2018. **59(3)**: p. 452-458.
70. Pang, D., et al., *Significant disparity in base and sugar damage in DNA resulting from neutron and electron irradiation*. *J Radiat Res*, 2014. **55(6)**: p. 1081-8.
71. Sage, E. and N. Shikazono, *Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis*. *Free Radic Biol Med*, 2017. **107**: p. 125-135.
72. Nonnekens, J., et al., *Potentiation of Peptide Receptor Radionuclide Therapy by the PARP Inhibitor Olaparib*. *Theranostics*, 2016. **6(11)**: p. 1821-32.
73. Bussink, J. and P.N. Span, *gamma-H2AX foci in peripheral blood lymphocytes to quantify radiation-induced DNA damage after 177Lu-DOTA-octreotate peptide receptor radionuclide therapy*. *J Nucl Med*, 2015. **56(4)**: p. 501-2.
74. Dalm, S.U., et al., *Comparison of the Therapeutic Response to Treatment with a 177Lu-Labeled Somatostatin Receptor Agonist and Antagonist in Preclinical Models*. *J Nucl Med*, 2016. **57(2)**: p. 260-5.
75. Dizdaroglu, M., E. Coskun, and P. Jaruga, *Repair of oxidatively induced DNA damage by DNA glycosylases: Mechanisms of action, substrate specificities and excision kinetics*. *Mutat Res*, 2017. **771**: p. 99-127.

76. Whitaker, A.M. and B.D. Freudenthal, *APE1: A skilled nucleic acid surgeon*. DNA Repair (Amst), 2018. **71**: p. 93-100.
77. Robertson, A.B., et al., *DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 981-93.
78. Krokan, H.E. and M. Bjoras, *Base excision repair*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(4): p. a012583.
79. Chang, H.H.Y., et al., *Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(8): p. 495-506.
80. Langelier, M.F., et al., *PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification*. Curr Opin Struct Biol, 2018. **53**: p. 187-198.
81. Ray Chaudhuri, A. and A. Nussenzweig, *The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(10): p. 610-621.
82. Rosado, M.M., et al., *Beyond DNA repair, the immunological role of PARP-1 and its siblings*. Immunology, 2013. **139**(4): p. 428-37.
83. Iglesias, P. and J.A. Costoya, *The antimitotic potential of PARP inhibitors, an unexplored therapeutic alternative*. Curr Top Med Chem, 2014. **14**(20): p. 2346-65.
84. Pascal, J.M., *The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage*. DNA Repair (Amst), 2018.
85. Eustermann, S., et al., *Structural Basis of Detection and Signaling of DNA Single-Strand Breaks by Human PARP-1*. Mol Cell, 2015. **60**(5): p. 742-754.
86. El-Khamisy, S.F., et al., *A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(19): p. 5526-33.
87. Bryant, H.E., et al., *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 913-7.
88. Ma, J., et al., *Efficacy and safety of olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive ovarian cancer patients with BRCA mutations: a meta-analysis on randomized controlled trials*. Cancer Manag Res, 2019. **11**: p. 3061-3078.
89. D'Andrea, A.D., *Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance*. DNA Repair (Amst), 2018.
90. Lu, Y., et al., *Double-barreled gun: Combination of PARP inhibitor with conventional chemotherapy*. Pharmacol Ther, 2018. **188**: p. 168-175.
91. Lesueur, P., et al., *Poly-(ADP-ribose)-polymerase inhibitors as radiosensitizers: a systematic review of pre-clinical and clinical human studies*. Oncotarget, 2017. **8**(40): p. 69105-69124.
92. Somnay, Y., et al., *The PARP inhibitor ABT-888 potentiates dacarbazine-induced cell death in carcinoids*. Cancer Gene Ther, 2016. **23**(10): p. 348-354.
93. Cullinane, C., et al., *Enhancing the anti-tumour activity of (177)Lu-DOTA-octreotate radionuclide therapy in somatostatin receptor-2 expressing tumour models by targeting PARP*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 10196.
94. Claringbold, P.G., et al., *Phase II study of radiopeptide 177Lu-octreotate and capecitabine therapy of progressive disseminated neuroendocrine tumours*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011. **38**(2): p. 302-11.
95. Kashyap, R., et al., *Favourable outcomes of (177)Lu-octreotate peptide receptor chemoradionuclide therapy in patients with FDG-avid neuroendocrine tumours*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2015. **42**(2): p. 176-85.
96. Jeong, H., et al., *Capecitabine plus temozolomide in patients with grade 3 unresectable or metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms with Ki-67 index <55%: single-arm phase II study*. ESMO Open, 2021. **6**(3): p. 100119.

97. Pavlakis, N., et al., *Australasian Gastrointestinal Trials Group (AGITG) CONTROL NET Study: Phase II study evaluating the activity of 177Lu-Octreotate peptide receptor radionuclide therapy (LuTate PRRT) and capecitabine, temozolomide CAPTEM)—First results for pancreas and updated midgut neuroendocrine tumors (pNETS, mNETS)*. 2020, American Society of Clinical Oncology.
98. Kesavan, M., P.G. Claringbold, and J.H. Turner, *Hematological toxicity of combined 177Lu-octreotate radiopeptide chemotherapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in long-term follow-up*. *Neuroendocrinology*, 2014. **99**(2): p. 108-17.
99. Kesavan, M., et al., *Long-term hematologic toxicity of 177Lu-octreotate-capecitabine-temozolomide therapy of GEPNET*. *Endocr Relat Cancer*, 2021. **28**(7): p. 521-527.
100. Fueger, B.J., et al., *Effects of chemotherapeutic agents on expression of somatostatin receptors in pancreatic tumor cells*. *J Nucl Med*, 2001. **42**(12): p. 1856-62.
101. Nayak, T.K., et al., *Enhancement of somatostatin-receptor-targeted (177)Lu-[DOTA(0)-Tyr(3)]-octreotide therapy by gemcitabine pretreatment-mediated receptor uptake, up-regulation and cell cycle modulation*. *Nucl Med Biol*, 2008. **35**(6): p. 673-8.
102. Basu, S. and V. Ostwal, *Observation on enhanced avidity on somatostatin receptor targeted 68Ga-DOTATATE PET-CT following therapy with everolimus and capecitabine-temozolamide: is redifferentiation akin phenomenon a reality in neuroendocrine tumors?* *Nucl Med Commun*, 2016. **37**(6): p. 669-71.
103. Thakral, P., et al., *Dosimetric analysis of patients with gastro entero pancreatic neuroendocrine tumors (NETs) treated with PRRT (peptide receptor chemo radionuclide therapy) using Lu-177 DOTATATE and capecitabine/temozolomide (CAP/TEM)*. *Br J Radiol*, 2018. **91**(1091): p. 20170172.
104. Jin, X.F., et al., *Combination of 5-Fluorouracil with Epigenetic Modifiers Induces Radiosensitization, Somatostatin Receptor 2 Expression, and Radioligand Binding in Neuroendocrine Tumor Cells In Vitro*. *J Nucl Med*, 2019. **60**(9): p. 1240-1246.
105. Oddstig, J., et al., *Radiation-induced up-regulation of somatostatin receptor expression in small cell lung cancer in vitro*. *Nucl Med Biol*, 2006. **33**(7): p. 841-6.
106. Taelman, V.F., et al., *Upregulation of Key Molecules for Targeted Imaging and Therapy*. *J Nucl Med*, 2016. **57**(11): p. 1805-1810.
107. Veenstra, M.J., et al., *Epidrug-induced upregulation of functional somatostatin type 2 receptors in human pancreatic neuroendocrine tumor cells*. *Oncotarget*, 2018. **9**(19): p. 14791-14802.
108. Claringbold, P.G., R.A. Price, and J.H. Turner, *Phase I-II study of radiopeptide 177Lu-octreotate in combination with capecitabine and temozolomide in advanced low-grade neuroendocrine tumors*. *Cancer Biother Radiopharm*, 2012. **27**(9): p. 561-9.
109. Kwekkeboom, D.J., et al., *[177Lu-DOTAOTyr3]octreotate: comparison with [111In-DTPA]octreotide in patients*. *Eur J Nucl Med*, 2001. **28**(9): p. 1319-25.
110. Evers, B.M., et al., *The human carcinoid cell line, BON. A model system for the study of carcinoid tumors*. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. **733**: p. 393-406.
111. Wong, C., et al., *Human neuroendocrine tumor cell lines as a three-dimensional model for the study of human neuroendocrine tumor therapy*. *J Vis Exp*, 2012(66): p. e4218.
112. Presky, D.H. and A. Schonbrunn, *Somatostatin pretreatment increases the number of somatostatin receptors in GH4C1 pituitary cells and does not reduce cellular responsiveness to somatostatin*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(2): p. 714-21.
113. Al-Toubah, T., et al., *Efficacy and Toxicity Analysis of Capecitabine and Temozolomide in Neuroendocrine Neoplasms*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2021: p. 1-8.

114. Purohit, N.K., et al., *Potentiation of (177)Lu-octreotate peptide receptor radionuclide therapy of human neuroendocrine tumor cells by PARP inhibitor*. *Oncotarget*, 2018. **9**(37): p. 24693-24706.
115. Mehta, G., et al., *Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy*. *J Control Release*, 2012. **164**(2): p. 192-204.
116. Werner, R.A., et al., *Survival prediction in patients undergoing radionuclide therapy based on intratumoral somatostatin-receptor heterogeneity*. *Oncotarget*, 2017. **8**(4): p. 7039-7049.
117. Werner, R.A., et al., *Pre-therapy Somatostatin Receptor-Based Heterogeneity Predicts Overall Survival in Pancreatic Neuroendocrine Tumor Patients Undergoing Peptide Receptor Radionuclide Therapy*. *Mol Imaging Biol*, 2019. **21**(3): p. 582-590.
118. Boora, G.K., et al., *Exome-level comparison of primary well-differentiated neuroendocrine tumors and their cell lines*. *Cancer Genet*, 2015. **208**(7-8): p. 374-81.
119. Mitsudomi, T., et al., *p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features*. *Oncogene*, 1992. **7**(1): p. 171-80.
120. Degenhardt, Y., et al., *Sensitivity of cancer cells to Plk1 inhibitor GSK461364A is associated with loss of p53 function and chromosome instability*. *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(7): p. 2079-89.
121. Adant, S., G.M. Shah, and J.M. Beaugreard, *Combination treatments to enhance peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumours*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2020. **47**(4): p. 907-921.
122. Bison, S.M., et al., *Optimization of combined temozolomide and peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) in mice after multimodality molecular imaging studies*. *EJNMMI Res*, 2015. **5**(1): p. 62.
123. Zhang, J., M.F. Stevens, and T.D. Bradshaw, *Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance*. *Curr Mol Pharmacol*, 2012. **5**(1): p. 102-14.
124. Matuo, R., et al., *DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **79**(2): p. 147-53.
125. Wang, T., A.J. Pickard, and J.M. Gallo, *Histone Methylation by Temozolomide; A Classic DNA Methylating Anticancer Drug*. *Anticancer Res*, 2016. **36**(7): p. 3289-99.
126. Mojardín, L., et al., *Chromosome segregation and organization are targets of 5'-Fluorouracil in eukaryotic cells*. *Cell Cycle*, 2015. **14**(2): p. 206-18.
127. Sun, L., et al., *Valproic acid induces NET cell growth arrest and enhances tumor suppression of the receptor-targeted peptide-drug conjugate via activating somatostatin receptor type II*. *J Drug Target*, 2016. **24**(2): p. 169-77.
128. Parghane, R.V., et al., *Long-term outcome of "Sandwich" chemo-PRRT: a novel treatment strategy for metastatic neuroendocrine tumors with both FDG- and SSTR-avid aggressive disease*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2021. **48**(3): p. 913-923.
129. Kong, G., et al., *High-administered activity In-111 octreotide therapy with concomitant radiosensitizing 5FU chemotherapy for treatment of neuroendocrine tumors: preliminary experience*. *Cancer Biother Radiopharm*, 2009. **24**(5): p. 527-33.
130. Kessel, K., et al., *Evolving Castration Resistance and Prostate Specific Membrane Antigen Expression: Implications for Patient Management*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(14).
131. Staniszevska, M., et al., *Drug and molecular radiotherapy combinations for metastatic castration resistant prostate cancer*. *Nucl Med Biol*, 2021. **96-97**: p. 101-111.