UNIVERSITE DE TOULOUSE III – Paul SABATIER
FACULTE DE MEDECINE

Année 2019 2019 TOU3 1702

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE
SPECIALITE BIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement par

Hélène CATALA
Le 12 Avril 2019

MESURE DE LA VARIABILITE DE BIOMARQUEURS MOLECULAIRES POUVANT CARACTERISER LES THERAPIES RADIONUCLEIDIQUES (AU 177Lu-DOTATATE) CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE TUMEURS NEUROENDOCRINES INTESTINALES G1-G2 METASTATIQUES

Directrice de thèse : Pr Frédérique SAVAGNER

JURY :

Monsieur le Professeur Bertrand PERRET	**Président**
Madame le Professeur Peggy GANDIA	**Assesseur**
Madame le Professeur Frédérique SAVAGNER	**Assesseur**
Monsieur le Professeur Frédéric COURBON	**Assesseur**
Madame le Docteur Claire THALAMAS	**Assesseur**

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER

TABLEAU du PERSONNEL HU

des Facultés de Médecine du l'Université Paul Sabatier

au 1er septembre 2018

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Yves
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre
Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel
Doyen Honoraire	M. VINEL Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel
Professeur Honoraire	M. ADER Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. ALBAREDE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis
Professeur Honoraire	M. ARLET Jacques
Professeur Honoraire	M. ARLET Philippe
Professeur Honoraire	M. ARLET-SUAU Elisabeth
Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. BARRET André
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis
Professeur Honoraire	M. BOCCALON Henri
Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. BONEU Bernard
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. BOUTAULT Franck
Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland
Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire	M. CARATERO Claude
Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre
Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard
Professeur Honoraire	M. CHABANON Gérard
Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire	M. CHAP Hugues
Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. CLANET Michel
Professeur Honoraire	M. CONTE Jean
Professeur Honoraire	M. COSTAGLIOLA Michel
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean
Professeur Honoraire	M. DABERNAT Henri
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine
Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER Nicolas
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric
Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges
Professeur Honoraire	Mme DELISLE Marie-Bernadette
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.
Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri
Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean
Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire	M. FABIÉ Michel
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean
Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire	M. FOURNIE Bernard
Professeur Honoraire	M. FOURTANIER Gilles
Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Professeur Honoraire	M. GHISOLFI Jacques
Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. GUIRAUD CHAUMEIL Bernard
Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. JOFFRE Francis
Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves
Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche
Professeur Honoraire	M. LARENG Louis
Professeur Honoraire	M. LAURENT Guy
Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Yves
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul
Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire	M. MANELFE Claude
Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. MASSIP Patrice
Professeur Honoraire	Mme MARTY Nicole
Professeur Honoraire	M. MAZIERES Bernard
Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. MURAT
Professeur Honoraire	M. OLIVES Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. PASCAL Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire	M. PONTONNIER Georges
Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques
Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline
Professeur Honoraire	M. PUEL Pierre
Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel
Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. RAILHAC Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. REGIS Henri
Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude
Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. ROCHE Henri
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre
Professeur Honoraire	M. ROLLAND Michel
Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel
Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. SARRAMON Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. SIMON Jacques
Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. TREMOULET Michel
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre
Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Professeur Honoraire	M. VOIGT Jean-Jacques

Professeurs Émérites

Professeur ADER Jean-Louis
Professeur ALBAREDE Jean-Louis
Professeur ARBUS Louis
Professeur ARLET-SUAU Elisabeth
Professeur BOCCALON Henri
Professeur BONEU Bernard
Professeur CARATERO Claude
Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CHAP Hugues
Professeur CONTÉ Jean
Professeur COSTAGLIOLA Michel
Professeur DABERNAT Henri
Professeur FRAYSSE Bernard
Professeur DELISLE Marie-Bernadette
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard
Professeur JOFFRE Francis
Professeur LAGARRIGUE Jacques
Professeur LARENG Louis
Professeur LAURENT Guy
Professeur LAZORTHES Yves
Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur MANELFE Claude
Professeur MASSIP Patrice
Professeur MAZIERES Bernard
Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur MURAT
Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur SALVAYRE Robert
Professeur SARRAMON Jean-Pierre
Professeur SIMON Jacques

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37 allées Jules Guesde - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : D. CARRIE

P.U. - P.H.
Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ADOUE Daniel (C.E)	Médecine Interne, Gériatrie
M. AMAR Jacques	Thérapeutique
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion
Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)
M. BONNEVIALLE Paul (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.
M. BOSSAVY Jean-Pierre (C.E)	Chirurgie Vasculaire
M. BRASSAT David	Neurologie
M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique
M. CALVAS Patrick (C.E)	Génétique
M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie
M. CHAIX Yves	Pédiatrie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. DEGUINE Olivier (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie
M. FERRIERES Jean (C.E)	Epidémiologie, Santé Publique
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie
M. FOURNIÉ Pierre	Ophtalmologie
M. GAME Xavier	Urologie
M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie
Mme LAMANT Laurence (C.E)	Anatomie Pathologique
M. LANG Thierry (C.E)	Biostatistiques et Informatique Médicale
M. LANGIN Dominique (C.E)	Nutrition
M. LAUWERS Frédéric	Anatomie
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie
M. MALAVAUD Bernard	Urologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique
M. MARCHOU Bruno	Maladies Infectieuses
M. MAZIERES Julien	Pneumologie
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie
M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie
M. PARINAUD Jean (C.E)	Biol. Du Develop. et de la Reprod.
M. PAUL Carle	Dermatologie
M. PAYOUX Pierre	Biophysique
M. PAYRASTRE Bernard (C.E)	Hématologie
M. PERON Jean-Marie	Hépato-Gastro-Entérologie
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie
M. RASCOL Olivier (C.E)	Pharmacologie
M. RECHER Christian	Hématologie
M. RISCHMANN Pascal	Urologie
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile
M. SALLES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie
M. SANS Nicolas	Radiologie
Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire
M. TELMON Norbert (C.E)	Médecine Légale
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépato-Gastro-Entérologie

P.U. Médecine générale

M. OUSTRIC Stéphane

P.U. - P.H.
2ème classe

Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
M. BONNEVIALLE Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. BUREAU Christophe	Hépato-Gastro-Entéro
Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
Mme CHARPENTIER Sandrine	Médecine d'urgence
M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. LOPEZ Raphael	Anatomie
M. MARTIN-BLONDEL Guillaume	Maladies infectieuses, maladies tropicales
M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
Mme RUYSSEN-WITRAND Adeline	Rhumatologie
Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
Mme TREMOLLIERES Florence	Biologie du développement
Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie

P.U. Médecine générale

M. MESTHÉ Pierre

Professeur Associé Médecine générale

M. ABITTEBOUL Yves

M. POUTRAIN Jean-Christophe

Professeur Associé en Neurologie

Mme PAVY-LE TRAON Anne

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : E. SERRANO

P.U. - P.H.
Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ACCADBLED Franck	Chirurgie Infantile
M. ALRIC Laurent (C.E)	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis (C.E)	Hépato-Gastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice	Thérapeutique
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel (C.E)	Cardiologie
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie, Eco. de la Santé et Prévention
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie
M. KAMAR Nassim	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophtalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. OTAL Philippe	Radiologie
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick	Nutrition
M. ROLLAND Yves (C.E)	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel (C.E)	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

Professeur Associé de Médecine Générale

M. STILLMUNKES André

P.U. - P.H.
2ème classe

M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. AUSSEIL Jérôme	Biochimie et biologie moléculaire
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
Mme DALENC Florence	Cancérologie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
M. GARRIDO-STÖWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. HUYGHE Eric	Urologie
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. REINA Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. SOLER Vincent	Ophtalmologie
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loic	Hématologie

P.U. Médecine générale

Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve

Professeur Associé de Médecine Générale

M. BOYER Pierre

Professeur Associé en Pédiatrie

Mme CLAUDET Isabelle

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37, allées Jules Guesde – 31062 Toulouse Cedex

M.C.U. - P.H.

M. ABBO Olivier	Chirurgie infantile
M. APOIL Pol Andre	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
Mme BERTOLI Sarah	Hématologie, transfusion
M. BIETH Eric	Génétique
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAGNE Myriam	Ophtalmologie
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
M. CAVAIGNAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie
Mme CHANTALAT Elodie	Anatomie
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
Mme DE MAS Véronique	Hématologie
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANTET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDI Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Anne	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
M. LHOMME Sébastien	Bactériologie-virologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie
M. VIDAL Fabien	Gynécologie obstétrique

M.C.U. Médecine générale

M. BRILLAC Thierry

Mme DUPOUY Julie

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE- RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE cedex

M.C.U. - P.H

Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
Mme CAMARE Caroline	Biochimie et biologie moléculaire
M. CAMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CAUSSE Elizabeth	Biochimie
M. CHASSAING Nicolas	Génétique
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
Mme CORRE Jill	Hématologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GALLINI Adeline	Epidémiologie
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GASQ David	Physiologie
M. GATIMEL Nicolas	Médecine de la reproduction
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
M. GUILLEMINAULT Laurent	Pneumologie
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme MAUPAS SCHWALM Françoise	Biochimie
M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. MOULIS Guillaume	Médecine Interne
Mme NASR Nathalie	Neurologie
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme VALLET Marion	Physiologie
M. VERGEZ François	Hématologie

M.C.U. Médecine générale

M. BISMUTH Michel

Mme ESCOURROU Brigitte

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr FREYENS Anne	Dr BIREBENT Jordan
Dr IRI-DELAHAYE Motoko	Dr BOURGEOIS Odile
Dr CHICOULAA Bruno	Dr LATROUS Leila

FEVRIER 2019

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Bertrand PERRET,

Je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury et de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail. Merci pour vos enseignements qui ont guidé mes choix au cours de cet internat, votre bienveillance et votre précieux soutien. C'est pour moi un honneur de terminer mes études sous votre direction. Soyez assuré de ma plus sincère gratitude, et veuillez accepter l'expression de mon plus grand respect.

A Monsieur le Professeur COURBON,

Je vous remercie de me faire l'honneur d'être membre de ce jury et de participer à la critique de ce travail. Je vous prie d'accepter l'expression de toute ma considération et de ma plus profonde estime.

A Madame le Professeur Peggy GANDIA,

Je te remercie chaleureusement de me faire l'honneur de siéger parmi les membres de ce jury. Les internes de biologie médicale sont chanceux de pouvoir compter sur une personne à l'écoute, investie, rigoureuse et compétente. Personne d'autre ne pourrait mieux remplir ce rôle que toi. Merci pour ton aide, tes conseils et ton soutien, pour cela je t'en serai toujours reconnaissante.

A Madame le Docteur Claire THALAMAS,

Je te remercie de me faire l'honneur de siéger parmi les membres de ce jury et de juger de ce travail de thèse. Mais avant tout, je te remercie sincèrement de m'avoir donné ma chance il y a un an et demi, de ton soutien et de l'opportunité que tu m'as donné de travailler dans la recherche clinique. J'espère être digne de tes attentes.

A Madame le Professeur Frédérique SAVAGNER,

Je vous remercie sincèrement de m'avoir proposé ce travail, de m'avoir fait confiance pour le mener à bien et d'avoir accepté de le diriger. Merci pour vos précieux conseils, vos encouragements, votre patience, votre partage de connaissances mais aussi pour l'implication et l'enthousiasme que vous avez placé dans ce travail. C'est et cela restera un plaisir et un honneur de poursuivre ce travail avec vous.

Au **Professeur Olivier RASCOL**, je vous remercie de la considération dont vous m'avez fait part et de votre soutien. C'est pour moi un honneur d'intégrer votre équipe. J'espère être à la hauteur de vos attentes.

Merci à **tous les biologistes** et à **tous les techniciens** qui m'ont accueillis et formés au cours de ces quatre années d'internat à Toulouse.

A **mes Parents**, je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci pour votre soutien infaillible, votre gentillesse inégalable, votre amour et toutes ces années de bonheur avec vous. Je n'aurai pu espérer mieux ! C'est grâce à vous si j'en suis arrivée jusqu'ici.

A mon frère **Félix**, merci pour ta bienveillance et ta tendresse envers moi m'ont toujours apporté énormément de réconfort. Ensemble dans le combat du gras ! Je te souhaite beaucoup de bonheur pour cette nouvelle vie à venir !

A **mes grands-parents** qui ne sont plus là, mais à qui je pense chaque jour.

A **Emma**, de la niche dorée aux talons écorchés je ne tiens plus le compte de tous ces supers moments qu'on a passés ! Merci d'avoir toujours été là pour moi, de notre si belle amitié, et de l'honneur que tu m'as fait d'être témoin de ton futur destin ! Prépare tes genoux **Olivier**, on va danser sur les bronzés **!**

A **Laurent** (tchi)**, Eva** (figolu)**, Thomas** (youyou) **et Amazigh** (lulu) sans qui toutes ces années d'externat n'auraient pas été les mêmes, on en a passé des moments de rire, de fou rire, et il y en aura bien d'autres encore !

A ma belle et joyeuse bande de grands fous : **Abdul, Alexis, Aliénor, Adeline, la Benje, Bertille, Céline, Fabien, Léo, Medhi, Mika, Idriss, Isaure, Paul-Artur, Priscilla, Rodolphe, Pierre-Marie, Sami, Sarah, Thibaut, Tiphaine.** Mille mercis pour toute votre folie ! J'ai hâte de vous retrouver !

A **Marion, Noémie et Karen** qui ont rempli ces 4 années d'internat de joie et d'amitié. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, ces stages remplis d'émotions. Merci Marion pour ta générosité et tes éclats de rires, à toi Nono pour ta présence et ton soutien jusqu'à la fin, tu vas beaucoup nous manquer dans ton pays lointain, et à toi Karen, pour ton coaching, ce fut un honneur de partager la même identité !

A mes co-internes, les anciens et les nouveaux : **Agnès, Ali, Alice-Anne**, **Anthony, Aude, Audrey, Camille C, Camille Garnier, Elodie, Etienne, Grégoire, Hugo, Imane, Jules, Julien L, Laurie, Louis-Thomas, Léa, Lucie, Ludo, Manu, Morgane, Nico, Pierre-Yves, Raphaëlle, Sandrine, Sarah, Tiphaine, Thomas.**
Spéciale dédicace à **Alban** (God save the lipstick)**, Anaïs** (pour ta gentillesse et pour tes qualités de fouine) et **Vuthy** (spécial non remerciement), merci à tous les trois pour votre soutien dans les bons comme dans les mauvais moments et surtout d'avoir eu la patience de m'écouter râler. Vous avez rendu ce semestre bien plus agréable !

Aux amis du lycée **la S1 team : Adrien, Fanny, Jul, Louis, Marie, Matoo, Sofo.**

A **l'équipe de biologie moléculaire,** sans qui mes nerfs auraient probablement lâché ! merci pour votre aide et soutien les filles, votre bonne humeur et votre grain de folie !

A ma nouvelle **CIC family,** j'ai hâte de pouvoir enfin travailler à 100% avec vous ! Encore un peu de patience, je fais le plein de connaissances ! Merci pour votre accueil dès mon arrivée il y a un an et demi, de la bienveillance que vous avez eu à mon égard. C'est la qualité de chacun d'entre vous qui fait de ce service un monde à part !

A **Hadrien**, et moi qui pensait qu'on le terminerait ensemble cet internat ! Merci pour ta patience à toute épreuve, tes conseils avisés, pour la réassurance et le réconfort que tu m'as apporté, sans oublier tous ces beaux moments passés. J'attends avec hâte tous ceux à venir !

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS **3**

TABLE DES TABLEAUX **4**

TABLE DES ANNEXES **4**

LISTE DES ABREVIATIONS **5**

INTRODUCTION **7**

I. GENERALITES SUR LES TUMEURS NEUROENDOCRINES DIGESTIVES. **9**

A. Epidémiologie **9**

B. Définition, nomenclature et classification. **13**

1. Origine embryologique et site anatomique. 14

2. Manifestations. 15

3. Classification OMS/TNM: Grading and Staging. 16

C. Clinique : les TNE intestinales et le syndrome carcinoïde. **17**

D. La somatostatine et ses récepteurs. **18**

1. La somatostatine et ses analogues. 18

2. Les récepteurs à la somatostatine : un rôle clé. 20

E. Diagnostic des TNE intestinales. **21**

1. L'imagerie médicale. 22

a) Les techniques d'imagerie conventionnelle 22

b) Les techniques d'imagerie fonctionnelle dites « moléculaires ». 23

2. Les biomarqueurs. 25

a) La Chromogranine A. 25

b) Le 5-HIAA : acide 5-hydroxy-indole acétique. 26

c) Les biomarqueurs moléculaires 27

3. L'anatomo-pathologie. 29

F. Traitement des tumeurs neuroendocrines intestinales. **30**

OBJECTIF DE CE TRAVAIL DE THESE. **36**

II. MATERIELS ET METHODES 36
A. Protocole GENEbioLuNET. 36
1. Design de l'étude. 36
2. Déroulement de l'étude 38
a) Traitement par 177Lu-DOTATATE. 38
b) Analyse au laboratoire. 38
B. Analyse des transcrits au laboratoire. 41
1. Les différentes étapes de l'extraction d'ARN. 41
a) Technique d'extraction manuelle d'ARN. 41
b) Quantification des acides nucléiques. 43
c) Traitement des ARN à la DNase TURBO®. 44
2. La RT-qPCR. 44
a) La Retro- Transcription (RT). 44
b) La PCR quantitative par SYBR Green. 47
III. RESULTATS. 53
A. Population d'étude. 53
1. Caractéristiques cliniques et biologiques. 53
2. Déroulement de la PRRT et évolution clinique post-traitement. 56
B. Analyse moléculaire des transcrits de gènes. 58
1. Modulation du niveau d'expression des gènes secondaire à la PRRT. 59
2. Modulation de l'expression chez le patient 1. 62
3. Modulation de l'expression des gènes chez le patient 2. 63
4. Modulation de l'expression des gènes chez le patient n°4. 64
IV. DISCUSSION 66
CONCLUSION. 78
BIBLIOGRAPHIE 80
ANNEXES 87

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Incidence des TNE selon la base de données du SEER[1]. 10
Figure 2: Incidence des TNE selon leur localisation [1]. 11
Figure 3 : Incidence ajustée à l'âge des TNE digestives selon la base de données SEER[1] 12
Figure 4: Incidence des TNE digestives en fonction du site anatomique selon la base de données du SEER. 12
Figure 5 : Origine embryologique des différentes TNE de l'organisme. 14
Figure 6: Structure biochimique de la somatostatine à 14 acides aminés. 19
Figure 7 : Effet anti-tumoral des aSST. 20
Figure 8 : Structure des SSTR (illustrée par le récepteur de sous-type SST2A)[24]. 21
Figure 9 : Exemples d'imagerie moléculaire utilisant les aSST. 24
Figure 10 : Diagrammes de Kaplan-Meier comparant la survie de patients atteints de TNED en fonction du taux de CgA [38]. 26
Figure 11 : Identification des 51 marqueurs moléculaires des TNE 28
Figure 12 : Arbre décisionnel dans la prise en charge des TNE intestinales métastatiques[51].. 31
Figure 13 : Essai clinique de phase III NETTER-1[3]. 32
Figure 14 : Anatomie du 177Lu-DOTATATE 34
Figure 15 : Structure biochimique du Lutécium 177 tyr3-octreotate. 34
Figure 16 : Déroulement du protocole GENEbioLuNET. 40
Figure 17 : Etapes de la Rétro-Transcription avec le kit SuperScript III First-Strand® Synthesis System[60]. System[60] 45
Figure 18 : Différentes phases de la réaction de qPCR. 48
Figure 19: Principes de la qPCR par SYBR Green. 49
Figure 20: Sélection des patients pour l'analyse biologique des transcrits. 54
Figure 21 : Melting curve pour le gène PANK2 du patient n°2, prélèvement P1. 59
Figure 22 : Modulation de l'expression des gènes au cours de la PRRT du patient n°1. 60
Figure 23: Modulation de l'expression des gènes au cours de la PRRT du patient n°2. 61
Figure 24: Modulation de l'expression des gènes au cours de la PRRT du patient n°4. 61
Figure 25 : Niveau d'expression des gènes au cours des 4 cycles de PRRT du patient n°1. ... 62
Figure 26 : Niveau d'expression des gènes du patient n°2 avec une échelle adaptée. 63
Figure 27 : Expression des gènes du patient n°4 avec une échelle adaptée. 64

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principaux syndromes sécrétoires des TNE fonctionnelles. 15
Tableau 2 : Classification OMS 2017 des TNE. 16
Tableau 3: Classification TNM des TNE du jéjunum et iléum selon L'UICC 2017[17]. 17
Tableau 4 : Actions de la somatostatine[21]. 19
Tableau 5 : Caractéristiques des TNE et options thérapeutiques. 30
Tableau 6: Solution d'acides aminés. 38
Tableau 7 : Présentation des 9 gènes d'intérêt du protocole GENEbioLuNET. 39
Tableau 8: Composition du Mix de dénaturation. 45
Tableau 9 : Composition du cDNA Mix. 46
Tableau 10: Avantages et inconvénients de la technique de SYBR Green. 48
Tableau 11: Mélange réactionnel pour la qPCR. 50
Tableau 12: Programme de qPCR SYBR Green I / HRM dye. 51
Tableau 13: Tableau récapitulatif des caractéristiques cliniques et biologiques des patients analysés en pré-PRRT. 55
Tableau 14: Tableau récapitulatif des caractéristiques cliniques et biologiques des patients analysés en post-PRRT. 57
Tableau 15 : Résultats des concentrations d'ARN obtenues après extraction. 58
Tableau 16: Tableau récapitulatif de la modulation d'expression des gènes de l'étude GENEbioLuNET 65

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Le NETest : présentation des 51 gènes du panel 87
Annexe 2 : Le principe du NETest[56] 89
Annexe 3 : Critères RECIST version 1.1 Evaluation de la réponse tumorale (Nouveaux critères RECIST v 1.1) 90
Annexe 4 : Couples d'amorces utilisés pour le protocole GENEbioLuNET. 93
Annexe 5 : Liste des miRNA exprimés en fonction du site anatomique[57]. 93

LISTE DES ABREVIATIONS

^{68}Ga : 68 Gallium

^{131}I-mIBG : méta-IodoBenzylGuanidine marqué à l'iode 131

^{177}Lu : 177-Lutecium

5-HIAA : Acide 5-Hydroxy Indol Acétique

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

ADNc : ADN complémentaire

AJCC : American Joint Committee on Cancer

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

APUD : Amine Precursor Uptake and Decarboxylation

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ASMR: Amélioration du Service Médical Rendu

ASST : Analogue de la Somatostatine

ATP6V : Vacuolar-type H +-ATPase

BAX : Bcl2-associated X protein

BCL2 : B-cell lymphoma 2

BRAF : B-raf proto-oncogène

CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A

CDKN1B : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B

CgA : Chromogranine A

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CNE : Carcinome Neuro-Endocrinien

Ct : Cycle threshold

CXCL14 : C-X-C Motif Chemokine Ligand 14

DDB2 : DNA damage-binding protein 2

DFG : Débit de Filtration Glomérulaire

dNTP : désoxyriboNucléotide Tri-Phosphate

DS : Déviation Standard

EDTA : Acide Ethylène Eiamine Tétraacétique

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay

ENETS : European Neuro Endocrine Tumor Society

FDG : Fluoro Désoxy Glucose

FDRX : Ferredoxin Reductase

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GHRH : Growth Hormone Releasing Hormone

GTE : Groupe d'étude des Tumeur Endocrine

GSP : Gene Specific Primer

HAS : Haute Autorité de Santé

HDA9C : Histone Deacetylase 9

HPLC : Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance

IFB : Institut Fédératif de Biologie

IRM : Imagerie par résonance magnétique

IUCT : Institut Universitaire du Cancer de Toulouse

LP : Libération Prolongée

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

miRNA : Micro ARN
NFS : Numération Formule Sanguine
PCR : Polymérase Chain Reaction
PFS : Progression Free Survival
PRRT : Peptide Receptor Radionuclide Therapy
qPCR : PCR quantitative
RENATEN : Réseau National de référence de prise en charge des TNE
RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RIV : Radiothérapie Interne Vectorisée
RPM : Rotor Par Minute
RT : Reverse Transcription
RT-qPCR : Reverse Transcription-PCR quantitative
SEER : Surveillance, Epidemiology, and End Results program
SNFGE : Société Nationale Française de Gastro-Entérologie
SST : Somatostatine
SSTR : Récepteur à la SST
SST1-5 : Récepteur à la SST de type 1 à 5
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PANK2 : Pantothenate kinase 2
TCEB3C : Transcription Elongation Factor B Polypeptide 3C
TDM : Tomo-Densitométrie Monophotonique
TEP : Tomographie par Emission de Positons
TEMP : tomographie par émission monophotonique
TNE : Tumeur Neuro Endocrine
TNED : TNE Digestives
TNE GEP: TNE Gastro-Entéro-Pancréatique
TNM : Tumor, Node, Métastases
UI : Unité Internationale
UICC : Union for International Cancer Control
UV : Rayon Ultra-Violet
VIP : Vasoactive Intestinal Peptide
XCP : Xeroderma pigmentosum, complementation group

INTRODUCTION

Les tumeurs neuroendocrines (TNE) intestinales appartiennent à un ensemble complexe de tumeurs dérivant du tube neural. Elles représentent le contingent des tumeurs neuroendocrines digestives (TNED) le plus fréquent avec une incidence en augmentation et une survie moyenne à 5 ans au stade métastatique inférieure à 50%[1]. Les alternatives thérapeutiques pour les TNE intestinales non éligibles à une exérèse chirurgicale complète restent très limitées. La radiothérapie interne vectorisée (RIV) par Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT) au 177Lu-DOTATATE délivre localement à bas débit de dose plusieurs centaines de Gray au niveau des tissus tumoraux sur-exprimant les récepteurs à la somatostatine SST2 sans irradier significativement les tissus environnants[2]. Lors de l'essai clinique récent de phase III NETTER-1[3] mené chez des patients atteints de TNE intestinales progressives métastatiques et inopérables, le traitement par PRRT a démontré sa supériorité en termes de réponse thérapeutique et d'amélioration du délai de survie globale sans progression par rapport au traitement standard par analogue de la somatostatine (aSST). Le 177Lu-DOTATATE a obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en Octobre 2017 dans le cadre du traitement des TNE intestinales inopérables ou métastatiques, progressives, bien différenciées (G1 et G2) et exprimant des récepteurs de la somatostatine chez l'adulte. A cela s'ajoute l'obtention d'une Amélioration du Service Médical Rendu (ASMR) de grade III en juillet 2018[4]. La lutathérapie (PRRT au 177Lu-DOTATATE) appartient à une nouvelle catégorie de molécules qualifiées de « théranostiques[5] ». L'engouement pour ces nouveaux traitements reste cependant modéré en raison du peu de recul existant vis-à-vis de leur gestion. La crainte que suscite ces nouveaux acteurs métaboliques radioactifs révèle un besoin pressant d'outils performants permettant de cadrer rigoureusement leur utilisation.

Chaque individu possède une radiosensibilité différente. Ainsi, l'évaluation de la radiosensibilité individuelle permettrait de proposer un schéma thérapeutique personnalisé. Le protocole GENEbioLuNET se propose d'étudier la variabilité radio-induite de l'expression de gènes chez les patients atteints de TNE intestinales et traités par PRRT. La diversité des options thérapeutiques et des profils évolutifs chez ces patients rend nécessaire l'identification de marqueurs biologiques permettant de guider la stratégie thérapeutique. A l'heure actuelle, il n'existe pas de biomarqueurs assez robustes dans la prise en charge de ce type de tumeur.

D’autre part, aucune étude de biomarqueurs associée à une approche dosimétrique n’a encore été réalisée dans le cadre des TNE intestinales traitées par PRRT. Il s’agit donc d’une étude pilote qui inclura 30 patients.

Devant la recherche permanente d’une prise en charge plus personnalisée des patients et la prise en compte de la radiosensibilité individuelle, une approche qualifiée de « biodosimétrie » nécessite la mise au point de marqueurs biologiques d’efficacité et de toxicité. L’hypothèse de notre étude est que le suivi de biomarqueurs moléculaires au cours du traitement permettrait de proposer une adaptation du schéma thérapeutique selon la radiosensibilité des patients.

Nous commencerons par présenter un état des lieux des connaissances actuelles sur les TNED en insistant sur les TNE intestinales. Puis, dans le cadre du protocole GENEbioLuNET réalisé chez l’adulte atteint de TNE intestinale progressive ou métastatique suivi à l’I.U.C.T (Institut Universitaire du Cancer de Toulouse) et traité par 177Lu-DOTATATE entre le 1 juin 2018 et le 1er février 2019, nous présenterons la démarche biologique mise en place au laboratoire de Biochimie-Biologie Moléculaire (Institut Fédératif de Biologie-IFB) ainsi que les premiers résultats obtenus en réponse aux objectifs suivants :

- évaluer les paramètres de distribution de certains transcrits pour des gènes sélectionnés comme gènes de radiosensibilité et de gènes impliqués dans les processus d’oncogénèse.
- analyser la variabilité de ces biomarqueurs en réponse à un traitement par PRRT.

I. GENERALITES SUR LES TUMEURS NEUROENDOCRINES DIGESTIVES.

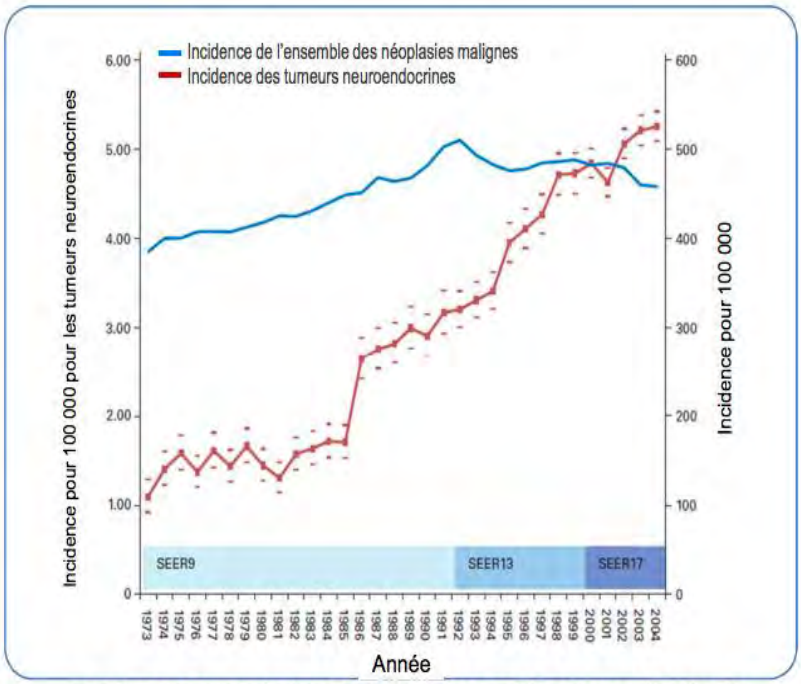
Les TNED sont des tumeurs rares d'évolution lente, hétérogènes tant sur le plan clinique que biologique. Elles sont généralement multiples, le plus souvent de découverte fortuite et localement avancées au moment du diagnostic. Elles peuvent se présenter comme des tumeurs bénignes, sans envahissement des tissus avoisinants, ni métastases, ni récidive après exérèse chirurgicale, ou se comporter comme des tumeurs malignes. Elles peuvent être associées à un syndrome carcinoïde, habituellement corrélé à la présence de métastases hépatiques. Selon la localisation de la tumeur primitive, la survie et les sites des métastases varient[1]. La majorité de ces tumeurs sont sporadiques et les facteurs étiologiques restent le plus souvent inconnus.
On distingue classiquement les tumeurs fonctionnelles (responsables de symptômes liés à une production tumorale de peptides ou d'amines) des tumeurs non fonctionnelles (non sécrétantes). Les TNE intestinales ont un potentiel de malignité très élevé. Elles tendent à progresser de manière asymptomatique contrairement aux autres TNED (notamment gastriques ou rectales) qui présentent un faible potentiel de malignité mais une expression plus agressive au niveau symptomatique. Le pronostic de ces TNED demeure moins sévère par rapport aux autres types de cancers.

A. Epidémiologie

Aujourd'hui les TNE sont mieux maîtrisées par les professionnels de santé, mais cela n'a pas toujours été le cas. Dans une revue systématisée de la littérature Fraenkel, Kim *et al.*[6] mettent en exergue l'hétérogénéité et la difficulté rencontrée dans le recueil des données épidémiologiques mondiales des TNE. En effet, il persiste encore d'un pays à l'autre une importante disparité dans les méthodes diagnostiques de ces tumeurs du fait de leur complexité, d'un spectre de manifestations cliniques très vaste mettant en porte à faux le diagnostic de ces tumeurs.

Bien que généralement considérées comme rares, l'incidence des TNE a significativement augmenté au cours de ces dernières décennies[7]. Selon la base de données SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results program, qui est un programme fournissant des informations sur les statistiques du cancer parmi la population américaine), leur incidence est passée de

1,09/100 000 en 1973 à 5,25/100 000 habitants en 2004 pour une prévalence de 35/100 000 habitants aux Etats-Unis[1] (Figure 1). Cependant, les registres du SEER ne prennent en comptent que les TNE malignes et les données sur les tumeurs bénignes sont souvent exclues de ces registres. Pour la plupart des tumeurs épithéliales, l'invasion de la membrane basale détermine une preuve histologique de malignité. C'est en revanche beaucoup plus complexe pour les TNE. Devant l'absence de comportement malin évident, telle que l'invasion directe des organes adjacents, des ganglions lymphatiques régionaux ou de la présence de métastases, il devient difficile de classer une TNE dans la catégorie bénigne ou maligne. Bien que les données du registre SEER fournissent des informations importantes sur les TNE malignes, il reste plus difficile de savoir dans quelles mesures ces données sous-estiment la fréquence des TNE bénignes. En France, l'incidence des TNED malignes est estimée à 1,1/100 000 chez l'homme et 0,9/100 000 chez la femme[8].



<u>Figure 1</u>: Incidence des TNE selon la base de données du SEER[1].

Illustration de l'incidence de l'ensemble des TNE et de l'ensemble des néoplasies malignes toutes confondues (échelles adaptées).

L'augmentation de l'incidence s'explique par une meilleure connaissance de ces tumeurs par les cliniciens, l'uniformisation de leur classification[9] et les progrès réalisés dans le domaine de l'imagerie. Le sexe ratio est de l'ordre de 1 pour les tumeurs bénignes et légèrement plus

fréquent chez les hommes pour les tumeurs malignes[10]. L'âge de survenu est généralement situé entre 40 et 60 ans mais l'âge moyen au moment du diagnostic est de 60 ans rendant compte d'un diagnostic relativement tardif.

En termes de fréquence, Les TNED se positionnent en 2ème position après les TNE thoraciques qui sont représentées notamment par les contingents pulmonaire et bronchique (Figure 2)[1].

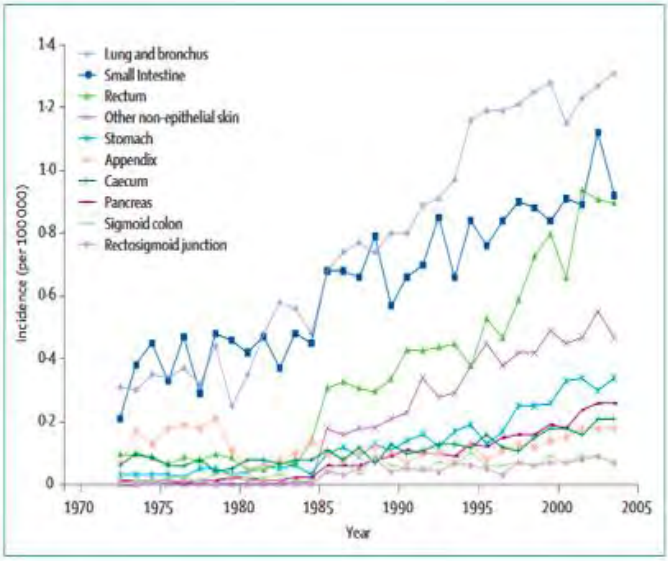


***Figure 2:* Incidence des TNE selon leur localisation** [1].

L'intestin grêle appelé « small intestine » chez les anglo-saxons représente avec le rectum la localisation digestive la plus fréquente du contingent digestif des TNE.

Plus spécifiquement, les TNED représentent environ 1 % des cancers digestifs en France[8]. Aux Etats Unis, toujours selon la base de données SEER, elles se placent en 2ème position des cancers digestifs, derrière le cancer colorectal. Au sein du contingent digestif, la localisation la plus fréquemment retrouvée avec le rectum est l'intestin grêle, appelées « small intestine » chez les anglo-saxons. En effet, les TNE intestinales représentent à elles seules environ 30 % des TNED (Figure 3 et Figure ***4***)[1].

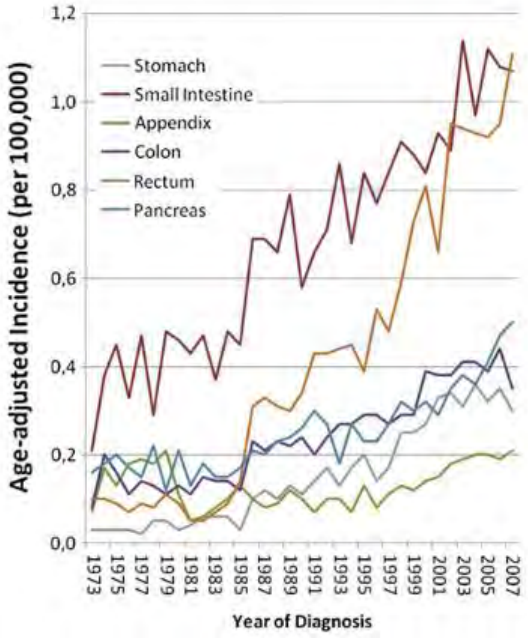


***Figure 3** : Incidence ajustée à l'âge des TNE digestives selon la base de données SEER*[1] .

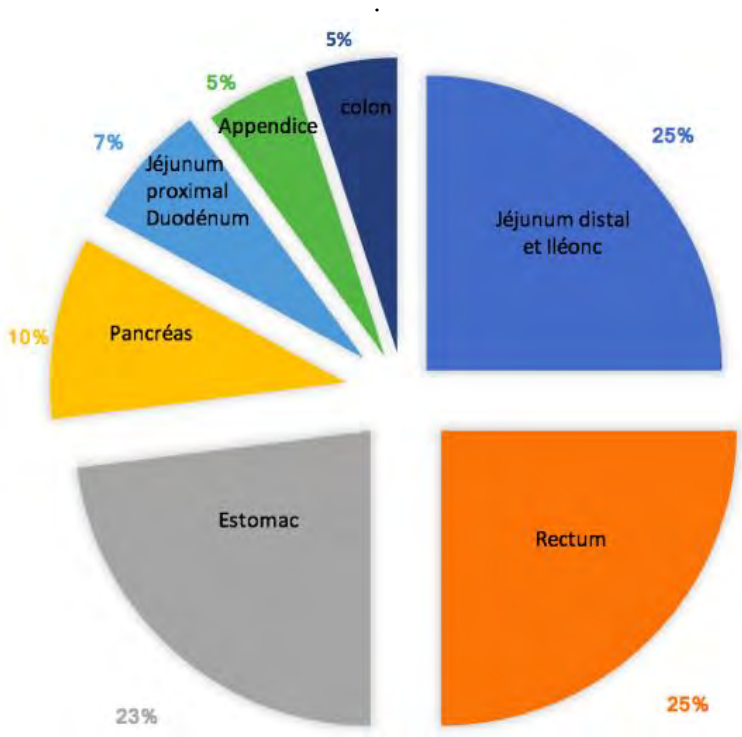


***Figure 4**: Incidence des TNE digestives en fonction du site anatomique selon la base de données du SEER.*

Dans la plupart des cas, les TNED sont des tumeurs bien différenciées (>80%)[11] et de nature non fonctionnelle. Les TNED fonctionnelles, plus rares (< 20 %), sont le plus fréquemment représentées par les tumeurs carcinoïdes, les insulinomes et les gastrinomes.

Plus de 50% des TNE intestinales sont diagnostiquées au stade métastatique, principalement au niveau hépatique. La survie moyenne au stade métastatique à 5 ans est estimée inférieure à 50%[1]. Selon la localisation du primitif et de l'invasion tumorale, cette moyenne peut varier. Parmi les principaux facteurs de mauvais pronostic, on retrouve le caractère peu différencié de la tumeur, le grade élevé (indice de prolifération, index mitotique) et le stade métastatique. L'évaluation de ces facteurs histologiques[12] va permettre d'établir un arbre décisionnel (cf. partie B « Définition, nomenclature et classification » présentée ci-dessous) qui définira les différentes options thérapeutiques.

B. Définition, nomenclature et classification.

Les TNE se définissent par l'expression de protéines de structure et de produits de sécrétion hormonaux communs aux neurones et à l'ensemble des cellules endocrines.
C'est en 1907 que Oberndorfer a introduit pour la première fois le terme de « carcinoïde » pour définir un groupe de tumeurs iléales mais ce n'est qu'en 1963 que William et Sandler[13] proposent une classification en fonction de l'origine embryologique. Aujourd'hui, des critères histologiques et immunohistochimiques bien définis permettent aux cliniciens d'identifier de manière fiable les TNE et de les différencier des autres types de tumeurs. Les critères de classification des TNE établis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2010 puis réactualisés en 2017 ont permis d'uniformiser leur classification et ont remplacé toutes classifications et termes antérieurs (tels que tumeurs du système Amine Precursor Uptake and Decarboxylation (APUD), tumeurs argentaffines et tumeurs carcinoïdes)[14].

1. Origine embryologique et site anatomique.

Le système « neuro-endocrinien » est un système vaste et complexe. Les cellules neuro-endocrines peuvent s'organiser sous formes[15]:

- D'organes ou de parties d'organes : hypothalamus, antéhypophyse, médullo-surrénale, parathyroïdes.
- D'amas bien individualisés à l'intérieur d'un organe : pancréas endocrine.
- Sous forme d'un réseau de cellules dispersées à l'intérieur d'un organe : thyroïde, tube digestif, poumon, thymus, arbre urinaire, appareil génital.

Les cellules neuro-endocrines du tube digestif, du pancréas et de l'appareil respiratoire dérivent de l'endoderme. Les cellules neuro-endocrines de l'intestin ont la particularité de dériver des cellules entérochromaffines dites de Kultchinsky.

L'origine embryologique des cellules neuro-endocrines (Figure 5) et de leur clone tumoral, permet de définir[16] :

- Les tumeurs développées à partir de l'intestin antérieur ou « foregut » (dans la classification anglo-saxone). Elles comprennent les TNE de l'appareil respiratoire (larynx, trachée, bronches) et du thymus ainsi que les TNE digestives dites « hautes » comprenant l'œsophage, l'estomac, le duodénum, le haut jéjunum, et le pancréas.
- Les tumeurs développées à partir de l'intestin moyen ou « midgut ». Il s'agit ici des TNE jéjunales basses, iléales, appendiculaires et caecales.
- Les tumeurs développées à partir de l'intestin postérieur ou « hindgut » comprennent les TNE coliques et rectales.

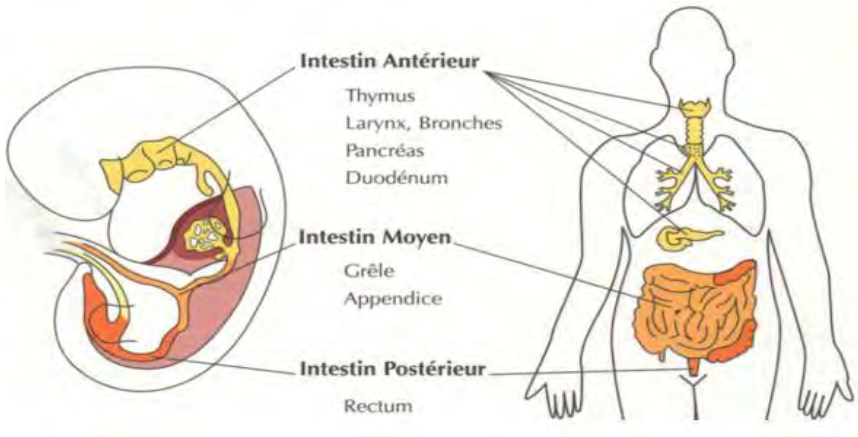


***Figure 5* : Origine embryologique des différentes TNE de l'organisme.**

2. Manifestations.

Seulement 20% des TNED sont fonctionnelles ce qui signifie qu'elles peuvent sécréter des hormones, des facteurs de croissance, des neurotransmetteurs à l'origine de symptômes cliniques typiques et bruyants (Tableau 1).

Plus fréquentes, les TNE non fonctionnelles sont souvent silencieuses. Généralement de découverte fortuite, elles se manifestent par des symptômes cliniques aspécifiques pouvant passer inaperçus, ce qui peut être à l'origine d'un important retard diagnostic[17]. L'intensité de ces symptômes va être proportionnelle à la progression et à l'invasion tumorale (syndrome de masse). Ceci explique leur découverte à des stades avancés de la maladie. C'est à cette catégorie qu'appartiennent les TNE intestinales.

Principales sécrétions hormonales	Nom des principaux syndromes sécrétoires	Siège le plus fréquent
Sérotonine	Syndrome carcinoïde	Iléon, bronche
Insuline	Insulinome	Pancréas
Glucagon	Glucagonome	Pancréas
Gastrine	Gastrinome	Duodénum, Pancréas
VIP	Vipome	Pancréas, Phéochromocytome
Somatostatine	Somatostatinome	Pancréas, Duodénum, Bronche
Cortisol	Syndrome de Cushing	Bronche, Thymus, Pancréas

***Tableau 1:** Principaux syndromes sécrétoires des TNE fonctionnelles.*

VIP : Vasoactive Intestinal Peptide

3. Classification OMS/TNM: Grading and Staging.

L'analyse anatomo-pathologique de la tumeur doit être obtenue (par biopsie ou chirurgie) avant tout traitement médicamenteux. La dernière version de la classification OMS 2017 est résumée dans le

Tableau ***2***. Celle-ci permet de classer les TNE en fonction de leur degré de différenciation cellulaire par l'utilisation d'outils immunohistochimiques. Ainsi, les TNED peuvent être classées en tant que TNE G1, G2 ou carcinomes neuroendocriniens (CNE) G3 composées respectivement de cellules tumorales bien, moyennement ou peu différenciées. Pour donner un exemple, les CNE sont caractérisés par une atypie cytologique de haut grade, un pléomorphisme apparent, une nécrose étendue et une activité mitotique importante [14].

Type	**Tumeur Neuroendocrine**		**Carcinome neuroendocrine**
Différenciation cellulaire	Bien différenciée	Bien à modérément différenciée	Peu différenciée
Grade	G1	G2	G3
Index Ki-67% (Indice de prolifération)	<3%	3-20%	>20%
Index mitotique (Nombre de mitoses/10 champs)	<2/10	2-20/10	>20/10

Tableau 2 : Classification OMS 2017 des TNE.

Les TNED font également l'objet d'une classification Tumor-Nodes-Metastasis (TNM) mise à jour par l'Union for International Cancer Control (UICC) en 2017[18]. Celle-ci intègre les particularités des TNED à la classification TNM classique conçue sous l'égide de l'ENETS[19] (European Neuro Endocrine Tumor Society) et permet d'établir une stadification tumorale (Tableau ***3***).

T	**Tumeur endocrine primitive**
TX	Tumeur primaire non évaluable
T0	Pas de tumeur primitive décelable
T1	Tumeur envahit la muqueuse ou la sous muqueuse et est < 1cm
T2	Tumeur envahit la musculeuse ou > 1cm
T3	Tumeur envahit la sous séreuse (respecte la séreuse)
T4	Tumeur envahit la séreuse ou d'autres organes/ structures adjacents
N	**Adénopathie(s) régionale(s)**
NX	Adénopathie(s) régionale(s) non évaluable(s)
N0	Absence de métastase ganglionnaire
N1	Présence de métastases ganglionnaires régionales < 12 ganglions
M	**Métastase(s)**
MX	Métastase(s) à distance non évaluable(s)
M0	Absence de métastase à distance
M1	Présence de métastase(s) à distance (M1a : hépatiques, M1b : dans au moins un site extra-hépatique, M1c : hépatiques et osseuses

Tableau 3: Classification TNM des TNE du jéjunum et iléum selon L'UICC 2017[18]***.***

C. Clinique : les TNE intestinales et le syndrome carcinoïde.

Les TNE intestinales se caractérisent par la manifestation de symptômes cliniques aspécifiques[19]. Elles sont le plus souvent asymptomatiques et de découverte fortuite (environ 60% des cas). Les symptômes dépendent généralement du siège, de la taille de la tumeur ainsi que de sa différenciation tumorale.

Les signes fonctionnels ou symptômes les plus fréquemment retrouvés sont :

- Douleurs abdominales.
- Altération de l'état général (anorexie, asthénie, amaigrissement).
- Nausées, vomissements.
- Météorisme abdominal.
- Syndrome occlusif en cas de masse tumorale volumineuse.

Il est fréquent de retrouver un syndrome carcinoïde (20 à 30%) le plus souvent associé à la présence de métastases hépatiques. Celui-ci peut se manifester chez tous les patients atteints de TNE mais il est plus couramment retrouvé en présence de TNE intestinales. Le syndrome carcinoïde se manifeste par un ensemble de symptômes liés à l'hypersécrétion de sérotonine (majoritairement) et d'autres peptides (histamine, bradykinine…) dans le sang. Il se caractérise par des signes fonctionnels et symptômes typiques :

- Flush +++ (typique chez environ 90% des patients) qui se caractérise par une coloration rouge ou violacée touchant le visage et la partie supérieure du tronc, d'apparition brutale, favorisée par le stress et la prise d'alcool.
- Diarrhées (chez 70% des patients) qui peuvent être de type moteur et sécrétoire.
- Tachycardie, diminution de la pression artérielle.
- Autres atteintes : cardiopathie carcinoïde, bronchoconstriction pulmonaire…

D. La somatostatine et ses récepteurs.

1. La somatostatine et ses analogues.

La somatostatine (SST) a été découverte en 1973 par Guillemin et Gerich [20]. C'est une hormone protéique inhibitrice de l'hormone de croissance GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone). Outre sa sécrétion au niveau de l'hypothalamus elle est également sécrétée au niveau gastro-intestinal par les cellules D. Ces cellules D sont réparties de manière diffuses au niveau du tractus digestif mais leur quantité diminue de l'estomac jusqu'au colon. La somatostatine existe sous 2 formes, une forme de 14 acides aminés (tétradécapeptide) (Figure 6) majoritairement sécrétée au niveau digestif et une forme de 28 acides aminés prédominante au niveau du système nerveux. La principale action de la somatostatine est d'inhiber les sécrétions exocrines et endocrines du tractus digestif (Tableau 4).

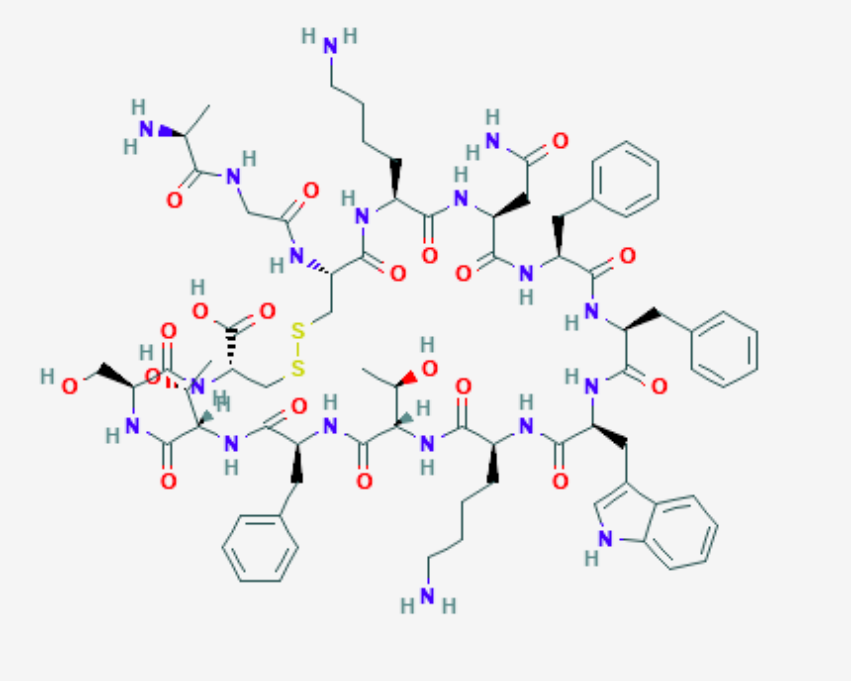


***Figure 6**: Structure biochimique de la somatostatine à 14 acides aminés.*

Inhibition des sécrétions exocrines	Inhibition des sécrétions endocrines	Autres actions
• Salivaire : amylase • Gastrique : acide chlorhydrique • Hépatique : bile • Pancréatique : amylase, trypsine, lipase	• Digestives : sécrétine, VIP… • Pancréatiques : glucagon, insuline.	• Inhibition de la motilité gastrique et intestinale • Hémodynamiques : diminution du flux sanguin splanchnique, diminution de la pression du système porte • Contrôle de la prolifération cellulaire dans les tissus normaux et tumoraux[21]

***Tableau 4** : Actions de la somatostatine[22].*

Les analogues de la somatostatine (aSST) présentent certains avantages par rapport à la somatostatine naturelle[22]. Ils possèdent une ½ vie plus longue et se fixent avec une plus forte affinité aux récepteurs SST2. Historiquement, l'Octréotide fut le 1er analogue de la somatostatine développé. Leurs mécanismes d'action anti-tumoraux sont décrits dans la **Error! Reference source not found.**.

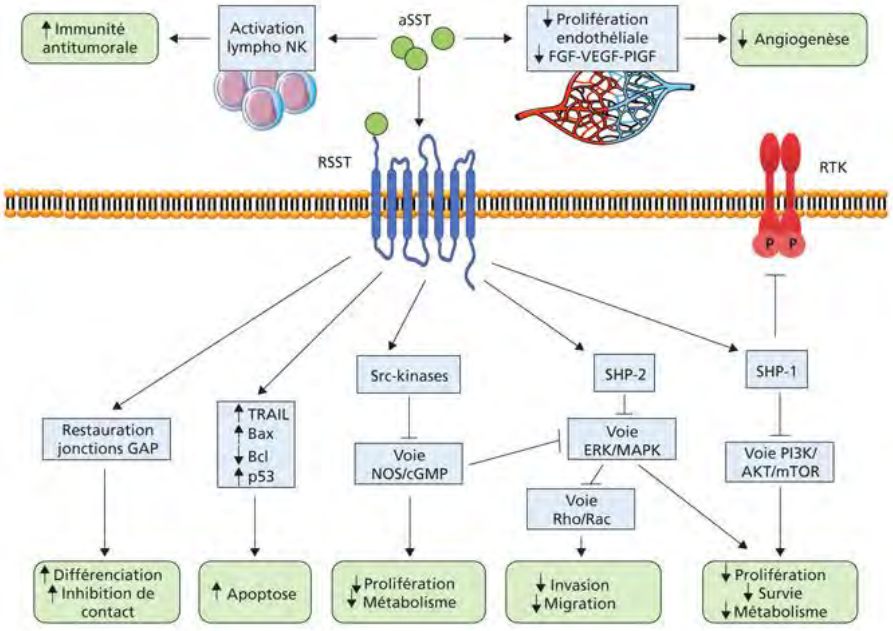


***Figure 7* : Effet anti-tumoral des aSST.**

Mécanismes directs et indirects de l'activité anti tumorale des analogues de la somatostatine dans les tumeurs neuroendocrines digestives (aSST : analogue de la somatostatine, RSST : récepteur de la somatostatine, RTK : récepteur à tyrosine kinase)

2. *Les récepteurs à la somatostatine : un rôle clé.*

Les récepteurs à la somatostatine (SSTR) sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (Figure 8). Au début des années 1990, cinq sous-types de SSTR ont été clonés et caractérisés. Ils ont été nommés SST1 ,SST2 ,SST3,SST4 et SST5[23]. Ces 5 SSTR diffèrent par leur capacité à internaliser le ligand lié au récepteur (cette étape d'internalisation va jouer un rôle clé dans le choix de la RIV par PRRT que nous décrirons dans la Partie F-Traitement des tumeurs neuroendocrines intestinales. Une des principales caractéristiques des TNE est leur richesse d'expression en SSTR. En effet, ceux-ci sont présents à la surface de 75-90% d'entre elles[24].

La majorité des tumeurs dites SST+ expriment simultanément plusieurs sous-types de SSTR. Il existe une variation considérable de l'expression des sous-types de SSTR entre les différents types de tumeurs et entre les tumeurs du même type. SST2 reste cependant le sous-type le plus largement retrouvé dans les cellules tumorales.

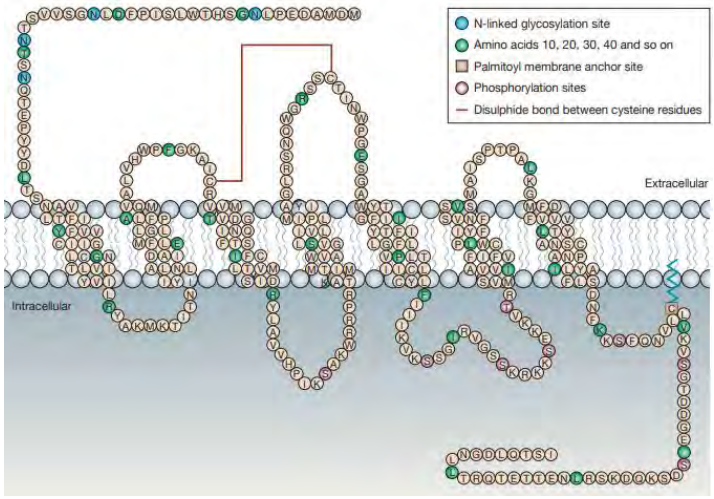


Figure 8 : **Structure des SSTR (illustrée par le récepteur de sous-type SST2A)[25].**

Les sites de glycosylation N-liée sont en bleu et de phosphorylation en rose. Une liaison de type pont disulfure et l'emplacement d'une ancre palmitoylée potentielle sont également affichées.

Les implications cliniques de la présence des SSTR dans les TNE sont multiples, que ce soit comme marqueur prédictif d'efficacité d'un traitement par aSST ou en tant que marqueur diagnostique, pronostique et comme cible radiothérapeutique potentielle[26].

Ainsi, la richesse d'expression de ces récepteurs, la connaissance de leur mode d'expression et de fonctionnement des différents sous types dans les TNE ont permis d'élargir les possibilités thérapeutiques en ciblant spécifiquement les SSTR. La « positivité SSTR » (notamment en SST2)[27] des TNE intestinales en font une cible de choix pour le développement de nouvelles molécules tels que les aSST radiomarqués, utilisés dans le cadre diagnostic (imagerie moléculaire) ou en thérapeutique par PRRT.

E. Diagnostic des TNE intestinales.

Tous les dossiers de patients atteints de TNE doivent être discutés en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) régionale puis soumis au Réseau National de référence de prise en charge des Tumeurs Neuroendocrines malignes sporadiques et héréditaires (RENATEN). Le réseau RENATEN comprend 17 centres experts répartis sur l'ensemble du territoire français, spécialisés dans la prise en charge des patients porteurs de TNE. Chaque dossier patient y est

soumis afin de vérifier les critères d'éligibilité à un traitement et de discuter des alternatives thérapeutiques.

Le réseau RENATEN est la branche clinique du Groupe d'études des Tumeurs Endocrines (GTE)[28]. Le GTE est une société savante crée en 2002 qui réunit les différentes spécialités impliquées dans la prise en charge des TNE : anatomopathologistes, biologistes, chirurgiens, endocrinologues, gastroentérologues, généticiens, médecins nucléaires, oncologues et radiologues. A ses côtés, on retrouve les réseaux TENPATH et TENGEN d'anatomopathologistes et de généticiens spécialisés dans le diagnostic des TNE.

1. L'imagerie médicale.

Face à la grande diversité des modes de présentation des TNE (type, grade, fonctionnelle ou non), les besoins en terme d'imagerie sont très divers[29]. Toutes les caractéristiques de ces tumeurs doivent être prises en compte pour orienter le choix de l'imagerie.

a) Les techniques d'imagerie conventionnelle

Au même titre que les examens biologiques de routine et comme dans toute nouvelle démarche diagnostique en cancérologie, un bilan d'imagerie conventionnelle est en premier lieu réalisé.
L'imagerie conventionnelle comprend selon les recommandations publiées dans le Thésaurus National de Cancérologie Digestive réalisé sous l'égide de la Société Nationale Française de Gastro-Entérologie (SNFGE) 2017 les examens suivants :

- Endoscopie /Iléo-coloscopie : ce sont les examens d'imagerie conventionnelle indispensables avant tout acte chirurgical pour rechercher la lésion primitive, apprécier son extension, réaliser des biopsies. L'iléo-coloscopie permet notamment de rechercher un cancer du côlon associé.
- Scanner thoraco-abdomino-pelvien (rechercher un autre cancer associé) avec réalisation d'un temps artériel tardif.
- IRM hépatique (évaluer l'étendue de l'invasion hépatique) ou scanner hépatique 3D (si métastases résécables).
- Scintigraphie osseuse (couplée au scanner) si suspicion de métastase(s) osseuse(s) non trouvée(s) par les autres examens d'imagerie.

b) Les techniques d'imagerie fonctionnelle dites « moléculaires ».

L'imagerie moléculaire joue un rôle clé dans la prise en charge des TNE intestinales du fait de leur richesse en SSTR et plus particulièrement en récepteurs SST2[27].

De nombreux progrès ont permis de mettre au point de nouvelles techniques d'imagerie fonctionnelles qualifiées de « moléculaires ». Celles-ci sont particulièrement adaptées au diagnostic et à la prise en charge des TNE puisqu'elles utilisent des aSST radiomarqués. Il existe plusieurs techniques d'imagerie dites « nucléaires » utilisant des traceurs radioactifs : la scintigraphie, la tomographie par émission monophotonique (TEMP) et la tomographie par émission de positons (TEP). Les radionucléides utilisés pour la scintigraphie émettent des rayons γ d'énergies bien définies et sont détectés par les cristaux de scintillation dans une caméra γ [29]. Le choix de l'imagerie fonctionnelle est à discuter en RCP. Dans un premier temps il sera orienté selon le grade tumoral établi par la classification OMS 2017. Ainsi, pour les TNE bien différenciées (G1 ou G2), l'imagerie moléculaire utilisant les analogues de la somatostatine sera privilégiée pour établir la stadification de la tumeur et évaluer l'expression des récepteurs SST2, marqueur pronostique et de sélection pour la PRRT. Pour les TNE peu ou pas différentiées (G3) et dès que l'indice du ki67 est supérieur à 10-15%, le TEP-18FDG (Fluoro Désoxy-Glucose) sera utilisé.

L'imagerie moléculaire va permettre de :

- Localiser la lésion primitive et caractériser la tumeur.
- Confirmer la nature différenciée (SST2+) ou non différenciée (SST2- et FDG +).
- Permettre un bilan d'extension lésionnel corps entier.
- Aider à la décision thérapeutique et permettre une évaluation pronostique (en fonction du profil SST2+ ou SST2-).

Ci-dessous, les différents examens d'imagerie moléculaire :

- Scintigraphie à l'Octréotide. L'Octréotide en raison de son fort taux d'absorption[30], fut en 1989 le premier aSST radiomarqué utilisé couplé à une technique de scintigraphie pour visualiser in vivo des tumeurs SST+[31].
- TEP-DOPA est utilisé pour les tumeurs bien différenciées.
- TEP-18FDG pour les tumeurs peu différenciées ou en cas de TEP-DOPA négatif.

– TEP ^{68}GA-DOTANOC. Dans une étude menée sur plus de 1000 patients utilisant le ^{68}Ga-DOTANOC, Ambrosini et al.[32] rapportent une sensibilité de 92% et une spécificité de 98%. L'avantage que présente le TEP 68Ga-DOTANOC est de détecter de plus petites lésions par rapport aux autres techniques présentées ci-dessus. L'Association Européenne de Médecine Nucléaire a publié des directives de procédure pour l'imagerie au 68Ga-DOTA-SSA.[33]

La Figure 9 présente les différents types d'imageries moléculaires couplées à un aSST.

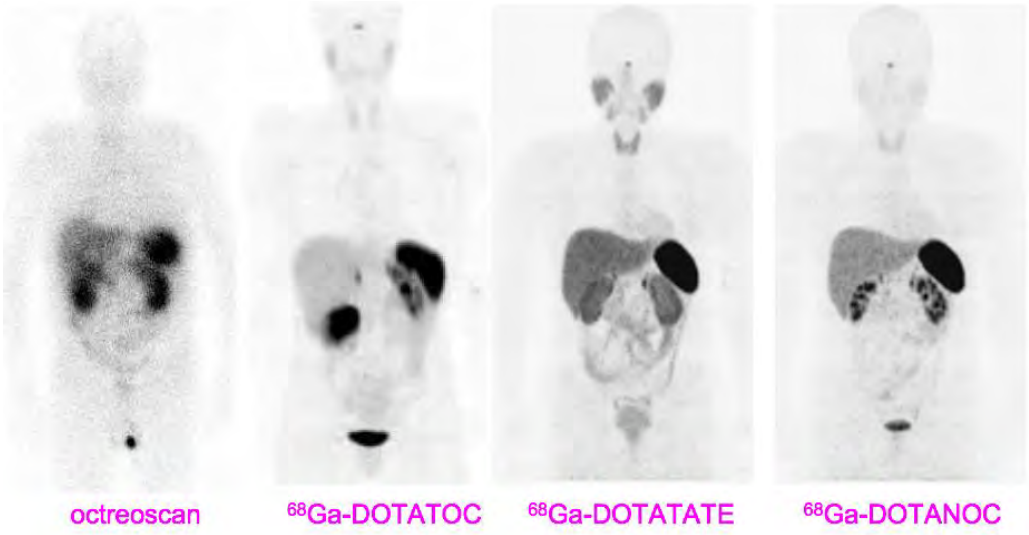


***Figure 9* : Exemples d'imagerie moléculaire utilisant les aSST[34].**

Ces différentes images représentent la biodistribution des principaux aSST radiomarqués en fonction des différents types d'imagerie fonctionnelle utilisée.

L'imagerie moléculaire présente de nombreux avantages. Le gain en terme de performances diagnostiques est indéniable. La TEP apporte une meilleure résolution spatiale et possède une meilleure sensibilité (par rapport au TEMP)[35-36] lorsqu'elle est combinée à l'utilisation de traceurs plus performants (ayant une meilleure affinité pour les SSTR). Ceci est lié au choix de l'aSST ainsi qu'au radiomarquage par le ^{68}Gallium qui présente un spectre d'affinité aux récepteurs de la somatostatine plus large.

Au cours de ces dernières années, l'imagerie est devenue une des pierres angulaires de la prise en charge des TNE dans le cadre du diagnostic ou pour orienter la prise en charge thérapeutique.

2. *Les biomarqueurs.*

Le bilan biologique outre le bilan classique (ionogramme sanguin, exploration de la fonction rénale, formule sanguine) comprend l'évaluation de biomarqueurs spécifiques propres à ce type de tumeur. Ces biomarqueurs jouent un rôle dans l'évaluation de la réponse tumorale, la surveillance de la progression de la maladie et sont utilisés comme indicateurs pronostiques[37]. Cependant, une élévation isolée de ces marqueurs n'est généralement pas suffisante pour établir un diagnostic sans confirmation anatomopathologique.

Parmi ces biomarqueurs, on distingue les marqueurs « généraux » (utilisés pour l'ensemble des TNE), des marqueurs spécifiques à certains types de tumeurs (TNE fonctionnelles). L'expression de ces marqueurs par les clones tumoraux démontre la conservation du phénotype endocrine par les TNED, que ce soit sur le plan structurel ou fonctionnel.

a) La Chromogranine A.

La Chromogranine A (CgA) est le biomarqueur neuroendocrinien tumoral de référence. C'est un marqueur sensible, précis à 60-85% pour les TNED[9] mais cependant non spécifique. Son taux est augmenté chez 50 à 100% des patients atteints de TNE [38]. Il est à l'heure actuelle le meilleur marqueur pour le diagnostic, le suivi mais également le pronostic de la maladie car son taux est directement corrélé à la progression tumorale et à la réponse thérapeutique[39-40].

La CgA est une glycoprotéine de 439 acides aminés codée par le chromosome 14. Elle est largement présente dans les granules de sécrétion des cellules neuroendocrines et est sécrétée par la quasi-totalité des TNED.

Pour les tumeurs bien différenciées, les taux plasmatiques de CgA peuvent être directement corrélés à la taille de la tumeur et à l'envahissement des tissus adjacents (notamment en présence de métastases hépatiques). Son dosage est réalisé par une méthode d'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay) sandwich. Le seuil est considéré comme pathologique au-delà de 100 ng/ml. C'est également un outil pronostique. Au cours du suivi de l'évolution tumorale, son augmentation est un facteur de mauvais pronostic (Figure 10).

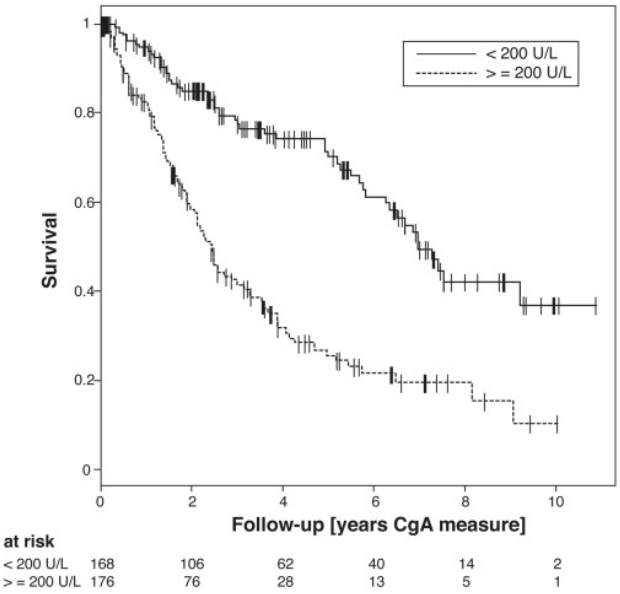


***Figure 10** : Diagrammes de Kaplan-Meier comparant la survie de patients atteints de TNED en fonction du taux de CgA* [40]**.**

Le CgA reste cependant un marqueur controversé en raison de sa faible spécificité. Son élévation peut correspondre à une prolifération non spécifique (10 à 35%) et sa valeur peut être surestimée dans les situations suivantes : traitement par inhibiteurs de la pompe à proton[41] (la plus fréquente), gastrite chronique, insuffisance rénale, insuffisance hépatique, maladie de Parkinson, hypertension artérielle non traitée, grossesse, traitement par stéroïdes ou glucocorticoïdes, épisode infectieux… En revanche, chez les patients traités par les aSST, le taux de CgA circulant peut être abaissé et son utilité questionnée chez ce groupe de patients[39].

b) Le 5-HIAA : acide 5-hydroxy-indole acétique.

Le 5-HIAA est le biomarqueur spécifique du syndrome carcinoïde. Les 5-HIAA sont des produits de dégradation issus du métabolisme hépatique de la sérotonine et éliminés par voie urinaire[42]. Le dosage des 5-HIAA est réalisé sur les urines de 24 heures. Il présente une sensibilité de 70 à 75% et une spécificité proche de 100% pour le diagnostic des TNE intestinales. Pour le syndrome carcinoïde, ce dosage présente une excellente sensibilité (de l'ordre de 100%) et une très bonne spécificité (de l'ordre de 85 à 90%)[43]. Il présente certains inconvénients concernant les conditions de recueil avec des restrictions alimentaires strictes 48 heures avant le dosage (excluant le café, thé et divers aliments tels que la banane, les fruits secs, l'avocat, les mollusques etc…) afin d'éviter des faux positifs [44]. Au laboratoire de Biochimie du CHU de Purpan, ils sont dosés par Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (HPLC).

c) Les biomarqueurs moléculaires.

Bien que la CgA soit le biomarqueur de référence pour le diagnostic et le suivi des TNE, il est loin d'être un biomarqueur prédictif et pronostique optimal. L'identification de biomarqueurs sensibles et robustes pour établir le diagnostic, suivre la progression de la maladie et surveiller l'efficacité du traitement représente le principal challenge de ces dernières années. Le retard au diagnostic des TNE entraine des répercussions sur l'efficacité du traitement. L'enjeu actuel est de proposer des outils capables de fournir un diagnostic précoce et un suivi fiable de l'évolution de la maladie. Il existe donc un besoin crucial en biomarqueurs de TNE sensibles et spécifiques[45], plus informatifs et précis.

Au cours de ces dernières décennies, le paysage thérapeutique et génomique des TNE a été largement étudié[46]. La découverte de mutations et d'anomalies d'expression de certains gènes a ouvert des perspectives pour l'utilisation de nouveaux biomarqueurs. Qui plus est, l'étude d'une empreinte moléculaire a déjà bien été investiguée et utilisée dans d'autres cancers tel que le cancer du sein avec le MammaPrint® (qui étudie une signature moléculaire de 72 gènes).

Le profilage transcriptionnel par microArrays de tissus tumoraux avait déjà permis d'identifier une série de transcrits neuroendocriniens[47-48] qui avait démontré son utilité pour le diagnostic de TNE malignes[49]. Les microArrays ou puces à ADN sont utilisés en cancérologie pour le typage tumoral en fonction des profils d'expression génique. Leur utilisation présente l'avantage de cribler simultanément plusieurs milliers de gènes et de fournir une signature moléculaire d'un type cellulaire donné.
Modlin *et al.*[55] ont développé en 2013 une « signature moléculaire multi-transcrits » spécifique des TNE GEP composée d'un panel de 51 gènes (liste en Annexe 1) et accessible à partir d'une simple biopsie liquide (Figure 11).
Ils ont d'abord analysé :

- Des données de profils d'expression géniques de tissus sains et de tissus tumoraux provenant essentiellement de cancers hépatiques, du sein, du colon, de la prostate et du poumon, obtenus par microArrays et extraites à partir de la base de données ArrayExpress[50].
- Des données provenant de microArrays réalisés sur des tissus normaux et TNE : le GEP-NEN-A (sur muqueuse intestinale normale, TNE primaires et TNE

métastatiques)[51] et le GEP-NEN-B (sur muqueuse iléale normale, TNE de l'intestin moyen, et métastases hépatiques)[52] .

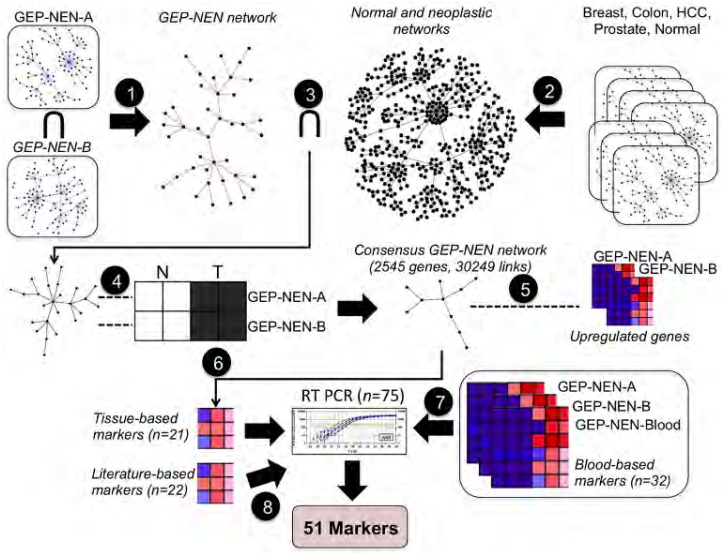
- L'expression de gènes provenant de 14 échantillons sanguins de sujets sains et de sujets atteints de TNE GEP par microArrays (Affymetrix™)[53].

Ils ont ensuite réalisé une analyse computationnelle de l'ensemble de ces données ce qui a permis de présélectionner 75 gènes et déterminer 3 panels de potentiels gènes d'intérêt :

- 1 panel composé de gènes surexprimés dans les tissus de TNE (co-exprimés dans les GEP-NEN A et B).
- 1 panel composé de gènes surexprimés dans le sang de patients atteints de TNE (et co-exprimés avec les GEP-NEN A et B).
- 1 panel issu de 13 gènes décrits dans la littérature[47] tels que les gènes SSTR[54].

Pour finir, ces 3 panels ont été analysés par RT-qPCR sur des échantillons sanguins de sujets sains et de sujets atteints de TNE et l'étude du profil d'expression des 75 gènes a permis d'identifier 51 gènes d'intérêt.

Parallèlement, une analyse bioinformatique par « Functional Gene Set Analysis » dont le but est de regrouper de manière pertinente les gènes en fonction de leur implication dans une voie biologique a permis de mettre en évidence une surexpression des gènes impliqués dans les voies du métabolisme cellulaire.



<u>Figure 11</u> : Identification des 51 marqueurs moléculaires des TNE[55].

GEP : Gastro-Entéro-Pancréatique ; RT-PCR : Rétro transcription- Polymerase Chain Reaction

Par la suite en 2018, cette signature moléculaire a été intégrée au NETest[56] (Laboratoires Wren, Branford, CT, États-Unis). Ce test qualifié de « multianalytes » analyse les profils d'expression des 51 gènes du panel à partir d'ARNm circulants par RT-qPCR qui sont ensuite intégrés à un algorithmique mathématique (Annexe 2 **: Le principe du NETest[56]**). Il présente une excellente sensibilité et spécificité (> 95%) pour la détection TNED[55] et se veut nettement plus précis que le dosage du CgA lui-même qualifié de test « monoanalyte ». Ce test permet de fournir une évaluation multidimensionnelle (grâce à l'analyse de groupes de gènes) pour diagnostiquer la TNE et évaluer le statut de la maladie.

Autre point à souligner, ces biomarqueurs moléculaires ne semblent pas être affectés par l'alimentation, l'âge, le sexe, l'origine ethnique ou l'utilisation à long terme des IPP contrairement à la CgA ou à la 5-HIAA[60]. Cela conforte l'idée que les biomarqueurs moléculaires peuvent fournir une information précise et sensible pour identifier les TNE et évaluer la progression de la maladie.

Toutes ces études soulignent un besoin crucial en biomarqueurs de haute précision pour le diagnostic et la gestion des TNE. La mise au point d'un test « multidimensionnel » capable de fournir des informations sur le diagnostic, le pronostic, le volume de la tumeur et la réactivité au traitement tout en prenant en compte les spécificités propres de chaque tumeur (grading et stadification) serait un outil majeur dans la prise en charge de ces tumeurs complexes chez ces patients lourds. Aucun test ne répond encore à ces besoins et les données concernant l'expression d'ARNm et miARN dans les TNE sont encore relativement rares comparées à divers autres types de tumeurs.

3. L'anatomo-pathologie.

L'obtention d'une analyse histologique est bien évidemment indispensable dans la démarche diagnostique. Celle-ci a été présentée dans la partie n°3 de la partie « Définition, nomenclature et classification. »

F. Traitement des tumeurs neuroendocrines intestinales.

Il existe différentes alternatives thérapeutiques pour la prise en charge de ce groupe complexe de tumeur. Actuellement, la chirurgie est le seul traitement curatif pour les tumeurs localisées mais 40% des patients présentent des métastases au diagnostic. Le Tableau 5 présente les différentes options thérapeutiques proposées selon les caractéristiques des TNE.

Caractéristiques	TNE bien différenciée	TNE moyennement différenciée	TNE peu différenciée ou CNE
Grade*	G1	G2	G3
Index du Ki 67 et/ou Index mitotique*	Ki67 < 3% et < 2 mitoses	Ki67 < 3-20% ou 2-20 mitoses	Ki67 > 20% ou > 20 mitoses
Evolution clinique et résultats TDM ou IRM	Progression lente	Intermédiaire	Progression rapide
Nombre de lésions TEP-FDG+	Faible	Intermédiaire	Elevée
Expression SSTR	Élevée	Intermédiaire	Faible
Pronostic	Bon	Moyen	Mauvais
Traitement de 1ère intention	Chirurgie curative		
Traitement de 2ème intention	- Chirurgie : réduction de la tumeur primitive + /- métastases - aSST** - Thérapie ciblée : Everolimus, Sunitinib - PRRT** - Chimiothérapie - Interféron - Chimio embolisation	- Chimiothérapie	

*selon les recommandations de l'OMS et de l'ENETS.[29]

**condition : surexpression des récepteurs à la somatostatine

Tableau 5 : ***Caractéristiques des TNE et options thérapeutiques.***

Nous nous interresserons ici au traitement des TNE intestinales bien différenciées (G1 ou G2) localement avancées ou métastatiques, qui représentent nos tumeurs d'interêt pour le protocole présenté dans la partie II. L'arbre décisionnel est présenté ci-dessous par la Figure 11.

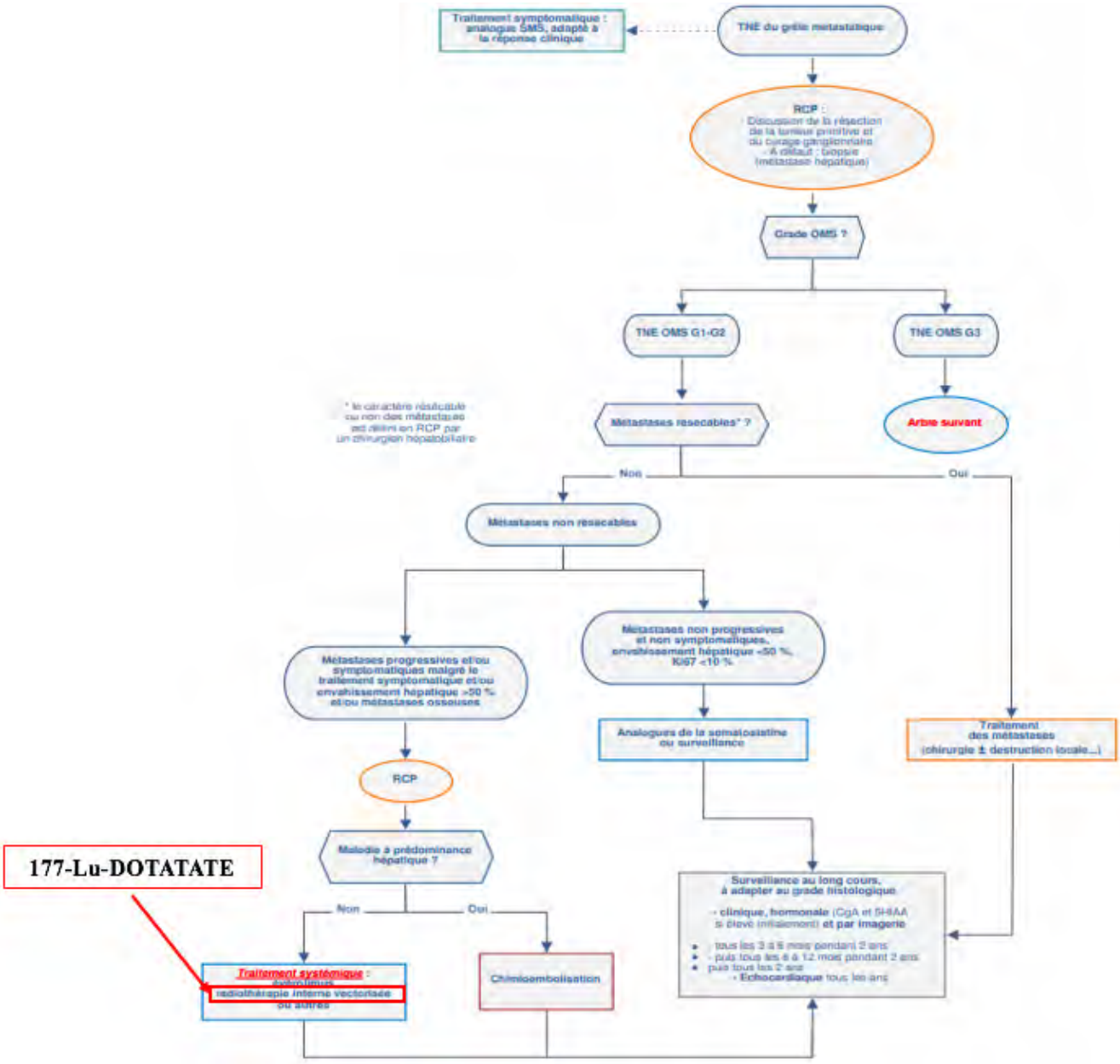
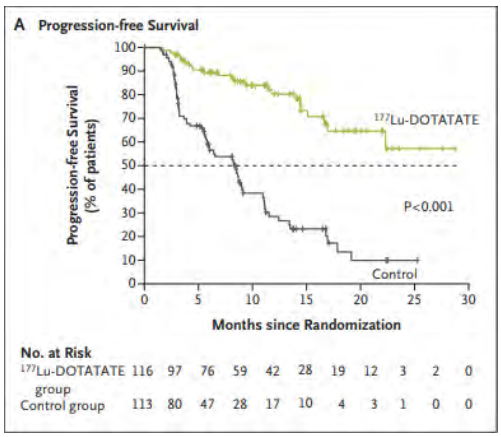


***Figure 11** : Arbre décisionnel dans la prise en charge des TNE intestinales métastatiques*[61].

La Peptide Receptor Radionuclid Therapy (PRRT) au 177Lu-DOTATATE.

La RIV par PRRT une forme de radiothérapie systémique qui permet la délivrance ciblée d'un radionucléide à des cellules tumorales exprimant un haut niveau de récepteurs à la somatostatine sans irradier le tissus sain environnant[2-62]. Il existe à ce jour peu d'options thérapeutiques pour la prise en charge des patients atteints de TNE avancées, progressives sous traitement standard par aSST. L'essai clinique randomisé de phase III NETTER-1[3] a récemment montré un haut niveau de preuve dans évaluation de l'efficacité et l'innocuité du 177Lu-Dotatate chez des patients atteints de TNE inopérables, bien différenciées de l'intestin moyen (G1 et G2), métastatiques ou localement avancées, progressives selon les critères RECIST[63] (Annexe 3). Les 2 principaux critères d'inclusion étaient la progression de la maladie sous aSST à dose standard et la surexpression des SSTR (révélée par scintigraphie). L'objectif principal était d'évaluer la survie sans progression (PFS-Progression Free Survival) chez des patients traités par 177Lu-DOTATATE + Octréotide LP 30 mg (177Lu-Dotatate à la dose de 7,4 GBq toutes les 8 semaines pour 4 injections) vs Octréotide LP à 60mg. Les résultats sont présentés dans la
Figure 12.



	177Lu-DOTA + Octréotide N=111	Octréotide N=110	Hazard ratio
PFS à 20 mois	65,2%	10,8%	HR=0,21 IC95(0,13-0,33) p<0,001
Taux de réponse objective	18%	3%	P<0,001
Résultats préliminaires de survie globale			HR=0,4 p=0,004

Figure 12 : Essai clinique de phase III NETTER-1[3].

Résultats illustrant le gain de survie sans progression apporté par le traitement par 177Lu-DOTATATE avec un Hazard Ratio à 0,21

La PRRT présente l'avantage d'être la seule option thérapeutique pour les TNE avec un biomarqueur prédictif d'efficacité clair : l'expression SSTR[64].

Au préalable, les candidats à la PRRT sont sélectionnés à l'aide de la scintigraphie à l'octréotide (ou du TEP-68Ga) ce qui permet de quantifier l'expression des SSTR de la tumeur[65]. En effet, outre le niveau d'expression des récepteurs, la réponse tumorale ne dépend pas que de la dose reçue mais également de la masse tumorale, de la biologie du cancer et de son potentiel de résistance et du choix du radionucléide (émetteur β ou γ). Par ailleurs, du fait de la toxicité au niveau de la moelle osseuse et du rein, les patients doivent présenter une fonction rénale normale avec un Débit de Filtration Glomérulaire (DFG) > 50 ml/min et une moelle fonctionnelle pour être éligibles à la PRRT .

Mécanisme d'action de la PRRT :

Après fixation du radiopeptide sur les SSTR, le complexe récepteur-radiopeptide va être internalisé par endocytose. Les produits de dégradation de ces radiopeptides sont ensuite stockés dans le lysosome permettant la libération et la rétention de la radioactivité. Cette rétention cellulaire de la radioactivité conduit à une exposition prolongée des cellules tumorales[66].

Plusieurs facteurs permettent de déterminer la quantité d'absorption d'aSST radiomarqués [24] :

- La stabilité du radiopeptide
- Les niveaux d'expression et le type de SSTR exprimé chez le patient.
- L'affinité du radiopeptide pour les SSTR exprimés
- L'efficacité de l'internalisation
- La rétention des radio-isotopes par la cellule tumorale
- La masse du radiopharmaceutique injecté

Le 177Lu-DOTATATE - 177Lu-DOTA, Tyr [3] octréotate (*Figure 13* et *Figure 14*)

Figure 13 : Anatomie du 177Lu-DOTATATE

Il se compose de 3 éléments : un radionucléide isotope - le 177Lutécium, un aSST - l'octréotate (qui est un analogue possédant une plus forte affinité pour les SST2) et un chélateur : le DOTA (acide Tétraacétique de TétraAzacyclododécane) qui va permettre de lier les 2 précédents et les stabiliser en un complexe.

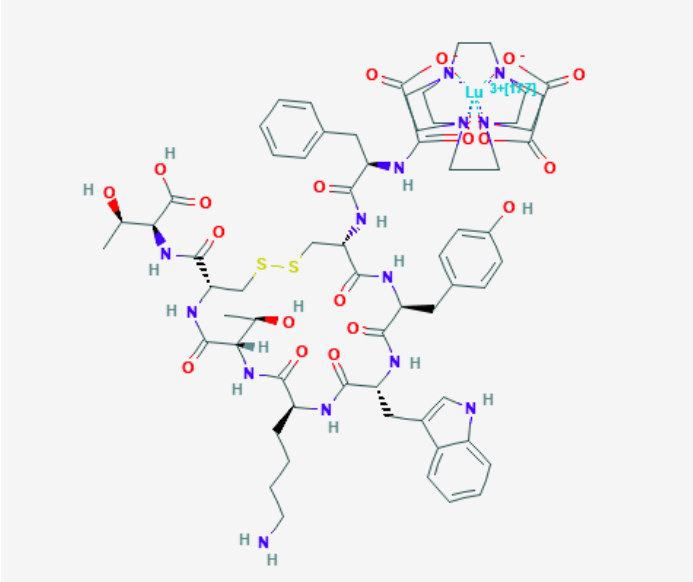


Figure 14 : Structure biochimique du Lutécium 177 tyr3-octreotate.

Le ^{177} lutécium (^{177}Lu) est une β-particule de moyenne énergie également γ-émetteur de faible énergie. Le 177Lu est une petite particule permettant une meilleure absorption dans les plus petites tumeurs. Elle possède une énergie maximale de 0,498 MeV et une pénétration tissulaire de 1,7mm. Sa demi-vie est de 162 heures. Elle possède également moins de toxicité au niveau de la moelle osseuse et du rein. Grace à son émission γ, elle peut être utilisée en imagerie pour détecter les récepteurs à la somatostatine et également être utilisée pour la dosimétrie et la surveillance de la réponse tumorale[67]. Ces spécificités en font un outil théranostique efficace.

Les recommandations de la HAS[4].

Le 177Lu-DOTATATE, a obtenu l'AMM en Octobre 2017 pour le traitement TNED inopérables ou métastatiques, progressives, bien différenciées (G1 et G2) et exprimant des récepteurs de somatostatine chez les adultes.
Les recommandations de la HAS concernant le 177Lu-DOTATATE (Lutathera®) vis-à-vis des TNE intestinales sont les suivantes[4] :

« La radiothérapie interne vectorisée avec Lutathera® est un traitement de 2ème intention, après progression de la maladie avec octréotide dans les TNE intestinales métastatiques, progressives, bien différenciées (G1, G2) et exprimant des récepteurs de somatostatine. Par ailleurs, la Commission recommande que pour les patients présentant des tumeurs d'emblée progressives ou avec une masse tumorale hépatique importante (> 50 %), l'utilisation de Lutathera®, sans avoir reçu de l'octréotide au préalable, pourra être discuté lors des RCP du réseau RENATEN. »

Nécessité d'outils prédictifs de la réponse thérapeutique à la PRRT.

La PRRT est aujourd'hui de plus en plus utilisée. Du fait de l'hétérogénéité de ces tumeurs et de leur mauvais pronostic, il est important de bénéficier d'outils performants permettant de prédire la réponse au traitement afin de réajuster ou réorienter la prise en charge de ces patients poly-pathologiques. Le suivi des marqueurs biologiques ou d'imagerie classiques ne suffisent pas à cette exigence et l'on se tourne aujourd'hui vers l'étude de marqueurs moléculaires tels que les transcrits de gènes. La mise au point de stratégies à partir desquelles les praticiens pourraient prédire ou évaluer la réponse au traitement et ainsi avoir un temps d'avance face à la maladie serait un atout majeur dans la prise en charge de ces patients pour qui l'espérance de vie est faible. Bodei *et al.*[68] s'y essayent en élaborant un « PRRT Predictive Quotient » (PPQ) basé sur l'expression de transcrits de gènes spécifiques des TNE au cours de la PRRT dont la variation permettra d'établir si le patients sera « PRRT responder » ou « PRRT non responder ». Le développement d'outils tels que le NETest ou le PPQ offre de nouvelles perspectives et un nouvel espoir dans la prise en charge de ces tumeurs.

OBJECTIF DE CE TRAVAIL DE THESE.

Dans ce travail de thèse nous avons proposé d'étudier la variabilité radio-induite par PRRT de l'expression de gènes de radiosensibilité et de gènes impliqués dans les processus d'oncogenèse. L'objectif principal est d'estimer les paramètres de distribution de certains transcrits pour des gènes sélectionnés par RT-qPCR chez des patients traités par 177Lu-DOTATATE pour les patients atteints de TNE intestinales bien différenciées (G1 ou G2), progressives ou métastatiques.

II. MATERIELS ET METHODES

A. Protocole GENEbioLuNET.

1. Design de l'étude.

Étude pilote, prospective, monocentrique, interventionnelle avec risques et contraintes minimes réalisée dans le service de Médecine Nucléaire Curiethérapie (I.U.C.T, Toulouse, France).

Objectif principal :

Estimer les paramètres de distribution de certains transcrits de gènes sélectionnés comme gènes de radiosensibilité et de gènes impliqués dans l'oncogenèse avant et pendant la phase de traitement par 177Lu-DOTATATE chez des patients atteints de TNE intestinales G1 ou G2, métastatiques ou en progression.

Population d'étude

Six patients ont été recrutés pour l'étude GENEbioLuNET dans le but d'analyser ces nouveaux biomarqueurs moléculaires sur la période de juin 2018 au 1er février 2019.

Afin de permettre une première analyse de résultats et au vu de la durée du traitement par PRRT, il a été décidé dans le cadre de ce travail de thèse, d'interrompre l'inclusion (biologique) des patients pour cette première partie d'analyse moléculaire au 1er février 2019. Parallèlement, le protocole thérapeutique se poursuivra normalement. Ainsi, il faut donc

prendre en compte que tous les patients n'auront pas le même nombre de prélèvements et ne seront pas au même stade de traitement au moment de l'analyse. Les autres prélèvements ainsi que les patients inclus après cette date seront analysés ultérieurement.

Tous étaient atteints de TNE iléales bien différenciées de grade G1 lentement évolutives et progressives sous traitement par analogues de la somatostatine (Sandostatine®). Une imagerie couplée aux aSST (octreoscan® ou TEP-68Ga-DOTANOC) a été réalisée au préalable mettant en évidence chez ces 6 patients une hyperfixation dans les régions atteintes corrélée à une surexpression des récepteurs à la somatostatine.

Critères d'inclusion

- Patients âgés de ≥18 ans diagnostiqués pour une TNE intestinale métastatique, de G1 ou G2 avec preuve de progression des lésions sur l'imagerie dans les 12 mois précédant la thérapie par 177Lu-DOTATATE (TDM thoraco-abdomino-pelvien, IRM hépatique, scintigraphie de type Octreoscan® ou TEP-TDM au Ga-68-DOTANOC).
- Patients éligibles pour la thérapie radionucléidique avec 177Lu-DOTATATE (4 injections de 7.4GBq à 8 semaines d'intervalle) après validation en RCP du réseau national des TNE (RENATEN), coordonné par le Professeur Rosine Guimbaud.
- Maladie évaluable selon les critères RECIST[63](Annexe *3* **: Critères RECIST version 1.1 Evaluation de la réponse tumorale (Nouveaux critères RECIST v 1.1)**)en TDM thoraco-abdomino-pelvien et/ou IRM hépatique.
- Patients sous analogues de somatostatine, si l'injection d'analogues de somatostatine est réalisée 24 à 48h après chaque traitement par 177Lu-DOTATATE, et 28 jours à distance de la prochaine thérapie par PRRT.
- Patients ayant accepté de participer à l'étude et ayant signé un consentement écrit.

Critères de non inclusion

- Patients sous thérapie systémique ou chimio-embolisation au cours des 4 mois précédant l'inclusion (ce type de thérapies influence le nombre de cellules tumorales circulantes).
- Patientes en âge de procréer sans contraception efficace ; patientes enceintes ou en période d'allaitement (ou refusant d'arrêter l'allaitement).

- Les patients avec antécédents de chimiothérapie ou radiothérapie externe ou de radiothérapie nucléidique (à l'I-131, Lu-177, Y-90 ou autre radionucléide).
- Patients atteints de troubles psychiatriques non-contrôlés.
- Insuffisance rénale (clairance à la créatinine < 50 mL/min).
- Insuffisance hépatique sévère (bilirubine > 3 fois la valeur de la normale, albumine <. 30 g/L et taux de prothrombine < 70%).
- Insuffisance médullaire : Leucocytes < 2,000/µl, Plaquettes <75,000/µl, Hémoglobine < 8g/dL).
- Patients bénéficiant d'un système de protection juridique.

2. Déroulement de l'étude

a) Traitement par 177Lu-DOTATATE.

Le traitement par 177Lu-DOTATATE sera administré selon les recommandations du produit[69]:

« La posologie de Lutathera® recommandée chez l'adulte est de 4 perfusions de 7,4 GBq chacune. L'intervalle de temps recommandé entre chaque administration est de 8 semaines et il peut être étendu jusqu'à 16 semaines en cas de toxicité modifiant la dose. Afin de protéger la fonction rénale, une solution d'acides aminés doit être administrée par voie intraveineuse pendant 4 heures. La perfusion de la solution d'acides aminés (Tableau 6) doit être initiée 30 minutes avant de commencer la perfusion de Lutathera®. »

Composition	Quantité
Lysine	25 g
Arginine	25 g
Chlorure de sodium 9 mg/mL (0,9 %) solution pour injection	1 L

Tableau 6: Solution d'acides aminés.

b) Analyse au laboratoire.

Une analyse génétique des transcrits sera réalisée au laboratoire de Biochimie-Biologie

moléculaire à l'I.F.B au CHU de Purpan, Toulouse.

Le Tableau 7 décrit les 9 gènes sélectionnés dans le cadre du protocole.

Gènes d'intérêt	Dénomination	Rôle
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase	Gène ubiquitaire (Comparateur)
DDB2	DNA Damage-Binding protein 2	Rôle dans réparation de l'ADN endommagé par les UV
XCP	Xeroderma Pigmentosum, Complementation group C	Rôle dans la réparation de l'ADN
BAX	Bcl2-Associated X protein	Régulation de l'apoptose (pro/anti-apoptotique)
PANK2	Pantothenate Kinase 2	Régule la phosphorylation oxydative (formation du coenzyme A)
BRAF	B-Raf proto-oncogène	Régule l'expression des facteurs de croissance (voie MAPK)
HDAC9	Histone Deacetylase 9	Rôle dans la régulation épigénétique des TNE
ATP6V	Vacuolar-type H +-ATPase	Rôle dans le métabolisme énergétique
CDKN1B	Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 1B	Régule la prolifération cellulaire Surexprimé en cas de TNE agressive, sous exprimé en cas de radiosensibilité

Tableau 7 : ***Présentation des 9 gènes d'intérêt du protocole GENEbioLuNET.***

ADN : Acide DésoxyriboNucléotide ; Bcl2 : *B-cell lymphoma* 2 *; ATP : Adenosine Tri-Phosphate ; MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases ; UV : Ultra-Violet*

Pour l'étude de la variabilité des transcrits des gènes d'intérêt sélectionnés, 4 séries de 2 prélèvements de sang total sur tubes PAXgene Blood RNA seront réalisées. Les prélèvements sanguins recueillis avant et post-PRRT permettront d'isoler les ARNm qui seront par la suite analysés par RT-qPCR (rétro-transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction).

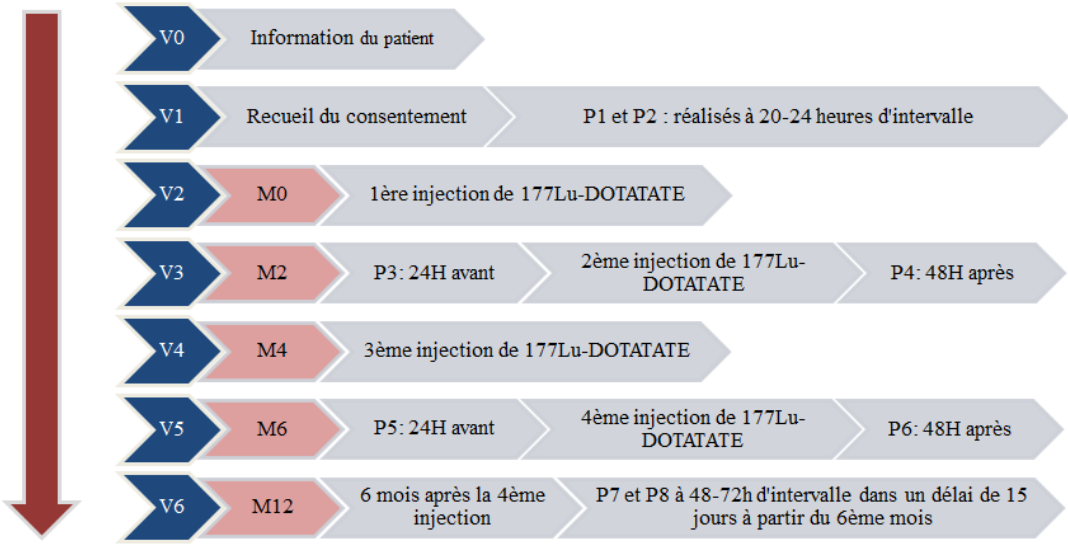
Déroulement des prélèvements sur les tubes PAXgene Blood RNA (*Figure 15*) :

- Les prélèvements 1 & 2 (P1 et P2) seront réalisés à au moins 20-24h d'intervalle, dans les 7 jours précédant le traitement par 177Lu-DOTATATE, avec évaluation concomitante de la CgA. Ces prélèvements devront être réalisés lors de la quatrième semaine après la dernière administration d'aSST (administré à 28 jours d'intervalle) afin d'évaluer la reproductibilité des mesures et de pouvoir les confronter avec celles obtenues pour les autres prélèvements.

- Les prélèvements 3 & 4 (P3 et P4) seront réalisés lors de la visite de 2ème injection de 177Lu-DOTATATE. Le P3 sera réalisé dans les 24h avant de débuter la deuxième injection (soit à la moitié du traitement) et le P4 48h après l'injection. Ceci permettra d'évaluer la variation des transcrits des gènes testés comme gènes potentiels de radiosensibilité.

- Les prélèvements 5 & 6 (P5 et P6) seront réalisés lors de la visite de 4ème injection de 177Lu-DOTATATE. Le P5 sera réalisé dans les 24h avant de débuter la quatrième et dernière injection (soit à la fin du traitement) et le P6 48h après l'injection. Ceci permettra d'évaluer la variation des transcrits des gènes testés comme gènes potentiels de radiosensibilité en fin de PRRT.

- Les prélèvements 7 & 8 (P7 et P8) seront réalisés lors de la dernière visite 6 mois après la dernière injection de 177Lu-DOTATATE à un intervalle de 48-72h dans un délai de 15 jours à partir du 6ème mois, avec évaluation concomitante de la CgA.



<u>Figure 15</u> : Déroulement du protocole GENEbioLuNET.

V : visite ; M : mois

B. Analyse des transcrits au laboratoire.

Les prélèvements sanguins ont été collectés au sein du service de Médecine Nucléaire – Curiethérapie de l'I.U.C.T. Pour chaque patient, le consentement écrit et éclairé a été recueilli. La réception de ces prélèvements s'est effectuée au sein de l'I.F.B dans le service de Biochimie - Biologie Moléculaire UA 1048, I2MC (CHU de Purpan, Toulouse, France).
Un ARN intact de haute qualité est essentiel. Pour ce faire, il a été choisi de réaliser les prélèvements sur tubes PAXgene™ RNA (QIAGEN ®, Valencia, CA) qui contiennent un stabilisateur d'ARN.

Un total de 2,5 ml de sang périphérique a été prélevé pour chaque temps de la PRRT : avant de débuter le traitement (P1 et P2), puis 24h avant et 48h après la 2ème et 4ème injection au 177Lu-DOTATATE. Les tubes de sang irradiés (P4 et P6) ont été conservés à -80°C pendant 15 jours après le traitement pour s'assurer de l'absence de radioactivité au 177Lu-DOTATATE (et atteindre 7 demi-vies). L'ARNm a ensuite été extrait à l'aide du kit PAX Gene™ en suivant les instructions du fournisseur.

<u>Reproductibilité</u>

La reproductibilité inter-série est assurée par la quantification de deux ARNm dans deux séries indépendantes. La valeur moyenne obtenue doit être dans les limites de variation de 20%.

<u>Sensibilité des techniques utilisées</u>.

La limite de sensibilité de la quantification des transcrits est de 100 copies (en valeur absolue) par analyse en RT-qPCR. Ceci a été vérifié pour plusieurs ARNm contrôles et l'appareil LC480 que nous utilisons au laboratoire.

1. Les différentes étapes de l'extraction d'ARNm.

a) <u>Technique d'extraction manuelle d'ARNm.</u>

La première étape dans l'analyse de la variation de ces transcrits de gènes consiste en une extraction manuelle des ARNm circulants à partir du sang total.

Avant toute manipulation, il est nécessaire d'incuber ces tubes à température ambiante (15-25°C) pendant au moins 2 heures afin de garantir une lyse complète des cellules sanguines.

1ère étape : Obtention d'un culot cellulaire.

Cette première étape va permettre, grâce à une succession de centrifugation et de lavages, d'obtenir un culot cellulaire à partir duquel sera extrait et purifié l'ARNm d'intérêt.

1. Centrifuger le tube PAXgene Blood RNA (BRT) pendant 10 minute à 4200 rpm afin d'obtenir un culot cellulaire.
2. Eliminer le surnageant en le vidant ou par pipetage. Le culot est ensuite lavé par ajout de 4 ml d'eau RNase-free (RNFW).
3. Vortexer afin de remettre en suspension le culot puis centrifuger à nouveau 10 minutes à 4200 rpm. Eliminer ensuite le surnageant aussi complètement que possible.
4. Ajouter 350 µL de tampon de remise en suspension (BR1) puis mélanger au vortex jusqu'à dissolution complète du culot cellulaire.

2ème étape : Purification manuelle de l'ARNm.

1. Après transfert de l'échantillon dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml (MCT), ajouter 300 µL de tampon de fixation (BR2) ainsi que 40µL de protéinase K (PK). Vortexer brièvement puis incuber 10 minutes à 55°C dans un bain marie agitateur.
2. Transférer le lysat obtenu sur une colonne de centrifugation PAXgene Shredder (PSC, couleur lilas) elle-même placée sur un tube de traitement de 2 ml (PT) puis centrifuger pendant 3 minutes à 13000 rpm.
3. Transférer la totalité de l'éluât dans un nouveau tube de 1,5 ml (MCT) en veillant à ne pas décoller le culot du tube d'origine.
4. Ajouter 350µL d'éthanol absolu.
5. Déposer le mélange sur une colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC, couleur rouge) elle-même placée sur un tube de traitement de 2 ml puis centrifuger pendant 1 minute à 13000 rpm.
6. Déposer 350µL de tampon de lavage 1 (BR3) sur la colonne de centrifugation PAXgene RNA puis centrifuger pendant 1 minute à 13000 rpm. A nouveau, mettre la colonne PAXgene (PRC) dans un nouveau tube de réaction de 2 ml (PT).

3ème étape : Suppression des traces d'ADN.

La membrane est incubée avec de la DNase I (RNFD) entre la première et la deuxième étape de lavage afin de supprimer toute trace d'ADN fixé (résidus contaminants) sur la colonne.

1. Préparer un mix de DNase I (RNFD) et de tampon de digestion de l'ADN (RDD) selon le calcul suivant : (*n* x 10µL de RNFD + *n* x 70L de RDD) pour *n* colonnes d'extraction dans un tube de 1,5 mL (MCT).
2. Déposer 80 µL de ce mix d'incubation directement sur la membrane de la colonne PAXgene RNA (PRC) et laisser incuber à température ambiante (20-30°C) pendant 15 minutes.
3. Déposer 350µL de tampon lavage 1 (BR3) sur la colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC), centrifuger pendant 1 minute à 13000 rpm.
4. Ajouter 500 µL de tampon de lavage 2 (BR4) sur la colonne et centrifuger 3 minutes à 13000 rpm. Jeter l'éluât puis placer la colonne sur un tube de microcentrifugation de 1,5 ml (MCT).

4ème et dernière étape : Elution de l'ARNm.

Cette étape consiste à éluer l'ARNm fixé sur la colonne PAXgene RNA (PRC) puis à le dénaturer par la chaleur pour le préparer à l'étape de retro-transcription.

1. Déposer 40µl de tampon d'élution (BR5) sur la membrane de la colonne PAXgene (PRC) puis centrifuger pendant 1 minute à 13000 rpm. Répéter cette étape.
2. Incuber l'éluât au bain marie (sans agitation) à 65 °C pendant 5 minutes. Placer ensuite l'éluât immédiatement dans la glace.

NB : conserver les échantillons d'ARNm à -20°C ou à -80°C s'ils ne sont pas utilisés immédiatement.

b) Quantification des acides nucléiques.

La quantification des ARNm est réalisée sur le spectrophotomètre Xpose® de chez Trinean. Le seuil limite utilisé discriminant une concentration forte ou faible est fixé à 30 ng/ul.

c) Traitement des ARNm à la DNase TURBO®.

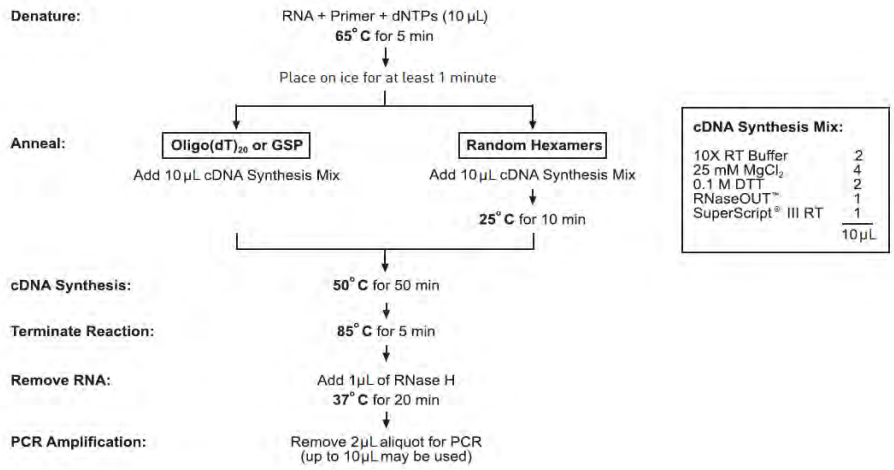
Après l'étape d'extraction, les ARNm sont traités à la DNase TURBO®. Cette étape cruciale va permettre d'éviter toute contamination par de l'ADN génomique pouvant gêner l'interprétation des résultats des analyses moléculaires à suivre. En effet, de petites quantités d'ADN génomique dans la préparation d'ARNm peuvent être amplifiées avec l'ADNc (Acide DésoxyriboNucléique complémentaire) cible qui servira de matrice lors de la qPCR. Dans cette étape, les ARNm sont incubés pendant 20-30 minutes à 37°C avec la DNase TURBO®. Une fois traités, ils peuvent être alors recongelés à -80°C ou directement utilisés.

2. La RT-qPCR.

La RT-PCR est utilisée quand le matériel de départ est l'ARNm. Le but de la première étape va être de transcrire l'ARNm en un brin complémentaire d'ADN (ADNc).
Dans un second temps, l'ADNc obtenu va être utilisé comme modèle pour la réaction de qPCR. La RT-qPCR est utilisée pour une grande variété d'applications incluant notamment l'analyse de l'expression des gènes.
Dans ce protocole, c'est une « two-step PCR » qui est réalisée, car la RT et la qPCR sont réalisées dans des tubes séparés (avec des tampons différents optimisés pour chacune des réactions, différentes conditions de réaction et l'utilisation d'amorces différentes).

a) La Retro- Transcription (RT).

Cette étape va permettre de transformer les ARNm obtenus lors de l'extraction, en ADNc.
Cette étape de de RT-PCR est réalisée au laboratoire avec le kit SuperScript III First-Strand Synthesis System^{TM} (Life Technologies®, Carlsbard, CA). Cette technique va permettre de convertir de l'ARNm en ADNc en utilisant des amorces à base d'oligonucléotides (oligodT) (Figure 16)



<u>Figure 16</u> : Etapes de la Rétro-Transcription avec le kit SuperScript III First-Strand® Synthesis System[70].

GSP (gene specific primer) *: technique utilisant une amorce spécifique pour la séquence du gène d'intérêt.* ***Oligo(dt)20*** *: est une technique d'amorçage plus spécifique, qui s'hybride à l'extrémité polyadénylée (polyA)3' de l'ARNm (retrouvée sur la grande majorité des ARNm eucaryotes). Les ARNm polyA+ constituent environ 1% à 2% de l'ARN total.* ***Random hexamers*** *: Technique utilisant des amorces non spécifiques et est généralement utilisée lorsque l'ARNm est difficile à copier dans son intégralité. Avec cette méthode, tous les ARN d'un échantillon deviennent modèle pour la synthèse du premier brin d'ADNc et les amorces confèrent une spécificité pendant la PCR.*

1. Selon la concentration d'ARNm obtenue lors de l'étape d'extraction, un premier mix de dénaturation va être préparé (Tableau 8) :

	Quantité d'ARNm > 30 ng/ul	**Quantité d'ARNm < 30 ng/ul**
	Volume (µl)	**Volume (µl)**
ARNm extrait	5	7
Oligo(dT)20 50µM	1	1
dNTP mix 10 mM	1	1
Eau qualité moléculaire	3	1
Volume final	10	

<u>Tableau 8</u>: Composition du Mix de dénaturation.

Oligo(dT)20 : amorce ; dNTP : désoxyribonucléotides ; eau qualité moléculaire : eau certifiée sans nucléase.

2. Incuber 5 minutes à 65°C au bain-marie sec puis placer dans la glace pilée pendant au minimum 1 minute.
3. Préparer le CDNA Synthesis Mix selon le Tableau 9 suivant :

	Volume/ éch. (µl)
10 X RT Buffer	2
25 mM MgCl2	4
0.1 M DTT	2
Rnase OUT (40 U/µl)	1
Super Script III RT (200 U/µl)	1
Volume final	10

Tableau 9 : Composition du cDNA Mix.

10 X RT Buffer : tampon de RT ; 25 mM MgCl2 : solution de chlorure de magnésium à 25 mili-molaire ; 0.1 M DTT : Dithiothreitol ; Super Script III RT : rétro-transcriptase

Un inhibiteur de RNase recombinant RNaseOUT ™ a été ajouté au système de protection contre la dégradation de l'ARN cible pour éliminer les contaminations par la ribonucléase lors de la préparation d'ARN.

4. Ajouter 10µl de cDNA Synthesis Mix à chaque échantillon.
5. Incuber 50 minutes à 55°C puis terminer la réaction à 85°C pendant 5 minutes.
6. Mettre dans la glace pilée au moins 1 minute, centrifuger brièvement puis ajouter 1 µl de RNase H à chaque tube *(ceci va permettre d'éliminer toute trace d'ARN résiduel).*
7. Incuber 20 minutes à 37°C.

L'ADNc obtenu peut être immédiatement utilisé pour la qPCR ou être stocké à -20°C (ou -80°C).

b) La PCR quantitative par SYBR Green.

Les amorces utilisées pour le protocole sont détaillées dans l'Annexe 4 **: Couples d'amorces utilisés pour le protocole GENEbioLuNET.**.

Intérêt de la PCR quantitative dans le protocole GENEbioLuNET :

La PCR quantitative ou PCR en temps réel est la référence en matière de quantification d'acide nucléique. Elle permet d'analyser l'expression de gènes dans un échantillon donné par rapport à un échantillon de référence (un échantillon de contrôle ou calibrateur). Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons souhaité étudier les 8 premiers gènes d'intérêt (le gène de la GAPDH servant de gène de référence) sélectionnés dans le cadre du protocole GENEbioLuNET à différents moments du traitement par PRRT.

Principes de la qPCR :

La PCR quantitative ou PCR en temps réel est une méthode simple et efficace permettant de déterminer la quantité d'une séquence cible ou d'un gène présent dans un échantillon. Ce qui la distingue d'une réaction de PCR classique, c'est que l'on peut suivre « en temps réel » le processus d'amplification des produits de PCR néo formés (amplicons) grâce à l'utilisation d'un fluorochrome. La synthèse exponentielle d'amplicons au cours de la réaction de PCR entraîne une augmentation explosive des signaux de fluorescence. L'émission de cette fluorescence est donc le reflet de la quantité d'ADN synthétisée à chaque cycle.
La PCR en temps réel s'appuie donc sur des mesures faites pendant la phase dite exponentielle de la PCR.
La qPCR se décompose en 3 phases (Figure 17) :

1. La phase de bruit de fond : phase où la quantité de matériel à amplifier est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur à la fluorescence de base.
2. La phase exponentielle : phase d'amplification où le signal fluorescent est détecté. Le Ct (cycle threshold) est défini comme le cycle seuil à partir duquel le signal fluorescent dépasse le bruit de fond.
3. La phase de saturation : phase où tous les produits de la PCR ont été consommés.

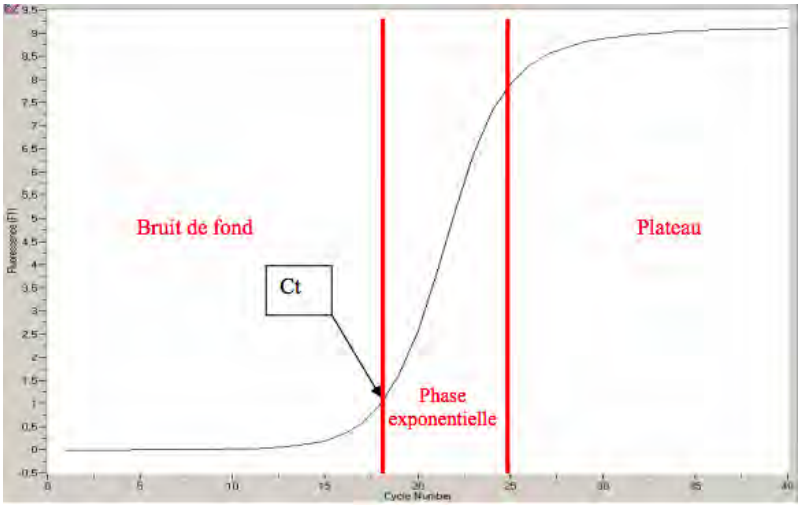


***Figure 17* : Différentes phases de la réaction de qPCR.**

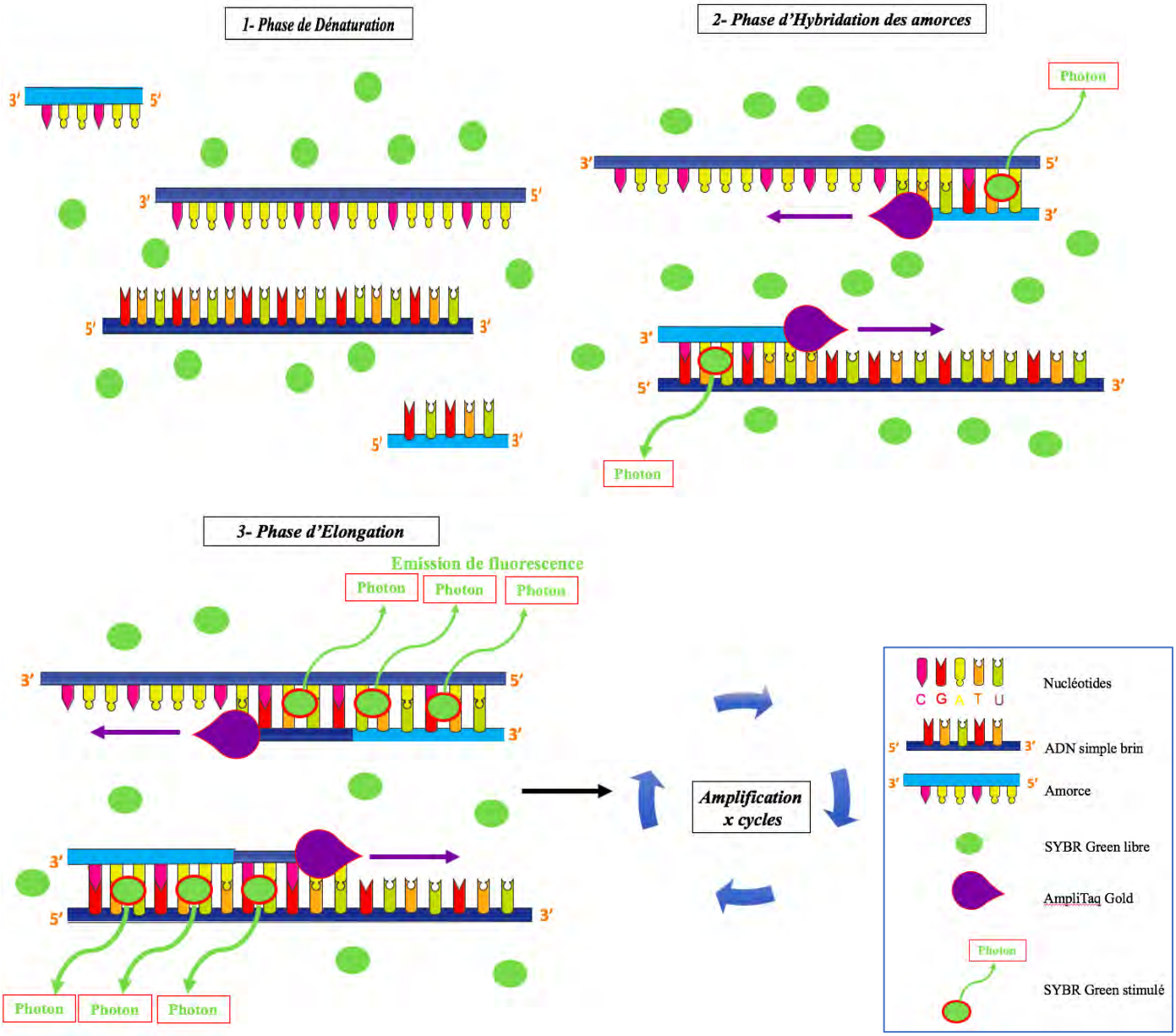
Le choix du fluorochrome SYBR Green® I Dye :

Le SYBR Green est un colorant de type cyanine qui présente la particularité de se lier à l'ADN double brin, situation dans laquelle il devient extrêmement stable. Une fois lié il va émettre une fluorescence de l'ordre de 100 fois plus élevée que dans sa forme libre. La Figure 18 montre les principes de la qPCR par SYBR Green. Les avantages et inconvénients du SYBR Green sont présentés dans le Tableau 10.

La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle de PCR. L'analyse des Melting Curves (courbes de fusion) réalisée après la PCR permettra l'identification et la quantification de produits spécifiques.

La méthode du SYBR Green	
Avantages	**Inconvénients**
• Surveiller l'amplification de toute séquence d'ADN double brin. • Aucune sonde n'est requise, ne nécessite que des amorces. • Analyse en Melting Curves : permet de s'assurer que les produits d'amplification sont spécifiques. • Méthode la moins onéreuse et simple à mettre en œuvre.	• Risque de faux positifs (production d'amplicons aspécifiques quantifiés comme des amplicons spécifiques). • Moins spécifique qu'avec une sonde. • Pas d'application en PCR Multiplex possible (amplifications de plusieurs séquences dans un même tube).

***Tableau 10*: Avantages et inconvénients de la technique de SYBR Green.**



<u>Figure 18</u>: Principes de la qPCR par SYBR Green.

1) Phase de dénaturation : lors de l'ajout du SYBR Green dans un échantillon, celui-ci se lie immédiatement à tout l'ADN double brin présent dans cet échantillon (cela détermine le « bruit de fond ») ; 2) Phase d'hybridation des amorces : dès cette étape, des molécules de SYBR Green peuvent commencer à se lier ; 3) Phase d'élongation : l'ADN polymérase AmpliTaq Gold® amplifie la séquence cible, conduisant à la création d' « amplicons». Le SYBR Green va alors se lier à chaque nouvelle copie d'ADN double brin nouvellement formé. Il en résulte une augmentation de l'intensité de la fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN double brin néo-formé.

A chaque cycle de PCR la quantité d'ADN double. De ce fait, au bout de N cycles, il y aura 2^N copies d'ADN. La fluorescence sera donc proportionnelle à la quantité d'amplicons produits

Préparation du mélange réactionnel :

Les quantifications sont réalisées en plaque 96 puits sur l'appareil LightCycler®480. Un mélange réactionnel utilisant le mix Power SYBR® Green Master Mix 2X (*Life Technologies, Carlsbad, CA*) est préparé pour l'ensemble des échantillons comme décrit dans le Tableau 11 ci-dessous :

MIX qPCR	
Power SYBER® Green Master Mix 2X	5 µl
Amorce sens	0,2 µl
Amorce antisens	0,2 µl
H2O (eau biologie moléculaire)	2.6 µl
Volume du mix	8 µl
Auquel on ajoute :	
ADNc ou H2O (si témoin négatif)	2 µl
Volume final	**10 µl**

***Tableau 11*: Mélange réactionnel pour la qPCR.**

Power SYBR® Green Master Mix 2X contenant du SYBR Green I, de l'Ampli Taq Gold DNA Polymerase LD, des dNTPs et du tampon de réaction.

Pour chaque expérience, un témoin négatif H2O (eau biologie moléculaire), est utilisé à la place de l'ADN pour s'assurer de la non contamination des réactifs. Chaque réaction est réalisée en duplicate afin de valider la reproductibilité intra-opérateur.

Le programme de la qPCR :

Etapes	**1**	**2**			**3**			**4**
Programme	Dénaturation	Amplification			Melting			Cooling
Mode Analyse	-	Mode quantification			Mode melting curves			-
Cycles	1	50			1			1
Target (°C)	95	95	58	72	95	55	97	40
Hold (mm:ss)	10 :00	00 :10	00 :10	00 :20	00 :05	01 :00	-	00 : 30
Ramp rate (°C/s)	4,4	4,4	2,2	4,4	4,4	2,2	0,11	2,2
Acquisition mode	None	None	None	Single	None	None	Continuous	None

Tableau 12*: *Programme de qPCR SYBR Green I / HRM dye.

Le programme consiste en une étape de dénaturation de 10 minutes à 95 °C puis 50 cycles d'amplification. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle, permettant ainsi d'établir une courbe de quantification représentant la fluorescence en fonction du nombre de cycles. Une courbe de fusion (Melting curve) est réalisée après la phase d'amplification afin de s'assurer de la spécificité des produits de PCR amplifiés. Cette courbe permet de discriminer les dimères d'amorces et les produits de PCR spécifiques. Pour cela, une étape de dénaturation ponctuelle à 95°C est effectuée puis une hybridation à 55°C pendant 1 minute et enfin une étape de fusion avec élévation progressive de la température jusqu'à 97°C par incrément (Ramp rate) de 0.11°C par seconde, c'est durant cette dernière phase que la fluorescence est lue. Un pic unique pour l'échantillon indique la fiabilité des mesures de quantification.

Résultats :

Les résultats seront exprimés en valeur de Ct pour chaque gène étudié. Le Ct correspond à l'intersection entre le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence dépasse le seuil du bruit de fond et que la cinétique de la réaction soit d'ordre 1. Ceci permet de s'assurer qu'il

existe une relation directe entre le Ct obtenu et la quantité d'ADNc amplifié. En d'autres termes, il permet de définir de manière relative la quantité d'ADN présente au départ dans l'échantillon. La valeur du Ct est inversement proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans un échantillon. Ainsi, plus un gène sera exprimé, plus la valeur de son Ct sera faible.

Analyse des données : Normalisation : Quantification relative par la méthode de $2^{-\Delta\Delta C\,t}$.

La quantification relative permet de déterminer le niveau d'expression de gènes dans une condition expérimentale par rapport à une condition de référence (calibrateur). C'est ce qui est le plus communément appelé : la normalisation. Pour ce faire, elle fait intervenir un gène de référence qui va permettre de « normaliser » l'analyse (gène stable dont l'expression restera inchangée quelques soient les conditions analysées). Elle présente l'avantage de ne pas nécessiter la réalisation de courbe d'étalonnage.
Cette méthode va permettre de comparer la valeur de Ct d'un gène d'intérêt à un gène contrôle dans un échantillon. Pour être valable, il est nécessaire que l'efficacité de l'amplification de nos gènes cibles (nos 8 gènes d'intérêt) et celle de notre gène de référence (ici le gène de la GAPDH) soient pratiquement identiques.

Dans ce protocole, chaque patient va être son propre témoin. Nous allons pour chacun d'eux, analyser le profil d'expression des gènes lors des prélèvements P2, P3, P4, P5 et P6 (prélèvements encadrant les cycles de PRRT) et les comparer au prélèvement P1 (échantillon de référence réalisé avant tout traitement).

On va donc comparer la différence de Ct entre les différents prélèvements recueillis au cours du traitement par PRRT puis les analyser par la méthode du $2^{-\Delta\Delta C\,t}$ ou quantification relative normalisée par un calibrateur décrite par Livak et Schmittgen[71] .

Les calculs seront les suivants :

- $\Delta Ct = Ct_{\text{Gène cible}} - Ct_{\text{Gène de référence}}$
- $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct)_{\text{condition expérimentale}} - (\Delta Ct)_{\text{condition contrôle}}$
- Quantification relative $R = 2^{-\Delta\Delta C\,t}$

Analyse des résultats :

Un $2^{-\Delta\Delta C_t} < 1$: indique une sous-expression du gène cible dans la condition expérimentale par rapport à la condition contrôle.

Un $2^{-\Delta\Delta C_t} > 1$: indique une surexpression du gène cible dans la condition expérimentale par rapport à la condition contrôle.

III. RESULTATS.

A. Population d'étude.

1. Caractéristiques cliniques et biologiques.

Sur les 6 patients recrutés, 3 ont pu être analysés dans le cadre de cette étude pilote. Leurs caractéristiques cliniques et biologiques sont détaillées dans le Tableau 13.

Parmi les 3 autres, le patient n°3 n'a pas pu être inclus en raison de la présence d'une insuffisance rénale lors du bilan pré-thérapeutique et a été utilisé pour tester notre modèle de RT-qPCR. Le patient n°5 n'a pas pu être analysé en raison d'une intervention chirurgicale reportant le 2ème cycle de PRRT au cours duquel les prélèvements n°3 et n°4 (P3 et P4) auraient dû être prélevés, ne nous permettant donc pas d'établir une analyse comparative. Le patient n°6 est quant à lui décédé des suites de sa maladie.

Notre analyse s'est concentrée sur les patients n°1, n°2 et n°4 suffisamment avancés dans leur cycle de traitement pour démontrer l'utilité de notre approche.

Nous avons pu analyser dans le secteur de Biologie Moléculaire à l'I.F.B:

- 6 prélèvements (P1 à P6) pour le patient n°1 chez qui les 4 cycles de PRRT ont été effectués.
- 4 prélèvements (P1 à P4) pour le patient n°2 chez qui 3 cycles de PRRT ont été effectués.
- 4 prélèvements (P1 à P4) pour le patient n°4 chez qui 2 cycles de PRRT ont été effectués.

La méthode de sélection des patients et les temps de prélèvement de chaque échantillon sont détaillés dans la Figure 19.

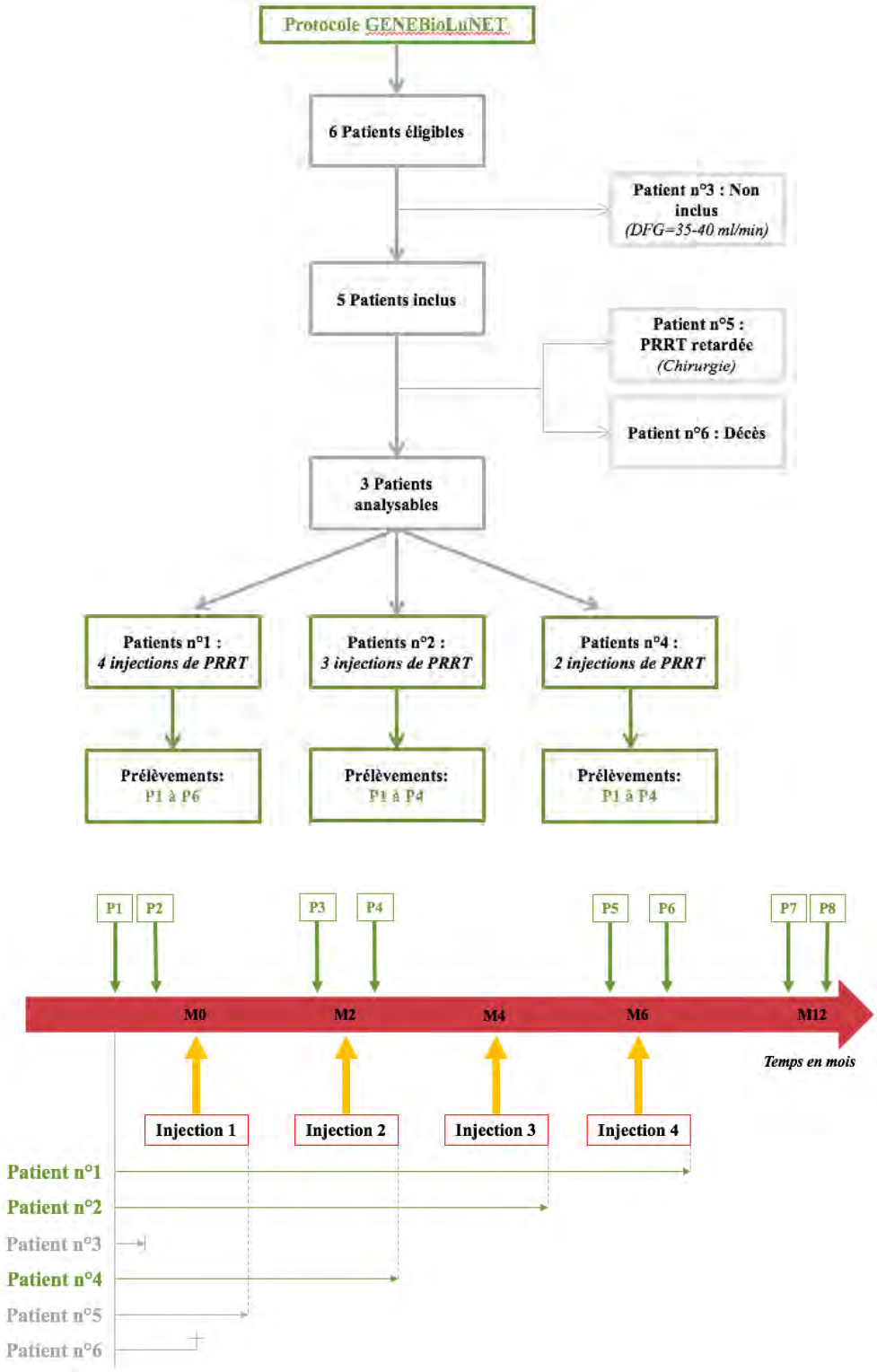


***Figure 19:* Sélection des patients pour l'analyse biologique des transcrits.**

« P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8 » représentent les prélèvements réalisés dans le cadre du protocole GENEbioLuNET et dédiés à l'analyse des transcrits de gènes. Le déroulement du protocole est détaillé dans la frise ci-dessus. Les « injections 1,2,3,4 » représentent les différents temps d'injection du 177Lu-DOTATATE. Au-dessous de la frise, on peut voir à quels stades du traitement sont les 6 patients sélectionnés pour le protocole. PRRT : Peptide Receptor Radionucleide Therapy, DFG : Débit de FiltrationGlomérulaire

	Caractéristiques cliniques des patients.		
Paramètres	**Patient n°1**	**Patient n°2**	**Patient n°4**
Age	83 ans	66 ans	58 ans
Sexe	Féminin	Masculin	Masculin
Date du diagnostic	2004	1999	2018
Type de tumeur	TNE iléo-caecale G1 avec envahissement ganglionnaire lentement progressive	TNE iléale G1 d'emblée métastatique au foie, lentement progressive	TNE iléale G1 avec métastases hépatiques, ganglionnaires sus et sous-diaphragmatiques
Progression	Métastases hépatiques	Métastases hépatiques, pulmonaires, osseuses, ganglionnaires, péritonéales	-
Signes cliniques	➢ Asymptomatique ➢ +/- Asthénie	➢ Syndrome carcinoïde : flushs provoqués par la consommation d'alcool.	➢ Syndrome carcinoïde (depuis 2010) : flushs spontanés et diarrhées chroniques (4-6/jours), douleurs abdominales. ➢ Amaigrissement (2018).
Traitements	➢ Hémi-colectomie (2004) ➢ Surveillance active des métastases hépatiques (2005-2013) ➢ Sandostatine LP 30mg (2013-2016)	➢ Résection iléale partielle avec hépatectomie droite (1999) et métastases hépatique (2001), chimioembolisations (2003-2013-2017) ➢ Sandostatine LP 30mg (2007) ➢ Sonde JJ (mai 2018)	➢ Sandostatine LP 10mg (Juillet–Septembre 2018)
Bilan Biologique Pré-PRRT	DFG : 60/ml/1,73m^2	DFG : 57/ml/1,73m^2	DFG : 72/ml/1,73m^2
	NFS : Hb : 12,1 g/l GB: 7.99 G/l; Lymphocytes= 1.9 G/l PQ : 269 G/l	NFS : Hb : 12,4g/dl GB: 6,37 G/l; Lymphocytes= 1,7 G/l PQ : 182 G/l	NFS : Hb : 15,2 g /dl GB: 7,92 G/l; Lymphocytes = 1,540 G/l PQ : 280 G/l
	➢ CgA: 618ng/ml (juin 2018)	➢ CgA : 1339ng/ml (juin 2018)	➢ CgA: 1498ng/ml ➢ 5-HIAA: 2600µmol/24h

NFS : numération formule sanguine, Hb : hémoglobine, GB : globules blancs, PQ : plaquettes, LP :libération prolongée, DFG : débit de filtration glomérulaire

***Tableau 13*: Tableau récapitulatif des caractéristiques cliniques et biologiques des patients analysés en pré-PRRT.**

2. Déroulement de la PRRT et évolution clinique post-traitement.

Le Tableau 14 résume le déroulement du traitement par PRRT et l'évolution clinique respective des patients.

Le patient n°1 a complété ses 4 cycles de traitement au moment de l'analyse biologique. Sur le plan clinique, le déroulement de la PRRT s'est passé sans problèmes notables en dehors d'une asthénie. Devant la majoration de celle-ci une imagerie a été réalisée révélant une réponse partielle au traitement selon les critères RECIST[63] (cela correspond à une « diminution d'au moins 30 % de la somme des diamètres des lésions cibles par rapport à la somme initiale des diamètres réalisé lors de l'examen BASELINE »). Sur le plan biologique, on note une diminution du taux de CgA. Sur le plan pharmaco-toxicologique, on observe une anémie de grade I présente dès le 1er cycle d'injection probablement en rapport avec la myelosuppression induite par traitement (11,2 g/dl après le 1er cycle, 2ème cycle 10.6 g/dl après le 2ème cycle, 9.6 g/dl après le 3ème cycle).

Le patient n°2 a complété 3 cycles de traitement. Sur le plan clinique, on constate une stabilisation de la maladie, bien que la disparition des épisodes de flushs soit secondaire à l'arrêt de sa consommation d'alcool. En revanche, l'infection de sa sonde JJ a eu pour conséquence de retarder la 3ème injection de PRRT. Sur le plan biologique, le taux de CgA a diminué de moitié en comparaison au bilan pré-PRRT. Sur le plan pharmaco-toxicologique, la toxicité au niveau plaquettaire et lymphocytaire observée dès le 1er cycle d'injection (thrombopénie à 95G/l et lymphopénie à 1500 G/l en post-injection) a nécessité une concession de dose de 10% pour la 2ème injection (thrombopénie à 75 G/l et lymphopénie à 0,7 G/l en post-injection) et de 50% pour la 3ème devant la toxicité plaquettaire persistante (thrombopénie isolée à 75G/ l).

Le patient n°4 a quant lui a complété 2 cycles de traitement. Sur le plan clinique, il présente une nette amélioration avec la disparition des épisodes de flushs spontanés et de diarrhées et ce dès la 1ère semaine qui suit les injections jusqu'à la 8ème semaine en post-injection. Au-delà de cette période, le patient a notifié en moyenne 2 ou 3 épisodes sur les 2 semaines précédant l'injection suivante, ce qui reste très largement acceptable. Sur le plan biologique, la CgA et le 5-HIAA ont également diminué de moitié après 2 cycles de PRRT. Sur le plan pharmaco-toxicologique, on observe une toxicité lymphocytaire avec une lymphopénie de grade II (0,5 G/l contre 1,540 G/l avant le début du traitement, et 0,72 G/l après la 1ère injection).

	Traitement par PRRT et évolution clinique.					
Paramètres	**Patient n°1**		**Patient n°2**		**Patient n°4**	
Inclusion	7 Juin 2018		11 Juin 2018		28 Octobre 2018	
Cycle PRRT	4 cycles	Dose	3 cycles	Dose	2 cycles	Dose
1er cycle	26/06/2018	7,4 GBq	11/06/2018	7,4 GBq	29/10/2018	7,4 GBq
2ème cycle	28/08/2018	7,4 GBq	07/08/2018	6,65 GBq*	08/01/2019	7,4 GBq
3ème cycle	24/10/2018	7,4 GBq	02/01/2019 (retardé)	3,7 GBq**	*Prévu le 5/03/2019*	
4ème cycle	18/12/2018	7,4 GBq	*Prévu le 6/03/2019*		-	
Evolution Clinique	➢ Réponse partielle selon les critères RECIST avant la 4ème injection. ➢ Asthénie majorée.		➢ Stabilisation clinique.		➢ Amélioration clinique nette : dès la 1ère jusqu'à la 8ème semaine post-injection : disparition des flushs, diarrhées et douleurs. ➢ Asthénie post-injection	
Bilan Biologique Post-PRRT	➢ DFG : 50/ml/1,73m²		➢ DFG : 80/ml/1,73m²		➢ DFG : 70/ml/1,73m²	
	NFS	Hb : 9,7 g/dl GB : 4,13 G/l ; Lymphopénie = 0,9 G/l PQ : 193 G/l	NFS	Hb : 13 g/dl GB: 5 G/l; Lymphocytes= 1,6 G/l PQ : 75 G/L	NFS	Hb : 14.6 g/dl GB : 7.22 G/l ; Lymphopénie = 0,5 G/l PQ : 234 G /l
	➢ CgA : 458 ng/ml		➢ CgA : 763 ng/ml		➢ CgA: 725 ng/ml ➢ 5-HIAA : 1058 µmol/24h	
Evènements Indésirables	➢ Myélo-suppression cumulée : ▪ Anémie ▪ Lymphopénie grade 2		➢ Infection sur sonde JJ : reprise chirurgicale → 3ème injection retardée ➢ Toxicité plaquettaire de grade 2 →Concession de dose		➢ Myélo-suppression cumulée : ▪ Lymphopénie grade 2-3	

** concession de 10% de la dose en raison de la toxicité plaquettaire*

***concession de 50% de la dose devant la persistance de la toxicité plaquettaire*

NFS : numération formule sanguine, Hb : hémoglobine, GB : globules blancs, PQ : plaquettes, LP :libération prolongée, DFG : débit de filtration glomérulaire

Tableau 14*: Tableau récapitulatif des caractéristiques cliniques et biologiques des patients analysés en post-PRRT.*

B. Analyse moléculaire des transcrits de gènes.

Il s'agit donc d'une étude sur sang total prélevé chez des patients traités par PRRT au 177-Lu-DOTATATE ayant pour objectif de caractériser des biomarqueurs moléculaires pouvant être utilisés en biodosimétrie et pour le suivi de la pathologie tumorale.

1. Extraction d'ARNm.

Tous les prélèvements ont été extraits à partir des tubes PAXGene. La concentration moyenne +/- DS (Déviation standard) extraites pour chaque patient et la qualité d'extraction (ratio A260/A280) étaient :

- 82,16 +/- 40,9 DS pour un ratio moyen à 2,27 pour la patiente n°1
- 81,75 +/- 20,8 DS pour un ratio moyen à 2,18 pour le patient n°2
- 50,77 +/- 36 DS pour un ratio moyen à 2,29 pour le patient n°4

Ces valeurs sont en accord avec les données fournisseur PAxgene. Les résultats d'extraction sont détaillés dans le Tableau 15 ci-dessous.

Prélèvements	Concentrations d'ARNm (ng/ul) et pureté A260/280					
	Patient 1		Patient 2		Patient 4	
	ng/ul	A260/280	ng/ul	A260/280	ng/ul	A260/280
P1	128.0	2,13	82.4	2,18	80.6*	2,23
P2	122.4	2,13	95.5	2,13	83.4	2,20
P3	102.8	2,16	97.0	2,17	19.0*	2,44
P4	52.0	2,21	52.1	2,27	20.1	2,32
P5	30.1	2 ,32	-		-	
P6	57.7	2,24	-		-	

*Alarme « Nucleic acid (ng/ul) »

Tableau 15 : Résultats des concentrations d'ARNm obtenues après extraction.

Les concentrations concernant les prélèvements P1 et P3 du patient n°3 signifient que pour ces 2 prélèvements une alarme s'est déclenchée lors du dosage des produits d'extraction, indiquant la présence « d'acides nucleiques » contaminants. Dans le cas de contamination par l'ADN génomique, le Xpose n'arrive pas à faire la différence entre l'ADN et l'ARN. Le rapport d'absorbance à 260 nm et à 280 nm est utilisé pour évaluer la pureté de l'ARN. Un rapport d'environ 2,0 est généralement accepté comme « pur ». Si le rapport est sensiblement inférieur, cela peut indiquer la présence de protéines, de phénol ou d'autres contaminants absorbant fortement à 280 nm ou près de celle-ci.

Pour l'analyse des résultats de qPCR, nous nous sommes assurés de la spécificité des produits d'amplification pour chaque série. La Figure 20 représente une courbe de fusion ou « melting curve » donc la présence d'un unique pic témoigne de la spécificité du produit amplifié.

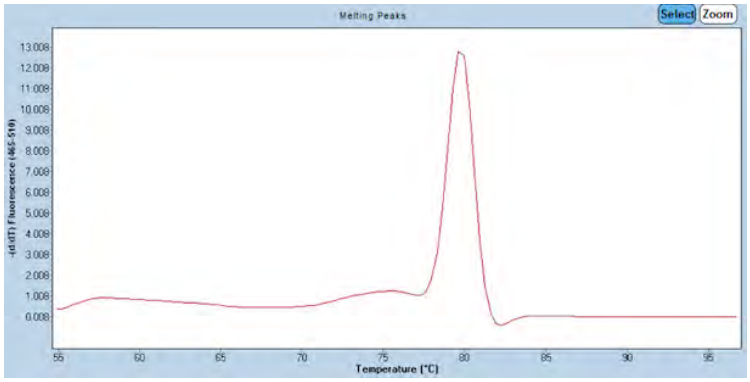


***Figure 20* : Melting curve pour le gène PANK2 du patient n°2, prélèvement P1.**

La présence d'un pic unique confirme l'amplification d'un produit spécifique lors de la réaction de qPCR.

1. Modulation du niveau d'expression des gènes secondaire à la PRRT.

Au total, 9 transcrits de gènes d'intérêt déterminés dans le matériel et méthode ont été analysés pour chacun des 3 patients. Le gène de la GAPDH, exprimé de manière ubiquitaire nous a servi de comparateur.

On peut regrouper ces gènes d'intérêt en 4 catégories selon leur fonction :

- Les gènes dits de « radiosensibilité » impliqués dans les voies de la réparation de l'ADN pour DDB2 et XPC ou dans la voie de l'apoptose pour BAX.
- Les gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire : PANK2, HDAC9, ATP6V.
- Le gène impliqué dans la voie de la signalisation cellulaire (voie MAPK- Mitogen Activated Protein Kinase) : BRAF.
- Le gène impliqué dans la prolifération cellulaire : CDKN1B.

Les 9 transcrits d'intérêt ont donné de bons résultats d'expression lors des tests de mise au point de la RT-qPCR. Les niveaux d'expression de 8 transcrits étudiés ont été pour certains considérablement modifiés après traitement au 177Lu-DOTATATE par rapport au prélèvement de référence P1.

Les Figure 21,Figure ***22***Figure 23, montrent l'évolution de l'expression des gènes déterminée par le calcul de quantification relative (représenté par le $2^{-\Delta\Delta CT}$ en ordonnée) aux différents temps de la PRRT : avant tout traitement (P1 et P2), 24h avant (P3) puis 48 h après la 2ème injection (P4). Pour apprécier ces modulations et dans une démarche de comparabilité, seuls les prélèvements P1 à P4 sont représentés dans les figures ci-dessous. Les courbes de chaque patient seront détaillées individuellement dans les parties suivantes.

Dès lors, on constate que l'expression des gènes est très inégale d'un patient à l'autre. Ce qui ressort immédiatement de ces courbes, c'est la différence évidente qu'il y a entre les taux d'expression du patient n°1 par rapport aux deux autres pour une même échelle donnée.

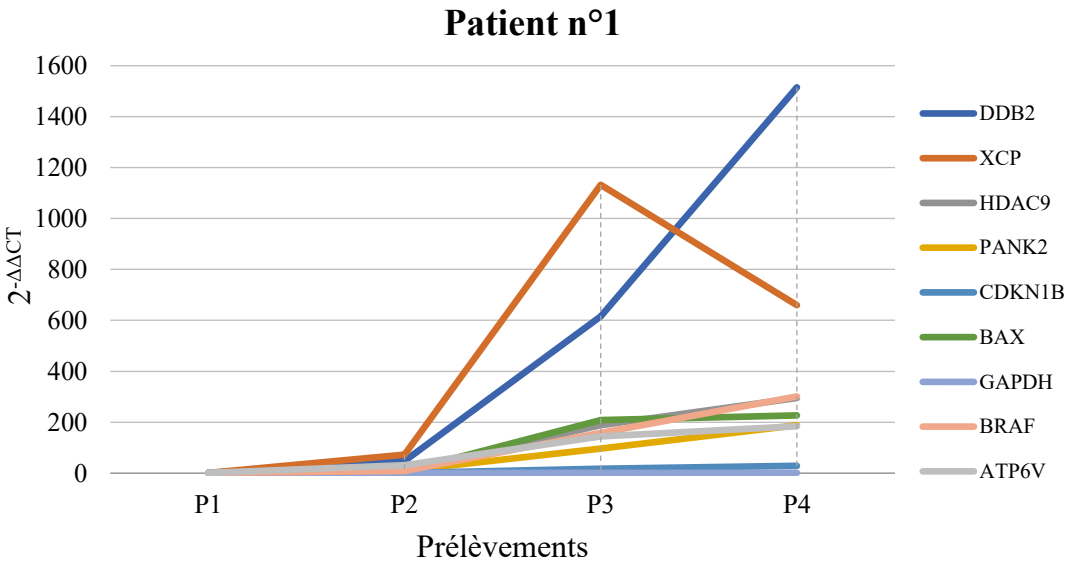


Figure 21 : Modulation de l'expression des gènes au cours de la PRRT du patient n°1.

Pour le patient n°1, dès le prélèvement P2 on observe une augmentation explosive de l'expression des gènes de radiosensibilité et plus particulièrement des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN : XCP et DDB2. Ceci *semble* coïncider avec la délivrance de la 1ère injection de 177Lu-DOTATATE et est confirmé par la modulation observée entre le P3 et P4, tous deux encadrant la 2ème injection. Les gènes impliqués dans le métabolisme et la signalisation cellulaire, bien qu'à une moindre mesure, présentent une augmentation de leur niveau d'expression selon la même cinétique. En revanche pour le gène impliqué dans la prolifération cellulaire CDK1B, on constate que son expression reste inchangée ou très peu modifiée au cours de la PRRT.

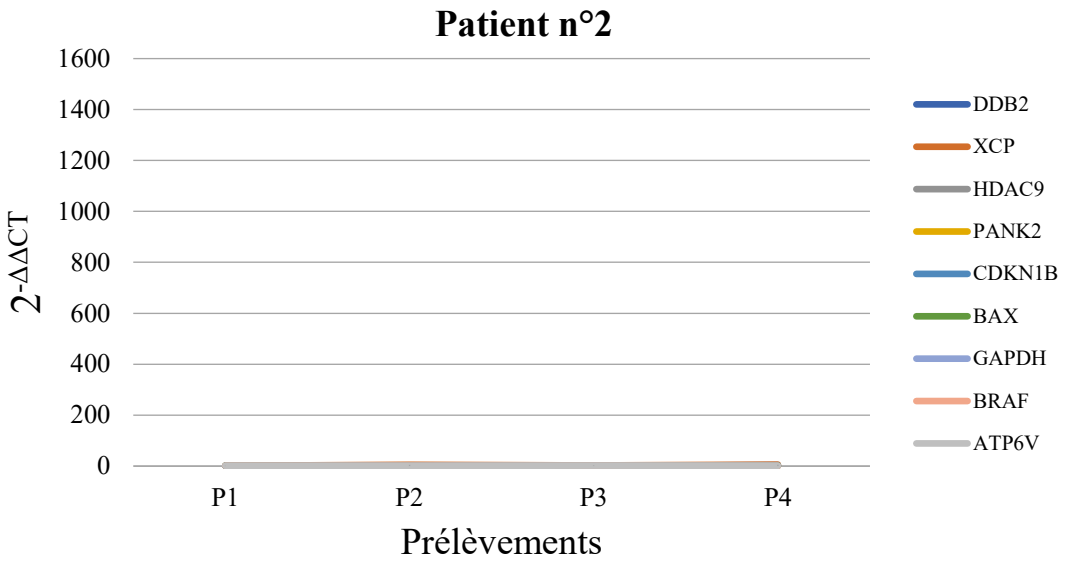


***Figure 22*: Modulation de l'expression des gènes au cours de la PRRT du patient n°2.**

Pour le patient n°2, aucune modification significative de l'expression des gènes n'est observée au cours des différents temps de la PRRT.

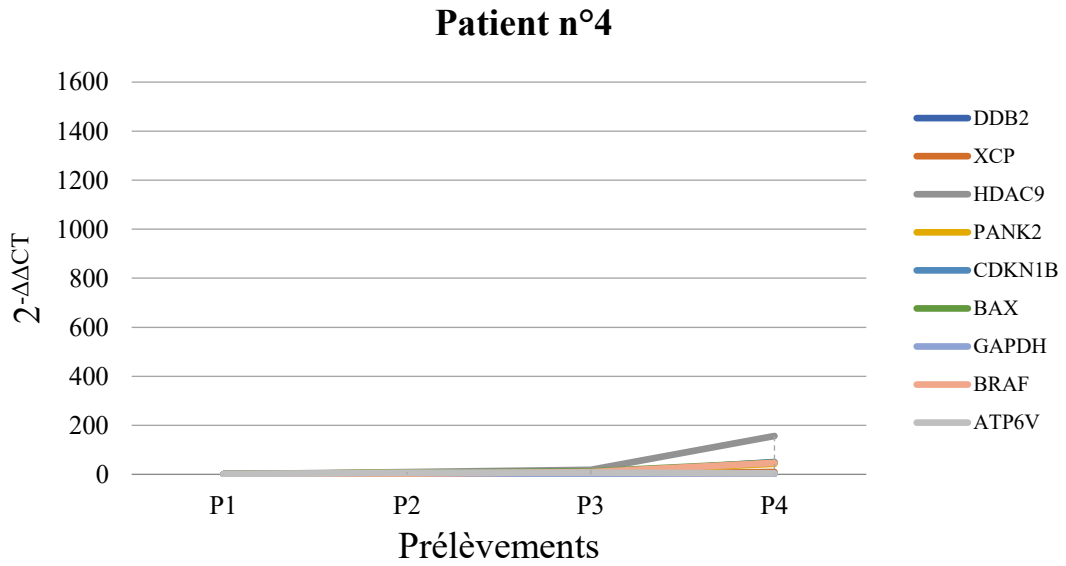


***Figure 23*: Modulation de l'expression des gènes au cours de la PRRT du patient n°4.**

Pour le patient n°4, on observe une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme (HDA9C) et la signalisation cellulaire (BRAF) à partir du prélèvement P3. En revanche, aucune modification n'est observée pour les deux autres catégories de gènes à cette échelle.

2. *Modulation de l'expression chez le patient 1.*

La Figure 24-A représente les courbes d'expression géniques de la patiente n°1 au cours de ses 4 cycles d'injection au 177Lu-DOATATE.

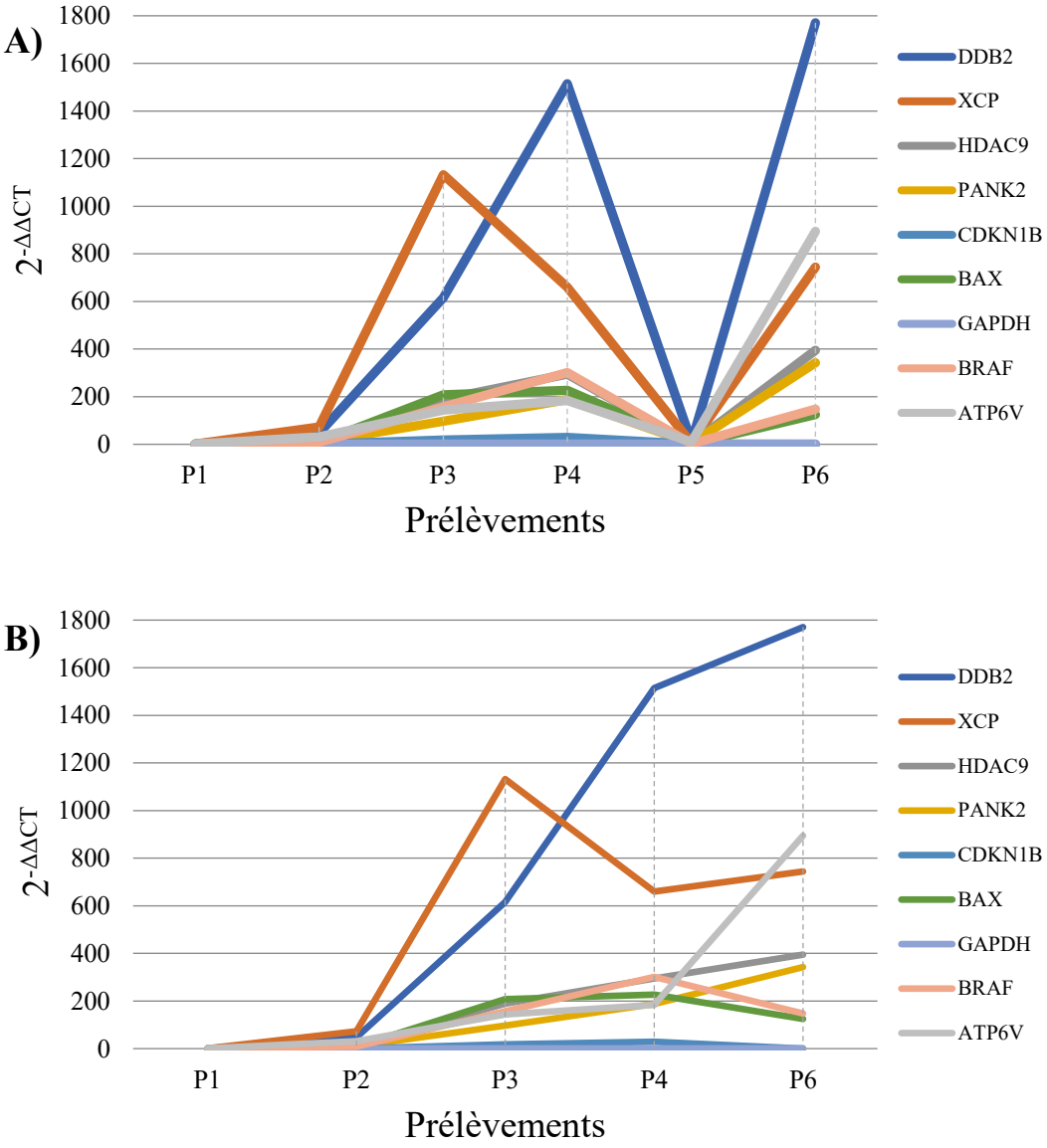


***Figure 24* : Niveau d'expression des gènes au cours des 4 cycles de PRRT du patient n°1.**
A) avec l'ensemble des prélèvements, B) sans le prélèvement P5

Au niveau du prélèvement P5, on observe une chute globale de l'expression des gènes. Pour rappel, le P5 se situe 2 mois après la 3ème injection et 24h avant la 4ème et dernière injection de 177Lu-DOTATATE. Cependant, au vu des résultats obtenus pour le prélèvement P6 présentant un niveau d'expression génique encore plus marquée vis-à-vis des précédents et dont la cinétique s'inscrit dans la continuité des autres prélèvements, nous avons pris la liberté d'omettre volontairement le prélèvement P5 dans la Figure 24-B. Ceci permet de montrer la

cinétique d'expression des gènes que ce soit de radiosensibilité ou certains gènes du métabolisme (ATP6V, HDA9C, PANK2) et de la signalisation cellulaire (BRAF). On peut émettre quelques suppositions quant aux résultats obtenus pour le prélèvement P5 dont les résultats peuvent être corrélés à :

- A la faible concentration d'ARNm obtenue lors de l'extraction (P5 = 30,1 ng/ul).
- A une mauvaise qualité du prélèvement ou de la conservation de ce prélèvement.

Ce point sera éclairci dans la partie « Discussion ».

3. Modulation de l'expression des gènes chez le patient 2.

Pour apprécier les variations observées chez le patient n°2, il a été choisi de présenter dans la Figure 25 l'évolution de l'expression génique avec une échelle plus appropriée. Il est important de prendre en compte la différence d'échelle et donc d'expression par rapport aux deux autres patients.

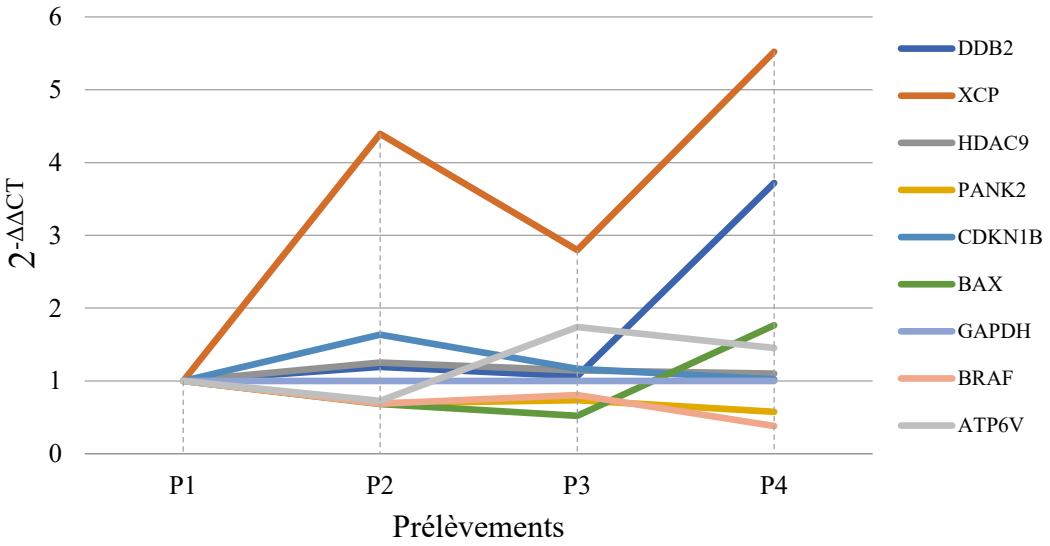


Figure 25 : Niveau d'expression des gènes du patient n°2 avec une échelle adaptée.

Tout en prenant en compte l'échelle, on constate :

- Une augmentation de l'expression des gènes de radiosensibilité après le prélèvement P3.
- Une sous-expression (par rapport au gène de la GAPDH) des gènes impliqués dans le métabolisme PANK2 et la signalisation cellulaire BRAF et ce dès le 1er prélèvement.
- Une variation de l'expression de XCP entre les prélèvements P1 et P2.

Cependant, ces variations doivent être balancées avec les variations observées pour les deux autres patients.

4. Modulation de l'expression des gènes chez le patient n°4.

Comme pour le patient n°2, une mise à l'échelle a été réalisée pour permettre d'apprécier les variations d'expression génique chez le patient n°4 (Figure 26). Une fois encore on constate une importante différence d'expression par rapport au patient n°1 dont l'expression est de l'ordre de 10 fois supérieure et du patient n°2 où l'expression est considérée comme inchangée.

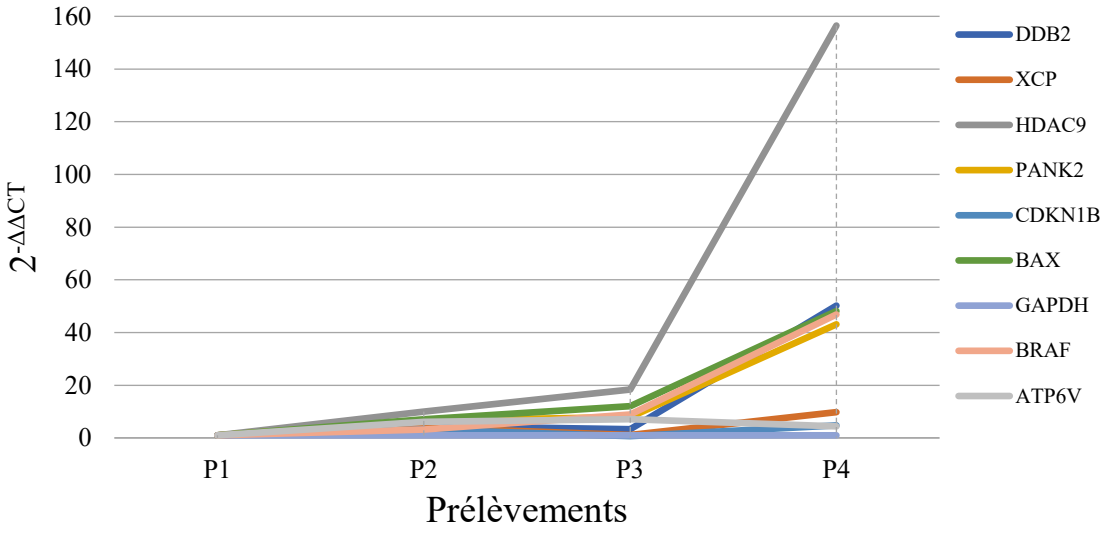


Figure 26 : Expression des gènes du patient n°4 avec une échelle adaptée.

Comme décrit dans la partie a), on observe une nette élévation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire tels que HDAC9 et dans une moindre mesure de PANK2 ainsi que du gène BRAF dès le prélèvement P3. On observe également une surexpression en regard des gènes de radiosensibilité DDB2 et BAX dans les mêmes proportions et suivant la même cinétique que pour les gènes du métabolisme cellulaire. Seuls ATPV6, XCP et CDKN1B semblent conserver le même niveau d'expression tout au long du traitement.

Le Tableau 16, fait une synthèse des résultats décrits ci-dessus.

Catégories	**Patients**	**Prélèvements**						**Interprétation générale**
		P1	**P2**	**P3**	**P4**	**P5**	**P6**	
Radiosensibilité *DDB2* *XCP* *BAX*	Patient n°1							Surexpression indéniable des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN représentés par DDB2 et XCP et dans une moindre mesure du gène impliqué dans l'apoptose cellulaire BAX. Ces variations semblent bien corrélées aux différents cycles d'injection au 177Lu-DOTATATE.
	Patient n°2							
	Patient n°4							
Métabolisme *PANK2* *HDAC9* *ATP6V*	Patient n°1							Surexpression prédominante des gènes PANK2 et HDA9C impliqués respectivement dans la phosphorylation oxydative et la régulation épigénétique. Ces variations semblent également corrélées aux différents cycles d'injection au 177Lu-DOTATATE.
	Patient n°2							
	Patient n°4							
Signalisation & Prolifération *BRAF* *CDKN1B*	Patient n°1							Surexpression prédominante du gène BRAF impliqué dans les voies de la signalisation cellulaire et dans l'expression des facteurs de croissances elle aussi corrélée aux différents cycles d'injection.
	Patient n°2							
	Patient n°4							

0-20	20-200	200-400	400<
Pas ou faiblement exprimé	Moyennement exprimé	Fortement exprimé	Très fortement exprimé

***Tableau 16*: Tableau récapitulatif de la modulation d'expression des gènes de l'étude GENEbioLuNET.**

IV. DISCUSSION

Le protocole GENEbioLuNET : intérêt de la recherche et challenge.

Dans cette étude pilote, nous avons voulu étudier la variabilité de l'expression de certains gènes de radiosensibilité et de gènes impliqués dans l'oncogenèse des TNE intestinales par RT-qPCR chez des patients atteints de TNE intestinales bien différenciées progressives ou métastatiques, traités par 177Lu-DOTATATE. Nous avons recherché une corrélation entre la modification de l'expression des gènes sélectionnés, le profil pharmacocinétique et la réponse clinique lors du traitement. En effet, une posologie thérapeutique fixe ne signifie pas une même dose d'irradiation pour tous les patients, la pharmacocinétique étant différente d'un patient à l'autre. L'identification de gènes dont l'expression est stable en dehors du traitement mais présentant une variation importante pendant la PRRT, nous permettrait de les utiliser comme marqueurs prédictifs pertinents de la réponse thérapeutique afin de proposer aux patients une stratégie personnalisée[72]. Cette première approche viserait, si les résultats le permettent, à poser les bases pour la mise en place d'une étude de plus grande ampleur (PRTK).

Si des études similaires ont déjà été réalisées, aucune encore n'a étudié l'impact direct du 177Lu-DOTATATE sur l'expression de gènes de radiosensibilité et de gènes impliqués dans l'oncogenèse des patients atteints de TNE intestinales.
En effet, en 2013 Modlin *et al.*[60] ont étudié l'expression d'une signature moléculaire d'un panel de 51 gènes spécifiques des TNE GEP réalisée par RT-qPCR mais dans un but de diagnostic et comme indicateur prédictif de la réponse au traitement par aSST[73]. En 2016, Bodei *et al.*[74] avec l'élaboration du PPQ (PRRT Predictive Quotient), ont suggéré que la modulation d'expression de certains gènes pouvait être corrélée de manière fiable à la réponse thérapeutique de la PRRT. Ils décrivent qu'une élévation des gènes impliqués dans la voie de la signalisation cellulaire (notamment BRAF) et du métabolisme (dont ATP6V et PANK2) permettrait de prédire avec une précision de 97%, une bonne réponse à la PRRT. Cependant, ce PPQ intègre également une quinzaine d'autres variables (données cliniques, d'imageries, biologiques). Edmondson *et al.*[75] se sont intéressés à l'analyse de l'expression génique (dont DDB2, XCP et BAX) de patients recevant une radiothérapie ciblée pour établir une approche biodosimétrique et déterminer la dose absorbée en fonction de la modulation des transcrits de

gènes mais cette étude concernait les patients traités par ^{131}I-mIBG (méta-IodoBenzylGuanidine) pour des neuroblastomes récidivants.

Outre le challenge clinico-biologique soulevé par le protocole GENEbioLuNET, d'autres enjeux organisationnels sont à relever. En effet, la complexité d'un tel protocole de recherche biomédicale réside sur la diversité des intervenants. Les dimensions logistiques et organisationnelles doivent être coordonnées de manière rigoureuse pour articuler l'action des différents acteurs de la recherche. Ce protocole possède 2 versants distincts mais interdépendants l'un de l'autre. Il y a d'une part le protocole thérapeutique avec le traitement au 177Lu-DOTATATE réalisé dans le service de médecine nucléaire à l'I.U.C.T, et d'autre part le protocole biologique concernant l'analyse génétique des transcrits réalisée dans le service de Biochimie-Biologie Moléculaire à l'IFB. La coordination est gérée par le Bureau des Essais Cliniques (B.E.C) à l'I.U.C.T. Cela rend compte de la multiplicité des intervenants de cette étude qui peut être un facteur limitant important et une source d'erreur non négligeable. Une formation continue, claire et rigoureuse doit être dispensée à tous les personnels prenant part à la recherche, afin de s'affranchir des potentiels risques d'erreurs liés à l'organisation et qui peuvent avoir des répercussions irrémédiables sur la qualité de l'analyse biologique.

Dans le cadre du protocole, nous avons organisé en amont en collaboration avec les médecins investigateurs, l'Attaché de Recherche Clinique (ARC) promoteur, le cadre du service de médecine nucléaire et la radiopharmacie, une formation spécifique pour chacun des intervenants :

- Au personnel infirmier du service de médecine nucléaire : formation relative aux modalités particulières de prélèvement des tubes PAXgène et à leur conservation selon les recommandations du fournisseur.
- A l'ARC coordinateur : formation relative aux modalités de transport spécifiques aux tubes PAXgène (transport en 801, dans la carboglace, à la verticale dans une boîte dédiée).
- Au personnel du laboratoire de l'IFB : formation relative à la réception des prélèvements et à la procédure de prise en charge.

La dimension « radioactive » a rajouté un challenge supplémentaire pour la conservation des prélèvements.

Ainsi, depuis juin 2018, les prélèvements génétiques du protocole GENEbioLuNET transitent de l'I.U.C.T jusqu'à l'I.F.B selon une procédure standardisée. Une organisation rigoureuse est indispensable au bon déroulement d'un protocole et chaque acteur a son importance et ses responsabilités. Une méthodologie et une organisation irréprochables représentent de véritables enjeux pour le déroulement d'une recherche clinique efficiente.

Analyse de nos biomarqueurs moléculaires.

D'après nos résultats, on constate tout d'abord que l'expression des gènes étudiés dans le cadre de ce protocole est très inégale avec des taux d'expression pouvant être jusqu'à 1000 fois plus important d'un patient à l'autre. On observe de manière évidente que la modulation d'expression des gènes est rythmée par les différents cycles d'injection de 177Lu-DOTATATE et qui plus est de façon cumulative, laissant préjuger d'une radiosensibilité très différente d'un individu à l'autre.

Nous avons constaté que les gènes de radiosensibilité impliqués dans les voies de la réparation de l'ADN (DDB2 et XCP) étaient ceux dont l'expression était la mieux corrélée à l'injection de 177Lu-DOTATATE. L'un des gènes impliqués dans les mécanismes de l'apoptose (BAX) suivait le même schéma d'expression mais dans des proportions moins importantes. Ces résultats sont similaires à ceux retrouvés par Edmondson *et al.*[75] dont l'étude portait sur l'expression de gènes après traitement par ^{131}I-mIBG. Ceci vient renforcer l'idée que ces gènes dits « radiosensibles » pourraient être des indicateurs pertinents pour prédire la réponse thérapeutique lorsqu'ils sont corrélés à la réponse clinique du patient au traitement, ou comme indicateurs de radiotoxicité lorsqu'ils sont corrélés à la réponse biologique et notamment hématologique au cours de la PRRT.
Les gènes impliqués dans le métabolisme et la signalisation cellulaire présentaient également un fort degré d'expression en réponse aux différents cycles d'injection. La PRRT est une radiothérapie métabolique, il n'est donc pas surprenant d'observer de telles variations pour ces deux dernières catégories de gènes étant donné qu'elle induit des changements dans les voies de signalisation cellulaire. En revanche, aucune modification n'a été observée pour le gène impliqué dans la prolifération cellulaire CDKN1B (pouvant être surexprimé en cas de TNE agressive et sous-exprimée en cas de radiosensibilité tumorale) chez les trois patients. On peut émettre l'hypothèse que ce dernier pourrait être un bon biomarqueur pour le suivi du traitement par PRRT, mais il nous est encore impossible de conclure au vu du nombre de

patients. Dans une étude de 2015, Bodei *et al.*[74] ont mis au point une stratégie basée sur l'analyse des ARNm circulants afin de déterminer un index permettant de prédire la réponse tumorale à la PRRT (PRRT répondeurs vs PRRT non-répondeurs) en fonction de l'expression de certains gènes. Pour ce faire, ils ont identifié neuf « groupes génomiques » ou « omes » permettant de classer les transcrits de gènes selon leurs fonctions cellulaires : « SSTRome (qui regroupe les gènes spécifiques des récepteurs à la somatostatine), proliferome, signalome, métabolome, sécrétome, épigénome, plurome, apoptome » et les ont ensuite intégrés au NETest. Cette analyse du transcriptome a permis de donner des informations sur l'activité biologique de la tumeur. Ils ont montré qu'il existait une corrélation entre le statut dit « PRRT-responder » (selon les critères d'imagerie RECIST de 54 patients atteints de TNE de différents grades et origines) et le profil d'expression de gènes impliqués dans les voies de la signalisation et du métabolisme (signalome et métabolome) analysés avant chaque cycle de PRRT au 177Lu-DOTATATE ainsi qu'à 3 et 6 mois après la fin du traitement. En 2018, Bodei et Modlin[68] intègrent ces 2 groupes de gènes dans le PPQ (PRRT predictive quotient), qui est un algorithme mathématico-biologique reposant sur l'analyse de données histologiques et de profils d'expression des gènes du signalome et du métabolome qui, intégré à un modèle de régression logistique, permet de donner un score binaire prédictif de la réponse ou non à la PRRT .

Bien que nos résultats semblent en accord avec les données de la littérature, ils doivent être nuancés en raison du trop faible nombre de patients inclus dans notre échantillon et il est encore trop tôt pour indiquer s'il existe une corrélation entre les profils d'expression de ces 3 groupes de gènes (radiosensibilité, signalisation et métabolisme) et la réponse à la PRRT. Notre panel de gènes n'incluait pas dans un premier temps les gènes spécifiques des récepteurs à la somatostatine SSTR dans la mesure où l'inclusion dans le protocole était conditionnée par la présence de SSTR fonctionnels (confirmée par l'imagerie métabolique). Nous n'avons donc pas pu évaluer l'impact de la PRRT sur le profil d'expression de ce groupe de gènes. Il est néanmoins prévu d'étoffer ce panel avec d'autres gènes pour l'analyse des patients à venir.

Concernant les aspects techniques du protocole, nous avons obtenus dans l'ensemble de bonnes concentrations d'ARNm en termes de quantité et de qualité (ratio A260/A280). On peut suggérer que la quantité d'ARNm obtenue peut présager de la qualité des recueils sur les tubes PAXgene et donc d'une meilleure quantification des transcrits. Ces résultats sont à

mettre en relation avec les concentrations d'ARNm obtenues lors de l'extraction pour chaque prélèvement. Ceci pourrait concorder avec les niveaux d'expression observés pour la patiente n°1 et pourrait expliquer les profils d'expression (quasi indétectables) observés pour le prélèvement P5 (où la concentration d'ARNm était de 30,1 ng/ul) pour lequel les résultats ne semblent pas cohérents avec la cinétique observée sur tous ses autres prélèvements. Par ailleurs, la concentration retrouvée pour le prélèvement P6 de cette même patiente (57,7 ng/ul), avec des niveaux d'expression 1500 fois plus importants par rapport à P5, semble indiquer que la concentration d'ARNm de départ n'interfère pas avec le rendu de résultat d'expression génique. Nous avons donc émis l'hypothèse de la survenue d'un problème technique lors du prélèvement, de la conservation ou de l'analyse pour le prélèvement P5.

Pour le protocole GENEbioLuNET il a été choisi de travailler sur de l'ARNm extrait de sang total. Ceci présente l'avantage d'être peu invasif. Cependant, l'ARN étant un matériel très instable, il peut se dégrader rapidement dans les heures qui suivent le prélèvement sanguin. C'est ce que mettent en évidence Modlin *et al.*[60] dans une étude évaluant les caractéristiques et la reproductibilité d'une signature moléculaire de certains gènes spécifiques des TNE. Outre la dégradation, certains ARNm peuvent se développer *in vitro* par induction des gènes après le prélèvement. Par conséquent, la dégradation enzymatique, l'induction *in vitro* de l'ARN ou tout simplement la mort cellulaire peuvent entraîner une surestimation ou une sous-estimation du nombre de gènes transcrits *in vivo*. Les tubes PAXgene^{TM} Blood RNA[76] contiennent un additif qui stabilise le profil de transcription des gènes in vivo en réduisant la dégradation de l'ARN *in vitro* et en minimisant l'induction de gènes tout en permettant une meilleure conservation[77,78,79].

L'extraction d'ARNm sur tube PAXgène requiert une technique d'extraction dite manuelle. En effet, il n'existe pas de technique automatisée pour l'extraction d'ARNm pour ce type de tube. C'est pour cela qu'il a été choisi de réaliser les extractions en séries de 4 prélèvements pour obtenir une meilleure reproductivité (plutôt qu'un tube à la fois).

Bien que ces tubes PAXgene permettent un meilleur rendement d'extraction d'ARNm, ils présentent des exigences techniques strictes qui, si elles ne sont pas correctement appliquées peuvent avoir des répercussions sur la qualité des résultats.

Ces exigences concernent :

- Le prélèvement : le tube doit être suffisamment rempli sinon le ratio sang/additif sera erroné et pourra fausser les résultats, doit être suivi d'une homogénéisation lente et doit être conservé 2h à température ambiante (nécessité d'un tube de purge).

- La conservation : en position verticale sur un support non en mousse ou en polystyrène (qui risqueraient de fissurer le tube une fois congelés), jusqu'à 72h maximum au frigo, puis à -20°C si traité au bout de 1 mois, et -80°C au-delà (avec une étape de congélation à -20°C).
- Le transport : position verticale, +/- dans la carboglace.
- Le traitement : au moins 2h à température ambiante avant toute manipulation technique.

Ces exigences techniques ne sont pas sans conséquences et soulignent l'importance d'une maitrise rigoureuse de la gestion de ces prélèvements par les différents intervenants (des infirmières jusqu'à la prise en charge au laboratoire). Un autre point à prendre en compte est l'organisation logistique du transport des prélèvements sur 2 sites différents (du service de médecine nucléaire à l'I.U.C.T où les prélèvements sont réalisés au service de biologie moléculaire à l'IFB où les tubes sont traités). Cela implique un transport d'au minimum 20 min en coursier 801 dans les meilleures conditions de circulation. Le problème se pose notamment pour les prélèvements réalisés 48 heures après une injection de 177Lu-DOTATATE (P4 et P6) conservés à -20°C par la radiopharmacie de l'I.U.C.T jusqu'à l'élimination complète de la radioactivité (on compte généralement 7 1 /2 vies soit 6-7 jours). Pour donner un exemple, si le jour de l'envoi au laboratoire, les prélèvements ne sont pas manipulés le jour même, il est indispensable que la chaine du froid soit préservée et que les prélèvements soient transportés dans de la glace ou carboglace en position verticale puis stockés dans les congélateurs de l'IFB. Une décongélation-recongélation peut entrainer une dégradation des ARNm. Toutes ces précautions doivent être prises en compte dans l'organisation du transport.

Comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes (Partie B), l'analyse des transcrits au laboratoire a été réalisée en 3 étapes distinctes : l'étape d'extraction manuelle d'ARNm, l'étape de rétro-transcription de l'ARNm en ADNc et l'étape de PCR quantitative. Chaque étape nécessite la maîtrise technique de chacun des protocoles.
Là encore, la multiplicité des étapes outre les contraintes en matière de temps technique, peut augmenter le risque d'erreur dans l'analyse des résultats :

- Augmentation du risque de dégradation des ARNm et des ADNc.
- Augmentation du risque de contamination des échantillons.

- Augmentation du risque d'erreurs liées à la manipulation technique.

Travailler sur de l'ARN présente des contraintes évidentes et nous a conduit à discuter du choix de l'ARNm comme matériel de départ. Cependant, des interactions entre les cellules sanguines et les tissus périphériques dans lesquels le sang circule dont les tissus néoplasiques, peuvent influencer l'expression des gènes des cellules sanguines. Des études récentes[80,81,82] ont montré que l'expression des gènes par les cellules sanguines périphériques pourrait être influencée par le tissu néoplasique à travers lequel le sang circule et pourrait fournir des informations sur le comportement de ces tumeurs à visée diagnostique, pronostique, prédictive en réponse à un traitement. Par ailleurs, les globules blancs sont bien caractérisés en termes de dommage de l'ADN et de sensibilité aux expositions aux rayonnements ionisants ce qui en fait des cibles de choix pour l'étude de la dosimétrie dans des protocoles de radiothérapie métabolique tel que le nôtre. L'un des enjeux majeurs est de pouvoir déterminer une approche de biodosimétrie afin mieux maîtriser et d'être en mesure d'adapter au cas par cas la dose délivrée de radiothérapie interne. De plus, l'étude des profils d'expression des gènes dans le sang présente plusieurs avantages : une méthode de prélèvement peu invasive (une simple prise de sang appelée biopsie liquide), des protocoles d'analyse standardisés et la possibilité d'obtenir avec aisance des échantillons répétés au fil du temps (contrairement à une biopsie par exemple). C'est en grande partie pour ces raisons que le choix s'est porté vers l'ARNm sur sang total. De plus, devant la complexité et la diversité du comportement biologique du cancer, l'étude des profils d'expressions géniques est la plus à même de capter de manière efficiente l'activité biologique de la cellule tumorale active, sa prolifération, son activité métabolique, la signalisation des facteurs de croissance.

La population d'étude et l'impact de la PRRT au 177Lu-DOTATATE.

Nous avons pu analyser l'expression de gènes chez 3 patients (1 femme et 2 hommes) traités par PRRT au 177Lu-DOTATATE sur la période définie.

Si tous nos patients ont été diagnostiqués pour une TNE iléale bien différenciée, lentement progressive et métastatique, ils présentaient des tableaux cliniques très différents.
La patiente n°1 diagnostiquée en 2004 et âgée de 83 ans au moment de l'analyse, présentait un tableau clinique asymptomatique, d'évolution lente pendant plusieurs années n'ayant

nécessité qu'une surveillance active jusqu'en 2013 où l'apparition de nouvelles métastases hépatiques a conduit à la mise en place d'un traitement par Sandostatine®. Le tableau clinique de cette patiente illustre parfaitement la présentation typique de ce type de tumeurs, asymptomatiques dans 60% des cas[19].

Le patient n°2 diagnostiqué en 1999 et âgé de 66 ans au moment de l'analyse, présentait un tableau clinique d'emblée métastatique avec comme principal symptôme un flush déclenché essentiellement après la consommation d'alcool. Ce flush était secondaire à l'hypersécrétion de sérotonine qui caractérise le syndrome carcinoïde généralement associé dans 30% cas aux TNE intestinales bien différenciées[83]. La présence d'un syndrome carcinoïde s'accompagne souvent de métastases hépatiques ce qui était le cas chez ce patient pour lesquelles il fut traité de multiples fois par chimio embolisation et résections chirurgicales. Contrairement à la patiente n°1, ce patient a été diagnostiqué à l'âge de 44 ans ce qui est relativement jeune pour ce type de tumeur dont l'âge moyen au moment du diagnostic est de 60 ans[1].

Le patient n°4 diagnostiqué en 2018 et âgé de 58 ans au moment de l'analyse, présentait un tableau bruyant puisque l'histoire de la maladie rapportait la présence de diarrhées et de flush spontanés pouvant se manifester jusqu'à 6 fois par jours et ce depuis 7-8 ans. Malgré les manifestations cliniques évidentes d'un syndrome carcinoïde, ce n'est qu'après un épisode d'amaigrissement (8kg en 3 mois) en 2018 que le diagnostic de TNE iléale multi-métastatique a été posé. Sur les 3 patients c'est le seul chez qui la PRRT a été proposée en 1ère intention.

Ces 3 cas de figure illustrent parfaitement les données rapportées dans la littérature concernant la présentation clinique des TNE intestinales. Du tableau asymptomatique typique au syndrome carcinoïde franc, cette diversité clinique souligne la grande hétérogénéité et la complexité qui caractérisent ce type de tumeur. Il devient facile de comprendre pourquoi il n'est pas aisé de les diagnostiquer et de les catégoriser[6].

Concernant le traitement par PRRT au 177Lu-DOTATATE, tous les patients ont reçu au moins 2 cycles de PRRT, 3 pour le patient n°2 et 4 cycles pour la patiente n°1.
Sur le plan clinique, la PRRT a dans l'ensemble été bien tolérée. Cependant là encore, on constate une grande hétérogénéité vis-à-vis de la réponse clinique au traitement. La patiente n°1 jusqu'alors asymptomatique a présenté une asthénie qui s'est majorée à au fur et à mesure des cycles de PRRT. Pour le patient n°2 on a constaté une « stabilisation clinique », d'autant

plus que l'arrêt volontaire de sa consommation d'alcool a permis d'éradiquer ses épisodes de flush. En revanche, le patient n°4 a présenté une très nette amélioration clinique dès la 1ère injection de 177-Lu-DOTATATE avec la disparition complète de ses symptômes jusqu'à la 8ème semaine post-PRRT.

Sur le plan biologique, l'impact de la PRRT fait apparaître 2 points :
Une nette diminution des taux de la CgA chez nos 3 patients, de l'ordre de 25% chez la patiente n°1, 43% pour le patient n°2 et 49% pour le patient n°4.
Une myelotoxicité se traduisant par une toxicité hématologique plus ou moins prononcée chez ces 3 patients. La patiente n°1 a développé progressivement au cours de la PRRT une anémie de grade 1 et une lymphopénie de grade 2 qui n'ont cependant pas entraîné d'interruption ni d'adaptation de dose contrairement au patient n°2 chez qui la persistance d'une toxicité plaquettaire de grade 2 présente dès le 1er cycle de PRRT a entrainé une concession de dose de 10% à la 2ème injection et de 50% à la 3èmeinjection.Quant au patient n°4, dès la 1ère injection est apparue une lymphopénie de grade 2-3.

Ces résultats cliniques et biologiques sont en accord avec les données de la littérature, que l'on parle en termes d'efficacité[84,85] (stabilisation clinique, amélioration des symptômes cliniques), d'effets secondaires (l'asthénie est fréquemment retrouvée) ou d'évènements indésirables biologiques. Dans la littérature, une hématotoxicité à long terme a été décrite chez les patients traités par 177-Lu-DOTATATE. Dans une étude évaluant la toxicité du 177Lu-DOTATATE chez 203 patients, Sabet *et a.l*[86] rapportent la survenue d'une hématotoxicité après 4,6% des injections au 177Lu-DOTATE et chez 11,3% des patients. Ces résultats sont en accord avec les données précédemment publiées par Kwekkeboom *et al.*[84] et dans l'essai clinique NETTER-1[3] où 25% des patients ont développé une toxicité hématologique pendant l'essai.
D'autre part, nous nous sommes demandé si la toxicité leucocytaire essentiellement lymphocytaire induite par le 177Lu-DOTATATE chez les patients n°1 et n°4 pouvait altérer le rendement de l'extraction d'ARNm et avoir des répercussions sur les résultats. Lorsqu'on compare les niveaux d'expression des gènes pour ces 2 patients à partir du moment où la lymphopénie a été rapportée, aucune diminution d'expression n'est observée ce qui laisse supposer qu'une atteinte de la lignée leucocytaire ne semble pas impacter les résultats.

Bien que l'évolution clinique et biologique observée chez nos 3 patients après le traitement au 177Lu-DOTATATE concordent avec les données de la littérature, nous ne pouvons fournir ici qu'une analyse descriptive des premiers résultats sans pouvoir conclure ni extrapoler ces données en raison du très faible nombre de patients inclus au moment de l'analyse. Un autre point limitant est que les 3 patients n'en étaient pas au même stade de traitement et ont reçus des doses différentes de PRRT ce qui peut être un facteur de confusion possible (4 cycles de 177Lu-DOTATATE pour la patiente n°1, 3 pour le patient n°2 dont 2 injection avec dose réduite et 2 pour le patient n°4). Cela ne nous permet donc pas de donner une analyse comparative représentative.

Par ailleurs, le bilan d'évaluation de la réponse tumorale est programmé 6 mois après la fin du traitement par 177Lu- DOTATATE. Celui-ci comprend une évaluation sur des critères biologiques (variation des taux de CgA) et sur des critères radiologiques (évolution selon critères RECIST des lésions mesurées lors du bilan d'imagerie réalisé avant le début du traitement par Octreoscan® ou TEP-TDM 68Ga-DOTANOC). Aucun de ces patients n'a l'heure actuelle terminé ce protocole. Cette analyse sera bien entendue réalisée lorsque tous les patients inclus (objectif d'inclusion fixé à 30 patients) auront terminé le traitement.

Cependant, la diversité des réponses clinico-biologiques observées à ce stade entre chaque patient conforte l'idée d'être en mesure de proposer des schémas thérapeutiques personnalisés.

Si on fait le bilan de l'ensemble nos résultats et que l'on compare les profils d'expression géniques obtenus pour chacun des patients à leur évolution clinique sous PRRT par 177Lu-DOTATATE on remarque que :

- Pour la patiente n°1 : des niveaux d'expression très élevés et croissants au fur et à mesure du traitement pour notre cohorte de gènes de radiosensibilité et dans une moindre mesure de nos gènes impliqués dans le métabolisme et la signalisation se traduisant sur le plan clinique par une asthénie majorée (effet secondaire de la PRRT), une bonne « réponse partielle » selon les critères RECIST d'imagerie et une réduction de 25% du taux de CgA après traitement.
- Pour le patient n°2 : des niveaux d'expression géniques inchangés avant ou après traitement avec une stabilisation sur le plan clinique et une réduction de 49% du taux de CgA.
- Pour le patient n°4 : des niveaux d'expression géniques élevés après le 2ème cycle de 177Lu-DOTATATE pour les gènes de radiosensibilité et les gènes impliqués dans le

métabolisme et la signalisation cellulaire avec une nette amélioration sur le plan clinique avec disparition des symptômes associés au syndrome carcinoïdes et une réduction de presque 50% du taux de CgA.

Notre cohorte de gènes de radiosensibilités et des gènes impliqués dans le métabolisme et la signalisation cellulaire semblent être de bons candidats pour évaluer la réponse à la PRRT au 177Lu-DOTATATE. Cependant, afin de déterminer s'ils sont suffisamment sensibles et robustes pour être utilisés en tant que biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement, pour suivre l'évolution de la maladie et proposer des stratégies thérapeutiques plus personnalisées, il est nécessaire d'approfondir cette analyse sur un panel de gènes plus large mais compatible avec une analyse de qPCR rapide (afin d'être en mesure de proposer une adaptation thérapeutique éventuelle par exemple), sur un effectif de population beaucoup plus important et chez des patients ayant terminé leur traitement.

Perspectives.

Le panel de gènes étudiés pour ce travail de thèse va être élargi dans le cadre du protocole GENEbioLuNET. En effet, il sera intéressant d'étudier les gènes codant pour les récepteurs à la somatostatine spécifiques des TNE et qui représentent des cibles de fixation thérapeutique du 177Lu-DOTATATE tels que les gènes SSTR1, SSTR3, SSTR4, SSTR5 et analyser leur niveau d'expression en réponse au traitement. Il est aussi envisagé d'étudier des groupes de gènes appartenant aux gènes suppresseurs de tumeur tels que CXCL14[74-87] (surexprimé en cas de réponse clinique au 177Lu-DOTATATE) et TCEB3C[88] (codant pour l'elongine A3, jouant un rôle dans la prolifération tumorale des TNE intestinales et présentant également une régulation épigénétique). D'autres gènes de radiosensibilité tel que FDRX (impliqué dans l'apoptose cellulaire) ou des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire tel que CDKN2A[87] (pouvant être surexprimées en cas de TNE intestinale agressive et sous exprimé en cas de radiosensibilité tumorale tout comme CDKN1B testé dans le panel actuel) viendront étoffer le panel de gènes préexistants.

Les miARN représentent d'autres marqueurs moléculaires d'intérêt. Les microARN (miARN). Les miARN sont de petits ARN non codants d'une longueur de 21 à 25 nucléotides qui participent à la régulation des gènes au niveau post-transcriptionnel. Plusieurs miARN agissent soit comme oncogènes, soit comme suppresseurs de tumeurs, influençant ainsi la croissance et la dissémination des tumeurs. Jusqu'à récemment, les données sur les profils

d'expression de miARN dans les TNED étaient encore rares. De nombreuses études tendent aujourd'hui à définir le profil miARN des TNE intestinales et de rechercher de nouveaux sous-groupes moléculaires et de nouveaux biomarqueurs pronostiques[58]. Cependant, la mesure de miARN reste complexe et son utilisation n'est pas encore adéquate pour un usage clinique[59].

Plus stables que l'ARN, moins contraignants techniquement (prélèvement sur tube EDTA, extraction automatisée) et agissant comme des inhibiteurs translationnels des ARNm lors de la radiothérapie nucléidique ils suscitent de plus en plus l'intérêt. Zimmermann *et al.*[57] donnent une analyse approfondie des TNE GEP et ont pu déterminer des profils de miARN (Annexe 5) spécifiques pour chaque site de la tumeur primaire, établissant une corrélation avec les indices de prolifération ainsi que les métastases nodales et distantes correspondantes. Ainsi l'étude du profil des miARN dans les TNE intestinales pour déterminer leur validité en tant que biomarqueurs pronostiques[58] potentiels est pertinent .

Dans le cadre du protocole GENEbioLuNET, il sera prévu d'étudier le profil de miRNA plasmatiques spécifiques des TNE intestinales en progression ou métastatiques et ayant montré une stabilité d'expression lors du traitement par des aSST tels que :

- miRNA-200a (exprimé surtout dans les métastases hépatiques), miRNA-31, miRNA-129-5p, miRNA-133a et miRNA-215 qui restent sous-exprimés chez les patients métastatiques, en progression malgré le traitement par aSST[89].
- miRNA-183 et miRNA-196a qui sont surexprimés chez les patients traités par aSST[89]. Cependant, si miR-196a a montré son rôle dans la régulation transcriptionnelle, il ne semble pas jouer de rôle dans la prolifération cellulaire tumorale[90].

Nous espérons que les résultats, en combinaison avec les marqueurs ARNm, ouvriront de nouvelles perspectives pour la prise en charge de ces tumeurs**.**

Face au développement de la radiothérapie métabolique et devant la progression vers une médecine personnalisée, la recherche de biomarqueurs sanguins fiables et robustes est devenue une priorité pour la prise en charge de ces tumeurs complexes. Des stratégies d'intégration de données provenant de différentes sources telles que l'imagerie, les paramètres cliniques et biologiques permettraient de fournir de solide outil diagnostic, de suivi, et prédictif pour ces TNE. Le challenge biologique est d'avoir des marqueurs dont la stabilité et le transport sont simples avec un dosage rapide permettant une adaptation thérapeutique rapide.

CONCLUSION.

La PRRT est un traitement efficace dans le cadre des TNE intestinales[3,91]. Prescrit en Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) depuis 2015, l'obtention de l'AMM en 2017 du Lutathéra® dans cette indication a changé les perspectives thérapeutiques des patients atteints de TNE intestinales. Depuis 2015, 33 nouveaux patients diagnostiqués pour une TNE intestinales ont été validés en RCP RENATEN et ont été traités par PRRT dans le service de Médecine Nucléaire – Curithérapie à l'I.U.C.T. Le CHU de Toulouse est aujourd'hui un des principaux centres utilisant la PRRT au 177Lu-DOTATATE. Cependant, il existe encore peu de données permettant de fournir des informations précises sur l'impact, notamment moléculaire, de ce traitement. Le peu de recul en regard de ces nouvelles thérapies et la crainte que peut susciter l'utilisation de ces nouveaux acteurs métaboliques parmi les professionnels de santé soulève un besoin crucial d'outils performants, fiables et sensibles pour cadrer rigoureusement la PRRT dont la durée de traitement et la toxicité au niveau de la moelle osseuse et du rein sont loin d'être anodines.

La mise au point de marqueurs facilitant une identification rapide et précise des réponses thérapeutiques est nécessaire. Ceci est particulièrement pertinent dans la gestion des TNE et devient crucial pour ces thérapies coûteuses en temps et en main-d'œuvre (généralement 6-12 mois avec le 177Lu-octréotate)[84]. Actuellement, l'évaluation de l'efficacité de la PRRT peut être suivie grâce à l'imagerie couplée à un aSST (Octreoscan®, TEP-TDM au 68Ga-DOTANOC) et la réponse tumorale peut être évaluée sur le dosage de la CgA[40,92] mais les outils prédictifs précoces de la réponse à la PRRT sont rares et le seul indicateur pouvant prétendre à ce rôle est la quantification de la densité de SSTR par l'imagerie métabolique[5]. Aucune étude avant la nôtre n'a permis d'analyser des biomarqueurs associés à une approche dosimétrique dans le cadre des TNE intestinales traitées par 177Lu-DOTATATE.

La mise au point de biomarqueurs moléculaires capables de suivre l'évolution de la maladie au fil du temps revêt une importance clinique particulière compte tenu de la faible précision des biomarqueurs actuels et des limites de l'imagerie (sensibilité et exposition aux radiations) comme indicateur de diagnostic, pronostic, de prédiction de réponse à un traitement et de suivi. C'est pour répondre à ce besoin que cette étude pilote - le protocole GENEbioLuNET a été élaboré.

Cependant, nous avons été limités par le nombre de patients inclus à ce stade de l'analyse dans le cadre de ce travail de thèse, ne nous permettant donc pas de conclure sur la variabilité des biomarqueurs moléculaires étudiés. En revanche, les premiers résultats ont permis de faire apparaitre 3 points importants en matière de faisabilité. Le premier point se rapporte à la complexité organisationnelle qu'implique un tel protocole et à l'encadrement rigoureux nécessaire pour articuler de manière fluide les différents intervenants. Le deuxième point se réfère à la faisabilité d'une technique de qPCR rapide basée sur la quantification d'ARNm réalisée à partir d'une simple biopsie liquide et permettant d'envisager des perspectives concernant d'éventuelles adaptations thérapeutiques. Enfin le troisième point, à la vue des premiers résultats d'analyse de nos patients et en accord avec les données de la littérature, ouvre des perspectives encourageantes dans le cadre d'un traitement par PRRT pour la mise au point de nouveaux biomarqueurs moléculaires.

Bien qu'il soit trop tôt pour conclure, l'analyse de nos premiers résultats a d'ores et déjà pu soulever certains points et a permis de proposer plusieurs pistes de réflexion. Nous espérons que la poursuite du protocole GENEbioLuNET avec l'ajout de nouveaux gènes d'intérêt au panel testé et l'étude des miRNA permettra d'identifier des biomarqueurs moléculaires solides et ouvrira de nouvelles perspectives dans la prise en charge des patients atteints de TNE intestinales.

BIBLIOGRAPHIE

1. Yao, J. C. *et al.* One Hundred Years After 'Carcinoid': Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States. *J. Clin. Oncol.* **26**, 3063–3072 (2008).
2. Kwekkeboom, D. J. *et al.* Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [177 Lu-DOTA 0,Tyr3]octreotate: toxicity, efficacy, and survival. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26**, 2124–2130 (2008).
3. Strosberg, J. *et al.* Phase 3 Trial of ^{177} Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors. *N. Engl. J. Med.* **376**, 125–135 (2017).
4. Haute Autorité de Santé - LUTATHERA (177Lutécium oxodotréotide), radiopharmaceutique. Available at: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2864194/fr/lutathera-177lutecium-oxodotreotide-radiopharmaceutique.
5. Baum, R. P. & Kulkarni, H. R. THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labeled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy - The Bad Berka Experience. *Theranostics* **2**, 437–447 (2012).
6. Fraenkel, M. *et al.* Incidence of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: a systematic review of the literature. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, R153–R163 (2014).
7. Cho, M.-Y. *et al.* Current Trends of the Incidence and Pathological Diagnosis of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors (GEP-NETs) in Korea 2000-2009: Multicenter Study. *Cancer Res. Treat.* **44**, 157–165 (2012).
8. Lepage, C. Incidence and management of malignant digestive endocrine tumours in a well defined French population. *Gut* **53**, 549–553 (2004).
9. Modlin, I. M. *et al.* Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol.* **9**, 61–72 (2008).
10. Lombard-Bohas, C. *et al.* Thirteen-Month Registration of Patients with Gastroenteropancreatic Endocrine Tumours in France. *Neuroendocrinology* **89**, 217–222 (2009).
11. Lepage, C., Rachet, B. & Coleman, M. P. Survival From Malignant Digestive Endocrine Tumors in England and Wales: A Population-Based Study. *Gastroenterology* **132**, 899–904 (2007).
12. Oberg, K., Akerström, G., Rindi, G., Jelic, S. & ESMO Guidelines Working Group. Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines

for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **21 Suppl 5**, v223-227 (2010).

13. Williams, E. THE CLASSIFICATION OF CARCINOID TUMOURS. *The Lancet* **281**, 238–239 (1963).
14. Klöppel, G. Neuroendocrine Neoplasms: Dichotomy, Origin and Classifications. *Visc. Med.* **33**, 324–330 (2017).
15. Saint André JP, Valo I, Guyétant S, Anatomie pathologique des tumeurs neuro-endocrines, *e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie*, 2003, 2 (3) : 47-52
16. Lawrence, B. *et al.* The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **40**, 1–18, vii (2011).
17. Klöppel, G., Perren, A. & Heitz, P. U. The Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Cell System and Its Tumors: The WHO Classification. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1014**, 13–27 (2004).
18. TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition. *Wiley.com* Available at: https://www.wiley.com/en-us/TNM+Classification+of+Malignant+Tumours%2C+8th+Edition-p-9781119263579.
19. Niederle, B. *et al.* ENETS Consensus Guidelines Update for Neuroendocrine Neoplasms of the Jejunum and Ileum. *Neuroendocrinology* **103**, 125–138 (2016).
20. Guillemin, R. & Gerich, J. E. Somatostatin: physiological and clinical significance. *Annu. Rev. Med.* **27**, 379–388 (1976).
21. Lamberts, S. W. J., Krenning, E. P. & Reubi, J.-C. The Role of Somatostatin and Its Analogs in the Diagnosis and Treatment of Tumors. *Endocr. Rev.* **12**, 450–482 (1991).
22. Harris, A. G. Somatostatin and somatostatin analogues: pharmacokinetics and pharmacodynamic effects. *Gut* **35**, S1–S4 (1994).
23. Hoyer, D. *et al.* Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**, 86–88 (1995).
24. Hofland, L. J. & Lamberts, S. W. J. The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocr. Rev.* **24**, 28–47 (2003).
25. Weckbecker, G. *et al.* Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 999–1017 (2003).
26. Reubi, J. C., Laissue, J., Krenning, E. & Lamberts, S. W. Somatostatin receptors in human cancer: incidence, characteristics, functional correlates and clinical implications. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 27–35 (1992).

27. Reubi, J., Waser, B., Schaer, J.-C. & Laissue, J. A. Somatostatin receptor sst1–sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur. J. Nucl. Med.* **28**, 836–846 (2001).
28. GTE - Groupes d'étude des tumeurs endoctrines. Available at: http://www.reseau-gte.org/.
29. van Essen, M., Sundin, A., Krenning, E. P. & Kwekkeboom, D. J. Neuroendocrine tumours: the role of imaging for diagnosis and therapy. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 102–114 (2014).
30. Krenning, E. P. *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.* **20**, 716–731 (1993).
31. Krenning, E. P. *et al.* Localisation of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 242–244 (1989).
32. Ambrosini, V., Campana, D., Tomassetti, P. & Fanti, S. 68Ga-labelled peptides for diagnosis of gastroenteropancreatic NET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **39**, 52–60 (2012).
33. Virgolini, I. *et al.* Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with 68Ga-DOTA-conjugated peptides: 68Ga-DOTA-TOC, 68Ga-DOTA-NOC, 68Ga-DOTA-TATE. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **37**, 2004–2010 (2010).
34. Ansquer C, Métayer D, Imagerie TEP aux analogues de la somatostatine marqués au 68Ga dans les Tumeurs endocrines digestives bien différentiées, CHU Hôtel Dieu Nantes pdf.
35. Khalil, M. M., Tremoleda, J. L., Bayomy, T. B. & Gsell, W. Molecular SPECT Imaging: An Overview. *Int. J. Mol. Imaging* **2011**, 1–15 (2011).
36. Rahmim, A. & Zaidi, H. PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges. *Nucl. Med. Commun.* **29**, 193–207 (2008).
37. Ardill, J. E. S. & Erikkson, B. The importance of the measurement of circulating markers in patients with neuroendocrine tumours of the pancreas and gut. *Endocr. Relat. Cancer* **10**, 459–462 (2003).
38. Eriksson, B., Oberg, K. & Stridsberg, M. Tumor markers in neuroendocrine tumors. *Digestion* **62 Suppl 1**, 33–38 (2000).
39. Massironi, S. *et al.* Plasma chromogranin A response to octreotide test: prognostic value for clinical outcome in endocrine digestive tumors. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 2072–

2078 (2010).

40. Arnold, R. *et al.* Plasma chromogranin A as marker for survival in patients with metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumors. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **6**, 820–827 (2008).
41. Peracchi, M. *et al.* Plasma chromogranin A in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis, enterochromaffin-like cell lesions and gastric carcinoids. *Eur. J. Endocrinol.* **152**, 443–448 (2005).
42. Meijer, W. G., Kema, I. P., Volmer, M., Willemse, P. H. B. & Vries, E. G. E. de. Discriminating Capacity of Indole Markers in the Diagnosis of Carcinoid Tumors. *Clin. Chem.* **46**, 1588–1596 (2000).
43. Feldman, J. M. & O'Dorisio, T. M. Role of neuropeptides and serotonin in the diagnosis of carcinoid tumors. *Am. J. Med.* **81**, 41–48 (1986).
44. O'Toole, D. *et al.* ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Biochemical Markers. *Neuroendocrinology* **90**, 194–202 (2009).
45. Oberg, K. *et al.* Consensus on biomarkers for neuroendocrine tumour disease. *Lancet Oncol.* **16**, e435–e446 (2015).
46. Capdevila, J. *et al.* Molecular biology of neuroendocrine tumors: from pathways to biomarkers and targets. *Cancer Metastasis Rev.* **33**, 345–351 (2014).
47. Kidd, M. *et al.* The role of genetic markers--NAP1L1, MAGE-D2, and MTA1--in defining small-intestinal carcinoid neoplasia. *Ann. Surg. Oncol.* **13**, 253–262 (2006).
48. Kidd, M. *et al.* Utility of molecular genetic signatures in the delineation of gastric neoplasia. *Cancer* **106**, 1480–1488 (2006).
49. Drozdov, I. *et al.* Predicting neuroendocrine tumor (carcinoid) neoplasia using gene expression profiling and supervised machine learning. *Cancer* **115**, 1638–1650 (2009).
50. Parkinson, H. *et al.* ArrayExpress update--from an archive of functional genomics experiments to the atlas of gene expression. *Nucleic Acids Res.* **37**, D868-872 (2009).
51. Kidd, M. *et al.* GeneChip, geNorm, and gastrointestinal tumors: novel reference genes for real-time PCR. *Physiol. Genomics* **30**, 363–370 (2007).
52. Leja, J. *et al.* Novel markers for enterochromaffin cells and gastrointestinal neuroendocrine carcinomas. *Mod. Pathol.* **22**, 261–272 (2009).
53. Shou, J. *et al.* Optimized blood cell profiling method for genomic biomarker discovery using high-density microarray. *Biomarkers* **10**, 310–320 (2005).
54. Gene expression of somatostatin receptor subtypes SSTR2a, SSTR3 and SSTR5 in

peripheral blood of neuroendocrine lung cancer affected patients | SpringerLink. Available at: https://link.springer.com/article/10.1007/s13402-011-0025-9.

55. Modlin, I. M., Drozdov, I. & Kidd, M. The Identification of Gut Neuroendocrine Tumor Disease by Multiple Synchronous Transcript Analysis in Blood. *PLoS ONE* **8**, (2013).
56. Modlin, I. M. *et al.* The NETest: The Clinical Utility of Multigene Blood Analysis in the Diagnosis and Management of Neuroendocrine Tumors. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **47**, 485–504 (2018).
57. Zimmermann, N. *et al.* MicroRNA analysis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and metastases. *Oncotarget* **9**, 28379–28390 (2018).
58. Arvidsson, Y. *et al.* miRNA profiling of small intestinal neuroendocrine tumors defines novel molecular subtypes and identifies miR-375 as a biomarker of patient survival. *Mod. Pathol.* **31**, 1302 (2018).
59. Malczewska, A., Kidd, M., Matar, S., Kos-Kudla, B. & Modlin, I. M. A Comprehensive Assessment of the Role of miRNAs as Biomarkers in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology* **107**, 73–90 (2018).
60. Modlin, I. M., Drozdov, I. & Kidd, M. Gut neuroendocrine tumor blood qPCR fingerprint assay: characteristics and reproducibility. *Clin. Chem. Lab. Med.* **52**, (2014).
61. Référentiel «Tumeurs neuroendocrines du grêle». Available at: http://oncologik.fr/referentiels/interregion/tumeurs-neuroendocrines-du-grele.
62. Cives, M. & Strosberg, J. Radionuclide Therapy for Neuroendocrine Tumors. *Curr. Oncol. Rep.* **19**, (2017).
63. Eisenhauer, E. A. *et al.* New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer* **45**, 228–247 (2009).
64. Van Essen, M., Krenning, E. P., De Jong, M., Valkema, R. & Kwekkeboom, D. J. Peptide Receptor Radionuclide Therapy with radiolabelled somatostatin analogues in patients with somatostatin receptor positive tumours. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* **46**, 723–734 (2007).
65. Kolasińska-Ćwikła, A., Łowczak, A., Maciejkiewicz, K. M. & Ćwikła, J. B. Peptide Receptor Radionuclide Therapy for Advanced Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors - from oncology perspective. *Nucl. Med. Rev.* **21**, (2018).
66. Capello, A., Krenning, E. P., Breeman, W. A. P., Bernard, B. F. & Jong, M. de. Peptide Receptor Radionuclide Therapy In Vitro Using [111In-DTPA0]Octreotide. *J. Nucl. Med.* **44**, 98–104 (2003).
67. Pool, S. E. *et al.* Preclinical and clinical studies of peptide receptor radionuclide

therapy. *Semin. Nucl. Med.* **40**, 209–218 (2010).

68. Bodei, L. *et al.* PRRT genomic signature in blood for prediction of 177Lu-octreotate efficacy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **45**, 1155–1169 (2018).
69. Fiche RCP Lu177 oxodotreotate LUTATHERA.pdf.
70. SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR. Available at: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FsuperscriptIIIfirststrand_pps.pdf&title=U3VwZXJTY3JpcHQgSUlJIEZpcnN0LVN0cmFuZCBTeW50aGVzaXMgU3lzdGVtIGZvciBSVC1QQ1I=.
71. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).
72. van 't Veer, L. J. & Bernards, R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature* **452**, 564–570 (2008).
73. Ćwikła, J. B. *et al.* Circulating Transcript Analysis (NETest) in GEP-NETs Treated With Somatostatin Analogs Defines Therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, E1437-1445 (2015).
74. Bodei, L. *et al.* Measurement of circulating transcripts and gene cluster analysis predicts and defines therapeutic efficacy of peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) in neuroendocrine tumors. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **43**, 839–851 (2016).
75. Edmondson, D. A. *et al.* Transcript Analysis for Internal Biodosimetry Using Peripheral Blood from Neuroblastoma Patients Treated with 131I-mIBG, a Targeted Radionuclide. *Radiat. Res.* **186**, 235–244 (2016).
76. PAXgene_Blood_RNA_Tube_Product_Circular.pdf.
77. Stabilization of mRNA Expression in Whole Blood Samples | Clinical Chemistry. Available at: http://clinchem.aaccjnls.org/content/48/11/1883.short.
78. Wang, J. *et al.* Optimizing RNA extraction yield from whole blood for microarray gene expression analysis. *Clin. Biochem.* **37**, 741–744 (2004).
79. Carrol, E. D. *et al.* Successful downstream application of the Paxgene Blood RNA system from small blood samples in paediatric patients for quantitative PCR analysis. *BMC Immunol.* **8**, 20 (2007).
80. Olmos, D. *et al.* Prognostic value of blood mRNA expression signatures in castration-resistant prostate cancer: a prospective, two-stage study. *Lancet Oncol.* **13**, 1114–1124

(2012).

81. Aziz, H., Zaas, A. & Ginsburg, G. S. Peripheral blood gene expression profiling for cardiovascular disease assessment. *Genomic Med.* **1**, 105–112 (2007).
82. Talwar, S. *et al.* Gene expression profiles of peripheral blood leukocytes after endotoxin challenge in humans. *Physiol. Genomics* **25**, 203–215 (2006).
83. Halperin, D. M. *et al.* The frequency of carcinoid syndrome at neuroendocrine tumor diagnosis: A large population-based study using SEER-Medicare data. *Lancet Oncol.* **18**, 525–534 (2017).
84. Kwekkeboom, D. J. *et al.* Treatment With the Radiolabeled Somatostatin Analog [177Lu-DOTA0,Tyr3]Octreotate: Toxicity, Efficacy, and Survival. *J. Clin. Oncol.* **26**, 2124–2130 (2008).
85. Hervás, I. *et al.* 177Lu-DOTATATE treatment in neuroendocrine tumours. A preliminary study. *Rev. Espanola Med. Nucl. E Imagen Mol.* **36**, 91–98 (2017).
86. Sabet, A. *et al.* Long-term hematotoxicity after peptide receptor radionuclide therapy with 177Lu-octreotate. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **54**, 1857–1861 (2013).
87. Stålberg, P., Westin, G. & Thirlwell, C. Genetics and epigenetics in small intestinal neuroendocrine tumours. *J. Intern. Med.* **280**, 584–594 (2016).
88. TCEB3C a putative tumor suppressor gene of small intestinal neuroendocrine tumors. - PubMed - NCBI. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24351681.
89. Li, S.-C. *et al.* Somatostatin Analogs Treated Small Intestinal Neuroendocrine Tumor Patients Circulating MicroRNAs. *PLOS ONE* **10**, e0125553 (2015).
90. Li, S.-C. *et al.* Roles of miR-196a on gene regulation of neuroendocrine tumor cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **412**, 131–139 (2015).
91. Kwekkeboom, D. J. *et al.* Peptide receptor radionuclide therapy in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Semin. Nucl. Med.* **40**, 78–88 (2010).
92. Namwongprom, S., Wong, F. C., Tateishi, U., Kim, E. E. & Boonyaprapa, S. Correlation of chromogranin A levels and somatostatin receptor scintigraphy findings in the evaluation of metastases in carcinoid tumors. *Ann. Nucl. Med.* **22**, 237–243 (2008).

ANNEXES

Annexe 1 : Le NETest : présentation des 51 gènes du panel

AKAP8L	A kinase (PRKA) anchor protein 8-like
APLP2	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2
ARAF	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog
ARHGEF	40 Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 40
ATP6V1H	ATPase, H+ transporting, lysosomal 50/57kDa, V1 subunit H
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
C21orf7	chromosome 21 open reading frame 7
CD59	CD59 molecule, complement regulatory protein
COMMD9	COMM domain containing 9 CTGF connective tissue growth factor
ENPP4	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4 (putative function)
FAM131A	family with sequence similarity 131, member A
FZD7	frizzled homolog 7 (Drosophila)
GLT8D1	glycosyltransferase 8 domain containing 1
HDAC9	histone deacetylase 9
HSF2	heat shock transcription factor 2
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LEO1	Replicative senescence down-regulated leo1-like protein
MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
MORF4L2	mortality factor 4 like 2 NAP1L1 nucleosome assembly protein 1-like 1
NOL3	nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
NUDT3	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 3
OAZ2	ornithine decarboxylase antizyme 2 PANK2 pantothenate kinase 2
PHF21A	PHD finger protein 21A
PKD1	polycystic kidney disease 1 (autosomal dominant)
PLD3	phospholipase D family, member 3
PNMA2	paraneoplastic antigen MA2
PQBP1	polyglutamine binding protein 1
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
RNF41	ring finger protein 41

RSF1 remodeling and spacing factor 1 RTN2 reticulon 2

SLC18A1 solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 1

SLC18A2 solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2

SMARCD3 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3

SPATA7 spermatogenesis associated 7

SSTR1 somatostatin receptor 1

SSTR3 somatostatin receptor 3

SSTR4 somatostatin receptor 4

SSTR5 somatostatin receptor 5

TECPR2 tectonin beta-propeller repeat containing 2

TPH1 tryptophan hydroxylase 1

TRMT112 tRNA methyltransferase 11-2 homolog (S. cerevisiae); similar to CG12975

VPS13C vacuolar protein sorting 13 homolog C (S. cerevisiae)

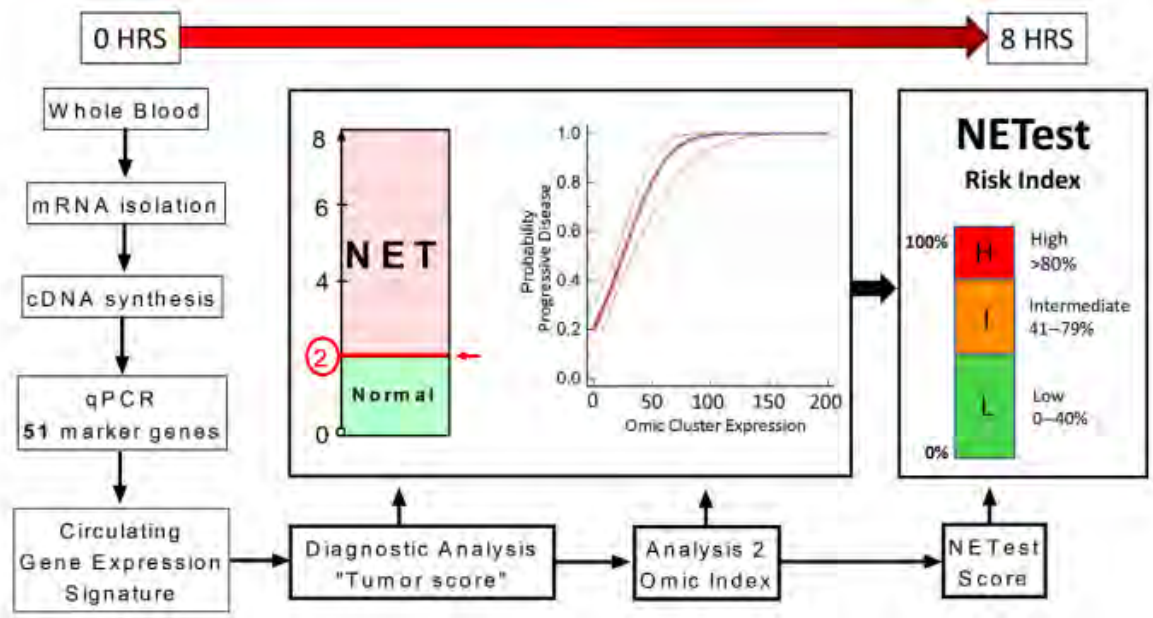
WDFY3 WD repeat and FYVE domain containing 3

ZFHX3 zinc finger homeobox 3; hypothetical LOC100132068

ZXDC ZXD family zinc finger C

ZZZ3 zinc finger, ZZ-type containing 3

<u>Annexe 2</u> : Le principe du NETest[56]



Le protocole en plusieurs étapes utilisé pour fournir un panel d'expression génique multi-analytique pour TNED. Un protocole en deux étapes (isolement de l'ARNm et synthèse de l'ADNc) est entrepris avant l'analyse par qPCR. La signature moléculaire de 51 marqueurs est ensuite analysée à l'aide de 2 analyses algorithmiques mathématiques distinctes afin de permettre deux lectures. Le Tumor Score identifie si l'échantillon est une TNE ou non (score 0–8). Les échantillons notés 0 à 2 sont classés comme normaux et ceux de 3 à 8 sont classés comme des TNE. La deuxième analyse évalue l'expression de groupes définis de gènes impliqués dans les voies TNE biologiquement pertinentes. Les valeurs omiques supérieures ou égales à 50 ont une probabilité d'identification supérieure à 75% une maladie progressive. Ces 2 ensembles d'information sont condensés en un seul score, qui est mis à l'échelle 0% à 100% (le score NETest). La mise à l'échelle est fonction de la pondération du score de classification (analyse 1), par l'expression biologique (omique) liée au statut de la maladie (analyse 2). Le NETest détermine pour un patient spécifique si la tumeur est dans une catégorie de risque faible (<40%), modéré (40% à 79%) ou élevé (80%) d'activité de la maladie. HRS, heures qPCR, PCR quantitative.

<u>Annexe 3</u> : ***Critères RECIST version 1.1 Evaluation de la réponse tumorale (Nouveaux critères RECIST v 1.1)***

"New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1)" E.A. Eisenhauer, P. Therasse, J. Bogaerts, L.H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe, J. Verweij ; Eur J Cancer , 4 5 (2 0 0 9) 2 2 8 –2 4 7.

Lésions à l'inclusion:

Les lésions et les ganglions sont classés individuellement comme étant mesurable ou non mesurable.

Maladie mesurable Pour qu'une lésion soit jugée mesurable, au moins une de ses dimensions doit pouvoir être mesurée de façon précise (la dimension la plus longue, dans le plan de la prise de mesures, devra être rapportée). Pour être mesurables, les lésions doivent présenter une mesure minimum de

♦ ≥ 10 mm au scanner (pour autant que la largeur de bande du CT-scan soit d'au maximum 5 mm)

♦ ≥ 10 mm par examen clinique (mesurable par pied à coulisse) (les lésions qui ne peuvent être mesurées précisément doivent être répertoriées comme étant non-mesurables)

♦ 20 mm par radiographie (=X-ray) du thorax

♦ Pour qu'un ganglion lymphatique malin soit considéré pathologique et mesurable, celui-ci doit présenter un plus petit axe ≥ 15 mm (le plus petit axe étant l'axe perpendiculaire à la plus grande dimension du ganglion). Seule la longueur de ce plus petit axe sera rapportée tant à l'entrée que durant le suivi. Maladie non-mesurable Toutes les autres lésions, incluant les petites lésions (plus grand diamètre < 10 mm au scanner ou les ganglions lymphatiques dont le plus petit axe est ≥ 10 mm et < 15 mm) ainsi que les lésions réellement non-mesurables : maladie leptoméningée, ascite, pleurésie, péricardite, maladie inflammatoire du sein, lymphangites carcinomateuses pulmonaires ou cutanées, les masses abdomino-pelviennes décelées par l'examen clinique mais non confirmées à l'imagerie et les lésions kystiques. Nota bene : les lésions osseuses, les lésions kystiques simples et les lésions ayant précédemment reçu un traitement local nécessitent une considération particulière (cf commentaires ci-dessous). Lésions cibles Les lésions cibles sont sélectionnées parmi les lésions mesurables que présente le malade à l'entrée de l'étude. **Au maximum 5 lésions cibles sont sélectionnées au total avec un maximum de 2 lésions cibles par organe**. La sélection des lésions cibles s'opérera de façon à être représentative de tous les organes envahis, en choisissant les lésions les plus grandes (dans leur plus grande dimension) qui de plus, pourront être suivies tout au long de l'essai avec la méthode utilisée lors de l'examen initial. Les ganglions lymphatiques peuvent être considérés

comme lésions cibles si leur plus petit axe (mesuré au scanner) est ≥ 15 mm. C'est la somme des diamètres de ces lésions cibles (plus grand axe pour les lésions, et plus petit axe pour les ganglions) qui sera suivie au long de l'essai pour évaluer la réponse ou la progression. Lésions non-cibles Toutes les autres lésions sont identifiées comme lésions non-cibles et sont également relevées à l'inclusion. Elles ne sont pas mesurées mais sont suivies tout au long de l'essai.

Critères de réponse au traitement : Lésions cibles :

Réponse complète (RC) : Disparition de toutes les lésions. De plus, tous les ganglions lymphatiques (cible ou non-cible), doivent avoir atteint une dimension < 10 mm dans leur plus petit axe.

Attention : les ganglions sélectionnés comme lésions cibles doivent toujours être mesurés (dimension du plus petit axe dans le plan anatomique utilisé pour l'examen BASELINE), même s'ils diminuent en taille durant l'étude et que leur petit axe devient < 10 mm. Dès lors, lorsque des ganglions sont utilisés comme lésion cible, la « somme » des dimensions des lésions n'est pas nécessairement nulle, même en cas de réponse complète, puisqu'un ganglion normal est défini comme ayant un plus petit axe < 10 mm. Pour obtenir une réponse complète chaque ganglion doit avoir atteint une dimension < 10 mm dans son plus petit axe.

Réponse partielle (RP) : Diminution d'au moins 30 % de la somme des diamètres des lésions cibles par rapport à la somme initiale des diamètres (Examen BASELINE).

Progression (PD) : Augmentation ≥ 20 % de la somme des diamètres des lésions cibles par rapport à la plus petite somme des diamètres observée durant l'étude (NADIR), y compris la visite de baseline. En plus de cette augmentation relative de 20%, cette somme doit augmenter d'au moins 0,5 cm. Nota bene : l'apparition d'une ou plusieurs nouvelles lésions est également considérée comme progression.

Attention : s'il existe une progression par rapport au NADIR et une réponse par rapport à l'examen BASELINE, c'est la progression qui prévaut.

Stabilisation (SD) : Ni RP (ou RC), ni PD. **Lésions non-cibles**

Réponse complète : Disparition de toutes les lésions non-cibles et normalisation des marqueurs tumoraux. Tous les ganglions lymphatiques doivent avoir atteint un petit diamètre < 10 mm. **Réponse incomplète - Stabilisation** : Persistance d'au moins une lésion non-cible et/ou marqueur tumoral au-dessus des normales.

Progression : Augmentation **indiscutable** de la taille des lésions non-cibles ou apparition d'une nouvelle lésion.

Réponse globale :

Lésions cibles	Lésions non-cibles	Nouvelle lésion		Réponse globale
RC	RC	Non	=	**RC**
RC	Non RC/Non PD	Non	=	**RP**
RC	Non évalué	Non	=	**RP**
RP	Non PD ou pas tous évalués	Non	=	**RP**
SD	Non PD ou pas tous évalués	Non	=	**SD**
Pas tous évalués	Non PD	Non	=	**Non-évaluable**
PD	Indifférent	Oui ou non	=	**PD**
Indifférent	PD	Oui ou non	=	**PD**
Indifférent	Indifférent	Oui	=	**PD**

Commentaires relatifs à la mesurabilité des lésions à l'entrée

Lésions osseuses :

♦ l'imagerie par scintigraphie osseuse, PET-scan et « plain films » ne sont pas considérées comme étant adéquates pour la mesure des lésions osseuses. Cependant, ces techniques peuvent être utilisées pour confirmer la présence ou la disparition de lésions osseuses

♦ Les lésions osseuses de type lytique ou de type mélangé lytique-ostéoblastique, qui contiennent une composante identifiable de tissus mous, peuvent être considérés comme des lésions mesurables, pour autant qu'elles puissent être mesurées par des techniques d'imagerie cross-sectionnelle de type CT ou IRM, et que la composante de tissus mous remplissent les conditions de mesurabilité indiquées plus haut. Lésions kystiques :

♦ Les lésions qui correspondent au diagnostic de simple kyste par radiographie ne sont pas considérées comme des lésions malignes (ni mesurables, ni non-mesurables)

♦ Les lésions kystiques de type malin peuvent être prises en compte comme lésion mesurable pour autant qu'elles remplissent les critères de mesurabilité définis plus haut. Cependant, si le patient présente d'autres lésions non kystiques, celles-ci seront préférablement choisies comme lésion cible. Lésions préalablement traitées localement :

♦ Les lésions situées dans une région préalablement irradiée ou ayant reçu une autre thérapie

loco-régionale ne sont en général pas considérées comme étant mesurables, à l'exception des lésions ayant progressé depuis le traitement local. Le protocole de l'étude doit détailler les conditions spécifiques permettant de considérer de telles lésions comme étant mesurables.

Annexe 4 : ***Couples d'amorces utilisés pour le protocole GENEbioLuNET.***

Couples d'amorces	Oligonucléotides	Taille
GAPDHF **GAPDHR**	5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3' 5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'	250
ATPF **ATPR**	5'-GGCGCCTCTGTCATTCTACT-3' 5'-CAACAAATCTCGCGAATCCTC-3'	258
BRAFF **BRAFR**	5'-CTTTCCCCAAATTCTCGCCTC-3' 5'-GGACAGGAAACGCACCATA-3'	180
HDAC9F **HDAC9R**	5'-GACGTGTGGTGTTGGCTCTA-3' 5'-GTGGCTCCAGCTCATTTCCT-3'	102
PANK2F **PANK2R**	5'-CGGCCGCTTTTTCCATGGTT-3' 5'AAGCCACATTGGAGGTCAGG-3'	151
CDKN1BF **CDKN1BR**	5'GGCAAGTACGAGTGGCAAGA-3' 5'AGAAGAATCGTCGGTTGCAGG-3'	270
DDB2F **DDB2R**	5'GGAGGGAACAACTAGGCTGC-3' 5'TTCCAAAGCTCTTTGCCGTC-3'	180
XPCF **XPCR**	5'GAGCAAGGCCCGGCG-3' 5'GAAAGTCCCTGAGGTCATCCC-3'	236
BAXF **BAXR**	5'GGAGCTGCAGAGGATGATTG-3' 5'GGAGACAGGGACATCAGTCG-3'	300

Annexe 5 ***: Liste des miRNA exprimés en fonction du site anatomique***[57]***.***

Site primaire	Pancréas	Iléum	Appendice	Rectum
miRNA Surexprimés	let-7e, miR-126 miR-127, miR-30a-3p, miR-409-3p, miR-539, miR-652 miR-95	Let-7g, miR-16, miR200a, miR-320, miR-324-3p, miR-331, miR-342-3p, miR-744	miR-125b	miR-151-3p
miRNA sous-exprimés	miR-155, miR-193b,miR-28-3p miR-642, miR-886-5p		miR-200c miR-223 miR-24	

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.
Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

AUTEUR : Hélène CATALA
TITRE : Mesure de la variabilité de biomarqueurs moléculaires pouvant caractériser les thérapies radionucléidiques (au 177Lu-DOTATATE) chez des patients atteints de tumeurs neuroendocrines intestinales G1-G2 métastatiques.

DIRECTEUR DE THESE : Pr Frédérique SAVAGNER
LIEU ET DATE DE LA SOUTENANCE : Toulouse, le 12 avril 2019.

RESUME :
La radiothérapie interne vectorisée (RIV) au 177Lu-DOTATATE a montré son efficacité pour améliorer la survie sans progression des tumeurs neuroendocrines (TNE) métastatiques de l'intestin. Il existe un besoin crucial de biomarqueurs performants permettant une identification rapide et précise des réponses thérapeutiques. L'objectif de cette étude pilote est d'évaluer le profil d'expression de transcrits de gènes sélectionnés comme gènes de radiosensibilité ou impliqués dans les processus d'oncogenèse avant et pendant le traitement par 177Lu-DOTATATE. Nous avons analysé les ARNm circulants par RT-qPCR sur sang total à partir d'une biopsie liquide. Les premiers résultats montrent l'intérêt de la technique de qPCR pour monitorer en temps réel la progression de la maladie et l'efficacité thérapeutique par des biomarqueurs moléculaires. A l'heure actuelle, l'étude GENEbioLuNET est toujours en cours d'inclusion et d'expertise afin de pouvoir conclure quant aux meilleurs biomarqueurs à sélectionner.

ABSTRACT
Measuring molecular biomarkers and their capacity to characterize radionuclide therapy (with Lu-177 DOTATATE) in metastatic G1-G2 neuroendocrine midgut tumors.

Vectorized internal radiotherapy using 177Lu-DOTATATE proved its therapeutic efficiency by increasing progression free survival for metastatic midgut neuroendocrine tumors (NET). A critical unmet need is the development of efficient biomarkers to provide information on disease status and response to treatment. This pilot study aims to evaluate gene expression profiling induced by 177Lu-DOTATATE treatment using selected gene transcripts such as those involved in radiosensitivity or oncogenic signatures. We analyzed circulating mRNA using RT-qPCR on liquid biopsy. Preliminary results showed that qPCR analysis of selected molecular biomarkers seemed to be promising for real-time monitoring of disease progress and therapeutic efficacy. At the present time, the GENEbioLuNET study is under progress to increase the number of patients and improve biomarker accuracy.

Mots-clés: TNE intestinale – RIV – 177Lu-DOTATATE – Biomarqueurs moléculaires – Biopsie liquide – ARNm – RT-qPCR – Monitoring – Etude pilote

---

Discipline Administrative : BIOLOGIE MEDICALE

Faculté de Médecine de Rangueil – 133 Route de Narbonne – 31062 TOULOUSE Cedex 04 – FrancE