amU
Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
Le 29 Novembre 2024 par

Emilien BILLON

Exploration du rôle pronostic des checkpoints immuns de la famille des butyrophilines et des lymphocytes T γδ dans le cancer de la prostate

Discipline
Biologie-Santé

Spécialité
Oncologie

École doctorale
ED62 – Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM)
Equipe Immunité et Cancer
Laboratoire d'immunologie des tumeurs
Institut Paoli-Calmettes

Composition du jury

Laurence ALBIGES	**Rapporteuse**
Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France	
Laurent DERRE	**Rapporteur**
CHUV, Lausanne, Suisse	
Clotilde THERY	**Présidente du jury**
Institut Curie, Paris, France	
Éric TARTOUR	**Examinateur**
HEGP, Paris, France	
Daniel OLIVE	**Directeur de thèse**
CRCM, IPC, Marseille, France	
Gwenaëlle GRAVIS	**Membre invité**
Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France	

CRCM CENTRE DE RECHERCHE EN CANCÉROLOGIE Marseille

INSTITUT PAOLI-CALMETTES unicancer Marseille

Affidavit

Je soussigné, Emilien BILLON, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Daniel OLIVE, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 16 septembre 2024

Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Affidavit

I, undersigned, Emilien BILLON, hereby declare that the work presented in this manuscript is my own work, carried out under the scientific supervision of Daniel OLIVE, in accordance with the principles of honesty, integrity and responsibility inherent to the research mission. The research work and the writing of this manuscript have been carried out in compliance with both the French national charter for Research Integrity and the Aix-Marseille University charter on the fight against plagiarism.

This work has not been submitted previously either in this country or in another country in the same or in a similar version to any other examination body.

Place Marseille, date 16 septembre 2024

Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et/ou brevets et participation aux conférences

1) Liste des publications et/ou brevets [1] réalisés dans le cadre du projet de thèse :

   1. ***« Soluble BTN2A1 is a potential prognosis biomarker in pre-treated advanced renal cell carcinoma »***
      Frontiers in Immunology, 2021 (Research Article)
      Emilien Billon, Brice Chanez, Philippe Rochigneux, Laurence Albiges, Cécile Vicier, Géraldine Pignot, Jochen Walz, Anne Sophie Chretien, Gwenaelle Gravis, Daniel Olive.
   2. **« Hétérogénéité et impact en cancérologie des checkpoints immuns solubles »**
      La Revue Immunité et Cancer, 2023 (Article de revue)
      Emilien Billon, Laurent Gorvel, Daniel Olive
   3. ***« Immunothérapies dans le cancer de la prostate : contourner l'immunosuppression pour traiter le cancer »***
      La Revue Immunité et Cancer, 2023
      Emilien Billon, Daniel Olive, Gwenaëlle Gravis.
   4. ***« BTN2A1 acquisition through trogocytosis enhances Vγ9Vδ2 T cell cytotoxicity against autologous and cancer cells »***
      Research article, en cours de soumission
      Emilien Billon, Caroline Imbert, Damien Bruyat, Pierre Grassi, Lucie Robert, Téo Fernez, Philippe Livrati, Amira Ben Amara, Marie-Sarah Rouvière, Manon Richaud, Nicolas Boucherit, Jacques A. Nunès, Renaud Sabatier, Éric Lambaudie, Anne-Sophie Chrétien, Gwenaëlle Gravis, Laurent Gorvel, Daniel Olive
   5. **« Tertiary lymphoid structures are associated with enhanced macrophage activation, immune checkpoint expression and predict outcome in cervical cancer »**
      Research article, en cours de soumission
      Laurent Gorvel, Marylou Panouillot, Marie-Sarah Rouvière, Emilien Billon, Stéphane Fattori, Jumaporn Sonongbua, Nicolas Boucherit, Amira Ben Amara, Olivia Quilichini, Samuel Granjeaud, Clara Degos, Jacques Nunès, Xavier Carcopino, Eric Lambaudie, Anne-Sophie Chrétien, Renaud Sabatier, Marie-Caroline Dieu-Nosjean, Daniel Olive

[1] Cette liste comprend les articles publiés, les articles soumis à publication et les articles en préparation ainsi que les livres, chapitres de livre et/ou toutes formes de valorisation des résultats des travaux propres à la discipline du projet de thèse. La référence aux publications doit suivre les règles standards de bibliographie et doit être conforme à la charte des publications d'AMU.

2) Participation aux conférences[2] et écoles d'été au cours de la période de thèse :
    1. PhD Day de Ecole Doctorale 62 Année 2022. Présentation orale.
    2. Annual Meetings of the French Society for Immunology (SFI) and the French Cytometry Association (AFC) (SFI-AFC 2022) (22 novembre 2022 - 24 novembre 2022) SFI/AFC (Nice)
    3. Congrès annuel du Cancéropole PACA 2023, Saint Raphael, France. Présentation d'un poster. Prix du Poster Recherche Translationnelle.
    4. PhD day de Ecole Doctorale 62 Année 2023. Présentation d'un Poster. 1er Prix du Poster.
    5. 26e congrès annuel – Association Francaise de Cytométrie 2023 (15 novembre 2023 - 17 novembre 2023) Association Francaise de Cytométrie, Toulouse
    6. 2024 ASCO Genitourinary Cancers Symposium (25 janvier 2024 - 27 janvier 2024) American Society of Clinical Oncology, San Francisco. Présentation d'un Poster.

[2] Le terme « conférence » est générique. Il désigne à la fois « conférence », « congrès », « workshop », « colloques », « rencontres nationales et/ou internationales » … etc.

Indiquer si vous avez fait une présentation orale ou sous forme de poster.

Résumé

Le cancer de la prostate est le premier cancer en termes d'incidence chez l'homme en France. Malgré les progrès thérapeutiques récents en oncologie, le cancer de la prostate métastatique reste une maladie incurable, le classant au 5ème rang des décès par cancer. Dans le contexte d'échec des immunothérapies dans cette pathologie, il parait nécessaire d'identifier de nouveaux biomarqueurs immunitaires afin de mieux stratifier les patients pour améliorer leur traitement, mais également explorer leur potentiel en tant que cible thérapeutique. L'objectif principal de ce projet de thèse est d'identifier de potentiels nouveaux biomarqueurs immuns à partir de biopsies liquides dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible et d'élucider les mécanismes associés.

Ces travaux nous ont permis d'identifier la forme plasmatique, soluble, de BTN2A1, un checkpoint associé à la régulation des lymphocytes T Vγ9Vδ2, comme un biomarqueur potentiel associé à un pronostic défavorable à partir d'une cohorte de 66 patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique hormonosensible. Nous avons montré que les vésicules extracellulaires BTN2A1^{+} pouvaient interagir spécifiquement avec les lymphocytes T Vγ9Vδ2 et altérer leurs fonctions effectrices, cytotoxiques ou de recrutement dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. La présence de ces vésicules extracellulaires était également associée à des altérations phénotypiques des lymphocytes T Vγ9Vδ2 chez les patients pouvant expliquer le pronostic défavorable de la forme soluble de BTN2A1 chez ces patients. Ce travail nous a également permis de mieux appréhender certains mécanismes de régulation de l'expression de BTN2A1 à la surface des cellules immunes. Nous avons montré qu'il existait des échanges membranaires, appelés trogocytose, impliquant BTN2A1, entre les populations lymphoïdes et myéloïdes. Cette augmentation d'expression de BTN2A1 sur les cellules lymphoïdes était associée à une plus grande susceptibilité à la lyse par les lymphocytes T Vγ9Vδ2 autologues, et permettait de rendre sensible à la lyse par les lymphocytes T Vγ9Vδ2 des cellules Daudi BTN2A1 KO, conçues pour leur être insensible.

La forme soluble de BTN2A1 semble être un biomarqueur d'intérêt dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible. Nos résultats mettent en évidence le rôle des lymphocytes T γδ dans l'immunité antitumorale du cancer de la prostate, ce qui en fait une cible intéressante d'immunothérapie dans cette pathologie.

Mots clés : Cancer de la prostate ; Lymphocytes T γδ ; Butyrophilines ; Immunomonitoring ; Vésicules extracellulaires ; Trogocytose

Abstract

Prostate cancer is the first cancer in men in France. Despite recent therapeutic advances in oncology, metastatic prostate cancer remains an incurable disease, representing the fifth cause of cancer deaths. In the context of immunotherapy failure, we need to identify new immune biomarkers in order to improve patient therapy, and explore their potential as therapeutic targets. The main objective of this project was to identify potential new immune biomarkers from liquid biopsies in hormone-sensitive metastatic prostate cancer and to elucidate the associated mechanisms.

In this work, we identified the soluble plasma form of BTN2A1, a checkpoint associated with the regulation of Vγ9Vδ2 T lymphocytes, as a potential biomarker associated with an unfavorable prognosis in a cohort of 66 patients with hormone-sensitive metastatic prostate cancer. We showed that BTN2A1^{+} extracellular vesicles could interact specifically with Vγ9Vδ2 T lymphocytes and alter in *in vitro* and *in vivo* their cytotoxic or recruitment functions. The presence of these extracellular vesicles was also associated with phenotypic alterations of Vγ9Vδ2 T cells in patients, which may explain the unfavorable prognosis of the soluble form of BTN2A1 in this cohort.

This work also allowed us to better understand mechanisms regulating the expression of BTN2A1 on immune cells. We showed that there were membrane exchanges, called trogocytosis, involving BTN2A1, between lymphoid and myeloid populations. This increase in BTN2A1 expression on lymphoid cells was associated with a higher susceptibility to lysis by autologous Vγ9Vδ2 T lymphocytes, and restored Daudi BTN2A1 KO cells sensitivity to Vγ9Vδ2 T lymphocyte lysis.

The soluble form of BTN2A1 appears to be a biomarker of interest in hormone-sensitive metastatic prostate cancer. Our results highlight the role of γδ T lymphocytes in the antitumor immunity of prostate cancer, which makes them an interesting target for immunotherapy in this pathology.

Keywords : Prostate cancer ; γδ T cells ; Butyrophilin ; Immunomonitoring ; Extracellular vesicles ; Trogocytosis

Remerciements

*Au Professeur **Daniel OLIVE**, qui m'a encadré depuis mon Master 2 au sein de son équipe, qui m'a donné les moyens intellectuels, techniques et matériels pour mener à bien ce projet ; pour nos échanges et conseils au cours de ces années et pour les opportunités crées. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de la concrétisation de ce beau projet.*

*Au Docteur **Gwenaëlle GRAVIS**, mon mentor depuis mes débuts, autant sur le plan médical que scientifique. Pour la confiance que vous m'accordez depuis toutes ces années et votre soutien sans faille. C'est un plaisir de pouvoir travailler à vos côtés.*

*Aux membres du jury, au Docteur **Clothilde THERY**, pour avoir accepté de présider ce jury et d'examiner ce travail de thèse. Au Professeur **Laurence ALBIGES** pour avoir accepté avec enthousiasme de juger ce travail. Au Professeur **Éric TARTOUR**, pour les échanges constructifs et conseils prodigués lors de mon comité de suivi de thèse et pour votre participation à ce jury. Au Docteur **Laurent DERRE**, pour nos échanges enrichissants au cours de ce projet et pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail de thèse.*

*Au Professeur **Anthony GONÇALVES**, qui m'a témoigné son soutien tout au long de ce projet et qui m'a laissé l'opportunité de le concrétiser dans les meilleures conditions possibles. Je vous remercie également pour vos conseils scientifiques dans le cadre de mon comité de suivi de thèse, mais également professionnels.*

*Aux Docteurs **Anne-Sophie CHRETIEN**, **Jacques NUNES** et au Professeur **Raynier DEVILLIER**, pour les conseils, critiques et commentaires pendant les labmeetings, leur bienveillance et leur encadrement au quotidien.*

A l'ensemble des membres de l'équipe, actuels ou passés, pour lesquels ces quelques mots ne suffiront pas à traduire l'estime et reconnaissance que je leur porte. Je tenais à vous remercier pour l'accueil que vous m'avez fait et pour la place que vous me réservez au sein de l'équipe.

***Amira**, toujours là pour moi, dans les moments de réussite comme les moments de doute. Pour les moments partagés ensemble, nos discussions légères (parfois très légères) et profondes (parfois très profondes) et tous les conseils que tu m'as donnés tout au long de ces années.*

***Marie Sarah**, qui m'a tellement appris au cours de ces années. Toujours disponible quand on a besoin, toujours souriante, toujours volontaire, toujours le swag. C'est un plaisir de faire des manips avec toi. Merci pour ton aide au quotidien.*

***Laurent**, mon complice de sciences comme… de non sciences. Sans toi je n'aurai pas pu en arriver là. Tu es un vrai moteur pour l'équipe, toujours disponible pour aider et faire avancer les gens. C'est un bonheur de travailler avec toi au quotidien. Mais ne crois pas que j'arrêterai de venir te voir en te disant « Je crois que j'ai une idée… ».*

***Caroline**, pour tes précieux conseils et pour tout ce que tu m'as appris, tant sur le plan scientifique que technique.*

***Flo** et **Philou**, bien plus que des techniciens, des piliers. Leur bienveillance à mon égard n'a d'égal que leur bonne humeur (bon ça dépend des jours !). Merci pour tous vos conseils et votre disponibilité pendant ma thèse.*

***Sylvaine** et **Bernadette**, qui avaient assister à mes débuts, merci pour votre soutien et pour m'avoir montré comment fonctionne un labo.*

***Anne Charlotte**, **Stéphane**, **Clémence**, **Nassim** et **Julia**, pour cette partie d'aventure partagée en votre compagnie.*

***Aude**, **Nicolas**, **Lucie** et **Diane**, pour vos conseils en tout genre et nos conservations enflammées plus ou moins sérieuses.*

***Téo** et **Oumar** (oui je me devais de vous mettre sur la même ligne), un plaisir d'échanger ensemble et de partager un morceau de PSM avec vous, en espérant que cela puisse continuer encore quelques années.*

***Françoise**, toujours un plaisir de trier avec toi ! Et de boire un café, même quand tu me piques ma chaise.*

***Manon**, pour les connaissances que tu m'as apportées en cytométrie et m'avoir laissé expérimenter et développer de nouvelles techniques d'analyses avec ton aide. Promis l'Aurora va bien !*

***Damien**, pour son travail accompli avec moi cette année. En espérant t'avoir transmis l'envie de continuer dans la recherche.*

A l'ensemble du personnel au CRCM qui nous permettent de travailler au quotidien dans les meilleures conditions.

A ma famille, à mes amis qui me soutiennent et me supportent depuis toutes ses années et sans qui rien de cela aurait été possible. Promis, je m'arrête là dans les études, 14 ans ça suffit !

Aux patients, pour lesquels nous faisons tout ça.

Table des matières

Affidavit 2
Affidavit 3
Liste de publications et/ou brevets et participation aux conférences 4
Résumé 6
Abstract 7
Remerciements 8
Table des matières 11
Liste des figures 15
Liste des tables 17
Abréviations 19
Introduction 21
I. Le cancer de la prostate 21
1. Définitions et épidémiologie 21
2. Physiopathologie du cancer de la prostate 23
3. Stratégie diagnostique 27
4. Traitements du cancer de la prostate 33
5. Enjeux actuels dans la prise en charge des patients et objectif global du travail de thèse 45
II. Le système immunitaire, un allié dans le cancer de la prostate métastatique ? 48
1. Concepts généraux 48
2. Immunogénicité du cancer de la prostate 52
3. Place de l'immunothérapie dans le traitement du cancer de la prostate 57
4. Vers l'étude de nouvelles cibles dans le cancer de la prostate 85
III. Lymphocytes T Vγ9Vδ2 et leur implication en cancérologie 87
1. Origine et développement des lymphocytes T γδ 88
2. Fonctions des lymphocytes T γδ 89
3. Activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 90
4. Modulation d'activité à visée thérapeutique 96
IV. Les checkpoints immuns solubles : formes et rôles en cancérologie 98
1. L'hétérogénéité des checkpoints solubles en cancérologie 98
2. Checkpoints solubles et vésicules extracellulaires 99

3. Valeur pronostique des checkpoints solubles en cancérologie 102
Objectifs des travaux de recherche 105
PARTIE I: Les vésicules extracellulaires BTN2A1+ sont associées à un pronostic défavorable et altèrent les fonctions des lymphocytes T Vγ9Vδ2 dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible 107
Matériels et méthodes 109
I. Collection des échantillons biologiques humains 109
Protocole NKProstate-IPC2015-019 109
II. Exploration des formes solubles des checkpoints immuns 110
1. Détermination des concentrations des checkpoints solubles dans les fluides biologiques 110
2. Caractérisation des vésicules extracellulaires à partir des différents fluides biologiques .. 110
III. Caractérisations des populations immunes à partir des PBMC de patients par cytométrie spectrale 113
1. Protocole de marquage des échantillons 113
2. Panels utilisés 114
3. Pipeline d'analyses 114
IV. Expérimentations in vitro 116
1. Cultures cellulaires 116
2. Génération des lignées HEK293T BTN2A1KO et BTN2A1 surexprimé 116
3. Expansion de lymphocytes T Vγ9Vδ2 117
4. Tests fonctionnels in vitro 117
5. Modèle murin 118
V. Statistiques 119
Résultats 120
I. La forme soluble de BTN2A1 est un biomarqueur pronostique dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible 120
1. Caractéristiques des patients inclus dans le protocole NK-Prostate 120
2. sBTN2A1 est un facteur pronostique dans le cancer de la prostate hormonosensible 121
II. BTN2A1 peut être identifié à la surface de vésicules extracellulaires dans le plasma de patients atteints de cancer de la prostate métastatique hormonosensible 123
III. Les vésicules extracellulaires BTN2A1+ interagissent avec les lymphocytes T Vγ9Vδ2 et altèrent leurs fonctions 128
IV. Les vésicules extracellulaires BTN2A1+ dérivées des lymphocytes B sont associées à un pronostique défavorable dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible 133
V. Les vésicules extracellulaires BTN2A1+ dérivées des lymphocytes B sont associées à des altérations phénotypiques des lymphocytes T Vγ9Vδ2 dans le cancer de la prostate hormonosensible 136
Discussion 140

1. Synthèse et limites de l'étude clinique 140
2. Impact de la forme soluble de BTN2A1 141
3. Caractérisation des vésicules extracellulaires 142
4. Vésicules extracellulaires et cancer de la prostate 143
5. Place des lymphocytes B dans le cancer de la prostate 144
6. L'immunomodulation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 : une nouvelle piste dans le cancer de la prostate métastatique ? 145
7. Perspectives générales 146

PARTIE 2: BTN2A1 acquisition through trogocytosis enhances Vγ9Vδ2 T cell cytotoxicity against autologous and cancer cells 149

PARTIE 3: Soluble BTN2A1 Is a Potential Prognosis Biomarker in Pre-Treated Advanced Renal Cell Carcinoma 185

Conclusions générales et perspectives 193

Bibliographie 195

Annexe 1: Hétérogénéité et impact en cancérologie des checkpoints immuns solubles 214

Annexe 2. Poster présenté à l'ASCO GenituUrinary Congress, San Francisco, USA, 25-27 Janvier 2024 223

Liste des figures

Figure 1. Types de cancers les plus fréquents chez l'homme en termes d'incidence

Figure 2 : Anatomie de la prostate

Figure 3. Aspects anatomopathologiques de tissu prostatique sain et d'un cancer de la prostate

Figure 4. Action des androgènes

Figure 5. Principales voies de résistance à la castration

Figure 6. Stratégie diagnostique devant une élévation du PSA

Figure 7. Figure 7. Adénocarcinome prostatique. Grade histologique selon Gleason

Figure 8. Axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope et modulation pharmacologique dans le cancer de la prostate

Figure 9. Stratégie thérapeutique dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible

Figure 10. La régulation lymphocytaire par checkpoints immuns

Figure 11. Microenvironnement immun du cancer de la prostate

Figure 12. Infiltration tumorale en lymphocytes T γδ et association avec le pronostic

Figure 13. Place des lymphocytes T γδ parmi les cellules de l'immunité

Figure 14. Stades de développement des lymphocytes T

Figure 15 : Mécanismes d'action des lymphocytes T γδ dans le microenvironnement tumoral

Figure 16. Structures des principaux phosphoantigènes naturels et synthétiques

Figure 17. Voie du mévalonate

Figure 18. Structure des principaux aminobisphosphonates

Figure 19. Structure des BTN et BTNL

Figure 20. Structure des Butyrophilines et Butyrophilines-like

Figure 21. Biogénèse des vésicules extracellulaires et dissémination

Figure 22. Détection des billes Mégamix-Plus SSC sur cytomètre spectral Aurora

Figure 23. Mesure de l'expression de BTN2A1 à la surface des vésicules extracellulaires en fonction des différents marqueurs d'origine

Figure 24. Stratégie de gating manuel utilisée pour isoler les grandes populations immunes dans le panel 2 T/NK

Figure 25. Mesure de la concentration de différents checkpoints solubles dans le plasma de patients atteints de cancer de la prostate métastatique hormonosensible au diagnostic

Figure 26. Evaluation de la survie sans progression et de la survie globale en fonction du taux de BTN2A1 soluble au diagnostic

Figure 27. Expression de BTN2A1 à la surface des lignées de cancer de prostate

Figure 28. Mesure de la concentration en BTN2A1 dans le surnageant de culture de lignées de cancer de la prostate

Figure 29. Caractérisation par cytométrie spectrale des vésicules extracellulaires du surnageant de culture des différentes lignées de cancer de la prostate

Figure 30. Caractérisation par cytométrie spectrale des vésicules extracellulaires dans le plasma de patients atteints de cancer de prostate métastatique d'emblée (n = 6) ou de volontaires sains (n = 9).

Figure 31. Génération des lignées HEK293T BTN2A1 surexprimé

Figure 32. Caractérisation des vésicules extracellulaires dérivées des lignées HEK293T BTN2A1 KI WT et Mut

Figure 33. Interaction des vésicules extracellulaires BTN2A1 KI avec les lymphocytes T Vγ9Vδ2

Figure 34. Cytotoxicité des lymphocytes T Vγ9Vδ2+ contre les lignées tumorales de cancer de la prostate

Figure 35. Evaluation in vivo de l'effet des vésicules extracellulaires BTN2A1+ sur les lymphocytes T Vγ9Vδ2

Figure 36. Phénotype étendu des vésicules extracellulaires BTN2A1+

Figure 37. Production de vésicules extracellulaires par les lymphocytes B au cours de leur activation

Figure 38. Clusterisation des différentes populations lymphocytaires circulantes

Figure 39. Les altérations des lymphocytes T Vγ9Vδ2 circulants contribuent à discriminer les patients avec un score B faible et un score B haut

Figure 40. Altérations phénotypiques des lymphocytes T Vγ9Vδ2 associées à la présence de vésicules extracellulaires BTN2A1+

Liste des tables

Table 1. Classification histologique de l'ISUP

Table 2. Valeur seuil du PSA définissant la récidive biologique ou l'échec biologique

Table 3. Classification des patients atteints de cancer de la prostate métastatique hormonosensible

Table 4. Principaux essais de phase III évaluant les « hormonothérapies de nouvelle génération » dans le traitement du cancer de la prostate hormonosensible

Table 5. Caractéristiques des patients de la cohorte NK-Prostate

Table 6. Analyse multivariée de la survie globale par régression de Cox

Abréviations

ADCP : Antibody-dependent cellular phagocytosis

ADCC : Antibody-dependent cellular cytotoxicity

ADN : Acide désoxyribonucléique

AF : Alexa Fluor

AMM : Autorisation de mise sur le marché

AFU : Association Française d'Urologie

ADT : Androgen Deprivation Therapy

APC : Allophycocyanin

AREs : Androgen response elements

ARN : Acide ribonucléique

BCR : B cell receptor

BV : Brilliant Violet

BUV : Brilliant Ultra Violet

CAF : Cancer associated fibroblasts

CLP : Couche Leuco plaquettaire

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

Cy : Cyanine

DHT : Dihydrotestostérone

DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate

ELISA : Enzyme link Immunosorbent assay

EVs : Extracellular vesicles / Vésicules extracellulaires

FDA : Food and Drud administration

FITC : IsoThioCyanate de Fluorescéine

HMBPP : (E)-4-hydroxy-3-méthyl-but-2-ényl-pyrophosphate

HSP : Heat Shock Protein

HR : Hazard ratio

IFN : Interféron

IL : Interleukines

OS : Overall Survival

IPP : Isopentenyl pyrophosphate

IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique

ISUP : International Society of Urological Pathology

LH-RH : Luteinizing hormone-releasing hormone

MDSCs : Myeloid-derived suppressor cells

MMP : Métalloprotéases

MMR : Mismatch repair

PAgs : Phosphoantigènes

PBMC : Peripheral blood mononuclear cell

PBS : Phosphate Saline Buffer

PD-1 : Programmed death 1

PD-L1 : Programmed death ligand 1

PE : Phycoerythrine

PFS : Progression-free survival

PSA : Prostate specific antigen

RECIST : Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

SHBG : Sex hormone binding globulin

SVF : Serum de veau foetal

TAM : Tumor associated macrophages

TCR : T cell receptor

TILs : Tumor infiltrating lymphocytes

TLR : Toll-like receptor

TMB : Tumor mutational burden

TME : Tumor microenvironment

TNF : Tumor necrosis factor

UV : UltraViolet

Introduction

I. Le cancer de la prostate

1. Définitions et épidémiologie

a. Epidémiologie

Le cancer de la prostate est un des cancers les plus fréquents dans le monde, avec plus de 1,4 millions de cas diagnostiqués en 2020, correspondant à 7.3% de l'ensemble des cancers diagnostiqués (Données GLOBOCAN (1)). Il s'agit du premier cancer en termes d'incidence chez l'homme dans plus de la moitié des pays étudiés (112/185) (**Figure 1**). Avec plus de 375 000 décès, il se classe à la 5ème place des cancers les plus meurtriers.

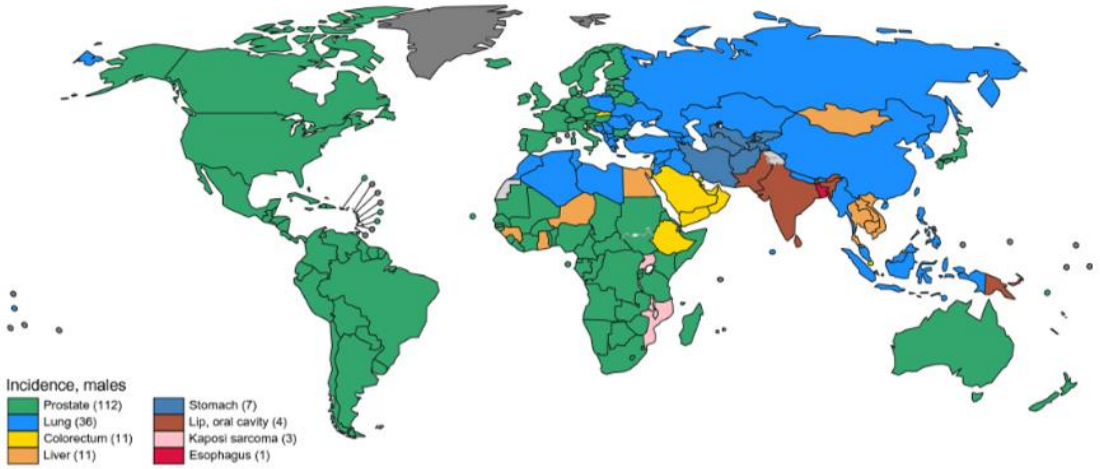


Figure 1. Types de cancers les plus fréquents chez l'homme en termes d'incidence (Données GLOBOCAN). *Entre parenthèse dans la légende, le nombre de pays concernés*

b. Facteurs de risque du cancer de la prostate

L'âge est un facteur de risque important de cancer de la prostate, avec un âge médian au diagnostic en France de 69 ans en 2018 et 79% des décès survenant après 75ans (Données Inca, (2)). L'hérédité joue également un rôle important, avec des formes monogéniques de cancer de la prostate (rares, < 5% des cas), et des formes polygéniques (les plus fréquentes). Les formes héréditaires de cancer de la prostate seront détaillée *Section 3b*. L'origine ethnique a également une influence forte sur le cancer de la prostate. Aux Antilles françaises – où 90% de la population à des origine africaines – l'incidence du cancer de la prostate et la mortalité sont deux fois plus élevées qu'en France métropolitaine (respectivement 173/100 000 pour l'incidence et 23/100 000 pour la mortalité selon le rapport publié par Santé Publique France en 2019).

D’autres facteurs de risques, considérés comme « modifiables » ont été décrits ou suspectés :

- L’exposition aux pesticides utilisés dans les milieux de travail agricoles est associé à un plus haut risque de cancer de la prostate, permettant la reconnaissance du cancer de la prostate comme maladie professionnelle depuis 2021.

- L’exposition professionnelle au cadmium (fabrication de piles) semble également majorer le risque de cancer de la prostate.

- Certaines études suggèrent également que l’inflammation chronique de la prostate, appelée prostatite aigue, pourrait également augmenter le risque de cancer (3) ; mais des résultats contradictoires ont été publiés.

- Le rôle du surpoids et de l’obésité est également controversé. De larges études ont montré un risque accru de cancer de la prostate chez les hommes avec un indice de masse corporel > 30kg/m^2 (4,5). D’autres études n’ont en revanche pas confirmé cette association. Le lien de causalité n’est pas démontré, il est suggéré que cette majoration du risque de cancer puisse être liée aux perturbations hormonales associées à l’obésité (insulinoresistance, leptin, IGF-1) ou bien aux habitudes alimentaires des patients.

c. Anatomie du cancer de la prostate

La prostate est un organe glandulaire masculin, située dans le pelvis (**Figure 2A**), sous la vessie et en avant du rectum. Elle entoure l’urètre, qui conduit l’urine de la vessie jusqu’à l’extérieur du corps. Elle se compose de 4 parties (**Figure 2B**) :

- La *zone périphérique*, correspondant à la plus grande partie de la glande, recouvrant les faces latérales et postérieures, qui est le siège préférentiel du cancer de la prostate.
- La *zone transitionnelle*, au centre de la glande, dont le « grossissement » avec l’âge est responsable de l’hypertrophie bénigne de la prostate.
- Une *zone centrale*, entourant les canaux éjaculateurs.
- Une *zone fibromusculaire* antérieure.

La grande majorité des tumeurs de la prostate se développe au dépend de la zone périphérique (75%), le reste se développera au niveau de la zone transitionnelle.

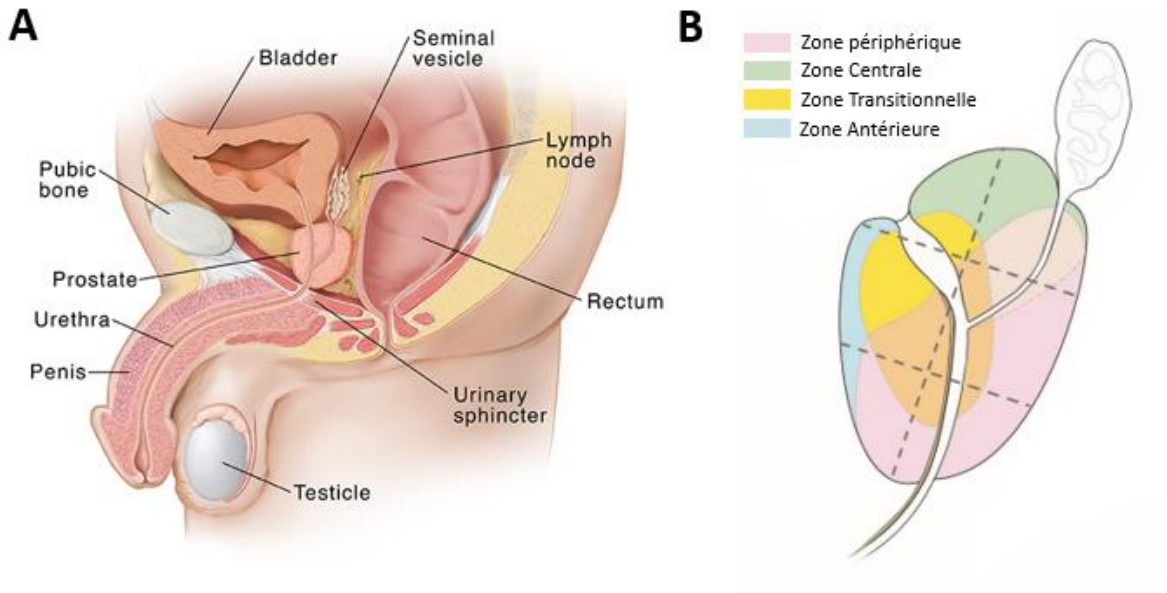


Figure 2 : Anatomie de la prostate.

(A) *Position globale (adapté de Saint Luke's Prostate anatomy* (6)*)* ***(B)*** *Anatomie de la prostate (adapté de PI-RADS , American College of Radiology)*

2. Physiopathologie du cancer de la prostate

a. Anatomopathologie

Le tissu glandulaire prostatique est constitué de plusieurs unités sécrétoires (acini), constituées de conduits bordés de cellules épithéliales, qui convergent et s'ouvrent de chaque côté du veru montanum. Ses principales fonctions sont de fournir la force nécessaire pour éjaculer le sperme et d'ajouter un liquide alcalin riche en nutriments au sperme pour maintenir la santé spermatique après l'éjaculation et améliorer la fertilité (7). La carcinogenèse prostatique est étroitement liée à l'organogenèse sur le plan embryologique, avec une forte dépendance à l'égard de la signalisation des androgènes, comme la testostérone, ainsi que des liens potentiels débattus avec d'autres voies de signalisation embryonnaires telles que l'expression de Sonic Hedgehog (Shh) (8).

Les tumeurs prostatiques se développent principalement au niveau du tissu épithélial, conduisant ainsi au développement de carcinome. Il a également été décrit des sarcomes ainsi que des lymphomes prostatiques, rares (9). L'épithélium prostatique est composé de cellules luminales (exprimant le récepteur aux androgènes et produisant le PSA), les cellules basales et les cellules neuroendocrines (à la base de l'épithélium, n'exprimant pas le récepteur aux androgènes) (10). Environ 90 à 95% des tumeurs de prostate sont des adénocarcinomes acinaires (11). Le diagnostic histologique est établi sur la perte des cellules basales environnantes, la perte de l'architecture glandulaire normale, y compris

la perturbation de la membrane basale, ainsi que les atypies nucléaires des cellules luminales (12) (**Figure 3**).

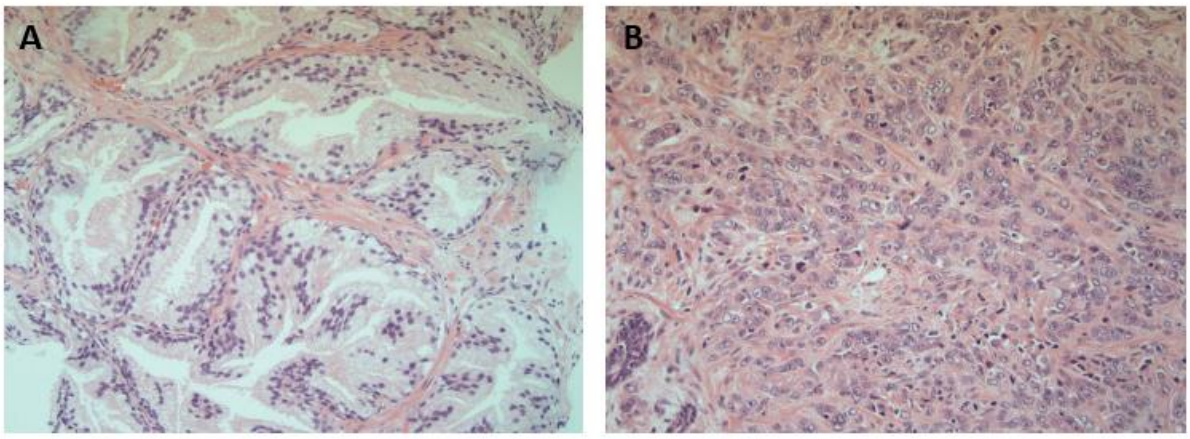


Figure 3. Aspects anatomopathologiques de tissu prostatique sain (A) et d'un cancer de la prostate (B). *Adapté de The pathogenesis of prostate Cancer* (13)

b. Régulation androgénique du cancer de la prostate

Le récepteur aux androgènes est un facteur de transcription indispensable au développement des organes sexuels masculins, et des caractères sexuels secondaires ainsi qu'à leur maintenance. Le développement du cancer de la prostate est également dépendant du récepteur aux androgènes (14).

La testostérone ou la dihydrotestostérone vont induire, après fixation, la translocation du récepteur aux androgènes vers le noyau cellulaire où il pourra interagir avec des séquences d'ADN spécifiques, les « androgen response elements » (AREs, contrôlant la transcription de gènes de différentiation, prolifération ou apoptose (**Figure 4**). La stimulation androgénique est indispensable à la survie et au fonctionnement des cellules luminales prostatiques.

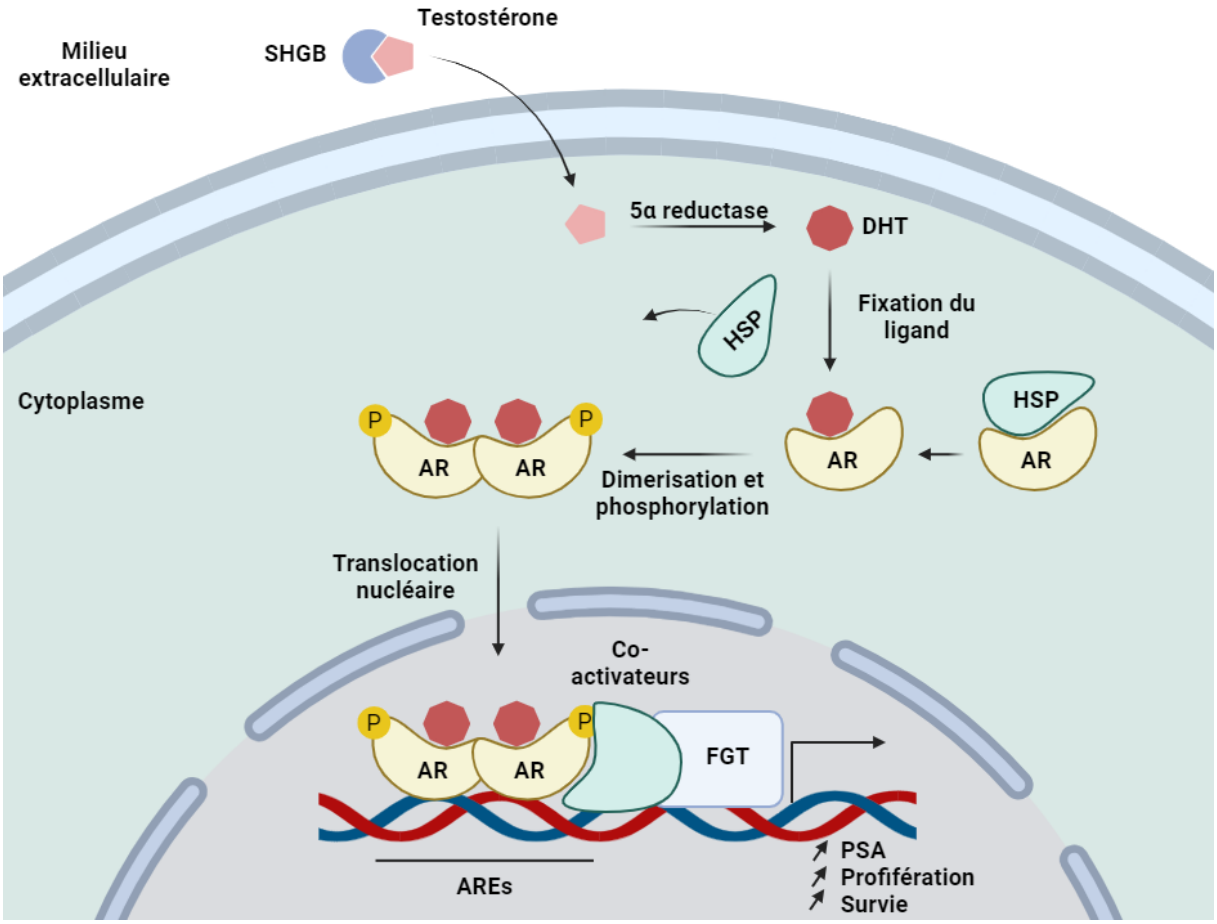


Figure 4. Action des androgènes. *Adapté de Feldman et al.* (15)

La testostérone est véhiculée jusqu'aux cellules par la SHBG (sex hormone binding globulin). Elle sera transformée en dihydrotestostérone (DHT) par la 5α reductase avant de se fixer à son récepteur en remplaçant une protéine chaperonne HSP. Cette fixation permettra la phosphorylation et la dimérisation du récepteur aux androgènes et sa translocation vers le noyau où il pourra interagir avec les séquences AREs. Cette interaction permettra le recrutement de molécules co-activatrices ou co-inhibitrices qui assureront la régulation de l'activité transcriptionnelle ainsi que des facteurs généraux de la transcription (FGT). La réponse transcriptionnelle sera associée à une augmentation de production du PSA, de la prolifération cellulaire et une amélioration de la survie cellulaire. [Figure réalisée avec Biorender].

c. Evolution vers des formes de cancers résistante à la castration

Comme nous le discuterons plus tard, les bases du traitement du cancer de la prostate reposent sur le blocage de la voie des androgènes (castration) afin d'induire un ralentissement de la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules tumorales. Cependant, des mécanismes d'échappement vont se mettre en place, avec une tumeur évoluant vers un stade de résistance à la castration, forme la plus agressive de cancer de la prostate. Plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits (**Figure 5**). Des mutations dans le récepteur aux androgènes sont retrouvés dans environ 50% des cancers de la prostate résistants à la castration, alors qu'elles sont rares au diagnostic (16). Ces mutations peuvent

[1] augmenter la sensibilité du récepteur aux androgènes, qui fonctionnera avec de très faibles concentrations de ligand ou l'amplification du récepteur (17); ou **[2]** rendre possible le fonctionnement du récepteur avec d'autres ligands que les androgènes (estrogène, progestérone, glucocorticoïdes, flutamide (18)). L'activation du récepteur au androgènes peut également être indépendante de la fixation avec un ligand **[3]**. L'IGF-1, le KGF, l'EGF ou encore le TGF-β peuvent activer le récepteur aux androgènes, par l'intermédiaire de la voie PI3K-AKT-mTOR (19,20). Le récepteur Errb2 (HER2/Neu), membre des récepteurs à l'EGF, est fréquemment surexprimé dans les tumeurs de la prostate résistante à la castration et peut être responsable de la phosphorylation du récepteur aux androgènes par l'intermédiaire de la voie PI3K-AKT-mTOR (21) ou par la voie des MAP Kinases (22).

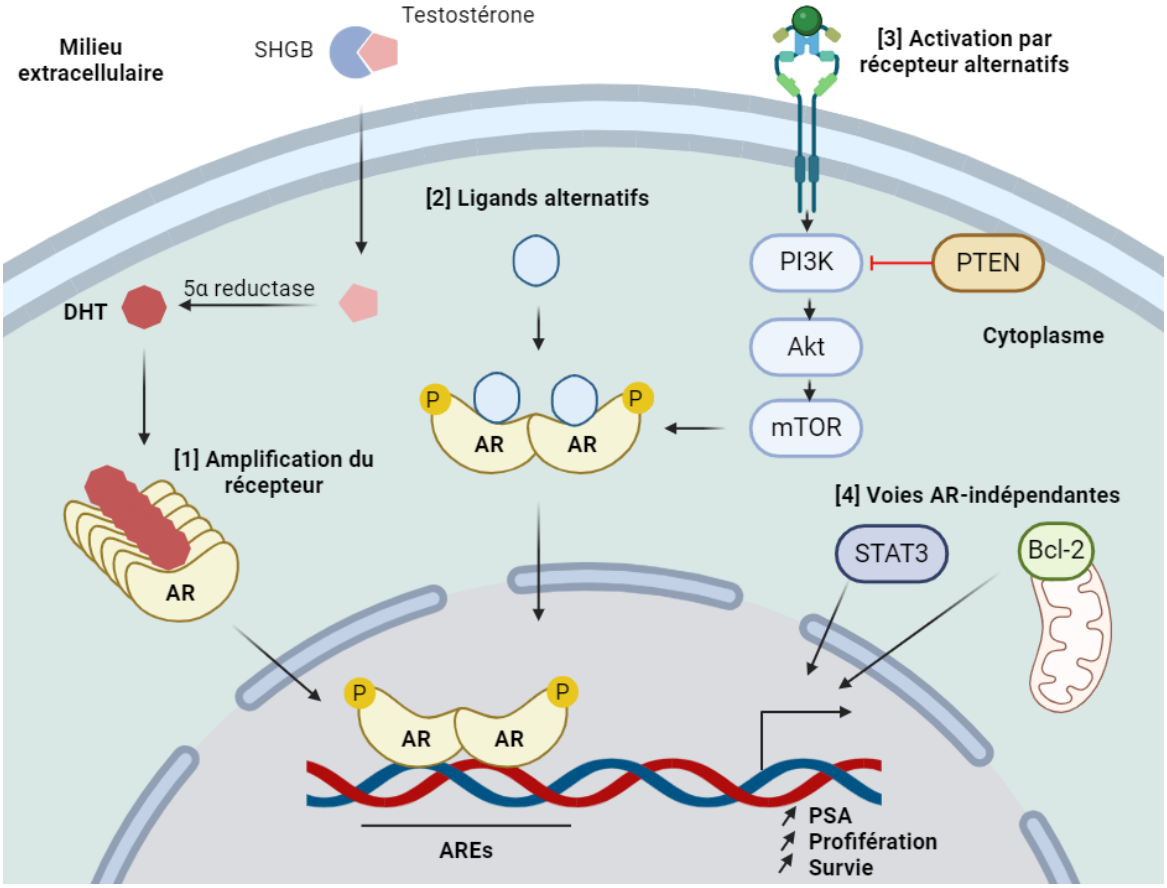


Figure 5. Principales voies de résistance à la castration. *Adapté de Tan et al.* (23)

D'autres voies totalement indépendantes du récepteur aux androgènes ont également été décrites comme participant à la progression tumorale en situation de résistance à la castration **[4]**. L'activation de la voie STAT3, notamment par la lymphotoxine produite par les lymphocytes B du microenvironnement tumoral, favorise la progression tumorale de façon totalement indépendante des androgènes (24). La surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 a également été décrite comme mécanisme de résistance à la castration, en protégeant les cellules tumorales de l'apoptose (25).

La perte d'expression de PTEN, retrouvée dans 50% des cancers de la prostate résistants à la castration va également être responsable d'une activation directe de la voie PI3K-AKT-mTOR, et être associé à une progression tumorale comme détaillé plus haut (26).

3. Stratégie diagnostique

a. Dépistage et diagnostic précoce

Le cancer de la prostate infraclinique est une pathologie fréquente chez les hommes après 50 ans. Plusieurs stratégies de dépistage ont ainsi été évaluées dans le but de réduire la mortalité par cancer de la prostate en population générale.

Il a été montré que le dépistage par dosage régulier du taux de PSA chez les hommes de 55 à 69 ans a montré une diminution de 25% du risque de décès par cancer de la prostate après un follow-up de 13 ans. Cependant, pour prévenir un décès, 570 hommes doivent être dépistés, et 18 patients traités, et cette approche n'a pas permis de montrer une amélioration significative de la survie globale dans cette population (27). Une étude rétrospective incluant 1369 patients atteints de cancer de la prostate a permis d'identifier des taux de PSA > 1ng/mL à 40 ans ou > 2ng/mL à 60 ans comme facteurs de risque de cancer de prostate métastatique ou de décès par cancer de la prostate dans les années qui suivent (28).

Ces considérations expliquent qu'il n'existe, à ce jour en France, pas de stratégie de dépistage de masse du cancer de la prostate. Cependant, l'Association Française d'Urologie (AFU) préconise la réalisation d'un dépistage individuel chez les hommes de 50 à 75 ans avec une espérance de vie supérieure à 10 ans ou dès 45 ans en cas de facteur de risque familial ou ethnique (origine africaine ou afro-caribéenne). Dans ce cas, il consiste en un toucher rectal, associé à un dosage du PSA tous les 2 à 4 ans si PSA > 1ng/ml ou tous les 5 ans sinon (29).

b. Cas particuliers des cancers de la prostate associés aux anomalies de la réparation de l'ADN

Le cancer de la prostate est un cancer pour lequel le poids de l'hérédité est prédominant, les antécédents familiaux étant le facteur de risque le plus important. Il existe deux types de prédispositions génétiques au cancer de la prostate : la transmission monogénique, rare (5 % des cas) et la transmission polygénique, prédominante (95 % des cas).

Le cancer de la prostate héréditaire répond à des critères qui doivent être systématiquement identifiés: le nombre de cas de cancer de la prostate dans la famille, la répartition dans une branche familiale et l'âge d'apparition. Les gènes les plus fréquemment impliqués dans la transmission monogénique sont les gènes de réparation de l'ADN (dont *BRCA2, BRCA1* et *ATM*) et le gène *HOXB13*

(30,31). Les caractéristiques des cancers monogéniques héréditaires sont un âge d'apparition précoce et une forte agressivité des mutations *BRCA2* et *HOXB13* (32). Les mutations *BRCA2* sont associées à un risque relatif de 2,64 (IC 95 % : 2,03–3,47) de forme agressive de cancer de la prostate, avec une réduction de la survie spécifique et globale (33). En cas de mutation *BRCA1*, le risque d'avoir un cancer de la prostate semble augmenter significativement [RR : 1,35 (IC 95 % : 1,03–1,76)], mais sans risque spécifique d'agressivité (32).

La susceptibilité polygénique est plus difficile à analyser. Plus de 150 variants génétiques ont été associés à une augmentation du risque de cancer de la prostate dans des populations ethniquement diverses (34).

L'identification précoce des formes héréditaires de cancer de la prostate est donc indispensable. Ces dernières sont suspectées en cas d'agrégation intrafamiliale de 3 cas chez des apparentés au premier (père, fils ou frères) ou au second degrés (neveux ou oncles) ; ou de 2 cas, si le cancer survient avant 55 ans. Les patients doivent être adressés en consultation d'oncogénétique à la recherche notamment, d'anomalies de la réparation de l'ADN (mutation BRCA2, BRCA1 ou ATM) ou de mutation HOXB13 en cas de suspicion de forme familiale, de diagnostic précoce avant 50 ans ou en cas agrégation intrafamiliale de cancer du sein ou de l'ovaire (cancer du sein < 40 ans, cancer du sein bilatéral, cancer de l'ovaire, cancer du sein chez un homme) (29).

c. Diagnostic du cancer de la prostate

En cas d'anomalie au toucher rectal ou d'élévation confirmée du PSA, il est maintenant recommandé de réaliser une IRM prostatique multiparamétrique avant la réalisation des biopsies. Celle-ci permettra la réalisation de biopsies guidées assurant une meilleure détection tumorale que les biopsies systématiques (35). En cas d'IRM « positive » (Prostate Imaging–Reporting and Data System (PI-RADS) ≥3), les biopsies seront réalisées. En cas d'IRM « négative », la réalisation des biopsies sera guidée par la probabilité clinique de cancer de la prostate qui prend en compte l'âge, l'origine ethnique, les antécédents familiaux, le taux de PSA, le ratio PSA libre/PSA total et les constatations du toucher rectal (36). Dans ce cas, les biopsies systémiques seront réalisées avec prélèvement dans chaque lobe. En cas de probabilité clinique faible, il peut être discuté, avec le patient de réaliser une surveillance rapprochée plutôt que les biopsies (29,37). L'ensemble de la stratégie diagnostique est résumé sur la **Figure 6**.

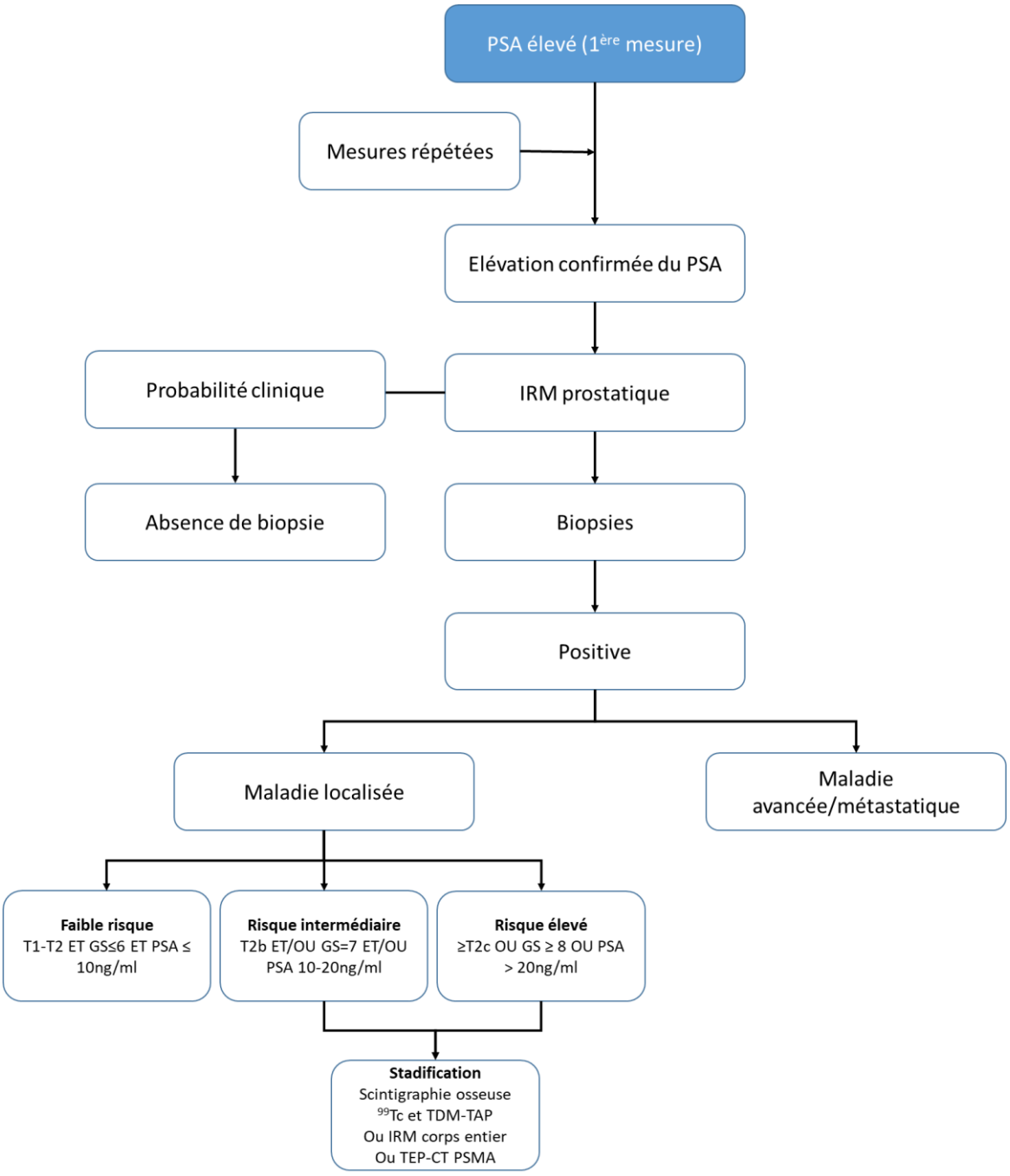


Figure 6. Stratégie diagnostique devant une élévation du PSA

d. Anatomopathologie

Le diagnostic de cancer de la prostate repose sur l'examen anatomopathologique. L'adénocarcinome prostatique est le type histologique majoritairement rencontré. La classification histologique du cancer de la prostate a été définie en 1966 par Donald Gleason et repose sur 5 grades architecturaux (numérotés de 1 à 5). Cette classification a été révisée en 2014 par l'International Society of Urological Pathology (ISUP) (38). La prostate contenant plusieurs foyers tumoraux à des stades différents, l'anatomopathologiste décrira les grades histologiques du foyer le plus représenté ainsi que le grade

le plus élevé des foyers secondaires. Le score de Gleason correspond à la somme de ces 2 grades, allant ainsi de 2 à 10. On parlera de cancer à partir d'un score de Gleason ≥ 6, avec des tumeurs bien différentiées (Gleason = 6), moyennement différentiées (Gleason = 7) ou peu différentiées (Gleason ≥ 8) (**Figure 4**). Une nouvelle classification en 5 groupes a été proposé en 2015 afin de mieux correspondre à la réalité clinique du cancer de la prostate (**Table 1**), en séparant notamment les Gleason 7 selon qu'ils soient grade 3 prédominant ou grade 4 prédominant.

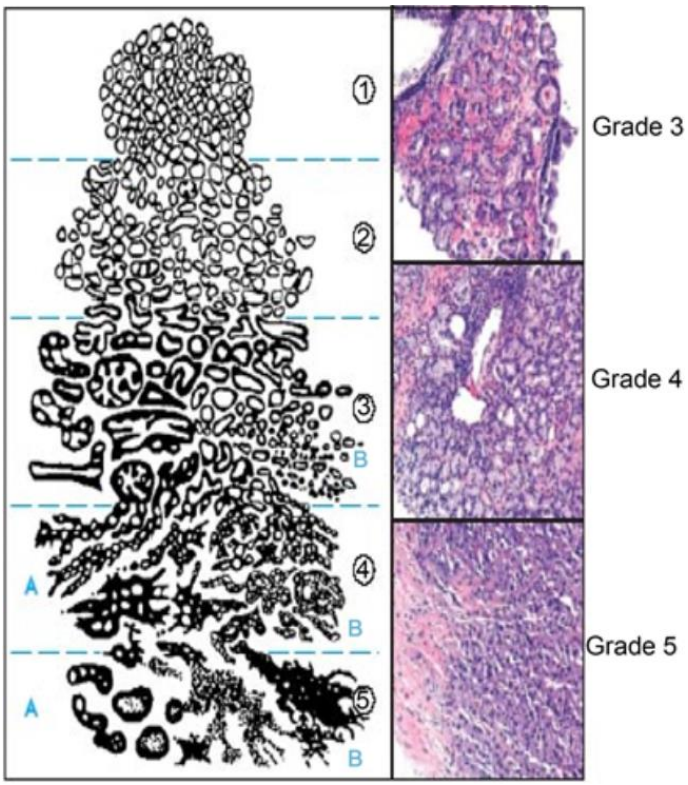


Figure 7. Adénocarcinome prostatique. Grade histologique selon Gleason, d'après Kamadjou et al. (39)

Groupe 1	Score de Gleason 6 (3 + 3)
Groupe 2	Score de Gleason 7 (principalement 3 ; 3 + 4)
Groupe 3	Score de Gleason 7 (principalement 4 ; 4 + 3)
Groupe 4	Score de Gleason 8
Groupe 5	Score de Gleason 9 ou 10

Table 1. Classification histologique de l'ISUP

e. Stadification du cancer de la prostate

Une fois le diagnostic positif établi, il conviendra de préciser l'extension de la maladie. L'extension clinique est définie par la classification cTNM 2016. Elle codifie l'extension locale de la tumeur (T),

l'extension ganglionnaire (N) ainsi que la dissémination métastatique (M). L'extension anatomopathologique sera faite selon la classification pTNM 2016.

Classification TNM 2016 Cancer de la prostate

- Stade T : Tumeur primitive
    - T1 : Tumeur non détectable cliniquement
        - T1a : tumeur présente sur < 5% des résections de prostate avec un score ISUP à 1 et absence de score Gleason 4 ou 5
        - T1b : tumeur présente ≥ 5% des résections de prostate ou ISUP ≥ 2 ou présence de grade 4 ou 5
        - T1c : tumeur diagnostiquée sur biopsies réalisées devant une élévation du PSA
    - T2 : Tumeur confinée à la prostate
        - T2a : tumeur envahissant un demi lobe prostatique ou moins
        - T2b : tumeur envahissant plus d'un demi lobe mais pas les 2 lobes
        - T2c : tumeur envahissant les 2 lobes
    - T3 : Tumeur étendue au-delà de la capsule prostatique
        - T3a : extension extra prostatique (uni ou bilatérale)
        - T3b : atteinte uni ou bilatérale des vésicules séminales
    - T4 : Tumeur fixée ou envahissant les structures adjacentes hors vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscles releveurs de l'anus, plancher pelvien)
- Stade N : Atteinte ganglionnaire
    - Nx : absence d'évaluation
    - N0 : absence d'atteinte ganglionnaire régionale
    - N1 : présence de métastases ganglionnaires régionales
    - N1mi : métastases ganglionnaires régionales ≤ 0.2cm
- Stade M : Métastases à distance
    - Mx : absence d'évaluation
    - M0 : absence de métastase à distance
    - M1 : Présence de métastases à distance
        - M1a : métastases ganglionnaires non régionales
        - M1b : métastases osseuses
        - M1c : autres métastases

Classification pTNM (AJCC 8ème édition)

- pT0 : absence de tumeur identifiée après prostatectomie radicale
- pT2 : tumeur confinée à la prostate
- pT3 : extension extra prostatique
    - pT3a : extension extra prostatique uni ou bilatérale
    - pT3b : atteinte uni ou bilatérale des vésicules séminales
- pT4 : tumeur fixée ou envahissant les structures adjacentes hors vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscles releveurs de l'anus, plancher pelvien)
- R : marges chirurgicales ou résidu tumoral post-opératoire
    - Rx : marges non évaluées
    - R0 : marges saines
    - R1 : marges positives

Les données du PSA, du toucher rectal, de l'IRM prostatique ainsi que de l'examen anatomopathologique permettront ainsi de définir le risque de progression de la maladie selon la classification d'Amico (40) qui orientera la suite de la prise en charge diagnostique et thérapeutique.

Classification d'Amico

- Faible risque : PSA ≤ 10ng/ml **ET** score ISUP1 **ET** CT1c ou T2a
- Risque intermédiaire : PSA compris entre 10 et 20ng/ml **OU** score ISUP 2 ou 3 **OU** cT2b
- Haut risque : PSA > 20ng/ml OU score ISUP > 3 OU ≥ cT2c

Le bilan d'extension sera complété selon le risque de progression d'Amico. Pour les patients à « Faible risque » de progression, le bilan d'extension pourra se limiter à l'IRM prostatique et pelvienne. Ce bilan sera complété par une scintigraphie osseuse en cas de risque intermédiaire ou élevé. Un scanner thoracique, abdominal et pelvien sera réalisé en cas d'atteinte ganglionnaire, présence de métastases osseuses ou chez les patients à risque élevé.

L'IRM corps entier, le TEP-choline (41) et le TEP-PSMA (42) ont une meilleure sensibilité et spécificité que la tomodensitométrie ou la scintigraphie osseuse, mais il n'a pas été démontré d'amélioration dans la prise en charge des patients. Les preuves concernant la TEP et l'IRM corps entier dans ce contexte ne sont pas suffisantes pour formuler une recommandation concernant leur utilisation.

4. Traitements du cancer de la prostate

Dans cette partie, nous présenterons des différentes modalités thérapeutiques disponibles dans le cancer de la prostate, sans discuter en détail de la stratégie thérapeutique à adopter.

a. Traitements du cancer de la prostate localisé

L'objectif des traitements dans le cancer de la prostate localisé est d'obtenir la guérison du patient ou la rémission complète la plus longue possible.

Surveillance active

La surveillance active est une option de traitement curatif qui permet de décaler la mise en route du traitement, le cas échéant, tout en restant dans la fenêtre de curabilité de la maladie. La validité de cette approche a été confirmée par plusieurs séries prospectives, dont certaines bénéficient désormais d'un suivi étendu (43,44). Ces études ne montrent pas de différence sur la mortalité spécifique ni sur la mortalité globale à 10 ans mais une différence significative entre la surveillance active et la chirurgie/radiothérapie sur le risque de progression clinique ou de métastases. Entre 59% et 67% des patients sont toujours en surveillance à 5 ans dans ces études.

La surveillance active est donc le traitement recommandé pour les cancers de la prostate localisé à faible de risque de progression. La surveillance consistera en un suivi rapproché du PSA et de l'examen clinique, associés à la réalisation régulière de biopsies prostatiques guidées par l'imagerie IRM.

Prostatectomie radicale

La prostatectomie radicale est l'un des traitements de référence du cancer de la prostate localisé, qui offre les meilleures garanties oncologiques à long terme (45). L'objectif est l'ablation de la totalité de la prostate et des vésicules séminales, tout en préservant les structures responsables de la continence urinaire et de l'érection. Il n'y a pas d'âge seuil, mais il n'y a de bénéfice global en termes de survie que si l'espérance de vie est supérieure à 10 ans (46). Elle est indiquée en traitement curatif des cancers localisés ou localement avancés. La prostatectomie radicale peut être envisagée pour les tumeurs à faible risque, elle est indiquée pour les tumeurs à risque intermédiaire et peut être suggérée pour les tumeurs à haut risque ou localement avancées avec possibilité d'association avec un traitement multimodal (47). Elle peut être réalisée par une approche ouverte, rétro pubienne. Des approches mini-invasives sont également possibles par laparoscopie ou laparoscopie assistée par robot. Les complications postopératoires les plus courantes sont la dysfonction érectile, l'incontinence à long terme et l'anéjaculation (48,49).

Le curage ganglionnaire ilio-obturateur, iliaque interne et externe ne sera réalisé qu'en cas de risque d'Amico élevé ; ou intermédiaire en cas de risque significatif (29).

Radiothérapie

La radiothérapie externe fait également partie des alternatives curatives dans le traitement du cancer de la prostate localisée. Elle doit être réalisé par technique 3D conformationnelle avec modulation d'intensité (IMRT). Il est recommandé de délivrer une dose comprise entre 74 et 80Gy (50,51). Les principales toxicités tardives sont urinaires (9 - 20% des cas) et digestives (7 – 12%) (52).

Dans certains cas, l'association à une hormonothérapie (voir section suivante) est recommandée : courte (6 mois) en cas de risque d'Amico intermédiaire avec facteur de risques supplémentaires ; ou longue (18 – 36 mois) en cas de risque d'Amico élevé (29).

La curiethérapie est une autre modalité thérapeutique qui peut être proposée dans certaines situations à visée curative, notamment dans les formes à bas risque de progression. Dans ces situations, le contrôle de la maladie à 10 ans est d'environ 90% (53). Les contre-indications liées à la technique sont un volume prostatique > 50 à 60 ml, l'existence d'un lobe médian, des antécédents de résection endoscopique de la prostate et des troubles urinaires préexistants.

Deux techniques de curiethérapies sont actuellement décrites :

• La curiethérapie interstitielle à faible débit de dose consiste en l'implantation permanente de billes, généralement des billes d'iode 125 en France

• La curiethérapie interstitielle à haut débit de dose par Iridium 192 en monothérapie consiste à implanter des aiguilles dans la prostate qui sont ensuite connectées à une source projecteur.

HIFU

Les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) sont une thérapie développée au cours des 20 dernières années pour traiter certains patients atteints d'un cancer localisé de la prostate. Il s'agit d'une procédure de destruction thermique des tissus. Des ultrasons de haute intensité sont émis par un transducteur piézoélectrique transrectal ou transurétral, générant une élévation locale de la température jusqu'à 60-70 °C au point de convergence, entraînant une nécrose tissulaire. Les formes extra-prostatiques ne peuvent pas être traitées par cette procédure et le traitement des cancers de la prostate à haut risque ou à risque intermédiaire défavorable n'est pas recommandé. Une revue de la littérature publiée en 2015 sur 4000 patients a montré que la survie sans rechute biochimique à un an était moins bonne qu'avec la radiothérapie, mais cette différence disparaissait en 5 ans. Cependant, en raison du manque de données prospectives et de résultats oncologiques à long terme, cette technique ne peut pas être considérée comme un traitement curatif standard du cancer de la prostate (54).

Cryothérapie

La cryothérapie est basée sur des cycles alternés de congélation et de réchauffage des tissus. Les cryosondes sont positionnées dans le parenchyme prostatique, sous contrôle échographique et par voie transpérinéale. L'objectif est d'atteindre des températures locales < −40 °C. Les températures extrêmes proches des cryosondes déclenchent la mort cellulaire. Plus loin, des microthromboses vasculaires se forment. Cela provoque une interruption du flux sanguin qui élimine les sources d'oxygénation et de nutrition des tissus cibles et conduit à une dénaturation des protéines et au développement d'une nécrose ischémique.

La cryothérapie est un traitement mini-invasif proposé aux patients atteints d'un cancer localisé comme alternative aux traitements standards principalement en cas de contre-indication, notamment pour des patients à risque faible ou intermédiaire (< T2c, PSA < 20 ng/ml, ISUP < 3) (55).

Techniques laser

Il existe deux techniques de traitement au laser :

• la thérapie photodynamique ciblée sur les vaisseaux (VTP) utilise un laser d'une longueur d'onde de 753 nm et un agent photosensibilisant pour produire une nécrose locale ;

• l'ablation laser focale ou laser interstitiel (FLA), qui utilise une diode laser d'une longueur d'onde de 980 nm pour induire la destruction thermique des tissus.

Suivi post traitement

Ce suivi est réalisé pour vérifier l'absence de récidive ainsi qu'évaluer la toxicité des traitements proposés. Il consiste en la mesure du PSA associé à un examen clinique, notamment le toucher rectal. Le premier dosage du PSA sera réalisé à 3 mois, puis s'il est négatif tous les 6 mois pendant 3 à 5 ans, puis tous les ans. Les valeurs limites de positivité du PSA dépendent du traitement initial (56) et sont résumées dans le **tableau 2**. Un bilan d'extension spécifique sera alors réalisé (non détaillé ici), permettant de confirmer s'il s'agit d'une récidive locale pouvant être accessible à un traitement de rattrapage ou s'i s'agit d'une rechute métastatique justifiant d'un traitement systémique.

Table 2. Valeur seuil du PSA définissant la récidive biologique ou l'échec biologique (d'après les recommandations de l'AFU 2022-2024 (29)**)**

Traitement	Définition de la récidive biologique
Prostatectomie totale	PSA > 0,2 ng/ml et ascendant confirmé par 2 dosages successifs
Radiothérapie ± hormonothérapie	PSA Nadir + 2 ng/ml
Curiethérapie	PSA Nadir + 2 ng/ml
HIFU	PSA Nadir + 1,2 ng/ml

Nadir : Valeur de PSA la plus basse mesurée au cours du suivi

b. Traitements du cancer de la prostate métastatique

En situation métastatique, l'objectif du traitement est de ralentir l'évolution tumorale tout en garantissant la meilleure qualité de vie pour les patients. Il faudra classiquement distinguer les patients présentant un cancer de la prostate métastatique d'emblée ; et ceux présentant une rechute métastatique d'un cancer de la prostate localisé traité. Les patients présentant une maladie d'emblée métastatique ont un pronostic moins bon (57).

Comme discuté plus haut, le cancer de la prostate est une maladie sensible aux androgènes, le traitement de base reposera donc sur la déprivation androgénique. Cependant, la maladie évoluera irrémédiablement vers une phase de résistance à la castration dans un délai plus ou moins long. Cette phase marque un tournant défavorable dans l'évolution de la maladie avec une espérance de vie qui sera limitée (environ 3 ans (58,59)).

Les critères classiquement utilisés pour stratifier les patients en fonction du risque de progression en situation hormonosensible sont le nombre et la localisation des métastases osseuses, la présence de métastases viscérales, et le score ISUP de la tumeur primitive (60,61). Ces paramètres permettent de définir différentes classifications, qui toutefois se recoupent assez largement (**Table 3**). Ces définitions sont basées sur l'utilisation des imageries conventionnelles (scanner/scintigraphie osseuse).

Classification	Définition clinique
Haut volume tumoral (Essai CHAARTED) (61)	Présence de métastases viscérales *et/ou* ≥ 4 métastases osseuses dont au moins 1 en dehors du pelvis ou du rachis
Haut risque tumoral (60)	Présence d'au moins 2 facteurs parmi : ≥ 3 lésions osseuses Présence de métastases viscérales ISUP ≥ 4

Table 3. Classification des patients atteints de cancer de la prostate métastatique hormonosensible

D'autres biomarqueurs pronostiques ont été décrits en situation de sensibilité à la castration. Un taux de phosphatase alcaline élevé ainsi que la présence de douleur au diagnostic sont également associés à un pronostic défavorable (62). La décroissance du PSA à 6-8 mois est un facteur pronostic majeur associé à une longue réponse au traitement. Toutefois, l'utilisation de ce biomarqueur n'est pas possible au diagnostic et ne permet donc pas l'identification des patients réfractaires primaires (63).

La déprivation androgénique (*Androgen Deprivation Therapy, ADT*)

La déprivation androgénique a pour but de diminuer le taux de testostérone circulante. Elle est habituellement réalisée en utilisation des agonistes ou des antagonistes de la LH-RH, luteinizing hormone-releasing hormone. La castration chirurgicale est également une alternative thérapeutique envisageable lorsque la déprivation doit être permanente.

La production de testostérone est assurée par les cellules de Leydig testiculaires, sous l'influence de l'hormone lutéinisante « LH ». La LH étant elle-même produite au niveau hypophysaire sous l'influence de la LH-RH hypothalamique (**Figure 8**). La testostérone produite exercera un rétrocontrôle négatif sur la production de LH-RH au niveau de l'hypothalamus.

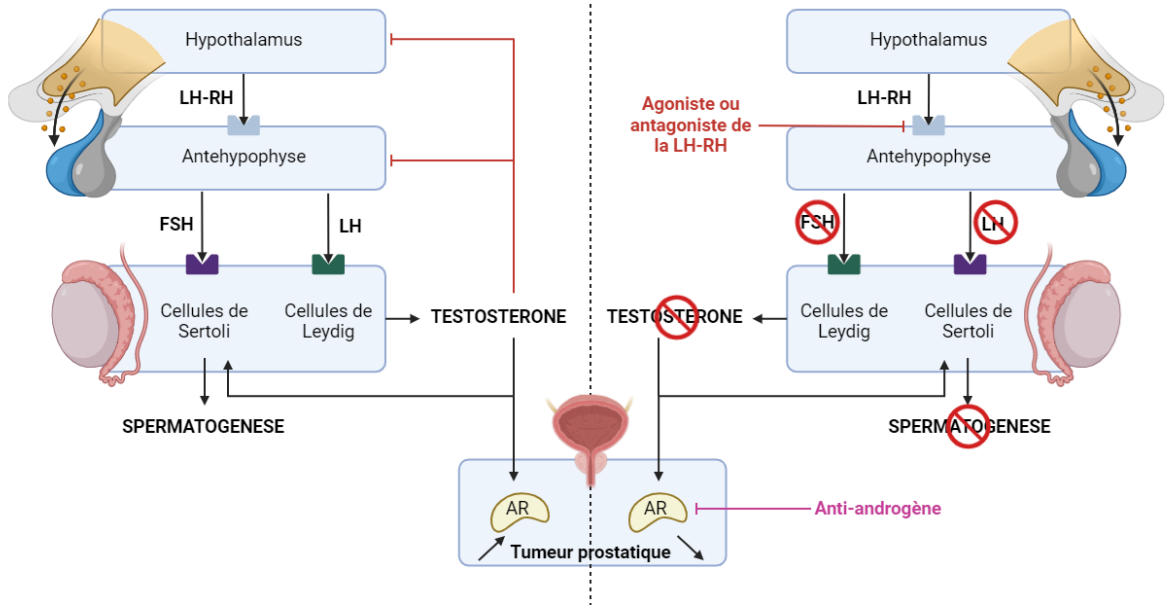


Figure 8. Axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope et modulation pharmacologique dans le cancer de la prostate. *Figure créée à l'aide de Biorender.*

Les agonistes et les antagonistes de la LH-RH vont bloquer la production hypophysaire de LH et de FSH soit en bloquant les récepteurs hypophysaires à la LH-RH (antagonistes) soit par la saturation des récepteurs et disparation de la pulsatilité de la LH-RH nécessaire au fonctionnement normal de l'axe (agoniste) (**Figure 8**). L'utilisation des agonistes de la LH-RH sera accompagné dans un premier temps

d'une augmentation temporaire de la production de LH et de FSH, appelé « effet Flair-up ». L'association à un anti-androgène périphérique pendant 15 jours ou 1 mois (acétate de ciprotérone ou bicalutamide) lors de la prescription d'un agoniste de la LH-RH peut être proposée dans certaines situations afin d'éviter l'apparition de symptômes en cas d'effet Flair-up (64).

L'efficacité de la déprivation androgénique sera évaluée par un dosage de la testostéronémie qui doit être inférieure à 50ng/dl (65).

Différentes formes d'agonistes ou antagonistes existent sur le marché :

Les agonistes de la LH-RH :

- Leuproréline (Eligard, Enantone), formes injectables intramusculaires/sous cutanées

- Goséréline (Zoladex), formes injectables sous cutanées

- Triptoréline (Decapeptyl, Salvacyl), formes injectables intramusculaires/sous cutanées

L'antagonistes de la LH-RH :

- Dégarélix (Firmagon), formes injectables sous cutanée

- Rélugolix (ORGOVYX), forme orale

Intensification thérapeutique

En complément de la déprivation androgénique, une intensification thérapeutique doit être discutée pour l'ensemble des patients. Différentes modalités sont proposées et à considérer selon le tableau clinique.

- Chimiothérapie

L'ajout d'une chimiothérapie par docétaxel à la déprivation androgénique a été évalué dans plusieurs études. Les essais STAMPEDE (66) et CHAARTED (67) ont montré une amélioration de la survie globale par l'ajout de 6 cycles de docétaxel. En revanche, l'essai GETUG-15 n'a pas montré d'amélioration significative de la survie globale de l'ajout du docétaxel, avec toutefois une amélioration de la survie sans progression radiologique (68). Une méta-analyse des trois essais a été réalisé confirmant l'intérêt de réaliser 6 cycles de chimiothérapie par docétaxel (69). L'intérêt de la chimiothérapie est clair notamment pour les maladies à haut volume ou à haut risque et semble plus discutable pour les maladies de faibles volumes.

- Hormonothérapies de nouvelle génération

Les hormonothérapies de nouvelle génération vont renforcer l'action de la déprivation androgénique, en agissant sur des mécanismes complémentaires de production des androgènes ou d'activation du récepteur aux androgènes. Ils seront toujours utilisés en complément de la déprivation androgénique classique et non en monothérapie (70).

On distingue deux types d'hormonothérapies de nouvelle génération. L'acétate d'abiratérone est un inhibiteur sélectif de la production des androgènes surrénaliens et testiculaires, en bloquant de façon irréversible le cytochrome P450 17α-hydroxylases-C17,20 lyase (CYP17A1), une enzyme exprimée dans le testicule, la surrénale et le tissu prostatique tumoral. Cette inhibition induira un blocage de la production d'androgènes mais également une diminution de la production de cortisol et une augmentation de la production d'ACTH par absence de rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse. Pour éviter un hyperminéralocorticisme secondaire, la prescription d'acétate d'abiratérone sera accompagnée d'une prescription de prednisone pour restaurer ce rétrocontrôle négatif (71).

L'adjonction de l'acétate d'abiratérone à la déprivation androgénique a été évaluée dans deux larges essais thérapeutiques de phase III : les essais LATITUTE (60) et STAMPEDE (72). Ces deux essais montrent une amélioration de la survie globale des patients métastatiques en comparaison à la déprivation androgénique (amélioration de la survie globale médiane de 16.8 mois, passant de 36.5 mois à 51.3 mois, HR : 0.66, $p < 0.0001$ dans l'essai LATITUDE ; l'essai STAMPEDE montre une amélioration de la survie globale avec un HR à 0.60 95% CI : 0.50-0.71 ; $P = 0.31 \times 10^{-9}$) (**Tableau 4**).

Les anti-androgènes de seconde génération (enzalutamide, darolutamide, apalutamide) agissent en se fixant directement au récepteur aux androgènes avec une affinité supérieure aux anti-androgènes de première génération, empêchant ainsi sa translocation nucléaire ainsi que le recrutement des molécules de co-activation.

L'enzalutamide et l'apalutamide ont montré une amélioration de la survie globale en comparaison à la déprivation androgénique seule dans trois essais de phase III randomisés (essais ARCHES HR : 0.66 (0.53 – 0.81), TITAN HR : 0.67 (0.52 – 0.86) et ENZAMET HR : 0.65 (0.53 – 0.79)). Les caractéristiques de ces différentes études sont résumées dans le **tableau 4**.

Essai	**LATITUDE** (60)	**STAMPEDE** (72)	**ARCHES** (73)	**ENZAMET** (74)	**TITAN** (75)
Molécule	AA	AA	Enzalutamide	Enzalutamide	Apalutamide
Nombre patients métastatiques inclus	1199	1003	1150	1125	1052
M+ de novo versus Métachrone	100/0	94/6	70/30	58/42	83/17
Haut volume/Bas volume	100/0	47/43 (9 non évaluables)	62/38	52/48	63/37
Suivi médian (mois)	51,8	73	44,6	33,9	44
Survie globale HR (95%CI)	0,66 (0,56-0,78) p<0,0001	0,60 (0,50-0,71) p<0,0001	0,66 (0,53-0,81) p<0,0001	0,97 (0,52-0,86) p=0,002	0,65 (0,53-0,79) p<0,0001

Table 4. Principaux essais de phase III évaluant les « hormonothérapies de nouvelle génération » dans le traitement du cancer de la prostate hormonosensible

La combinaison des hormonothérapies de nouvelle génération à la chimiothérapie par docétaxel a également été évaluée dans plusieurs études.

Dans l'étude ENZAMET (74), 45 % des patients traités par l'enzalutamide ont reçu du docétaxel en concomitance. Aucune amélioration de la survie globale n'a été observée dans ce groupe de patients. Les arrêts de traitement dus à des effets indésirables étaient cependant plus fréquents.

L'étude PEACE-1 a comparé l'intérêt de l'acétate d'abiratérone (+ prednisone) et/ou de la radiothérapie de la prostate au traitement standard chez des patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique de novo hormonosensible (76). Près de 60 % des patients de cette étude ont reçu une chimiothérapie associée à une déprivation androgénique. Le bénéfice de l'association après un suivi de 4,4 ans, dans l'ensemble population a été estimé à 2,5 ans pour la survie sans progression (HR = 0,50, 0,40-0,62, p < 0,0001) et à 12 mois pour la survie globale (HR : 0,83, IC95 % : 0,69 à 0,99, p = 0,034). Ce bénéfice a également été noté dans la population traitée par chimiothérapie (HR : 0,75, IC 95 % : 0,59-0,96, p = 0,021). Bien que les données de survie globale dans le groupe à faible volume tumoral ne soient pas définitives, le bénéfice dans le sous-groupe à volume tumoral élevé était de 1,6 ans (HR = 0,72, IC à 95 % : 0,55 à 0,95, p = 0,019).

L'étude ARASENS, essai de phase III, a évalué l'intérêt de l'ajout de darolutamide à la déprivation androgénique et au docétaxel (77). Un total de 1306 patients ont été randomisés dont plus de 80 % des patients présentaient une maladie métastatique de novo. L'ajout de darolutamide a entraîné une réduction de 32 % du risque de mortalité par rapport au groupe de traitement standard seul (HR = 0,68 ; IC à 95 % (0,57 – 0,80), p < 0,001). Dans les études en sous-groupes, le bénéfice observé n'était pas statistiquement significatif pour les patients métastatique métachrone. Les résultats selon le volume tumoral (élevé ou faible) n'étaient pas disponibles.

Les résultats de ces deux études ont permis d'indiquer le triplet « déprivation androgénique, hormonothérapie de nouvelle génération, chimiothérapie par docétaxel » chez les patients métastatiques *de novo*, notamment à haut volume tumoral, et en bon état général.

- Radiothérapie

La radiothérapie de la tumeur primitive fait également partie des traitements disponibles dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible. L'essai HORRAD (78) a randomisé 446 patients avec cancer de la prostate métastatique de novo, pour recevoir une déprivation androgénique seule ou associée à une radiothérapie prostatique (70Gy en 35 fractions). Cette étude n'a pas permis de montrer une amélioration de la survie globale par l'ajout de la radiothérapie sur l'ensemble de la population traitée, mais une tendance à l'amélioration de la survie globale pour les patients présentant moins de 5 métastases.

L'essai STAMPEDE (79) a randomisé 2061 patients pour recevoir un traitement standard ou un traitement standard associé à une radiothérapie prostatique. 40% des patients inclus avaient un faible volume tumoral selon la définition de CHAARTED. Avec un suivi médian de 17 mois, il n'a pas été mis en évidence de différence significative en survie globale sur l'ensemble de la population (Survie à 3 ans ; 65% vs. 62%, HR : 0.92, p = 0.266). En revanche, la différence est significative dans le sous-groupe des patients à faible volume tumoral (81% vs. 73% ; HR : 0.68, p = 0.007) en faveur de la radiothérapie. Ces résultats ont permis d'indiquer la radiothérapie prostatique en situation de cancer de la prostate métastatique sensible à la castration avec un faible volume tumoral.

La stratégie thérapeutique du cancer de la prostate métastatique hormonosensible est résumée sur la **figure 9**.

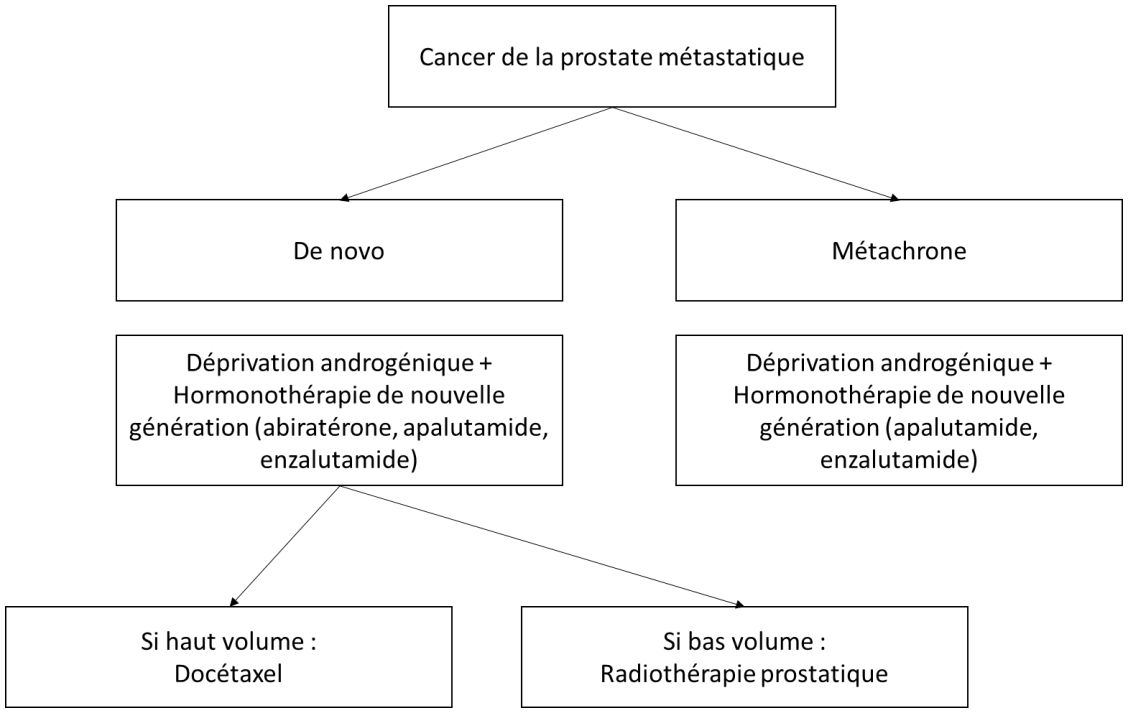


Figure 9. Stratégie thérapeutique dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible *(adapté de Ploussard et al.* (29)*)*

Traitements du cancer de la prostate résistant à la castration

Ne seront détaillés dans cette sous-partie uniquement les modalités thérapeutiques disponibles et non la stratégie thérapeutique.

La résistance à la castration est définie comme la présence d'une progression biochimique ou radiographique, dans le cadre d'une castration efficace, confirmée par un taux de testostérone < 50 ng/dl ou 1,7 nmol/l.

La progression biochimique est définie par trois augmentations du PSA entraînant deux augmentations de 50 % au-dessus du nadir avec un PSA > 2 ng/ml.

La progression radiographique est définie comme l'apparition d'au moins deux nouvelles lésions à la scintigraphie osseuse ou la progression d'une lésion mesurable selon les critères RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours).

- Agents anti-résorptifs osseux

Lorsqu'elles ne sont pas spécifiquement prévenues, les complications des métastases osseuses surviennent chez un patient sur deux dans les 24 mois suivant le diagnostic de cancer de la prostate résistant à la castration. Ces complications sont responsables d'une altération très importante de la qualité de vie et impactent même le pronostic vital des patients âgés par l'alitement.

Deux types d'agents anti-résorptifs sont disponibles : les bisphosphonates et les anti-RANKL.

Les bisphosphonates préviennent la résorption osseuse en bloquant l'action des ostéoclastes. Ils diminuent le risque d'évènement osseux et améliorent les douleurs. L'acide zolédronique est le plus couramment utilisé. La tolérance est bonne avec un risque toutefois d'hypocalcémie et d'ostéonécrose de la mâchoire (80).

Le dénosumab est un anticorps monoclonal anti-RANKL, qui va ainsi permettre de bloquer l'activation des ostéoclastes. Il a une efficacité supérieure à celle de l'acide zolédronique (81), avec des effets secondaires comparables. Il est indiqué chez les patients métastatiques osseux, résistant à la castration, en prévention du risque de complications osseuses.

- Chimiothérapies

La chimiothérapie fait partie des alternatives thérapeutiques dans le cancer de la prostate résistant à la castration. S'il n'a pas été administré en situation hormonosensible, le docétaxel 75mg/m2 toutes les 3 semaines plus prednisone 10mg/jour est la chimiothérapie de première intention dans cette situation, avec impact sur la survie globale (82). Le cabazitaxel peut également être utilisé en 2ème ligne de chimiothérapie, après docétaxel, et après progression sous hormonothérapie de nouvelle génération (83). En cas de transformation neuroendocrine, la chimiothérapie à base de sels de platine (cisplatine ou carboplatine) deviendra le traitement de référence (84).

- Hormonothérapies de nouvelle génération

Les hormonothérapies de nouvelle génération peuvent être utilisées en situation de résistance à la castration, surtout si le patient a reçu une déprivation androgénique simple +/- docétaxel en situation de sensibilité à la castration. En cas d'administration en 1ère ligne thérapeutique, il sera préféré une seconde ligne par docétaxel en première intention plutôt qu'un switch pour une autre hormonothérapie devant un taux important de cross-résistance (85).

- Dichlorure de radium 223

Le dichlorure de Radium 223 (^{223}RaCl2 ou Xofigo®) est un élément très proche du calcium qui se lie sélectivement aux os. C'est un émetteur alpha avec une demi-vie de 11,4 jours. Les particules alpha ont un transfert d'énergie linéaire élevé et induisent des dommages importants à l'ADN tumoral. En revanche, leur portée dans la matière est très courte (50 µm). Leur toxicité médullaire est donc très faible. Un essai randomisé dans le cancer de la prostate résistant à la castration avec métastases osseuses mais sans métastase viscérale (ALSYMPCA) a comparé le ^{223}RaCl aux meilleurs soins de support et a observé un bénéfice significatif en survie globale (survie médiane : 14,9 vs 11,3 mois, $p < 0,001$) (86). Les effets secondaires sont limités, notamment hématologiques (thrombocytopénie : 4 %).

- Radiothérapie interne vectorisée ciblant le PSMA

Le PSMA est une protéine transmembranaire contenant une glutamate carboxypeptidase. Elle est principalement exprimée dans cinq sites : la prostate, les reins, les glandes salivaires, les cellules et l'intestin grêle. Cependant, elle est surexprimée dans les cellules tumorales prostatique, et son expression augmente avec le score de Gleason et la progression tumorale, en particulier dans le cancer de la prostate résistant à la castration.

Dans le cadre de la radiothérapie interne vectorisée ciblant le PSMA, des ligands du PSMA sont couplés à des émetteurs β- ou α puis administrés par voie intraveineuse. Il existe des ligands similaires utilisables à visée diagnostique permettant de faire la cartographie des lésions accessibles et de suivre l'évolution du traitement. Les radiotraceurs les plus utilisés en thérapeutique sont le Lutétium-177 (émetteur β-), et l'actinium-225 (émetteur α). [177Lu]Lu-PSMA-617 est aujourd'hui une alternative thérapeutique disponible dans le cancer de la prostate résistant à la castration, en 3ème ligne thérapeutique (87).

- Inhibiteurs de PARP

La prévalence des altérations germinales ou somatiques des gènes de réparation de l'ADN chez les patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique atteint 20 à 30 %. Ces gènes comprennent BRCA1/2, ainsi que d'autres gènes tels que ATM, FANCA, CHEK2, PALB2, CDK12 et RAD51D. Les inhibiteurs de la poly-ADP ribose polymérase (PARPi) sont apparus comme un traitement disponible pour un sous-ensemble de patients atteints de cancer de la prostate résistant à la castration présentant une anomalie de la réparation de l'ADN. Ainsi, l'olaparib a une autorisation de mise sur le marché en monothérapie pour le traitement du cancer de la prostate résistant à la castration avec anomalie *BRCA1/2*, à partir de la 3ème ligne thérapeutique (88).

5. Enjeux actuels dans la prise en charge des patients et objectif global du travail de thèse

Comme discuté plus haut, les patients atteints de cancer de la prostate métastatique d'emblée représentent la population avec le pronostic le moins favorable. Cependant, cette population est très hétérogène avec des patients long répondeurs à une déprivation androgénique simple ; et d'autres qui seront réfractaires à l'intensification thérapeutique et qui progresseront rapidement vers un stade de résistance à la castration.

La stratification de ces patients est donc indispensable pour identifier ceux pour lesquels l'intensification thérapeutique par chimiothérapie et/ou hormonothérapie de nouvelle génération n'est pas nécessaire et sera source de toxicité ; mais également les patients qui à l'inverse répondront le moins bien aux différents traitements proposés. L'identification de nouveaux biomarqueurs pronostics ou prédictifs de réponse aux traitements permettra d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique pour chaque patient, mais également ouvrir des perspectives dans le développement de nouveaux traitements dans le cancer de la prostate métastatique.

Le « volume tumoral », tel que décrit précédemment, est un élément pronostic central qui participe à la décision thérapeutique. Il reste toutefois largement imparfait. La décroissance du PSA à 6-8 mois est un biomarqueur pronostique majeur. Un PSA > 0.2ng/ml est un facteur défavorable associé à une progression rapide vers la résistance à la castration. Ce biomarqueur est utilisé dans le cadre de protocole de recherche pour adapter le traitement chez les patients présentant une décroissance défavorable. Cependant, ce biomarqueur ne peut pas être utilisé dès le diagnostic et ne permet pas de dépister les patients réfractaires primaires.

Une autre difficulté au développement de biomarqueurs et plus largement à l'étude du développement tumoral en oncologie est la diminution de la quantité de matériel tumoral disponible secondaire au développement des approches diagnostiques mini-invasives, ainsi qu'à la généralisation des traitements néo adjuvants. Ces évolutions limitent l'accès à du matériel tumoral « non traité » et donc les possibilités d'analyses en oncologie. Cette limitation est également présente dans le cancer de la prostate métastatique d'emblée, puisque les patients bénéficieront de biopsies diagnostiques, sans exérèse tumorale en règle générale. La forte prévalence des métastases osseuses dans le cancer de la prostate est aussi un frein à ces analyses, le prétraitement de la biopsie pouvant altérer le tissu sous-jacent.

Ces considérations justifient l'intérêt de la recherche de biomarqueurs à partir de biopsies liquides (prélèvements sanguins, urinaires et autres fluides biologiques) ; qui représentent du tissu facilement accessible, en quantité et à moindre coût. Elles permettent également la constitution de cohorte avec

des échantillons disponibles à différents temps du traitement, approche plus difficile à mettre en place avec des biopsies tumorales répétées qui sont moins acceptées.

L'objectif général de ce projet est d'identifier de nouveaux biomarqueurs dans le cancer de la prostate métastatique de novo, à partir d'échantillons sanguins prélevés au diagnostic, de comprendre les mécanismes biologiques expliquant ce rôle pronostic et explorer leur potentiel en tant que cible thérapeutique.

II. Le système immunitaire, un allié dans le cancer de la prostate métastatique ?

1. Concepts généraux

a. Concepts d'immunosurveillance et Immunoediting en cancérologie

La transformation d'une cellule saine en une cellule tumorale, ou oncogenèse, résulte de l'accumulation d'altérations génomiques (génétiques ou épigénétiques) aboutissant à l'activation de proto-oncogène ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces altérations vont être associées une grande plasticité des cellules tumorales leur conférant un avantage sélectif ; mais conduiront également à l'expression d'antigènes associés aux tumeurs ou néoantigènes. Le système immunitaire pourra ainsi reconnaitre ces cellules comme anormales et assurer leur élimination. Le développement tumoral est ainsi conditionné par des facteurs génétiques intrinsèques à la cellule tumorale mais également à l'interaction de cette cellule avec les éléments immuns et non immuns du microenvironnement tumoral.

Le concept selon lequel le système immunitaire est capable de contrôler le développement de nombreux cancers a été décrit pour la première fois en 1909 par Paul Ehrlich. Il faudra attendre 1957 pour que soit formulé le concept d'Immunosurveillance par Sir Macfarlane Burnet and Lewis Thomas : *« [Chez les grands animaux à longue durée de vie, comme la plupart des vertébrés à sang chaud, les modifications génétiques héréditaires doivent être courantes dans les cellules somatiques et une proportion de ces modifications représentera un pas vers la malignité. Il est nécessaire au cours de l'évolution de disposer d'un mécanisme permettant d'éliminer ou d'inactiver de telles cellules mutantes potentiellement dangereuses et il est postulé que ce mécanisme est de caractère immunologique.] »* (89). Ce concept est validé par des données expérimentales, issues de modèles murins déficient en lymphocytes B, T et NKT (mutations *RAG1* et *RAG2*, gènes codant pour des enzymes nécessaires à la recombinaison des récepteurs TCR et BCR), qui vont développer spontanément plus de tumeurs que les modèles non déficients (90). Sur le plan clinique, l'augmentation de l'incidence des cancers chez les patients immunodéprimés (SIDA, traitements immunosuppresseurs…) vient renforcer ce concept.

Cependant, la grande majorité des cancers sont diagnostiqués chez des patients immunocompétents. Ce constat a conduit à faire évoluer le concept d'immunosurveillance en celui d'immunoediting par Dunn et al (91). L'interaction des cellules tumorales avec le microenvironnement sera vue comme un processus dynamique par lequel la pression de sélection exercée par le système immunitaire conduira à la sélection des clones tumoraux les moins immunogènes et donc au développement tumoral malgré un système immunitaire non compromis. Cette interaction est résumée en 3 phases successives, « les 3E de l'immunoediting » :

- La phase d'**Elimination** correspond à l'éradication des cellules tumorales par les cellules de l'immunité innée et adaptative. Les cellules de l'immunité innée ou transitionnelle (NKT, NK, lymphocytes T γδ, macrophages et cellules dendritiques) vont être recrutées par l'intermédiaire de facteurs pro-inflammatoires (chimiokines, cytokines, facteurs de remodelage matriciel) produits par l'infiltration tumorale débutante. Ces cellules vont pouvoir directement lyser les cellules tumorales en croissance. Les débris cellulaires vont être interceptés par les cellules présentatrices d'antigènes, et les néoantigènes vont ainsi pouvoir être présenter aux lymphocytes B et T au niveau des ganglions lymphatiques, initiant ainsi une réponse immune adaptative antigène spécifique, durable dans le temps.
- La phase d'**Equilibre** correspond à l'apparition d'un équilibre dynamique entre les cellules immunes et les cellules tumorales ayant survécus à la phase d'élimination. L'accumulation d'anomalies génétiques conduit à une diminution de production d'antigènes tumoraux, à une altération de la présentation antigénique et à la mise en place de mécanismes d'immunorégulation avec la production de cytokines immunosuppressives. Les cellules immunes exercent une pression sur les cellules tumorales limitant leur développement mais ne permettant pas leur éradication. A ce stade, la tumeur reste non détectable cliniquement.
- La phase d'**Echappement** est caractérisée par l'insensibilité des cellules tumorales à la détection immune par l'accumulation d'altérations génomiques nouvelles. On note également un « détournement » du microenvironnement tumoral qui favorisera le développement tumoral. A ce stade, la tumeur devient cliniquement détectable. L'altération des fonctions immunes antitumorales pourra passer par le recrutement d'effecteurs immunosuppresseurs dans le microenvironnement tumoral (myeloid-derived suppressor cells [MDSCs], lymphocytes T régulateurs, macrophages associés aux tumeurs M2) ; l'induction d'une exhaustion des cellules immunes effectrices compétentes ; ou bien le détournement des points de contrôle immuns (ou checkpoints immuns).

b. Les microenvironnements en cancérologie

Devant ces considérations, l'analyse du microenvironnement a gagné en importance ces dernières années. La caractérisation de l'infiltrat immun au sein du tissu tumoral permet d'affiner les classifications pronostiques existantes, comme par exemple, dans le cancer colorectal, où l'*Immunoscore* permet de prédire le risque de récidive tumoral de façon plus précise que les classifications conventionnelle (92).

On décrit classiquement 3 « types » de microenvironnements tumoraux en fonction de la nature de l'infiltrat immun et de sa distribution au sein de la tumeur (93) : les tumeurs « froides », les tumeurs

« altérées » et les tumeurs « chaudes ». Les tumeurs « froides » (ou non inflammatoires) sont définies comme des déserts immuns, caractérisées par :

1) une faible densité de lymphocytes T infiltrant la tumeur (TILs) à la fois au centre de la tumeur mais également à la marge,

2) une faible expression des checkpoints immuns et du CMH-I,

3) une faible charge mutationnelle tumorale (Tumor mutational burden, TMB).

Ce sont les tumeurs associées au plus grand risque de rechute dans le cancer colorectal dans le modèle décrit par Galon et al. A l'inverse, les tumeurs dites « chaudes » ou inflammatoires, sont caractérisées par un important infiltrat lymphocytaire intra tumoral, au centre comme aux marges de la tumeur et par une plus grande expression des checkpoints immuns. Elles sont associées à une meilleure survie dans le cancer colorectal. Il existe des profils intermédiaires, dits « altérés » dans lesquels le système immunitaire ne peut pas exercer correctement ses fonctions antitumorale. Dans les microenvironnements « exclus », le recrutement lymphocytaire est altéré au centre de la tumeur, avec une faible densité de TILs, qui s'accumulent au niveau des marges tumorales. Dans d'autres situations, le microenvironnement peut être immunosuppressif limitant le recrutement de lymphocytes au sein de la tumeur et bloquant leur activation.

Plus récemment, Krummel et al. ont introduit la notion « d'archétypes dominant » pour caractériser plus en détail l'infiltrat immun dans plusieurs types de tumeurs (94) en fonction du profil mutationnel des tumeurs et de la composition de l'infiltrat immun. Douze archétypes sont décrits, à partir de 10 paramètres. Trois correspondent à des microenvironnements immuns riches, avec une prédominance lymphocytes CD8/macrophages (1), CD8/monocytes (2) ou CD4 (3). Deux sont enrichis en cellules immunes et stromales, avec prédominance CD8 (4) ou CD4/macrophages (5). Trois sont classés parmi les déserts immuns avec dominance CD4/macrophages (10), monocytes (11) ou CD8/macrophages (12). Les derniers archétypes ont une expression intermédiaire de cellules $CD45^+$, et sont caractérisés par leur dominance immune, lymphocytes T/macrophages (6), lymphocytes T/Cellules dendritiques (7), Cellules dendritiques de type 2 (8), et cellules dendritiques de type 1 (9). Comme pour l'*Immunoscore*, ces différents archétypes sont associés à la survie globale des patients, les archétypes « déserts immuns » étant associés à un pronostic plus défavorable. Cette étude reflète également l'importante hétérogénéité qu'il peut exister dans le microenvironnement et ouvre de multiples perspectives quant aux stratégies d'immunomodulation à déployer pour le développement de nouvelles thérapies en oncologie.

c. Les checkpoints immuns et leur modulation en cancérologie

L'activation des lymphocytes T suite à la stimulation antigénique va être régulée par de nombreux récepteurs co-activateurs ou co-inhibiteurs, appelés checkpoints immuns. Ils permettent de limiter l'emballement de la réponse immune ou des réponses immunes aberrantes, notamment dans un contexte d'auto-immunité. De nombreux récepteurs ont été décrits (**Figure 10**) et leur ciblage thérapeutique est au centre des stratégies dans la prise en charge de nombreux cancers.

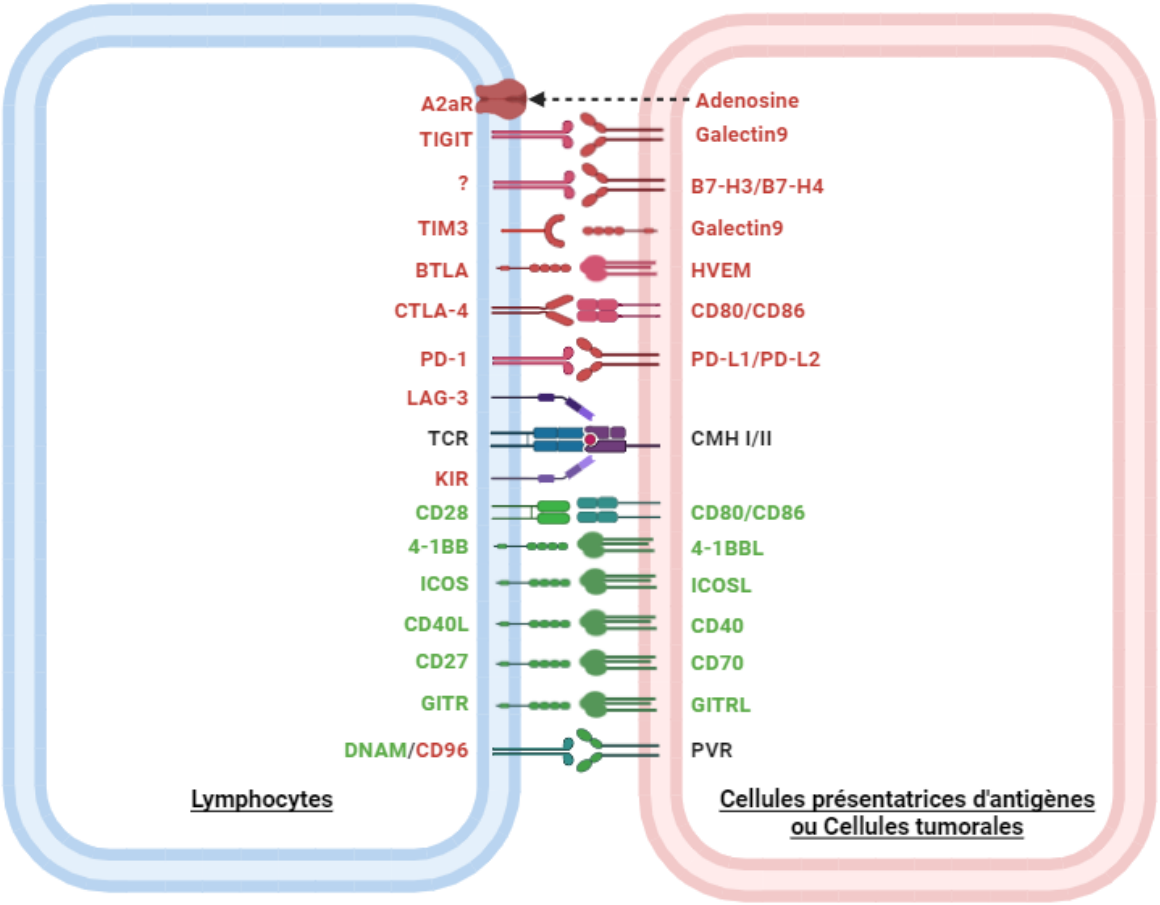


Figure 10. La régulation lymphocytaire par checkpoints immuns, *adapté de Wykes et al.* (95)

En rouge les checkpoints associés à une inhibition de la réponse lymphocytaire ; en vert ceux associés à une activation.

Les anticorps anti CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) et anti-PD-1 (*programmed death 1*) ont été les premiers inhibiteurs de checkpoints immuns développés à partir des travaux préliminaires de J. Allison (96) et K. Honjo (97) respectivement. Il s'agit d'anticorps bloquant l'interaction CTLA-4/CD80-86 ou PD-1/PD-L1 (*programmed death ligand 1*) permettant ainsi de restaurer l'activité des lymphocytes T. Ils ont respectivement obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2010 et 2014 dans la prise en charge du mélanome métastatique avancé. Les indications des inhibiteurs de checkpoints immuns ne cessent de s'étendre, avec des AMM pour les

thérapies anti PD-1, anti PD-L1 en monothérapie ou en combinaison avec les anti CTLA-4 ou la chimiothérapie dans le mélanome métastatique ou localisé, le cancer du poumon métastatique, le cancer du rein métastatique, le cancer de la vessie métastatique, les tumeurs de la tête et du cou métastatique, le carcinome hépatocellulaire, le cholangiocarcinome, le cancer de l'endomètre et le cancer du col de l'utérus. Le pembrolizumab (anti PD-1) a également une autorisation d'utilisation par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour le traitement des tumeurs présentant une altération du système *mismatch repair* (MMR), qui est associée à une augmentation de la charge mutationnelle et à la réponse au inhibiteurs de checkpoints immuns (98).

D'autres cibles thérapeutiques sont en cours de développement, en phase préclinique ou clinique, pour renforcer l'arsenal de modulateurs de checkpoints immuns, soit des bloqueurs de checkpoints inhibiteurs soit des agonistes de checkpoints activateurs.

2. Immunogénicité du cancer de la prostate

a. Caractéristiques du microenvironnement du cancer de la prostate

Une caractéristique majeure du cancer de la prostate est l'hétérogénéité. En effet, il s'agit d'une maladie multifocale, avec plusieurs foyers tumoraux se développant au sein de la tumeur. Ces différents foyers peuvent avoir des phénotypes différents, et participent à l'hétérogénéité intertumorale (99). Au cours du développement tumoral, on notera une hétérogénéité clonale au sein même de chaque foyer, on parlera d'hétérogénéité intratumorale. Il n'est pas clair à ce jour si cette hétérogénéité est d'origine polyclonale ou monoclonale (100).

Cette hétérogénéité tumorale s'accompagne d'une hétérogénéité du microenvironnement tumoral (TME). Le TME est composé de fibroblastes, de péricytes, de cellules immunitaires et de cellules endothéliales ; chacun étant capable d'interagir avec les cellules cancéreuses de manière dynamique. Le TME orchestre le développement des cellules tumorales, avec des mécanismes différents selon la zone tumorale, avec un rôle de l'hypoxie, du pH ou de l'environnement cytokinique (101).

Le microenvironnement immun du cancer de la prostate est considéré comme un microenvironnement « froid » et immunosuppressif. La faible immunogénicité du cancer de la prostate vient d'une part de la faible charge mutationnelle des cellules tumorales prostatiques (102), et donc d'une faible quantité de néoantigènes, mais également d'une importante diminution de l'expression des CMH de classe I et II, limitant la présentation antigénique aux lymphocytes T (103). En plus de cette faible immunogénicité spontanée, le TME du cancer de la prostate est également immunosuppressif sur les cellules en place. Le rôle central du TGF-β est clairement établi (104). Dans les tissus sains, le

TGF-β agit comme un suppresseur de tumeur, où il inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose. Cependant, lorsqu'il est surexprimé dans des cancers, tels que le cancer de la prostate, le TGF-β devient un puissant promoteur de l'invasion tumorale et de la dissémination métastatique. Il favorise l'échappement immun par la suppression de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes, des cellules NK et des macrophages. De plus, les cytokines antitumorales, telles que l'interféron de type I (IFN), et leurs voies de signalisation respectives, sont souvent supprimées dans le cancer de la prostate, en particulier chez les patients métastatiques.

Le développement tumoral s'associe à une diminution de l'infiltration en lymphocytes T CD8 et en monocytes en comparaison au tissu sain, et à une augmentation de l'infiltrat NK inactif, de lymphocytes B naïfs, de cellules dendritiques inactives et de macrophages immunosuppressifs M2 (105) reflétant l'impact immunosuppressif du TME. Le profil des lymphocytes T CD4 est également déséquilibré avec une accumulation de lymphocytes T régulateurs (*Treg*) et de lymphocytes CD4 Th17, sous l'influence du TGF-β et de l'IL-6 du microenvironnement tumoral (106).

Le rôle pronostique de l'infiltration lymphocytaire T dans le cancer de la prostate reste controversé. Un nombre plus élevé de lymphocytes T infiltrant a été corrélé à une meilleure survie dans diverses tumeurs solides, notamment le cancer de la vessie, le cancer colorectal, le cancer de l'ovaire et le mélanome. L'infiltrat T dans le cancer de la prostate est associé à la fois à de meilleures (107,108) et de moins bonnes survies (109). Ces résultats témoignent du probable rôle antitumoral des lymphocytes T infiltrats « efficients », mais soulèvent également l'importance de la nature de cet infiltrat qui selon sa composition pourrait favoriser le développement tumoral. De la même façon, la place de l'infiltrat T CD8 dans le cancer de la prostate n'est pas établie. Également associé à un meilleur pronostique dans de multiples pathologies tumorales, leur rôle dans le cancer de la prostate est controversé. Si la présence de lymphocytes T $CD8^+$ dans les tumeurs de prostate est associé à un risque de rechute moins important après prostatectomie radicale dans plusieurs études (110,111). D'autres en revanche ne retrouve pas d'impact de cette population en terme de risque de rechute ou de survie (112,113).

L'infiltration en lymphocytes B est plus importante dans le tissu tumoral que dans la prostate saine ; et est associée à une plus grande agressivité tumorale (114). Un des mécanismes décrits implique la production de lymphotoxine par les lymphocytes B qui activera la voie IKKα/STAT3 dans les cellules tumorales et favorisera la croissance tumorale indépendamment des androgènes (24). Des sous-populations productrices d'IL10 sont également présentes dans le cancer de la prostate, lymphocytes B (115) ou plasmocytes (116) pouvant ainsi participer à l'immunosuppression du microenvironnement tumoral et à la progression. Les plasmocytes $IL10^+$ aussi également PD-L1 et participent à l'inhibition

des lymphocytes T cytotoxiques de façon TGFβ dépendante. L'infiltration plasmocytaire générale semble elle associée à un bon pronostic après chirurgie (117), signant l'hétérogénéité tumorale et l'importance d'évaluer le statut fonctionnel des cellules immunes et pas seulement leur présence/absence.

Les cellules de l'immunité innée ont aussi une place dans le microenvironnement du cancer de la prostate. Les polynucléaires neutrophiles sont pourvus d'une importante plasticité. Sous l'influence de l'environnement cytokinique (G-CSF, IL-1β, TGF-β), ils peuvent présenter un phénotype plutôt antitumoral (N1) ou pro-tumoral (N2). Ils semblent associés à une activité antitumorale dans les modèles murins de cancer de la prostate ; où la déplétion en neutrophiles est associée à une croissance tumorale osseuse et la progression tumorale est accompagnée d'une altération des fonctions neutrophiliques (118).

Les cellules Natural Killer (NK) semblent également jouer un rôle protecteur dans le cancer de la prostate métastatique. L'expression des récepteurs activateurs NKp30 et NKp46 sur les lymphocytes NK circulants est fortement corrélée à la survie sans progression et à la survie globale chez des patients atteints de cancer de la prostate hormonosensible (119). Les lymphocytes NK infiltrant les tumeurs de prostate présentent des altérations phénotypiques avec un phénotype plus immatures et des capacités cytotoxiques diminuées en comparaison aux NK infiltrant les tissus sains. Ces altérations semblent être associées à la présence de grandes concentrations en TGF-β1 dans le microenvironnement tumoral (120).

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont des cellules inflammatoires clés qui contribuent également à l'immunosuppression du cancer de la prostate. Les MDSC sont activées par les Treg et exercent leurs fonctions immunosuppressives par déplétion en arginine et en tryptophane dans les tissus environnant. En fin de compte, cela conduit à un arrêt du cycle cellulaire des lymphocytes T et à une diminution de l'expression du TCR (121). Les TAM peuvent être stratifiés en deux sous-populations distinctes, les macrophages M1 et les macrophages M2. La fonction prédominante des macrophages de type M1 est d'éliminer les agents pathogènes et les cellules tumorales. Ils expriment fortement des molécules telles que le CMH-II, le CD80 et le CD86, et ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-γ, le TNF-α et IL-1. En revanche, les macrophages de type M2 remplissent principalement des fonctions anti-inflammatoires et réparatrices, et ils pourraient être définis comme un groupe de cellules avec une expression élevée à la surface membranaire de CD163, CD204, CD206 et sécrétant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, Arg-1, ou le TGF-β. Cependant, la majorité des TAM présents dans le

cancer de la prostate sont de type M2 (122) où leur présence est associée à l'agressivité de la tumeur et à un pronostic moins favorable pour les patients (123).

D'autres éléments « non immuns » du microenvironnement vont avoir un impact sur l'immunogénicité du cancer de la prostate. Les fibroblastes associés aux tumeurs (Cancer associated fibroblasts, CAF) sont une population hétérogène de cellules présente dans le stroma tumoral. On en distingue plusieurs types : les myofibroblastes, engagés dans la production et le remodelage de la matrice extracellulaire du microenvironnement, qui jouent un rôle important dans la signalisation juxtacrine entre les cellules tumorales et favorise l'agressivité tumorale ; les CAF inflammatoires (iCAF), impliqués dans la production de cytokines et chémokines ; et les CAF présentateurs d'antigènes (apCAF). Les iCAF et les apCAF exercent des fonctions immunosuppressives par la sécrétion de facteurs solubles immunosuppresseurs et la transformation de lymphocytes T CD4+ naïfs en Treg par présentation antigénique (124,125).

L'hypoxie tissulaire va également moduler l'activité du microenvironnement immun. Elle va favoriser le développement des TAM de type M2 ; mais également induire l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales diminuant ainsi l'activité antitumorale lymphocytaire (126).

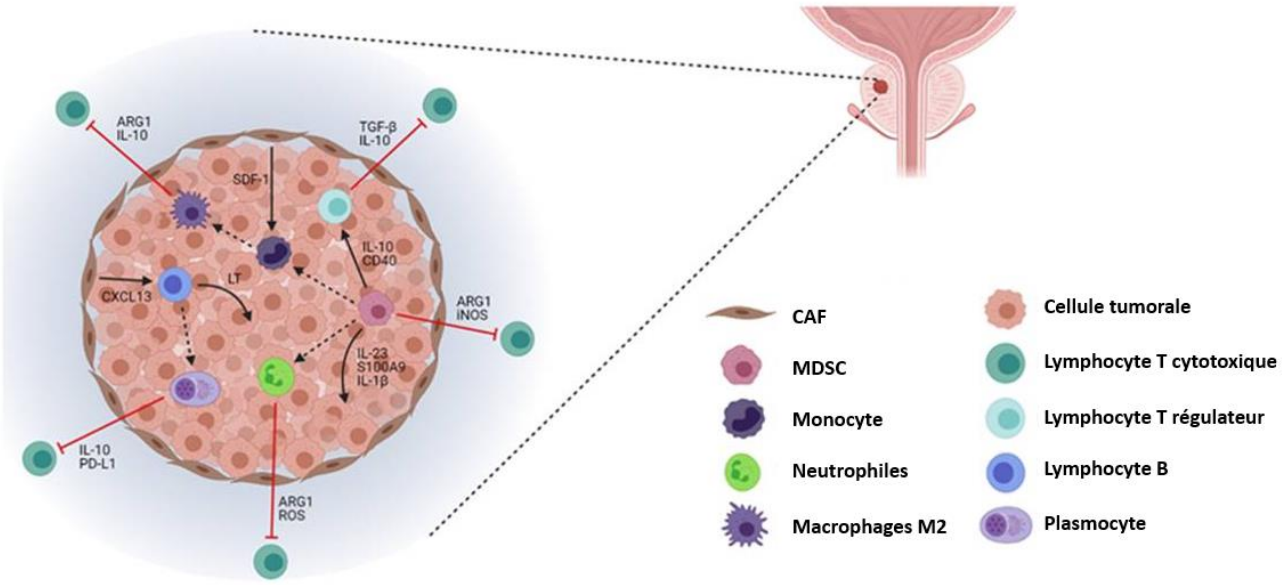


Figure 11. Microenvironnement immun du cancer de la prostate (d'après Kwon et al. (127). CAF: Cancer associated Fibroblast; MDSC: myeloid derived suppressive cell.

b. Modifications du microenvironnement immun sous l'influence des thérapies antitumorales

Le microenvironnement tumoral prostatique ainsi que l'activité des cellules immunes vont être modifiés sous l'influence des différents traitements antitumoraux ; notamment par la déprivation androgénique.

Les hormones stéroïdiennes modulent l'activité immune. Elles ont notamment une action suppressive sur les lymphocytes T $CD4^+$. Le récepteur aux androgènes est exprimé dans le thymus (dans le tissu épithélial et dans les thymocytes) et participent à la diminution en taille de ce dernier. A l'inverse la castration est associée à une hypertrophie thymique. Les androgènes peuvent aussi directement altérer les fonctions des lymphocytes. Ils sont associés à une augmentation de la production d'IL-10 par les lymphocytes T CD4 ; mais aussi, *in vitro*, à la différenciation de splénocytes T $CD4^+$ en lymphocytes T régulateurs. L'utilisation d'antiandrogènes permet à l'inverse de bloquer la production d'IL-10 *in vitro,* démontrant le caractère androgénodépendant des Treg (128).

La déprivation androgénique induit des modifications des cellules T circulantes, augmentant les cellules T naïves et cellules Th1 avec une réduction concomitante des cellules T régulatrices $CD4^+$. Des études sur des modèles murins indiquent des effets immunomodulateurs directs de la déprivation androgénique sur le microenvironnement tumoral ; dépendant du modèle murin utilisé. Une étude menée sur des échantillons cliniques de cancer de la prostate localisé pré- et post-déprivation androgénique - patients traités avec par déprivation androgénique avant chirurgie - montre que le traitement entraînait une augmentation de l'expression des checkpoints immuns, tels que PD-1 et CTLA-4, ainsi qu'une infiltration de cellules immunitaires, y compris cellules CD8 et Th1 (129).

L'ensemble de ces constatations reflètent le rôle des cellules du microenvironnement tumoral dans le développement et le contrôle du cancer de la prostate ainsi que l'importante plasticité de ce microenvironnement notamment au cours du temps et des différentes lignes thérapeutiques.

3. Place de l'immunothérapie dans le traitement du cancer de la prostate

Devant l'implication du système immunitaire dans le développement et la lutte antitumorale dans le cancer de la prostate, la question de la modulation thérapeutique du système immunitaire se pose comme dans de multiples autres pathologies tumorales.

La place des immunothérapies dans le traitement du cancer de la prostate a été discuté dans une revue publiée en français dans le journal « Immunité et Cancer » : Immunothérapies dans le cancer de la prostate : contourner l'immunosuppression pour traiter le cancer. Emilien BILLON, Daniel OLIVE, Gwenaelle GRAVIS. Rev Immun Cancer 2023 ; 7 (4) : 175-87

Abstract

Le cancer de la prostate est le premier cancer chez l'homme en France, et la 3ème cause de décès par cancer, malgré des évolutions thérapeutiques majeures ces dernières années. L'essor observé en oncologie pour les « immunothérapies » n'a pas épargné le cancer de la prostate, qui est une des premières tumeurs solides à avoir obtenu une AMM temporaire pour une immunothérapie avec le Sipuleucel-T. Ce dernier n'a jamais été remboursé en Europe limitant grandement son utilisation en routine. Cependant, les inhibiteurs de checkpoints immuns, largement utilisés dans un grand nombre de pathologies, se sont révélés décevants dans le cancer de la prostate métastatique à ce jour. Actuellement la seule indication retenue aux états unis sont les patients présentant une instabilité microsatellitaire ce qui représente 1 à 2% des cancer de la prostate métastatique.

L'enjeux actuel, réside dans l'identification des mécanismes de résistance afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques, toujours en cours d'évaluation. Des innovations thérapeutiques basées sur l'ingénierie cellulaire (CAR-T cell, anticorps bispécifiques…) apportent des opportunités supplémentaires, prometteuses dans cette pathologie. Elle renforcent l'activité des cellules immunes et/ou contournant les résistances induites par le microenvironnement tumoral.

Immunothérapies dans le cancer de la prostate : Contourner l'immunosuppression pour traiter le cancer

Auteurs : Emilien Billon[1,2], Daniel Olive[2], Gwenaelle Gravis[1,2]

Affiliations :

1. Département d'oncologie médicale, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France
2. Laboratoire d'Immunologie des Tumeurs, IBISA immunomonitoring platform, Centre de recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille, France.

Résumé

Le cancer de la prostate est le premier cancer chez l'homme en France, et la 3ème cause de décès par cancer, malgré des évolutions thérapeutiques majeures ces dernières années. L'essor observé en oncologie pour les « immunothérapies » n'a pas épargné le cancer de la prostate, qui est une des premières tumeurs solides à avoir obtenu une AMM temporaire pour une immunothérapie avec le Sipuleucel-T, mais ce dernier n'a jamais été remboursé en Europe limitant grandement son utilisation en routine. Cependant, les inhibiteurs de checkpoints immuns, largement utilisés dans un grand nombre de pathologies, se sont révélés décevants dans le cancer de la prostate métastatique à ce jour. La seule indication actuellement retenue aux états unis sont les patients présentant une instabilité microsatellitaire ce qui représente 1 à 2% des cancer de la prostate métastatique.

L'enjeux actuel, réside dans l'identification des mécanismes de résistance afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques, actuellement en cours d'évaluation. Des innovations thérapeutiques basées sur l'ingénierie cellulaire (CAR-T cell, anticorps bispécifiques…) apportent des opportunités supplémentaires, prometteuses dans cette pathologie, en renforçant l'activité des cellules immunes et/ou contournant les résistances induites par le microenvironnement tumoral.

Abstract

Prostate cancer is the leading cancer in men in France, and the third leading cause of cancer-related death, despite major therapeutic advances in recent years. The boom in "immunotherapies" in oncology has not spared prostate cancer, which was one of the first solid tumors to get an FDA approval for an immunotherapy with Sipuleucel-T, but without refund in Europe. However, immune checkpoint inhibitors, widely used in a large number of different tumor types, have disappointing results in metastatic prostate cancer. The only one approved is for patients with high microsatellite instability, which is 1 to 2% of patients. The challenge is to identify the mechanisms of resistance in

order to establish new therapeutic strategies, currently under evaluation. The emergence of new therapies based on cell engineering (CAR-T cells, bispecific antibodies, etc.) also offers promising opportunities in this metastatic tumor, by reinforcing the activity of immune cells and/or circumventing resistance induced by the tumor microenvironment.

Mots clés

Cancer de la prostate, immunothérapie, vaccination tumorale, CAR-T cells

Key words

Prostate cancer, immunotherapy, dendritic cell vaccine, CAR-T cells

Points clés

- Le cancer de la prostate métastatique est l'une des premières tumeurs solides à avoir bénéficié d'une AMM pour une immunothérapie : le Sipuleucel-T qui n'a jamais été remboursé en France mais commercialisé aux Etats-Unis.
- Les immunothérapies par inhibiteurs de checkpoints immuns (ICI) montrent des résultats décevants en monothérapie ou en combinaison avec d'autres traitements. La compréhension des mécanismes de résistance est un point clé qui pourrait possiblement améliorer l'efficacité des immunothérapies dans le cancer de la prostate, notamment dans le cadre d'associations thérapeutiques.
- Une indication seule d'immunothérapie par pembrolizumab dans le cancer de la prostate métastatique approuvée à ce jour par la FDA : les tumeurs MSI-H.
- L'évolution des techniques d'ingénierie cellulaire permet de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques en contournant les résistances aux ICI, avec des résultats préliminaires prometteurs : CAR-T cells, anticorps bispécifiques…

Introduction

Le cancer de la prostate est le premier cancer masculin en France métropolitaine, représentant environ 24% des cas de cancers diagnostiqués dans cette population, avec 66070 nouveaux cas ont été diagnostiqués en 2020 en France, avec un âge médian de 69ans (1). Le cancer de la prostate est considéré comme une maladie de très bon pronostic avec une survie globale à 5 ans de 93%. Cette mortalité diminue régulièrement depuis les années 1990, notamment grâce au dépistage permettant un diagnostic de la maladie à un stade localisé dans plus de 80% des cas. Le stade au diagnostic reste en effet le facteur pronostique principal dans le cancer de la prostate. Certaines formes localisées vont bénéficier d'une surveillance active, d'autres de traitement locaux par chirurgie, radiothérapie +/- hormonothérapie, assurant une guérison dans la majorité des cas (2). Cependant, la maladie métastatique demeure toujours mortelle, responsable de 9% des décès par cancer chez l'homme, le plaçant ainsi à la 3ème place des décès par cancer. Le traitement du cancer de la prostate métastatique repose principalement sur la déprivation androgénique à laquelle peut s'associer des hormonothérapies de nouvelle générations et/ou de la chimiothérapie (3). Malgré les innovations récentes, la maladie reste incurable, ce qui justifie la poursuite des efforts de recherche.

Le cancer de la prostate n'a pas échappé à l'engouement général des oncologues pour les immunothérapies. Les premiers succès des inhibiteurs de checkpoints immuns en cancérologie ont permis de relancer l'intérêt des chercheurs et cliniciens sur l'impact que peut avoir le microenvironnement tumoral dans le développement et/ou la lutte anti-tumorale. Le ciblage des lymphocytes T en vue de restaurer leur activité cytotoxique ou l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la tumeur montrent des résultats impressionnants dans un grand nombre de tumeurs comme le mélanome, le cancer du poumon, du rein, de la vessie ou de la tête et du cou (4). Cependant, les résultats cliniques associés à ces approches restent décevants dans le cancer de la prostate, notamment dans le cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (mCRPC).

L'objectif de cette revue est de faire une synthèse sur l'état de l'art des immunothérapies dans le cancer de la prostate métastatique afin de comprendre les mécanismes impliqués dans les résistances constatées ainsi qui les moyens envisagés permettant de restaurer l'efficacité de ces immunothérapies.

Les premiers succès cliniques

Le Sipuleucel-T est une immunothérapie cellulaire active, une sorte de "vaccin" thérapeutique autologue contre les cellules tumorales prostatiques. Il se compose de cellules mononuclées dont les cellules présentatrices d'antigènes (APC), prélevées par cytaphérèse à partir du sang périphérique (PBMC) de chaque patient. Ces cellules sont activées ex vivo avec une protéine de fusion recombinante (PA2024). Le PA2024 est constituée de PAP (phosphatase acide prostatique), un antigène exprimé sur les cellules tumorales, fusionné à un facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (PAP-GM-CSF), qui agit comme un activateur de cellules immunitaires.

En avril 2010, le sipuleucel-T a été approuvé par la FDA pour le traitement des patients atteints de mCRPC. Cette décision était basée sur les résultats de l'essai pivot D9902B de phase III, multicentrique, randomisé et en double aveugle. Au total, 512 patients atteints de mCRPC asymptomatiques ou peu symptomatiques ont été recrutés et ont randomisés, dans un rapport 2:1, à recevoir soit du sipuleucel-T, soit un placebo toutes les 2 semaines, pour un total de trois perfusions (5). Avec un suivi médian de 34 mois, la survie globale (SG) médiane était de 25,8 mois dans le groupe sipuleucel-T contre 21,7 mois dans le groupe placebo (p = 0,03). Aucune baisse du taux de PSA n'a été observée et la survie sans progression (SSP) était similaire dans les deux groupes. La tolérance globale a été très bonne, avec davantage d'effets indésirables (EI) en lien avec un relargage de cytokines de grade 1-2 dans le groupe sipuleucel-T (tels que des frissons légers à modérés (54,1%), une fièvre (29,3%) et des céphalées (16%)), qui étaient généralement transitoires, avec un pourcentage d'EI de grade 3-4 similaire dans les deux bras.

L'efficacité du Sipuleucel-T a également été évalué contre placebo dans le cadre de maladie non métastatique, chez des patients ayant bénéficié d'une prostatectomie et en situation de rechute biologique (essai PROTECT) (6). L'étude a montré un allongement non significatif du délai de rechute biologique dans le bras Sipuleucel-T (18.0 versus 15.4 mois), avec un temps de doublement du PSA plus long (155 versus 105 jours, p=0.038). L'étude ProVent (NCT03686683) évalue quant à elle l'intérêt de l'administration de Sipuleucel-T chez des patients présentant une maladie localisée, en surveillance active (Grade ISUP 1 (Gleason Score = 3 + 3) ou 2 (Gleason Score = 3 + 4). Le recrutement des patients est terminé, l'étude est toujours en cours.

Malgré ces résultats, le Sipuleucel-T n'est pas disponible en Europe (absence de remboursement et retrait de l'AMM pour cause commerciale), bien qu'il conserve son approbation aux Etats-Unis dans la prise en charge des mCRPC asymptomatiques ou pauci-symptomatiques.

D'autres stratégies de vaccination anti-tumorale ont par la suite été développées dans le cancer de la prostate métastatique. PROSTVAC utilise la structure des poxvirus modifiée pour contenir la séquence du PSA ainsi qu'une séquence TRICOM codant pour 3 molécules de co-stimulation (ICAM-1 (CD54), B7.1 (CD80) and LFA-3 (CD58)) (7). Le virus modifié injecté par voie sous cutanée sera ainsi capté par les cellules dendritiques du patient, génèrera une forte immunogénicité contre les protéines virales dont le PSA et sera responsable d'une activité antitumorale. L'efficacité du PROSTVAC +/- GM-CSF a été évalué au cours d'un essai de phase III multicentrique, incluant 1297 patients avec cancer de la prostate métastatique non ou peu symptomatiques. L'étude a été arrêtée pour futilité après la 3ème analyse intermédiaire, avec l'absence d'amélioration de la survie globale dans les bras expérimentaux par rapport au groupe placebo (SG = 33.2 mois dans le groupe PROSTVAC+GM-CSF, versus 34.4 mois dans le groupe PROSTVAC seul, versus 34.3 mois dans le bras placebo). Des essais de PROSTVAC en association sont en cours (8).

DCVAC/PCa (ou stapuldencel) est une immunothérapie active basée sur des cellules dendritiques autologues qui activent l'immunité antitumorale. Des cellules dendritiques préparées à partir des monocytes de patient ont été recueillies par leucaphérèse et ensuite exposées à une lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome de la prostate (LNCaP) tuée par modalité immunogène. L'essai VIABLE, essai de phase III, randomisé, multicentrique, n'a pas permis de montrer une amélioration de la survie globale, la survie sans progression radiologique, le temps de doublement du PSA ou le temps avant survenue d'évènement osseux, dans une cohorte de 787 patients traités par docétaxel + DCVAC/PCa ou placebo (9).

ProstAtak® (AdV-tk) est une nouvelle approche vaccinale, connue sous le nom d'immunothérapie cytotoxique à médiation génique (GMCI), ou thérapie génique suicide. En pratique, l'effet du vaccin est médié par l'administration intra-tumorale (dans la prostate par injection trans-rectale guidée par ultrasons) d'un vecteur adénoviral contenant le gène de la thymidine-kinase du virus de l'herpès (AdV-tk), suivie de l'administration systémique (par voie orale) d'un promédicament anti-herpétique (valaciclovir). Il a montré une synergie avec la

radiothérapie sans toxicité supplémentaire et des taux de récidive plus faibles que prévu lors d'essais cliniques antérieurs (10). L'efficacité de ce traitement en association à la radiothérapie chez des patients atteints d'un cancer de la prostate localisé de risque d'Amico intermédiaire ou élevé est en cours (PrTK03, NCT01436968), ou encore chez des patients en cours de surveillance active pour une tumeur à bas risque (PrTK04, NCT02768363).

Les stratégies vaccinales actuelles en cours d'évaluation dans le cancer de la prostate impliquent des changements de cibles (OVM-200 ciblant la survivin, NCT05104515 ; HB-302/ HB-301 ciblant le PSA et la PAP, NCT05553639 ; pTVG-AR DNA vaccine ciblant le récepteur aux androgènes, NCT04090528), l'utilisation de vaccin à ARN messagers (essai PRO-MERIT, NCT04382898, permettant le ciblage de 5 antigènes tumoraux), ou encore l'utilisation de vaccins personnalisés dirigés contre des antigènes spécifiques de chaque patient (Personalized Genomic Vaccine, PGV-001, NCT05010200). Les associations avec les autres stratégies d'immunothérapies sont elles aussi en cours d'évaluation (cf. sections suivantes).

L'ère des inhibiteurs de checkpoints immuns (ICI)

Les thérapies anti-CTLA-4

L'ipilimumab est le premier inhibiteur de checkpoint immun à avoir reçu une AMM dans la prise en charge de cancer. Il s'agit d'un anticorps monoclonal dirigé contre CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), une molécule régulant négativement l'activation des lymphocytes T. L'activation des lymphocytes T induit l'expression à leur surface de CTLA-4 comme mécanisme de rétrocontrôle. L'administration d'ipilimumab permet ainsi l'augmentation du nombre de lymphocytes dans le microenvironnement tumoral, dans le but de transformer une tumeur dite « froide » en une tumeur « chaude » (11). L'évaluation en phase I des anti-CTLA-4 (ipilimumab ou tremelimumab) dans le cancer de la prostate résistant à la castration a montré la faisabilité de l'approche avec de faibles signaux d'activité (diminution du PSA > 50% chez 2 patients sur 14 (12) et allongement du temps de doublement du PSA chez 3/11 (13)).

Les résultats issus de l'évaluation de l'ipilimumab en phase III sont en revanche plutôt décevants. Dans une première étude de phase III en double aveugle, 799 patients avec cancer de la prostate métastatique résistants à la castration ont été inclus et ont reçu une radiothérapie palliative sur les métastases osseuses + ipilimumab ou placebo. On a observé

une amélioration statistiquement significative de la SSP, mais aucune différence statistiquement significative de la SG entre le groupe ipilimumab et le groupe placebo (14). Cependant, dans l'étude de suivi à long terme, les taux de survie globale dans les groupes ipilimumab et placebo sont de 25,2 % contre 16,6 % à 2 ans, 15,3 % contre 7,9 % à 3 ans, 10,1 % contre 3,3 % à 4 ans, et 7,9 % contre 2,7 % à 5 ans (15), en faveur d'un taux plus élevé de longs survivants dans le bras ipilimumab.

Une autre étude randomisée de phase III (CA184-095) a évalué l'innocuité et l'efficacité de l'ipilimumab par rapport à un placebo dans le traitement de première intention des patients atteints de mCRPC asymptomatique ou peu symptomatique sans métastases viscérales. L'ipilimumab n'a pas atteint son critère d'évaluation principal, à savoir la survie globale (SG médiane 28,7 mois dans le groupe ipilimumab contre 29,7 mois dans le groupe placebo ; HR 1,11 ; IC 95,87%, 0,88 à 1,39 ; p = 0,3667). Une certaine activité antitumorale a été démontrée en termes de SSP médiane (5,6 mois dans le groupe ipilimumab contre 3,8 dans le groupe placebo ; HR 0,67 ; 95,87% CI, 0,55 à 0,81) et de taux de réponse au PSA (23% avec l'ipilimumab contre 8% avec le placebo). Selon cet essai de phase III, la diarrhée a été le seul effet indésirable lié à l'immunité (irAES) de grade 3-4 rapporté chez les 15 % de sujets recrutés recevant l'ipilimumab. Des irAES ont été observés chez 31 % des sujets du groupe ipilimumab et que 2 % des patients traités par l'ipilimumab (n = 9) sont décédés en raison d'irAES (16).

Il est toutefois à noter la description de cas de patients long répondeurs sous ipilimumab en monothérapie avec un bénéfice clinique important, témoignant d'une activité de l'ipilimumab (17). Ces patients ont présenté une réponse complète au traitement, persistant même à l'arrêt du traitement. Ces cas illustrent la nécessité d'identifier les biomarqueurs de réponse à l'ipilimumab pour mieux sélectionner les patients cibles.

Les thérapies anti-PD1/PD-L1

Le récepteur PD-1 est un checkpoint exprimé à la surface des lymphocytes T, qui permet, lorsqu'il interagit avec son ligand PD-L1, d'empêcher l'activation des lymphocytes T et donc la destruction de la cellule tumorale.

Le pembrolizumab est un anticorps monoclonal anti-PD1. Un essai de phase Ib évaluant le pembrolizumab chez 23 patients atteints de mCRPC PD-L1-positifs (≥ 1%) ayant reçu au moins deux traitements antérieurs, a montré un ORR de 17,4 %, une médiane de SSP et une SG de

3,5 et 7,9 mois, respectivement (18). Le pembrolizumab en monothérapie a également été évalué en phase II chez 258 patients avec mCRPC prétraités par chimiothérapie et hormonothérapie. Cette étude a montré un taux de réponse objective de 5% chez les patients PD-L1-positifs et de 3% chez les patients PD-L1-négatifs qui présentait une maladie évaluable selon les critères RECIST 1.1. La survie globale médiane était de 9,5 mois chez les patients PD-L1-positifs RECIST-mesurable, de 7,9 mois chez les patients PD-L1-négatifs RECIST-mesurable et de 14,1 mois chez les patients ayant une maladie à prédominance osseuse, indépendamment de l'expression de PD-L1 (19).

Dans l'étude de phase 1b/2 KEYNOTE-365 (NCT02861573), le pembrolizumab associé au docétaxel et à la prednisone a permis d'obtenir un taux de décroissance du PSA de 34 %, 23% de réponses objectives, une PFS radiographique médiane de 8,5 mois et une SG de 20,2 mois chez des patients atteints de mCRPC naïfs de chimiothérapie qui avaient été traités par l'abiratérone ou l'enzalutamide. Cependant le bénéfice de l'ajout du pembrolizumab au docétaxel n'a pas été confirmé en phase III (KEYNOTE-921) avec une SSP médiane de 8.6 mois dans le bras pembrolizumab + docétaxel versus 8.3 mois dans le bras placebo + docétaxel et une survie globale médiane de 19.6 mois versus 19.0 mois (20).

L'association immune checkpoints avec les hormonothérapies de nouvelle génération a également été évaluée. Un essai de phase II combinant le pembrolizumab et l'enzalutamide a été mené chez 28 hommes atteints de mCRPC progressant sous l'enzalutamide seul. L'essai a permis d'obtenir un taux de diminution du PSA de 18 % (5/28), un ORR de 25 % (3/12), une SSP médiane de 3,8 mois, une OS de 21,9 mois chez tous les patients et une SG de 41,7 mois chez les répondeurs (21). L'étude de phase III KEYNOTE-641 évaluant l'association enzalutamide/pembrolizumab versus enzalutamide seul chez des patients mCRPC à quant à elle été arrêtée après analyse intermédiaire pour futilité devant l'absence d'amélioration de la survie sans progression radiologique ou de la survie globale. Dans l'essai randomisé de phase III IMbassador 250, l'atézolizumab (un anticorps anti-PD-L1) en association avec l'enzalutamide a été comparé à l'enzalutamide seul chez 759 patients atteints de mCRPC ou de CRPC localement avancé qui avaient progressé sous abiratérone, et docétaxel. L'objectif principal de l'étude, l'amélioration de la SG dans le bras atézolizumab/enzalutamide, n'a pas été atteint (22). Les résultats de l'étude suggèrent toutefois que l'association atézolizumab plus enzalutamide pourrait être utile chez des patients sélectionnés notamment ceux

présentant une forte expression intratumorale de PDL1 et des niveaux élevés de cellules T CD8+ intratumoraux, évalués en immunohistochimie.

Le pembrolizumab est le seul ICI à avoir une autorisation aux Etats-Unis pour les patients présentant une tumeur métastatique, quel que soit le type histologique, avec instabilité microsatellite (MSI-H) ou déficit dans le système mismatch -repair (dMMR) ayant progressé après une première ligne thérapeutique et sans alternative thérapeutique satisfaisante. Cette situation représente 1 à 2% des cancers de la prostate métastatiques mais il existe peu de données publiées concernant l'utilisation du pembrolizumab chez ces patients. Quelques séries de cas ont été rapportées, incluant une dizaine de patients chacune, qui rapportent un taux de diminution du PSA > 50% d'environ 50% avec des réponses radiologiques parfois prolongées (23).

La plasticité du microenvironnement au centre des résistances à l'immunothérapie ?

Malgré ces diverses modalités thérapeutiques, les immunothérapies montrent une efficacité limitée dans le cancer de la prostate en raison de son environnement immunitaire dit « froid », c'est-à-dire peu infiltré par des cellules immunes effectrices. Pour une réponse immunitaire antitumorale robuste, 3 étapes majeures sont nécessaires : la génération de cellules T réactives aux cellules tumorales, l'interaction physique entre les cellules cibles et effectrices, et un microenvironnement permettant les fonctions effectrices immunitaires. Des altérations sur chacune de ces étapes peuvent expliquer l'échec des immunothérapies.

La plasticité du microenvironnement tumoral qui est sous l'influence des différentes lignes thérapeutiques est aujourd'hui bien documentée. L'étude du microenvironnement tumoral du cancer de la prostate avant et après traitement par ipilimumab montre l'augmentation de l'infiltration immune dans la tumeur, supposée être bénéfique. L'analyse approfondie du microenvironement tumoral de patients répondeurs à l'ipilumumab a permis de montrer que la réponse est associée à une signature transcriptomique de réponse à l'interféron γ et de lymphocytes infiltrant la tumeur, mais également que les lymphocytes intra-tumoraux sont bien réactifs face aux antigènes tumoraux (24).

Par ailleurs, on constate une augmentation d'expression de différents checkpoints inhibiteurs comme PD-L1 ou VISTA (11). L'augmentation d'expression de PD-L1 est identifiée sur les cellules immunes T CD4, CD8, et sur les macrophages, ainsi que sur les cellules tumorales.

L'augmentation d'expression de VISTA est-elle plus marquée sur les macrophages, dont la présence dans la tumeur semble également plus marquée post traitement. L'augmentation d'expression de checkpoints immuns inhibiteurs peut ainsi expliquer en partie les résistances observées dans le cancer de la prostate.

Ces constatations sont des arguments pour le développement de combinaison d'inhibiteurs de checkpoints immuns. L'essai Checkmate 650 a évalué l'association ipilimumab + nivolumab 4 cycles espacés de 3 semaines suivis d'un traitement par nivolumab seul toutes les 4 semaines jusqu'à progression ou toxicité inacceptable, a concerné 45 patients mCRPC naïfs de chimiothérapie. Sur les 32 évaluables pour la réponse, 8 (25.0%) ont présenté une réponse objective dont 2 une réponse complète. Cependant, seul 3 patients sur 30 pré-traités par chimiothérapie ont présenté une réponse objective ; et on constate également près de 50% d'arrêt de traitement pour toxicité dans les deux cohortes (25). La charge mutationnelle semble prédictive de réponse dans les deux cohortes avec un taux de réponse de 50% chez les patients avec une charge mutationnelle élevée.

L'efficacité des ICI en combinaison semble également très inférieure chez les patients présentant des métastases osseuses. 26 patients mCRPC avec métastases osseuses ont reçu une combinaison durvalumab/tremelimumab pour 4 cycles suivis d'une maintenance par durvalumab seul jusqu'à progression ou toxicité inacceptable. Aucun patient n'a présenté de réponse objective, 6 une maladie stable, avec une SSP radiologique de 3,7mois. L'étude du microenvironnement osseux par analyses transcriptomiques chez ces patients a montré une augmentation des signatures macrophages et neutrophiles après traitements, ainsi qu'une augmentation d'expression de *CSFRF3, MARCO, LILRB4* et *VISTA*, habituellement exprimés par les macrophages, et associés à des fonctions inhibitrices pour les deux derniers (26). Les analyses transcriptomiques et immunohistochimiques effectuées chez un patient ayant présenté une SSP longue montrent un microenvironnement post traitement plus infiltré en lymphocytes T CD8+ et lymphocytes Th1, sans augmentation de l'infiltration Treg, macrophages, ou neutrophiles, en faveur du rôle délétère suggéré de ces populations. Le microenvironnement des métastases osseuses montre également une plasticité différente du microenvironnement des métastases viscérales en réponse aux traitements anti-CTLA-4. Il a été constaté une augmentation de la proportion de cellules Th17 après traitement dans les métastases osseuses, alors que cette proportion reste inchangée dans les métastases

viscérales où il est décrit une augmentation des populations Th1. Ce switch phénotypique particulier pourrait expliquer également les résistances primaires observés chez ces patients (27). Ces données ont été confirmées dans des modèles murins de cancer de la prostate métastatique, avec mise en évidence de plus grandes concentrations d'Il6 et de TGFβ dans le microenvironnement tumoral osseux par rapport au microenvironnement tumoral viscéral. Dans ce même modèle, l'ajout d'une thérapie anti-TGFβ aux inhibiteurs de checkpoints favorisent l'infiltration CD4+, l'expansion clonale CD8, et conduit à une diminution de la croissance tumorale avec un impact positif sur la survie (20).

D'autres perturbations dans le microenvironnement tumoral du cancer de la prostate ont été décrites et peuvent être responsables des résistances primaires aux ICI observées. Certaines de ces modifications sont associées à des altérations génomiques bien décrites dans le cancer de la prostate et connues pour être associées à un pronostic défavorable. La délétion-perte de fonction de *PTEN* est retrouvée chez près de 50% des patients mCRPC. Elle est responsable d'une hyper activation de la voie PI3K, responsable à son tour d'une augmentation de la prolifération cellulaire et de la progression métastatique. La perte de fonction de *PTEN* est également responsable d'une augmentation de l'infiltration en MDSC, de macrophages associés aux tumeurs, et de lymphocytes T régulateurs et est corrélée à une plus grande expression de IDO1 dans le microenvironnement tumoral. La seconde grande altération marquant un tournant évolutif dans le cancer de la prostate est l'apparition d'altérations *TP53*, retrouvées chez 50% des patients mCRPC. Sur le plan immun, les altérations *TP53* sont associées un microenvironnement tumoral immunosuppressif avec une augmentation de l'infiltration en MDSC via la sécrétion de CXCL17, l'augmentation de l'expression lymphocytaire de PD-1, PD-L1 et CSF1R et une plus forte infiltration en macrophages immunosuppressifs M2 (28).

L'identification des mécanismes et de la multiplicité des acteurs du microenvironnement tumoral impliqués dans l'immunosuppression et dans la résistance primaire aux ICI a ouvert la voie aux associations thérapeutiques, ainsi qu'au développement de nouvelles stratégies afin de contourner ces résistances (**Figure 1**).

Agir sur le microenvironnement pour restaurer l'efficacité des ICI

Devant l'efficacité très modeste des inhibiteurs de checkpoints immuns en monothérapie ou en association aux traitements de référence du cancer de la prostate métastatique, les efforts se portent vers des associations visant à renforcer l'activité des ICI en ciblant notamment les autres acteurs du microenvironnement tumoral.

Combinaison ICI/vaccination antitumorale

Des essais de phase I et II du pembrolizumab en association avec l'ADXS31-142 (vaccin contenant une souche vivante atténuée de la bactérie Gram-positive Listeria monocytogenes et codant pour une protéine de fusion constituée de PSA et d'un fragment de la protéine immunostimulante listériolysine O (LLO)) (29), ou le MVI-816 (un vaccin ADN codant pour la phosphatase acide prostatique) (30) ont été menés chez des patients atteints de mCRPC progressif ou d'un cancer de la prostate oligométastatique hormonosensible nouvellement diagnostiqué. Ces essais ont permis d'observer des réponses durables des thérapies combinées dans un sous-groupe de patients atteints de cancer de la prostate. Cependant, de futurs essais cliniques randomisés sont nécessaires pour valider ces résultats.

L'association PROSTVAC avec le nivolumab est quant à elle en cours d'évaluation en phase I/II (NCT02933255), en situation métastatique ainsi qu'en néo adjuvant.

Combinaison ICI/inhibiteurs de PARP

La charge mutationnelle ou Tumor mutational Burden (TMB) parait être un facteur prédictif de réponse aux ICI dans de multiples pathologies, y compris le cancer de la prostate. Une stratégie actuelle est d'essayer d'augmenter cette charge mutationnelle dans le cancer de la prostate afin d'améliorer l'efficacité des ICI en augmentant la réactivité des cellules T face aux cellules tumorales.

La prévalence des altérations germinales ou somatiques des gènes de réparation de l'ADN chez les patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique atteint 20 à 30 %. Ces gènes comprennent *BRCA1/2*, ainsi que d'autres gènes tels que *ATM*, *FANCA*, *CHEK2*, *PALB2*, *CDK12* et *RAD51D*. Les inhibiteurs de la poly-ADP ribose polymérase (PARPi) sont apparus comme un traitement disponible pour un sous-ensemble de patients atteints de mCRPC présentant une anomalie de la réparation de l'ADN. Les PARPi vont, dans cette situation, empêcher d'autant

plus la réparation de l'ADN, favoriser l'accumulation de mutations et provoquer la mort cellulaire, par létalité synthétique (31). Ainsi, l'association de PARPi et d'ICI semble représenter une stratégie intéressante pour améliorer la réponse thérapeutique notamment chez les patients présentant un déficit dans les gènes de la recombinaison homologue. En agissant sur la réparation de l'ADN par l'intermédiaire de PARPi, il est suggéré que les lésions de l'ADN qui en résultent peuvent augmenter la charge en néoantigènes, rendant ainsi les tumeurs potentiellement plus sensibles à la thérapie par ICI.

Dix-sept patients atteints de mCRPC déjà traités, avec ou sans altération des gènes de la recombinaison homologues, et ayant reçu une association de durvalumab et d'olaparib, ont présenté une PFS médiane de 16,1 mois et une réponse radiographique et/ou du PSA de 53 % (32). Dans l'étude CheckMate 9KD (33), un essai de phase II composé de multiples cohortes a été mené chez des patients atteints de mCRPC. Dans la cohorte A2, les patients ayant déjà reçu un traitement à base d'abiratérone ou d'enzalutamide, mais pas de chimiothérapie, ont reçu 480 mg de nivolumab par voie IV toutes les 4 semaines, plus 600 mg de rucaparib par voie orale deux fois par jour. Sur un total de 71 patients, 34 patients présentaient une altération de la recombinaison homologue (HRR+). Globalement, le taux de réponse objective était de 39% et 66% des patients ont présenté une diminution du PSA > 50% (PSA50). La médiane de la SSP radiologique était de 8,1 mois pour tous les patients, mais de 10,9 mois pour les patients HRR+ contre 5,6 mois pour les patients HRR-. Dans la cohorte A1 de cette étude, les patients atteints de mCRPC étaient plus lourdement prétraités et avaient déjà reçu de l'abiratérone ou de l'enzalutamide et une chimiothérapie. Dans cette cohorte, 88 patients ont été traités ; 45 patients étaient HRR+. Le taux de réponse objective était de 10,3 % au total, et de 17,2 % chez les patients HRR+ contre 3,4 % chez les patients HRR-. En outre, le PSA50 confirmé était de 11,9 % dans l'ensemble, de 18,2 % chez les patients HRR+ et de 5,0 % chez les patients HRR-. Chez les patients présentant des mutations du gène BRCA2, le taux de réponse objective confirmé était de 37,5 % (3 patients sur 8) et le PSA50 confirmé était de 45,5 % (5 patients sur 11). La médiane globale de la SSP radiologique était de 4,9 mois et la médiane de la OS de 13,9 mois.

L'étude KEYNOTE-365 (34) est une étude de phase Ib/II évaluant le pembrolizumab associé à d'autres agents chez des patients atteints de mCRPC ayant déjà reçu une chimiothérapie à base de docétaxel. Dans la cohorte A, les patients reçoivent 200 mg de pembrolizumab par

voie IV toutes les 3 semaines et 400 mg d'olaparib par voie orale deux fois par jour. Le PSA50 était de 15 %, l'ORR de 8,5 % et le taux de contrôle de la maladie (DCR) de 26 %. La médiane de SSP radiologique était de 4,5 mois et la médiane d'OS de 14 mois.

Sur la base des résultats de l'étude KEYNOTE-365, l'étude de phase III KEYLYNK-010 associant le pembrolizumab à l'olaparib a été lancée (35). L'étude comparait le pembrolizumab associé à l'olaparib à l'abiratérone ou à l'enzalutamide. L'étude a été interrompue après une analyse de futilité planifiée à l'avance, car aucun bénéfice de l'association pembrolizumab et olaparib n'a été démontré au moment de l'analyse intermédiaire.

L'association du talazoparib et de l'avelumab est actuellement étudiée dans le cadre de l'essai JAVELIN PARP Medley (36). Il s'agit d'un essai de phase Ib/II sur des patients atteints de tumeurs solides avancées, y compris le mCRPC, avec ou sans altérations HHR. Les patients ont reçu 800 mg d'avelumab toutes les 2 semaines plus 1 mg de talazoparib une fois par jour. Dans la cohorte mCRPC de l'essai de phase 2, aucune réponse confirmée n'a été rapportée, mais des réponses du PSA ont été observées chez 2 des 21 patients. Dans la cohorte mCRPC HHR positive, l'ORR était de 11,1%.

Des essais sont encore en cours pour évaluer la pertinence de telles associations (NCT04336943 combinant durvalumab/olaparib, et NCT02484404 évaluant le durvalumab à l'olaparib et au cediranib).

<u>Combinaison ICI/Radiothérapie interne vectorisée ciblant le PSMA</u>

Le ^{177}Lu est un radionucléotide combiné à un ligand du PSMA dans le cadre d'une radiothérapie interne vectorisée ciblée sur le PSMA. Il est administré au patient par voie intraveineuse et atteint les cellules tumorales, où il émet des particules β^- avec une pénétration tissulaire <2 mm, minimisant ainsi les dommages aux tissus sains adjacents. Cette thérapie est disponible en monothérapie dans le traitement du cancer de la prostate résistant à la castration. En plus de l'effet direct des radiations sur le développement tumoral, il est suggéré que le ^{177}LuPSMA-617 peut induire des modifications immunes, notamment activer la voie de production des interférons de type I, et augmenterait la présentation antigénique.

L'association ^{177}LuPSMA-617 avec différents inhibiteurs de checkpoints a montré des résultats encourageants en essai de phase I. Dans l'essai PRINCE (NCT03658447), 37 patients avec mCRPC ont reçu l'association pembrolizumab/^{177}LuPSMA-617. 76% ont présenté une

diminution du PSA > 50% et 7/10 patients évaluables selon les critères RECIST avaient une réponse partielle. L'association 225Ac-J591 avec le pembrolizumab et un bloqueur du récepteur aux androgènes (eg enzalutamide, apalutamide ou darolutamide) a montré une décroissance du PSA > 50% chez 50% des 12 patients traités, et 33% de PFS > 6 mois lors d'un essai de phase I (NCT04946370) (37).

L'essai de phase II EVOLUTION (NCT05150236) évalue quant à lui l'association ^{177}LuPSMA-617/nivolumab/ipilimumab. Le recrutement est en cours.

Autres combinaisons

Le cabozantinib est un inhibiteur de tyrosine kinase non sélectif qui inhibe le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire 2 (VEGF2), c-MET, RET et AXL. Son association avec l'atezolizumab a été évaluée dans l'essai de phase Ib COSMIC-021, chez 132 patients avec mCRPC. 23% d'entre eux ont présenté une réponse objective, avec une PFS médiane de 5.5mois. L'évaluation en phase II est en cours (NCT05168618). Un essai de phase II est également ouvert associant le cabozantinib et le nivolumab (NCT05502315).

La cryoablation prostatique a également été évaluée en association au pembrolizumab dans le cancer de la prostate hormonosensible oligometastatique, dans le but d'augmenter l'immunogénicité de la tumeur et renforcer l'effet de l'anti-PD-1. 13 patients ont été traités en phase I. 92% ont présenté une réponse sur le taux de PSA, et un intervalle sans traitement de 17.5 mois (38).

Place des CAR dans le cancer de la prostate

La modification génétique des cellules immunitaires autologues et allogéniques (lymphocytes T principalement, cellules NK, macrophages, etc.) avec introduction de récepteurs antigéniques chimériques (CAR) est une nouvelle approche puissante pour cibler des antigènes spécifiques sur les cellules tumorales. Les CAR-T cells correspondent à des lymphocytes T du donneur modifiés génétiquement pour leur intégrer un récepteur chimérique qui combine des domaines de liaison à l'antigène - le plus souvent, un fragment variable à chaîne unique (scFv) dérivé des domaines variables des anticorps - avec les domaines de signalisation de la chaîne TCRζ et des domaines de co-stimulations supplémentaires provenant de récepteurs tels que le CD28, l'OX40 et le CD137 (39).

Le cancer de la prostate est un modèle idéal pour le développement de CAR-T cells car la prostate est un organe non essentiel, exprimant plusieurs antigènes spécifiques. De plus, la progression tumorale étant relativement lente, elle est compatible avec les délais inhérents à la production des CAR puis à l'instauration de la réponse immune après administration du produit. Les cibles antigéniques privilégiées à l'heure actuelle sont le PSMA (prostate-specific membrane antigen), le PSCA (prostate stem cell antigen), le PSA (prostate-specific antigen), le PAP (prostate acid phosphatase), EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), et Trp-p8 (transient receptor potential). Des résultats préliminaires sont disponibles démontrant la faisabilité d'une telle approche dans le cancer de la prostate métastatique ; avec plusieurs essais cliniques en cours (**Tableau 1**).

Le PSMA est une protéine transmembranaire de type II contenant une glutamate carboxypeptidase. Elle est principalement exprimée dans cinq sites : la prostate, les reins, les glandes salivaires, les cellules et l'intestin grêle. Cependant, elle est surexprimée dans les cellules tumorales prostatique, et son expression augmente avec le score de Gleason et la progression tumorale, en particulier dans le CRPC (40). Zuccolotto et al ont constaté que les CAR-T ciblant le PSMA survivaient, prolifèraient et reconnaissaient les cellules PSMA+ dans un modèle de souris immunodéficientes avec greffe de cellules PC3-PIP (41).

L'une des premières études sur les CAR-T cells chez des patients atteints de cancer de la prostate métastatique était un essai de phase I à doses croissantes évaluant la sécurité et la tolérance d'un CAR-T de deuxième génération ciblant la PSMA. L'étude a recruté sept patients pour trois niveaux de dose et a permis de confirmer la tolérance et la persistance des CAR-T cells sur une durée de plus de 2 semaines (42). Dans une étude ultérieure de phase I à doses croissantes, cinq patients ont été traités avec des cellules CAR-T anti-PSMA de première génération et une perfusion continue d'IL-2 à faible dose afin d'augmenter l'expansion des cellules T. Sur les cinq patients traités, deux ont obtenu des réponses cliniques partielles avec des baisses du PSA de 50 % et 70 %, ainsi qu'une réponse mineure chez un troisième patient (43). Cependant, des essais de phase précoce récemment rapportés fournissent des données plus encourageantes. Les premiers résultats d'un essai de phase I ouvert, multicentrique, 3 + 3 à doses croissantes utilisant le P-PSMA-101 ont été rapportés (NCT04249947). Le P-PSMA-101 est un CAR conçu à l'aide d'une nouvelle plateforme utilisant le système de modification de l'ADN piggyBac, qui permet la production de cellules T avec une plus forte proportion de

cellules souches mémoires (Tscm) qui peuvent ensuite conduire à une meilleure expansion des cellules T effectrices au sein du microenvironnement tumoral. Au moment de la présentation des données, l'essai en cours avait recruté 10 patients lourdement prétraités. Sur les 10 patients, des baisses de PSA de >50% ont été observées chez 3 patients, et de >99% chez 1 patient. Au total, sept patients ont vu leur taux de PSA diminuer et trois des quatre patients ayant bénéficié d'une imagerie F-fluorodéoxglucose (FDG) et PSMA-PET avant et après le traitement ont présenté des réponses radiographiques marquées (y compris des réponses complètes) (44).

L'antigène des cellules souches de la prostate (PSCA) est une petite protéine de surface cellulaire ancrée dans la membrane via un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) et appartenant à la famille Thy-1/Ly-6. Chez l'homme, la PSCA est exprimée dans les cellules épithéliales de la prostate, de la vessie, des reins, de la peau, de l'œsophage, de l'estomac et du placenta (45). Morgenroth et al. ont développé pour la première fois des CAR-T cells anti-PSCA en 2007 et ont pu démontrer une lyse efficace des cellules exprimant la PSCA sur des modèles in vitro (46). Ces résultats ont été reproduits in vivo chez des souris immunodéprimées utilisant divers modèles de cancer de la prostate (PC-3, PC-3M, mel526 et LAPC-9). Les souris traitées par CAR-T ont présenté une régression tumorale et une survie prolongée par rapport aux souris portant des xénogreffes tumorales non traitées (47–49). Ces résultats encourageants ont permis la mise en place d'essais cliniques pour évaluer l'intérêt des CAR T cells anti-PSCA dans le mCRPC. Une étude de phase I (NCT03873805) évaluant la sécurité des CAR T cells ciblant le PSCA chez 14 patients atteints de mCRPC, a permis de montrer que le PSCA était fortement exprimé dans plus de 80% des tumeurs primaires et 90% des métastases. Cette étude montre la faisabilité de l'administration de CAR T cells ciblant le PSCA dans cette population avec pour toxicité principale des cystites, la vessie présentant également une expression du PSCA. Des réponses radiologiques et des diminutions du PSA ont pu être constatés mais le design de l'étude ne permet pas de confirmer l'activité de ces CAR T cells (50). Une étude de phase Ib vient d'être lancée pour définir la dose optimale pour le traitement (NCT05805371).

Les enjeux actuels dans le développement des CAR dans le cancer de la prostate sont multiples. L'hétérogénéité tumorale reste une cause importante d'échappement de la tumeur aux CAR-T cells. En effet, au sein d'une même tumeur, les cellules tumorales vont présenter

différents phénotypes et fonctions, avec certains sous-clones résistants aux thérapeutiques engagées. De plus, les cibles thérapeutiques ne sont pas spécifiques du tissu tumoral et peuvent être retrouvées dans des tissus sains, responsables d'effets indésirables (effet on-target off-tumor). Une stratégie actuelle pour limiter ce problème est d'utiliser des CAR-T dont l'activité est médiée par la reconnaissance de 2 antigènes tumoraux (par exemple, le PSMA et le PSCA (48)) permettant une activation préférentielle des CAR-T dans le tissu tumoral et non dans le tissu sain. Une autre stratégie consiste à modifier l'affinité du récepteur CAR pour que l'activation ne soit médiée qu'en présence d'une forte expression de l'antigène, les tissus sains exprimant de façon plus faible les antigènes d'intérêt (51).

Une autre problématique majeure du développement des CAR dans le cancer de la prostate est le fort potentiel immunosuppresseur et modulateur du microenvironnement tumoral. Pour faire face à cela, des modèles de CAR-T cells modifiés ont vu le jour. Des CAR-T cells anti-PSMA surexprimant un récepteur dominant négatif du TGFβRII (TGFβRDN), bloquant ainsi la signalisation du TGFβ, ont été évalués en phase I (NCT03089203) chez 13 patients, montrant la faisabilité de l'approche avec quelques signes d'activité (52). Des modèles avec altérations combinées des voies du TGFβ et de TIM3 (dnTGFβRII-trTIM3-PSMA-CAR-T cells) (53) ou capables de produire des anticorps anti-IL23 (l'IL23 est produite par les MDSC et est impliquée dans l'activation de la voie du récepteur aux androgènes, le remodelage de la matrice extracellulaire et la diminution de l'infiltration T CD8 (54)) sont également en développement.

Enfin, une problématique majeure à l'utilisation des CAR T cells est l'importante toxicité associée à ce traitement, notamment les syndromes de relargage de cytokines et les toxicités neurologiques qui limitent l'utilisation de ces thérapies. Pour remédier à cette importante toxicité ainsi qu'à la lourdeur du procéder de fabrication d'un produit autologue (délais, couts de fabrication), les efforts se tournent également dans le développement de CAR à partir de cellules NK (55,56) ou γδ T cells (57), dépourvues d'allo réactivité et capables d'activité antitumorale naturelle.

Anticorps bi-spécifiques

Les anticorps bispécifiques sont des structures possédant 2 sites de fixation dirigés contre 2 antigènes ou 2 épitopes d'un même antigène. Les BiTE, pour Bispecific T-cell Engager, comportent deux domaines scFv distincts - un ayant une affinité pour un antigène tumoral

d’intérêt et l'autre ayant une affinité pour CD3ζ sur les cellules T. Ils vont ainsi servir de « pont » entre la cellule tumorale et la cellule T effectrice, l'activité cytolytique médiée par les cellules T est dirigée vers la cellule tumorale indépendamment de la costimulation TCR/MHC.

Le pasotuximab (AMG 212 or BAY2010112), un des premiers BiTE développé dans le mCRCP, présentait une bispecifité pour le PSMA et le CD3. Il a été évalué en phase I chez 47 patients, dont 31 patients avec injection sous cutanée quotidienne et 16 patients par perfusion intraveineuse continue. Parmi les 31 patients ayant reçu le traitement par voie sous cutanée, 28 ont développé des anticorps neutralisant avec diminution de l’exposition au traitement, imposant la fermeture de cette cohorte. Aucun patient de la cohorte IV n’a présenté d’anticorps neutralisant. 14 patients sur 17 ont présenté une diminution du taux de PSA de façon dose dépendante dont pendant plus de 50 semaines associés à une réponse radiologique (58). Malgré des données préliminaires encourageantes, le développement du pasotuximab a été interrompu à cause des contraintes pharmacocinétiques au profit d’une forme d’une forme à demi-vie allongée (Half-life extended HLE BiTE), permettant une administration IV courte : l’AMG160.

L’AMG160 ou apacamab est un anticorps bispécifique anti-PSMA/CD3 avec adjonction d’un fragment Fc permettant une augmentation de sa demi-vie en favorisant les mécanismes de recyclage. Cette modification permet une administration intraveineuse tous les 14 jours de l’AMG160. Les données préliminaires de phase I incluant 32 patients avec 6 niveaux de doses différents avec ou sans administration de pembrolizumab ont montré la faisabilité de l’approche, et un profil de tolérance acceptable. Le données d’efficacité de l’AMG160 en monothérapie montrent une réduction du PSA chez 15 patients sur 24 (63%) (59).

D’autres stratégies sont en développement pour allonger la demi-vie des anticorps bispécifiques. L’HPN424 est un T cell engager qui possède 3 domaines de fixations ciblant, le PSMA, le CD3 et l’albumine afin d’augmenter sa demi-vie). Les premières données disponibles sur 89 patients traités en essai de phase I (NCT03577028) montrent un profil de tolérance favorable avec environ 20% d’hépatite aigue et 3% de CRS de grade 3 ou plus. Une durée de traitement supérieure à 24 semaines a été observée chez 15 patients sur les 74 évaluables (20%) dont 8/17 naïfs (47%) de chimiothérapie.

Récemment, Kelly et al. ont rapporté les résultats de phase I du xaluritamig (AMG509) en monothérapie, un anticorps bispécifique ciblant le CD3 et STEAP1, un antigène fortement exprimé sur les cellules tumorales dans le cadre d'une première étude multicentrique portant sur des patients atteints de mCPRC. Dans les cohortes à hautes doses, une baisse du PSA > 50% chez 26/44 (26%) patients a été observée, avec une réponse radiologique chez 15/37 (41%) (60).

Conclusions et perspectives

Même si aucun traitement d'immunothérapie n'est actuellement utilisé en routine dans le cancer de la prostate, les approches d'immunothérapie représentent de réelles opportunités thérapeutiques. L'identification et le contournement des mécanismes de résistances immunes est un challenge mais permet d'envisager des combinaisons thérapeutiques plus efficaces. Un des freins au développement de stratégies d'immunothérapies efficaces est le manque de biomarqueurs prédictifs de réponse au traitement dans le cancer de la prostate. La charge mutationnelle, de même que le statut HRD semblent associés à la réponse aux ICI dans les différents essais cliniques, mais reste imparfait. L'identification de nouveaux biomarqueurs, tumoraux et/ou sur les biopsies liquides permettra ainsi dans l'avenir de mieux stratifier les patients et d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique à adopter.

Outre l'identification des mécanismes de résistance, il est nécessaire de l'interroger sur la séquence thérapeutique optimale à adopter. La plasticité importante du microenvironnement tumoral va être responsable de la modification d'expression des différentes cibles tumorales et différents checkpoints immuns sous l'influence des différentes lignes thérapeutiques. De même, la progression de la maladie est marquée par l'apparition de nouvelles altérations moléculaires (comme la délétion *PTEN* ou la mutation *TP53*) qui sont associées à un nouveau profil de sensibilité et de résistance. Cette plasticité relève l'importance de mener des études de caractérisation tumorale et du microenvironnement tumoral au différents temps de prise en charge des patients. Le développement de stratégies dirigées vers de nouvelles cibles/acteurs du microenvironnement (NK/lymphocytes T γδ) qui connait un grand essor en oncologie pourrait également être profitable à l'avenir dans le cancer de la prostate.

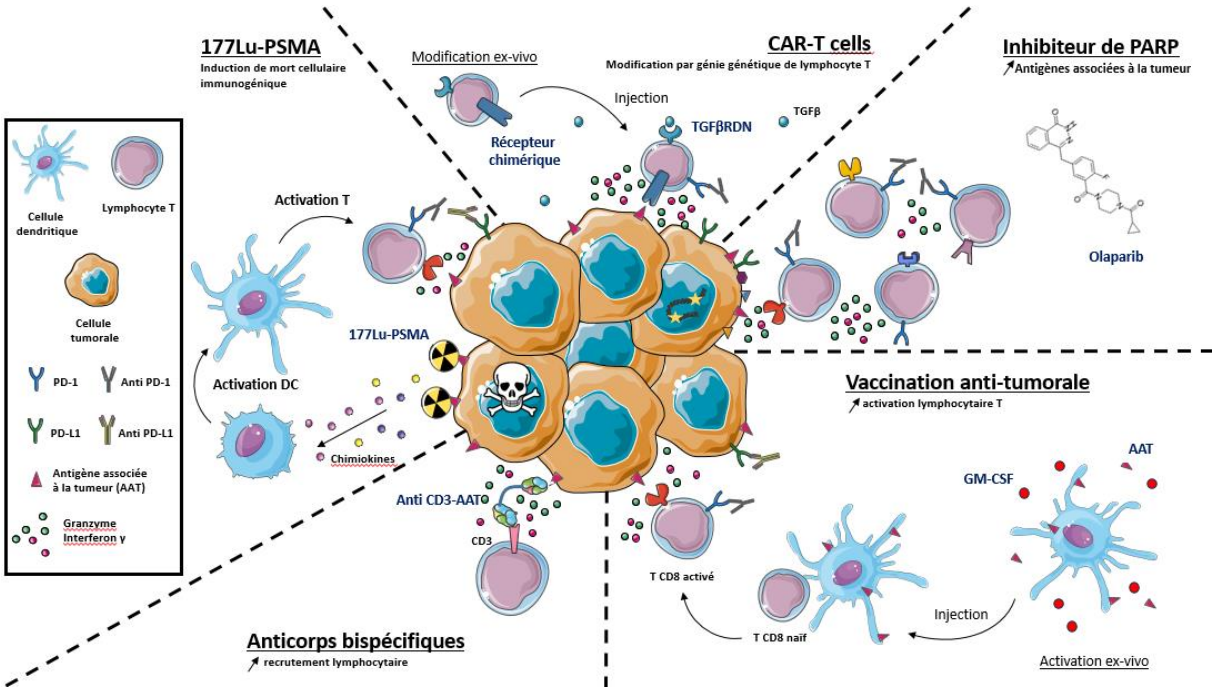


Figure 1. Stratégies d'immunothérapie en développement dans le cancer de la prostate

Table 1. Liste des essais thérapeutiques évaluant les CAR dans le cancer de la prostate

NCT	Phase	Cible	Traitement	Population	Recrutement
CAR-T cells					
NCT05805371	Ib	PSCA	CAR-T +/- radiothérapie	mCRPC	En cours
NCT04249947	I	PSMA	CAR-T	mCRPC	Terminé
NCT05354375	I	PSMA	CAR-T	CRPC (metastatique ou non)	En cours
NCT05732948	I	PSMA/PSCA	PD-1 silent CAR-T	Patients métastatiques	En cours
NCT05022849	I	KLK2	CAR-T	mCRPC	Terminé
NCT04429451	I/II	PSMA	CAR-T	mCRCP, tumeur PSMA+	En cours
NCT01140373	I	PSMA	CAR-T	mCRCPC	Terminé
NCT03089203	I	PSMA	CAR-T-TGFβRDN	mCRPC	En cours
NCT04633148	I	PSMA	CAR-T + TMpPSMA	CRPC (metastatique ou non) PSMA+	En cours
NCT05656573	I	PSMA	CAR-T	Stades avancés	En cours
CAR-NK cells					
NCT03692663	I	PSMA	CAR-NK	mCRCP	En cours

Abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

APC : Antigen Presenting Cell

CAR : Chimeric antigen receptor

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein-4

CRPC **:** Castration resistant prostate cancer

EI : Effets indésirables

FDA : Food and Drug Administration

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

HRR : Homologous Recombination Repair

ICI : Inhibiteurs de Checkpoints Immuns

irAES : immune related adverse events

MDSC : myeloid-derived suppressor cells

MET : microenvironment tumoral

ORR : objective response rate

OS : overall survival

PAP : prostate acid phosphatase

PARPi : poly[ADP-ribose] polymerase inhibitors

PBMC **:** Peripheral Blood Mononuclear Cells

PD-1 : Program death 1

PD-L1 : Program death ligand 1

PSA : Prostate Specific Antigen

PSCA : prostate stem cell antigen

PSMA : prostate-specific membrane antigen

RECIST : response evaluation criteria in solid tumours

SG : survie globale

SSP : survie sans progression

TEP : Tomographie par Emission de Positrons

VISTA : V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation

Bibliographie

1. Cancer today [Internet]. 2023 [cité 31 oct 2023]. Disponible sur: http://gco.iarc.fr/today/home

2. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Metcalfe C, Davis M, Turner EL, et al. Fifteen-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Prostate Cancer. N Engl J Med. 27 avr 2023;388(17):1547-58.

3. Fizazi K, Gillessen S, ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Updated treatment recommendations for prostate cancer from the ESMO Clinical Practice Guideline considering treatment intensification and use of novel systemic agents. Ann Oncol. juin 2023;34(6):557-63.

4. Shiravand Y, Khodadadi F, Kashani SMA, Hosseini-Fard SR, Hosseini S, Sadeghirad H, et al. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. Curr Oncol. 24 avr 2022;29(5):3044-60.

5. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. New England Journal of Medicine. 29 juill 2010;363(5):411-22.

6. Beer TM, Bernstein GT, Corman JM, Glode LM, Hall SJ, Poll WL, et al. Randomized Trial of Autologous Cellular Immunotherapy with Sipuleucel-T in Androgen-Dependent Prostate Cancer. Clinical Cancer Research. 1 juill 2011;17(13):4558-67.

7. Singh P, Pal SK, Alex A, Agarwal N. Development of PROSTVAC immunotherapy in prostate cancer. Future Oncol. août 2015;11(15):2137-48.

8. Gulley JL, Borre M, Vogelzang NJ, Ng S, Agarwal N, Parker CC, et al. Phase III Trial of PROSTVAC in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. J Clin Oncol. 1 mai 2019;37(13):1051-61.

9. Vogelzang NJ, Beer TM, Gerritsen W, Oudard S, Wiechno P, Kukielka-Budny B, et al. Efficacy and Safety of Autologous Dendritic Cell-Based Immunotherapy, Docetaxel, and Prednisone vs Placebo in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: The VIABLE Phase 3 Randomized Clinical Trial. JAMA Oncol. 1 avr 2022;8(4):546-52.

10. Rojas-Martínez A, Manzanera AG, Sukin SW, Esteban-María J, González-Guerrero JF, Gomez-Guerra L, et al. Intraprostatic distribution and long-term follow-up after AdV-tk immunotherapy as neoadjuvant to surgery in patients with prostate cancer. Cancer Gene Ther. nov 2013;20(11):642-9.

11. Gao J, Ward JF, Pettaway CA, Shi LZ, Subudhi SK, Vence LM, et al. VISTA is an inhibitory immune checkpoint that is increased after ipilimumab therapy in patients with prostate cancer. Nat Med. mai 2017;23(5):551-5.

12. Small EJ, Tchekmedyian NS, Rini BI, Fong L, Lowy I, Allison JP. A pilot trial of CTLA-4 blockade with human anti-CTLA-4 in patients with hormone-refractory prostate cancer. Clin Cancer Res. 15 mars 2007;13(6):1810-5.

13. McNeel DG, Smith HA, Eickhoff JC, Lang JM, Staab MJ, Wilding G, et al. Phase I trial of tremelimumab in combination with short-term androgen deprivation in patients with PSA-recurrent prostate cancer. Cancer Immunol Immunother. juill 2012;61(7):1137-47.

14. Kwon ED, Drake CG, Scher HI, Fizazi K, Bossi A, van den Eertwegh AJM, et al. Ipilimumab versus placebo after radiotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer that had progressed after docetaxel chemotherapy (CA184-043): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. Lancet Oncol. juin 2014;15(7):700-12.

15. Fizazi K, Drake CG, Beer TM, Kwon ED, Scher HI, Gerritsen WR, et al. Final Analysis of the Ipilimumab Versus Placebo Following Radiotherapy Phase III Trial in Postdocetaxel Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer Identifies an Excess of Long-term Survivors. Eur Urol. déc 2020;78(6):822-30.

16. Beer TM, Kwon ED, Drake CG, Fizazi K, Logothetis C, Gravis G, et al. Randomized, Double-Blind, Phase III Trial of Ipilimumab Versus Placebo in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Patients With Metastatic Chemotherapy-Naive Castration-Resistant Prostate Cancer. J Clin Oncol. janv 2017;35(1):40-7.

17. Cabel L, Loir E, Gravis G, Lavaud P, Massard C, Albiges L, et al. Long-term complete remission with Ipilimumab in metastatic castrate-resistant prostate cancer: case report of two patients. J Immunother Cancer. 18 avr 2017;5:31.

18. Hansen AR, Massard C, Ott PA, Haas NB, Lopez JS, Ejadi S, et al. Pembrolizumab for advanced prostate adenocarcinoma: findings of the KEYNOTE-028 study. Ann Oncol. 1 août 2018;29(8):1807-13.

19. Antonarakis ES, Piulats JM, Gross-Goupil M, Goh J, Ojamaa K, Hoimes CJ, et al. Pembrolizumab for Treatment-Refractory Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Multicohort, Open-Label Phase II KEYNOTE-199 Study. J Clin Oncol. 10 févr 2020;38(5):395-405.

20. Petrylak DP, Ratta R, Matsubara N, Korbenfeld EP, Gafanov R, Mourey L, et al. Pembrolizumab plus docetaxel for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC): Randomized, double-blind, phase 3 KEYNOTE-921 study. JCO. 20 févr 2023;41(6_suppl):19-19.

21. Graff JN, Beer TM, Alumkal JJ, Slottke RE, Redmond WL, Thomas GV, et al. A phase II single-arm study of pembrolizumab with enzalutamide in men with metastatic castration-resistant prostate cancer progressing on enzalutamide alone. J Immunother Cancer. 2 juill 2020;8(2):e000642.

22. Powles T, Yuen KC, Gillessen S, Kadel EE, Rathkopf D, Matsubara N, et al. Atezolizumab with enzalutamide versus enzalutamide alone in metastatic castration-resistant prostate cancer: a randomized phase 3 trial. Nat Med. janv 2022;28(1):144-53.

23. Iannantuono GM, Torino F, Rosenfeld R, Guerriero S, Carlucci M, Sganga S, et al. The Role of Histology-Agnostic Drugs in the Treatment of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. International Journal of Molecular Sciences. janv 2022;23(15):8535.

24. Subudhi SK, Vence L, Zhao H, Blando J, Yadav SS, Xiong Q, et al. Neoantigen responses, immune correlates, and favorable outcomes after ipilimumab treatment of patients with prostate cancer. Sci Transl Med. 1 avr 2020;12(537):eaaz3577.

25. Sharma P, Pachynski RK, Narayan V, Fléchon A, Gravis G, Galsky MD, et al. Nivolumab Plus Ipilimumab for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Preliminary Analysis of Patients in the CheckMate 650 Trial. Cancer Cell. 12 oct 2020;38(4):489-499.e3.

26. Subudhi SK, Siddiqui BA, Aparicio AM, Yadav SS, Basu S, Chen H, et al. Combined CTLA-4 and PD-L1 blockade in patients with chemotherapy-naïve metastatic castration-resistant prostate cancer is associated with increased myeloid and neutrophil immune subsets in the bone microenvironment. J Immunother Cancer. oct 2021;9(10):e002919.

27. Jiao S, Subudhi SK, Aparicio A, Ge Z, Guan B, Miura Y, et al. Differences in Tumor Microenvironment Dictate T Helper Lineage Polarization and Response to Immune Checkpoint Therapy. Cell. 14 nov 2019;179(5):1177-1190.e13.

28. Zhu Y, Duong L, Lu X, Lu X. Cancer-cell-intrinsic mechanisms shaping the immunosuppressive landscape of prostate cancer. Asian J Androl. 2023;25(2):171-8.

29. Stein MN, Fong L, Tutrone R, Mega A, Lam ET, Parsi M, et al. ADXS31142 Immunotherapy ± Pembrolizumab Treatment for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Open-Label Phase I/II KEYNOTE-046 Study. Oncologist. 8 juin 2022;27(6):453-61.

30. McNeel DG, Eickhoff JC, Wargowski E, Johnson LE, Kyriakopoulos CE, Emamekhoo H, et al. Phase 2 trial of T-cell activation using MVI-816 and pembrolizumab in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer (mCRPC). J Immunother Cancer. mars 2022;10(3):e004198.

31. Taylor AK, Kosoff D, Emamekhoo H, Lang JM, Kyriakopoulos CE. PARP inhibitors in metastatic prostate cancer. Front Oncol. 2023;13:1159557.

32. Karzai F, VanderWeele D, Madan RA, Owens H, Cordes LM, Hankin A, et al. Activity of durvalumab plus olaparib in metastatic castration-resistant prostate cancer in men with and without DNA damage repair mutations. J Immunother Cancer. 4 déc 2018;6(1):141.

33. Petrylak DP, Perez-Gracia JL, Lacombe L, Bastos DA, Mahammedi H, Kwan EM, et al. 579MO CheckMate 9KD cohort A2 final analysis: Nivolumab (NIVO) + rucaparib for chemotherapy (CT)-naïve metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). Annals of Oncology. 1 sept 2021;32:S629-30.

34. Yu EY, Piulats JM, Gravis G, Fong PCC, Todenhöfer T, Laguerre B, et al. Pembrolizumab plus Olaparib in Patients with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: Long-term Results from the Phase 1b/2 KEYNOTE-365 Cohort A Study. Eur Urol. janv 2023;83(1):15-26.

35. Yu E, Xu L, Kim J, Antonarakis ES. KEYLYNK-010: Phase III study of pembrolizumab (pembro) plus olaparib (OLA) vs enzalutamide (ENZA) or abiraterone (ABI) in ENZA- or ABI-pretreated patients (pts) with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) who had progression on chemotherapy (CTx). Annals of Oncology. 1 oct 2019;30:v351-2.

36. Yap TA, Bardia A, Dvorkin M, Galsky MD, Beck JT, Wise DR, et al. Avelumab Plus Talazoparib in Patients With Advanced Solid Tumors: The JAVELIN PARP Medley Nonrandomized Controlled Trial. JAMA Oncol. 1 janv 2023;9(1):40-50.

37. Sun MP, Nauseef JT, Palmer J, Thomas JE, Stangl-Kremser J, Bissassar M, et al. Phase I results of a phase I/II study of pembrolizumab and AR signaling inhibitor (ARSI) with 225Ac-J591. JCO. 20 févr 2023;41(6_suppl):181-181.

38. Ross AE, Hurley PJ, Tran PT, Rowe SP, Benzon B, Neal TO, et al. A pilot trial of pembrolizumab plus prostatic cryotherapy for men with newly diagnosed oligometastatic hormone-sensitive prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. mars 2020;23(1):184-93.

39. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. Science. 23 mars 2018;359(6382):1361-5.

40. Rahbar K, Afshar-Oromieh A, Jadvar H, Ahmadzadehfar H. PSMA Theranostics: Current Status and Future Directions. Mol Imaging. 6 juin 2018;17:1536012118776068.

41. Zuccolotto G, Fracasso G, Merlo A, Montagner IM, Rondina M, Bobisse S, et al. PSMA-Specific CAR-Engineered T Cells Eradicate Disseminated Prostate Cancer in Preclinical Models. PLoS One. 3 oct 2014;9(10):e109427.

42. Slovin SF, Wang X, Hullings M, Arauz G, Bartido S, Lewis JS, et al. Chimeric antigen receptor (CAR+) modified T cells targeting prostate-specific membrane antigen (PSMA) in patients (pts) with castrate metastatic prostate cancer (CMPC). JCO. 20 févr 2013;31(6_suppl):72-72.

43. Junghans RP, Ma Q, Rathore R, Gomes EM, Bais AJ, Lo ASY, et al. Phase I Trial of Anti-PSMA Designer CAR-T Cells in Prostate Cancer: Possible Role for Interacting Interleukin 2-T Cell Pharmacodynamics as a Determinant of Clinical Response. Prostate. 2016;76(14):1257-70.

44. Slovin SF, Dorff TB, Falchook GS, Wei XX, Gao X, McKay RR, et al. Phase 1 study of P-PSMA-101 CAR-T cells in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). JCO. 20 févr 2022;40(6_suppl):98-98.

45. Saeki N, Gu J, Yoshida T, Wu X. Prostate stem cell antigen (PSCA): a Jekyll and Hyde molecule? Clin Cancer Res. 15 juill 2010;16(14):3533-8.

46. Morgenroth A, Cartellieri M, Schmitz M, Günes S, Weigle B, Bachmann M, et al. Targeting of tumor cells expressing the prostate stem cell antigen (PSCA) using genetically engineered T-cells. Prostate. 1 juill 2007;67(10):1121-31.

47. Kloss CC, Lee J, Zhang A, Chen F, Melenhorst JJ, Lacey SF, et al. Dominant-Negative TGF-β Receptor Enhances PSMA-Targeted Human CAR T Cell Proliferation And Augments Prostate Cancer Eradication. Mol Ther. 5 juill 2018;26(7):1855-66.

48. Feldmann A, Arndt C, Bergmann R, Loff S, Cartellieri M, Bachmann D, et al. Retargeting of T lymphocytes to PSCA- or PSMA positive prostate cancer cells using the novel modular chimeric antigen receptor platform technology "UniCAR". Oncotarget. 21 févr 2017;8(19):31368-85.

49. Priceman SJ, Gerdts EA, Tilakawardane D, Kennewick KT, Murad JP, Park AK, et al. Co-stimulatory signaling determines tumor antigen sensitivity and persistence of CAR T cells targeting PSCA+ metastatic prostate cancer. Oncoimmunology. 16 oct 2017;7(2):e1380764.

50. Dorff TB, Blanchard S, Martirosyan H, Adkins L, Dhapola G, Moriarty A, et al. Phase 1 study of PSCA-targeted chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). JCO. 20 févr 2022;40(6_suppl):91-91.

51. Roybal KT, Rupp LJ, Morsut L, Walker WJ, McNally KA, Park JS, et al. Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen Sensing Circuits. Cell. 11 févr 2016;164(4):770-9.

52. Narayan V, Barber-Rotenberg JS, Jung IY, Lacey SF, Rech AJ, Davis MM, et al. PSMA-targeting TGFβ-insensitive Armored CAR T-cells in Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer: a Phase 1 Trial. Nat Med. avr 2022;28(4):724-34.

53. Tang L, Shao H, Wu Y, Wang J, Qian X, He L, et al. Dominant negative TGFβ receptor II and truncated TIM3 enhance the antitumor efficacy of CAR-T-cell therapy in prostate cancer. Int Immunopharmacol. 8 sept 2023;124(Pt A):110807.

54. Wang D, Shao Y, Zhang X, Lu G, Liu B. IL-23 and PSMA-targeted duo-CAR T cells in Prostate Cancer Eradication in a preclinical model. J Transl Med. 14 janv 2020;18:23.

55. Montagner IM, Penna A, Fracasso G, Carpanese D, Dalla Pietà A, Barbieri V, et al. Anti-PSMA CAR-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cell Therapy for Prostate Cancer. Cells. 2 juin 2020;9(6):1382.

56. Wang F, Wu L, Yin L, Shi H, Gu Y, Xing N. Combined treatment with anti-PSMA CAR NK-92 cell and anti-PD-L1 monoclonal antibody enhances the antitumour efficacy against castration-resistant prostate cancer. Clin Transl Med. 13 juin 2022;12(6):e901.

57. Frieling JS, Tordesillas L, Bustos XE, Ramello MC, Bishop RT, Cianne JE, et al. γδ-Enriched CAR-T cell therapy for bone metastatic castrate-resistant prostate cancer. Sci Adv. 9(18):eadf0108.

58. Hummel HD, Kufer P, Grüllich C, Seggewiss-Bernhardt R, Deschler-Baier B, Chatterjee M, et al. Pasotuxizumab, a BiTE ® immune therapy for castration-resistant prostate cancer: Phase I, dose-escalation study findings. Immunotherapy. févr 2021;13(2):125-41.

59. Tran B, Horvath L, Dorff T, Rettig M, Lolkema MP, Machiels JP, et al. 609O Results from a phase I study of AMG 160, a half-life extended (HLE), PSMA-targeted, bispecific T-cell engager (BiTE®) immune therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). Annals of Oncology. 1 sept 2020;31:S507.

60. Kelly WK, Danila DC, Lin CC, Lee JL, Matsubara N, Ward PJ, et al. Xaluritamig, a STEAP1 × CD3 XmAb 2+1 Immune Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Results from Dose Exploration in a First-in-Human Study. Cancer Discov. 20 oct 2023;OF1-14.

4. Vers l'étude de nouvelles cibles dans le cancer de la prostate

L'échec relatif des stratégies d'immunothérapies actuelles dans le cancer de la prostate nous incite à évaluer la place des autres acteurs du système immunitaire, qu'ils soient immuns ou non immuns. En effet, les stratégies thérapeutiques actuelles, notamment l'utilisation les inhibiteurs de checkpoints, sont principalement dirigés vers les lymphocytes T CD8, dont le rôle dans le cancer de la prostate reste très controversé.

Parmi ces nouvelles cibles, les lymphocytes T γδ semblent d'un intérêt particulier dans le cancer de la prostate métastatique. L'infiltration intra tumorale de ce sous type particulier de lymphocytes T cytotoxique (*Cf section suivante*) est le plus associé à un pronostic favorable dans une étude analysant les transcriptomes de 3282 tumeurs parmi lequel des cancers de la prostate (**Figure 13A**) (130). Une autre étude d'analyses transcriptomiques du microenvironnement tumoral de 55 types tumoraux différents dont 476 cancers de la prostate montre que les tumeurs de la prostate comptent parmi les plus infiltrées en lymphocytes T Vγ9Vδ2 (**Figure 13B**) (131). Il a aussi été montré que les ligands impliqués dans l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 sont exprimés dans les tumeurs de prostate mais également dans les métastases de cancer de la prostate (132).

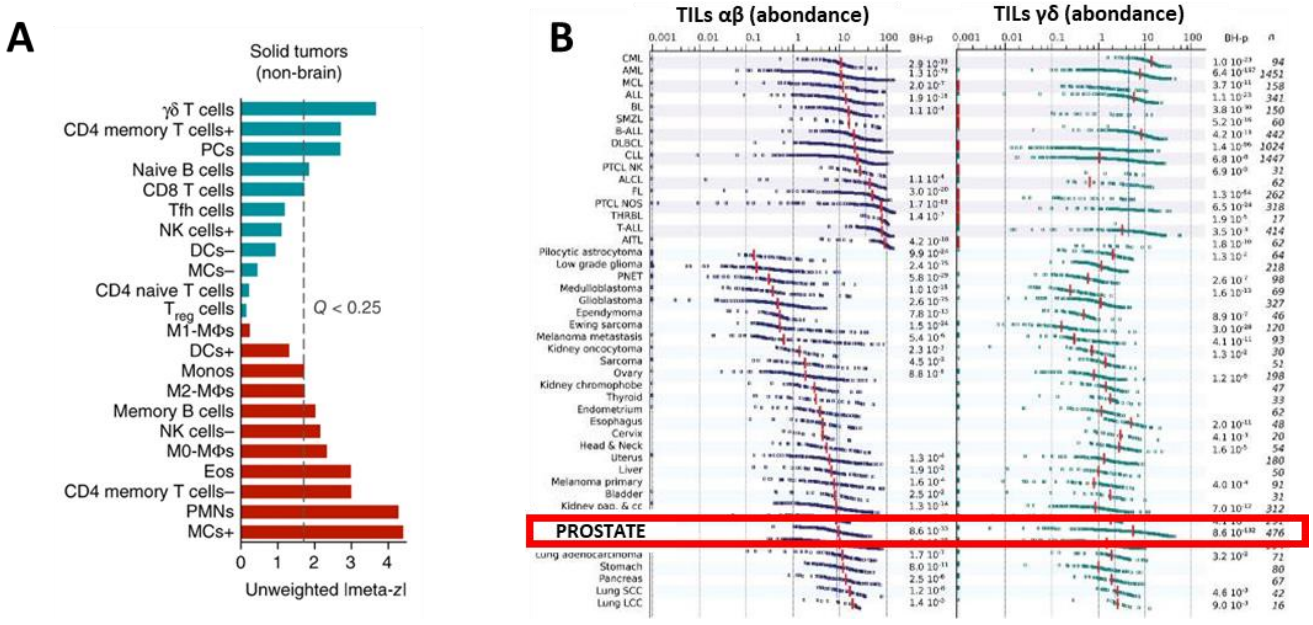


Figure 12. Infiltration tumorale en lymphocytes T γδ et association avec le pronostic *(d'après Gentles et al. Et Tosolini et al.).* ***(A)*** *Association de 22 populations lymphocytaires infiltrant 14 sous types tumoraux avec le pronostic. En bleu les populations associées à un pronostic favorable, en rouge un pronostic défavorable. Expression du meta Z score, avec un seuil FDR fixé à 0.25.* ***(B)*** *Abondances individuelles de lymphocytes T αβ T et TCRVγ9Vδ2+ γδ infiltrant les tumeurs dans 55 types de cancers hématologiques et solides.*

Il existe des données *in vitro* et *in vivo* montrant l'activité potentielle des lymphocytes T Vγ9Vδ2 face à des cellules tumorales prostatiques. *In vitro*, les lymphocytes T Vγ9Vδ2 humains sont capables de lyser les cellules de lignées de cancer de prostate (LNCaP, DU145 et PC3), et cette activité antitumorale semble supérieure à celle des lymphocytes T CD8+ conventionnel (133). Les lymphocytes T γδ murins semblent également capables de contrôler la croissance tumorale dans un modèle murin de cancer de la prostate (134).

Ainsi les lymphocytes T γδ font partie des acteurs d'intérêt dans l'immunité antitumorale dans le cancer de la prostate. L'analyse de leur phénotype, dans le sang circulant ou dans la tumeur, peut aider au développement de biomarqueurs associés au pronostic ou prédictif de réponse au traitement. Ils seront mis en lumière dans le cadre de ce travail de thèse, et font l'objet d'un paragraphe dédié dans l'Introduction de ce manuscrit.

III. Lymphocytes T Vγ9Vδ2 et leur implication en cancérologie

Les lymphocytes T ont un rôle central dans l'immunité anti-infectieuse ou antitumorale. On distingue les lymphocytes T αβ, dit « conventionnels » représentant la majorité des lymphocytes T de l'organisme et les lymphocytes T γδ, considérés comme « non conventionnels ». Ces derniers expriment un TCR (T Cell Receptor) composé d'une chaine γ et d'une chaine δ. Ils sont considérés comme faisant partie de l'immunité « transitionnelle » à la frontière entre l'immunité inné et adaptative ; partageant des caractéristiques communes aux cellules NK et aux lymphocytes T conventionnels (**Figure 13**). Ils partagent avec les cellules NK l'expression de nombreux récepteurs leur accordant des fonctions cytotoxiques ; mais expriment également, comme les lymphocytes T αβ, un TCR permettant une reconnaissance antigénique. Ils présentent une grande diversité phénotypique leur conférant un large éventail de fonctions anti-infectieuses, antitumorales ou de maintien de l'homéostasie des épithéliums. Ils représentent une minorité des lymphocytes T circulants (1 à 10% de la lymphocytose) mais leur proportion peut considérablement augmenter dans certains tissus ou organes où ils exercent des fonctions spécifiques.

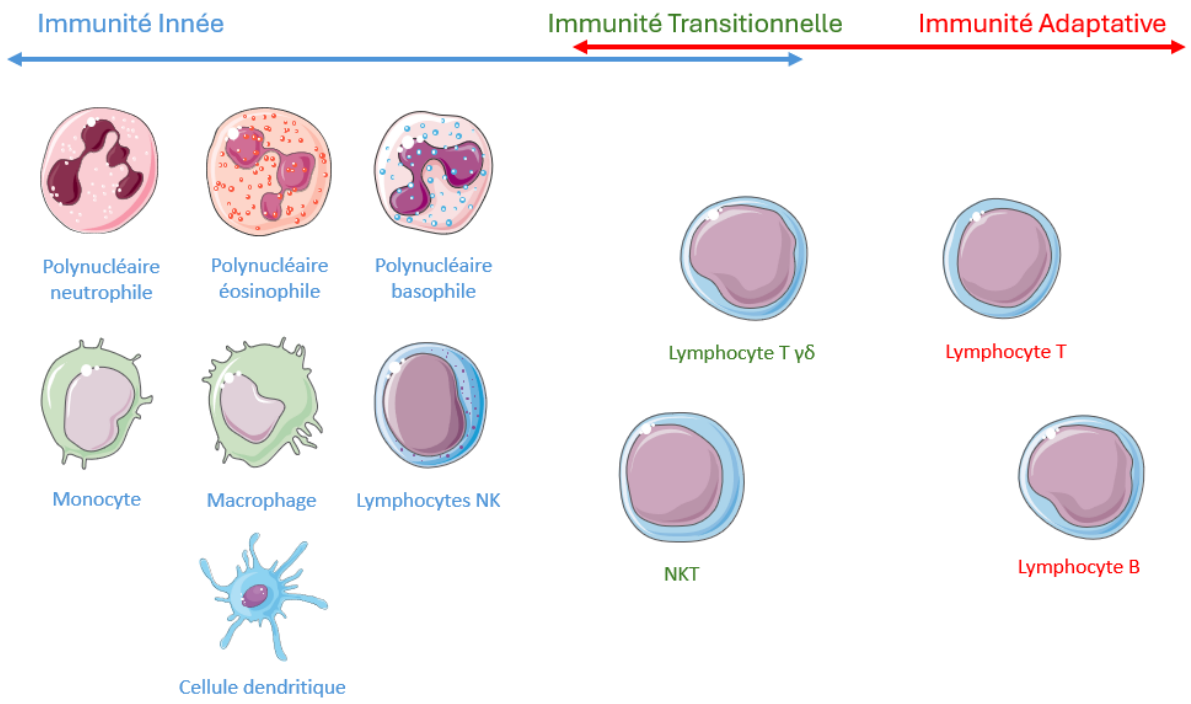


Figure 13. Place des lymphocytes T γδ parmi les cellules de l'immunité

1. Origine et développement des lymphocytes T γδ

Les premiers stades de développement des lymphocytes T γδ sont communs avec les lymphocytes T αβ. Il est bien décrit chez la souris où la bifurcation avec les lymphocytes T αβ se fait dans le thymus à un stade où les thymocytes sont double négatifs ($CD4^-$/ $CD8^-$) (**Figure 14**), au stade DN3a. Les facteurs influençant la bifurcation des lymphocytes T γδ sont non totalement connus. Même si l'hypothèse d'un déterminisme avant le stade DN3a est souvent évoqué, il existe des arguments suggérant le rôle du signal du TCR γδ et du pre-TCR mais également de l'interaction des thymocytes avec leur microenvironnement (135).

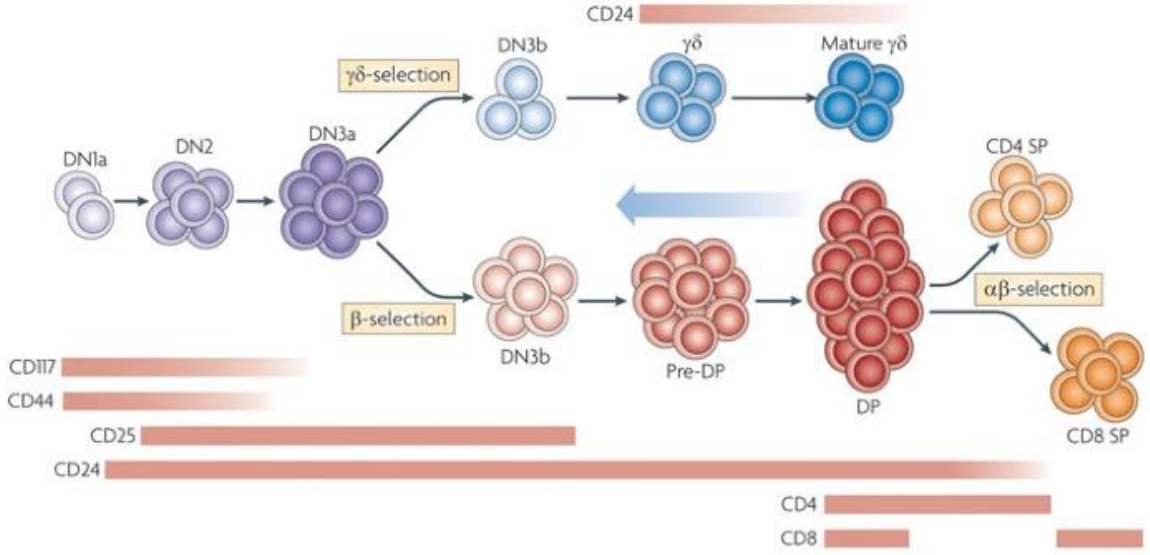


Figure 14. Stades de développement des lymphocytes T (d'après Ciofani et al. (135)***)***

Lors du développement fœtal, les lymphocytes T γδ sont les premiers lymphocytes à apparaitre. Avant l'apparition du thymus, ils sont produits dans le foie fœtal où les lymphocytes Vγ9Vδ2 sont les seuls lymphocytes identifiables (136). Les autres sous-types apparaitront avec le développement thymique, à partir de la $10^{ème}$ semaine de développement. Les lymphocytes T Vδ1 sont majoritaires à la naissance dans le sang de cordon ou dans le thymus ; mais les lymphocytes T Vγ9Vδ2 s'expandront dans le sang périphérique au cours de la vie des individus suite à la rencontre avec les micro-organismes, jusqu'à devenir majoritaire (137).

2. Fonctions des lymphocytes T γδ

Les différentes sous populations de lymphocytes T γδ décrites vont présenter des caractéristiques propres ; autant sur le plan fonctionnel que sur leur localisation dans l'organisme. En physiologie, ils sont impliqués dans les défenses anti-infectieuses, contre les pathogènes intra et extracellulaires, dans les défenses antitumorales, mais encore dans la régulation des réponses immunitaires innées ou adaptatives et à l'intégrité des barrières épithéliales (138).

Leurs fonctions effectrices sont supportées par plusieurs mécanismes qui peuvent être combiné, synthétisés sur la **Figure 15** :

- Les lymphocytes T γδ sont des cellules cytotoxiques, capables de lyser les cellules cibles avec la production de perforines et granzymes après activation via la reconnaissance de phosphoantigènes, l'implication de récepteurs d'apoptose tel que NKG2D ou TRAIL, ou bien par la reconnaissance d'anticorps (*cf. section suivante*).
- Ils sont également capables de produire un large éventail de cytokines (IFN-γ, TNF-α, IL-17, IL-5, IL13, IL10, IL-4, LTβ4) et de chémokines (RANTES, lymphotactin) selon leur sous-type mais également selon l'environnement dans lequel ils se trouvent. Cette fonction permet la modulation et la régulation des autres cellules de l'immunité innée ou adaptative (138).
- Les lymphocytes T γδ présentent des capacité de présentation antigénique, notamment *in vitro* dont l'implication *in vivo* reste à étudier (139).
- La production de facteurs de croissance, pour le maintien de l'intégrité des barrières.

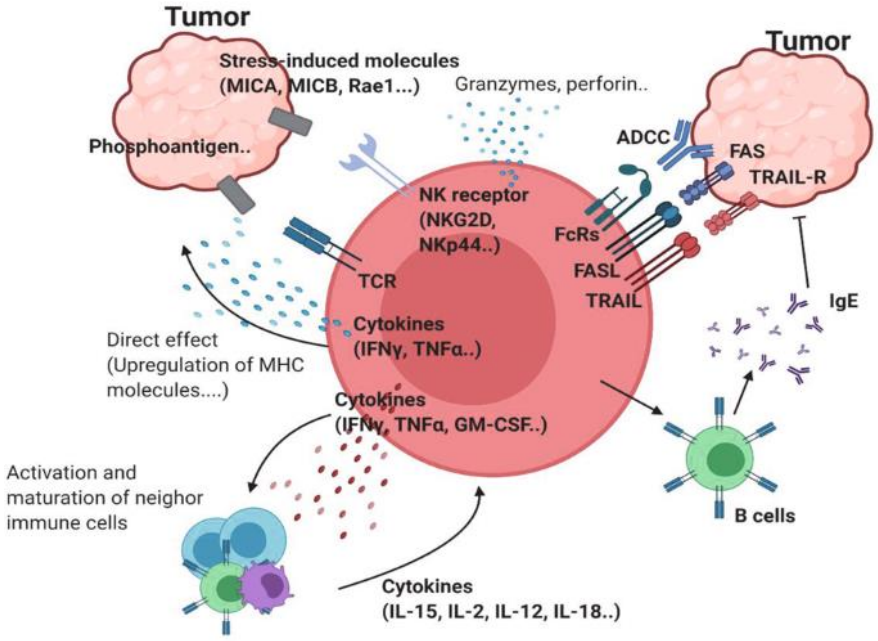


Figure 15 : Mécanismes d'action des lymphocytes T γδ dans le microenvironnement tumoral *(d'après Park et al.* (140)*)*

3. Activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2

Les lymphocytes T Vγ9Vδ2 sont le sous type majoritaire de lymphocytes T γδ dans le sang périphérique chez l'homme, représentant 1 à 10% des lymphocytes circulants. Ce sont des senseurs de stress cellulaire au sein de l'organisme, capables d'identifier et d'éliminer des cellules infectées ou transformées. Ils reconnaissent des antigènes spécifiques, appelés phosphoantigènes, exprimés au sein des cellules cibles, par un engagement de leur TCR, mais de façon indépendante du CMH. Un certain de nombres de récepteurs vont également pouvoir moduler l'activité des lymphocytes T Vγ9Vδ2.

a. Les phosphoantigènes

Les premiers travaux permettant de caractériser l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 ont été publiés dans les années 1990. Il a été montré que des antigènes provenant de *Mycobacterium tuberculosis* étaient capables d'activer les lymphocytes T Vγ9Vδ2 *in vitro* (141). Les quatre antigènes identifiés à partir d'extraits de *Mycobacterium tuberculosis* (TUBag1-4) étaient des carbohydrates, non-peptidiques, pyrophosphatés, de faible poids moléculaire (<3kDa), et ont ainsi été nommés phosphoantigènes (PAgs) (142–144).

Il a par la suite été isolés et caractérisés d'autres phosphoantigènes dits « naturels » (Isopentenyl pyrophosphate, IPP) à partir de *Mycobacterium tuberculosis*. D''autres ont pu être synthétisés, permettant de confirmer la spécificité de l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 ainsi que l'importance du groupement phosphate (145). La structure des principaux phosphoantigènes est présentée en **Figure 16**. Les différents phosphoantigènes présentent des capacités d'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 différentes. Les caractéristiques propres à chaque PAgs peuvent être utilisés à des fins d'immunomodulation *in vitro*.

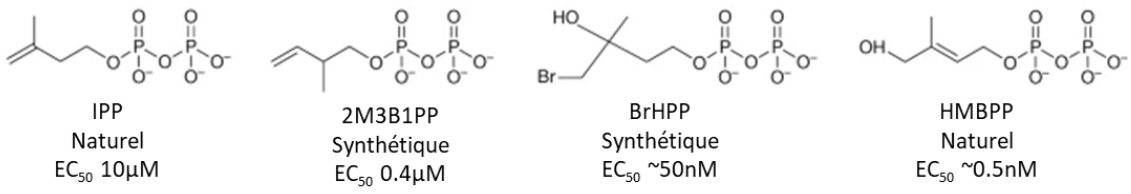


Figure 16. Structures des principaux phosphoantigènes naturels et synthétiques *(adapté de Sebestyen et al.* (146)*)*

b. Biosynthèse des phosphoantigènes

Les PAgs endogènes sont principalement produits chez les eucaryotes par la voie de synthèse des isoprénoïdes, dite voie du mévalonate (**Figure 17**). C'est une voie métabolique importante qui fournit aux cellules des molécules bioactives essentielles à de multiples processus cellulaires. Cette voie convertit le mévalonate en isoprénoïdes, comme le cholestérol, précurseur indispensable des acides biliaires, des lipoprotéines et des hormones stéroïdes, et en un certain nombre de molécules hydrophobes, les isoprénoïdes non stéroliques. La voie du mévalonate aboutit à la formation d'isopentenyl pyrophosphate (IPP) ou de diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP), puissant activateurs des lymphocytes T Vγ9Vδ2 (147). Les modifications d'activité de la voie du mévalonate en cas d'infection ou stress cellulaire pourront ainsi permettre l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 vis-à-vis de ces cellules. L'accumulation de métabolites intermédiaires de la voie du mévalonate a par ailleurs été décrite dans le cadre des cellules cancéreuses, expliquant l'activité des lymphocytes T Vγ9Vδ2 contre ces cellules (148).

Chez les procaryotes, la principale source de PAgs provient d'une voie de synthèse des isoprénoïdes alternative à la voie du mévalonate, la voie du méthylérythritol phosphate, qui aboutit à la production d'IPP, de DMAPP et d'HMBPP. Cela contribue à expliquer l'implication des lymphocytes T Vγ9Vδ2 dans l'immunité anti-infectieuse d'un grand nombre d'agents pathogènes.

La voie du mévalonate peut également être modulée pharmacologiquement. Les aminobisphosphonates (zolédronate, pamidronate, **Figure 18**), sont des molécules largement utilisées en routine médicale comme anti résorptif osseux en rhumatologie dans la prise en charge de l'ostéoporose ou en oncologie en cas de métastases osseuses. Ce sont des inhibiteurs de la Farnésyl Diphosphate Synthase (FFP-synthase), enzyme intervenant dans la transformation de l'IPP en Farnésyl Pyrophosphate. L'inhibition de cette enzyme va donc être responsable d'une augmentation de la concentration intracellulaire en IPP et va ainsi participer à l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 (149). L'utilisation des aminobisphosphonates fait aujourd'hui partie des techniques de référence pour induire la prolifération et l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 in vitro ou in vivo (150,151). A l'inverse, les statines, largement employées dans le traitement des dyslipidémies, sont des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, et vont empêcher la formation d'IPP et ainsi l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 (152).

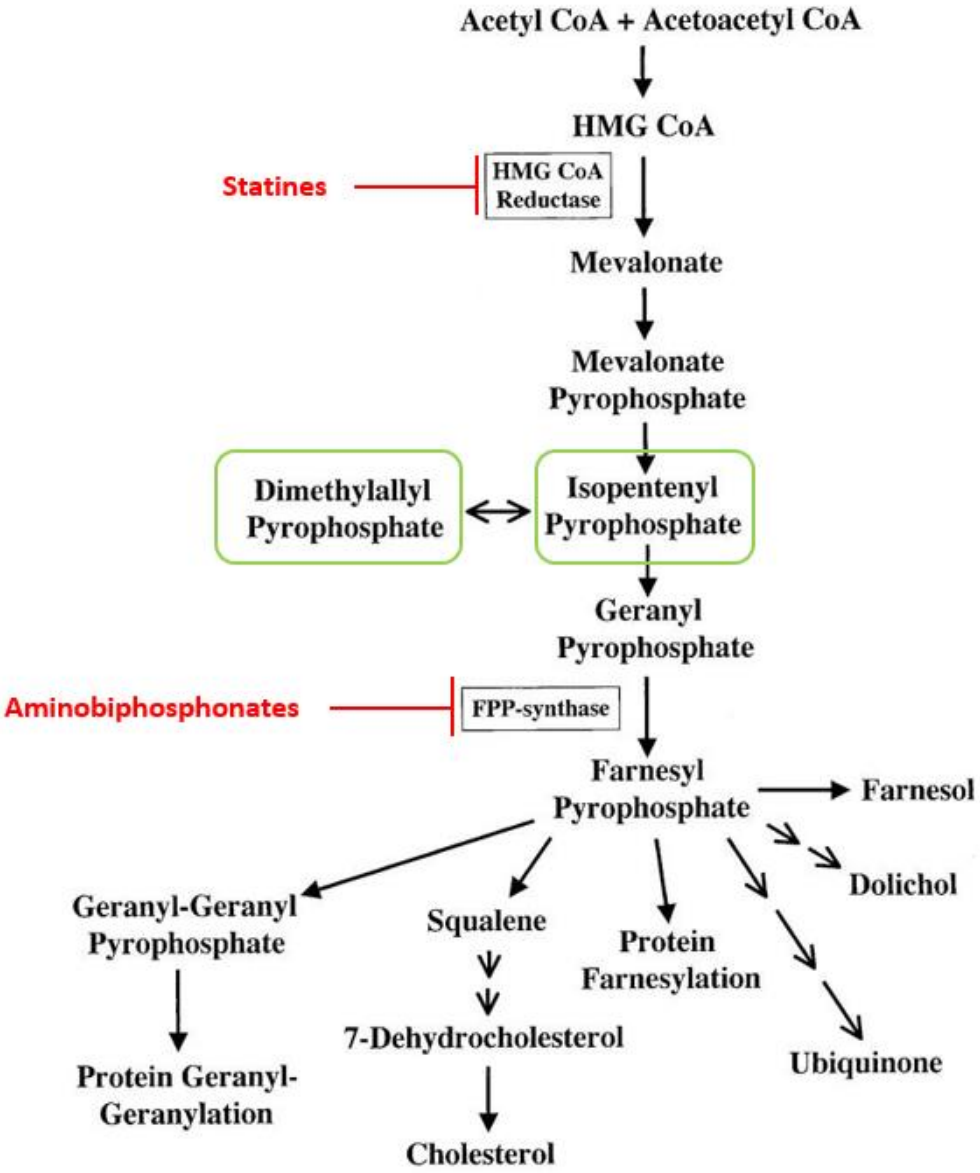


Figure 17. Voie du mévalonate *(adapté de Gober et al.* (148)*).*

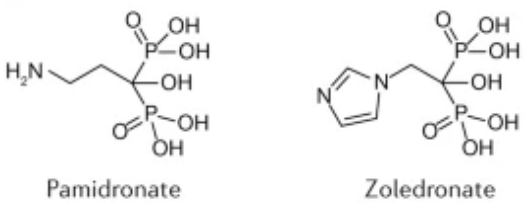


Figure 18. Structure des principaux aminobisphosphonates *(adapté de Sebestyen et al.* (146)*).*

c. Détection des phosphoantigènes par les lymphocytes T Vγ9Vδ2

L'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 fait intervenir des récepteurs immuns dédiés de la famille des butyrophilines. Il s'agit d'un groupe de glycoprotéines transmembranaires de type I faisant parti de la superfamille des immunoglobulines. Elles sont structurellement similaires à la famille B7, possédant des domaines extracellulaires d'immunoglobulines (Ig)C-IgV, un domaine transmembranaire unique, un domaine juxta membranaire (JTM) et, chez la plupart des membres, un domaine B30.2 intracellulaire (**Figure 20**) (153,154). Les premiers membres décrits chez l'Homme (BTN1A1, BTN2A1/2A2, BTN3A1/3A2/3A3) ont des gènes situés sur le chromosome 6, à proximité du CMH de classe I. Il n'existe pas d'équivalent murin de ces protéines. Il existe également des protéines apparentées, les butyrophilin-like (BTNL) reprenant une partie des caractéristiques des butyrophilines décrites.

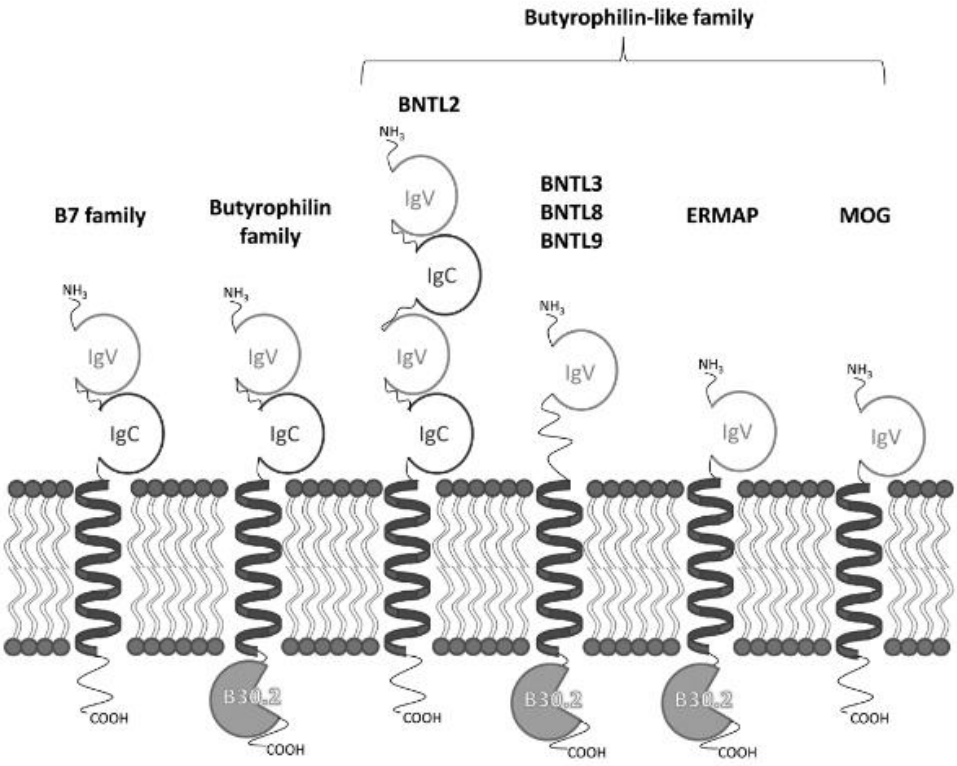


Figure 20. Structure des Butyrophilines et Butyrophilines-like, d'après Brunker et al. (155)

Les mécanismes précis associés à la reconnaissance des PAgs par les lymphocytes T γδ restent non complètement connus à ce jour. Cependant, BTN2A1 et BTN3A1 semblent des acteurs clés dans l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2. Il a récemment été montré que BTN2A1 était un ligand direct du TCR Vγ9Vδ2, se fixant sur la chaine Vγ9 (156). Cependant, cette interaction seule ne permet pas l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2. BTN3A est également un acteur indispensable à l'activation lymphocytaire. L'interaction des phosphoantigènes avec le domaine intracellulaire 30.2 de BTN3A est

associée à un changement de conformation dans le domaine JTM, indispensable à l'activation lymphocytaire (157). Les données les plus récentes montrent que l'activation lymphocytaire passe par la création d'un complexe BTN2A1-BTN3A1, formé d'un homodimère BTN2A1 et d'un homodimère ou hétérodimère BTN3A1. Cette activation est induite par la fixation des phosphoantigènes sur la portion intracellulaire des butyrophilines. Cette complexation sera associée à l'interaction de BTN2A1 avec la chaine Vγ9 du TCR et permettra, grâce à un changement de conformation de BTN3A1, son interaction avec le TCR sur sa portion apicale (158,159).

Ainsi les butyrophilines apparaissent comme des récepteurs immuns essentiels à l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2. Les mécanismes régulant l'expression de ces checkpoints sont encore mal connus à ce jour. BTN2A et BTN3A sont exprimés dans un grand nombre de tissus, sains comme tumoraux dans l'espèce humaine. L'expression de BTN3A est également augmentée dans de nombreuses tumeurs solides ou hématologiques (153). BTN3A est surexprimé par la stimulation Th1 dans les tissus sains ; mais également, au niveau tumoral, par les cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IFN-γ, CCL3, et IL-6), l'hypoxie et les éléments associés (VEGF, PlGF, et IL-10) ou encore la déprivation énergétique. Le clivage de BTN3A à la surface des cellules tumorales semble également faire partie des mécanismes de régulation négatif en contexte tumoral (160).

Les mécanismes de régulation de BTN2A1 sont encore très obscurs. Il a récemment été montré que l'expression de BTN2A1 et BTN3A1 pouvait être augmentée en cas de « crise énergétique » ; notamment en cas d'augmentation de l'activité de l'AMP-kinase (161). Cependant, ces travaux ont été effectués sur une seule lignée tumorale et nécessitent d'être approfondis.

d. Autres voies d'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2

Même si la reconnaissance des phosphoantigènes a une place centrale dans l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2, il existe d'autres axes d'activation ou de modulation de l'activité de ces cellules.

- Les récepteurs NK

Les lymphocytes T Vγ9Vδ2 peuvent exprimer un grand nombre de récepteurs NK activateurs ou inhibiteurs. L'expression du récepteur activateur NKG2D et son activation vont être associés à une augmentation de la production des cytokines Th1 et de la cytotoxicité des cellules T Vγ9Vδ2 contre les cellules tumorales exprimant les ligands de NKG2D (162–164).

A l'inverse, l'expression de NKG2A/CD94 est associée à une diminution de l'activité des lymphocytes T Vγ9Vδ2. Ce dimère va être externalisé après activation par la reconnaissance des phosphoantigènes, exerçant alors un rétrocontrôle négatif sur les T Vγ9Vδ2 (165).

- L'influence cytokinique

Comme un grand nombre de cellules, l'environnement cytokinique va grandement moduler l'activité des lymphocytes T Vγ9Vδ2. L'interleukine 2 (IL-2) est certainement la cytokine la plus étudiée. Elle assure la prolifération et la maturation des cellules in vitro notamment après activation par les phosphoantigènes. Les autres cytokines de la famille γc (IL-7, IL-15, IL-21) jouent également un rôle dans le développement des populations Vγ9Vδ2 in vivo (166) ; IL-21 étant associé au développement de T Vγ9Vδ2 régulateurs, CD73 positifs (167).

- Expression du FcγRIII

Le FcγRIII ou CD16 est un récepteur se fixant aux immunoglobulines G (IgG) complexées à leur antigène. Son engagement est associé à des activités, selon les cellules qui l'expriment, de phagocytose (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) ou cytotoxiques (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC). Il a été montré qu'une sous population particulière de T Vγ9Vδ2 effecteurs mémoires terminallement activé (T_{EMRA}, CD27-/CD45+) peut exprimer le CD16, et être doté de capacités d'ADCC. Cette population est moins sensible à l'activation par les phosphoantigènes, et produit moins de cytokines que la population $CD16^-$ (168,169).

- Les Toll-Like Receptors (TLR)

Les TLR sont des récepteurs reconnaissant certains motifs moléculaires particuliers, notamment exprimés ou produits par des agents infectieux. Ils participent à l'activation de multiples sous types cellulaires de l'immunité innée ; et permettant ainsi l'activation indirecte de l'ensemble des fonctions immunes face à un agent agresseur. Les lymphocytes T Vγ9Vδ2 peuvent exprimer les TLR1,2,3, 5 et 6. L'interaction d'un ligand avec ces TLR va augmenter la réponse cytotoxique et la production cytokines des lymphocytes T Vγ9Vδ2 de façon TCR-dépendant (dépendant donc de la reconnaissance des phosphoantigènes) (170). Cela renforcera l'action des lymphocytes T Vγ9Vδ2 notamment en cas d'infection virale ou bactérienne.

L'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 est donc un processus complexe, faisant intervenir de multiples mécanismes, en équilibre avec l'ensemble des membres du système immunitaire, qui vont moduler la réponse aux phosphoantigènes ou même activer les lymphocytes T Vγ9Vδ2 de façon indépendante des phosphoantigènes.

4. Modulation d'activité à visée thérapeutique

Les lymphocytes T Vγ9Vδ2 ont des caractéristiques qui les rendent intéressants dans la lutte antitumorale. Comme décrit plus haut, ils présentent de fortes capacités cytotoxiques et de production de cytokines. Leur activité est indépendante du CMH rendant possible les stratégies allogéniques. Ils présentent également des capacités de prolifération in vivo ou ex vivo sous l'influence des phosphoantigènes ou des bisphosphonates.

Les premières stratégies étudiées visaient à induire l'expansion et l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 directement chez le patient, *in vivo*, par l'utilisation de bisphosphonates ou de phosphoantigènes et de cytokines. Cette approche a été testé dans les hémopathies malignes (lymphome non hodgkinien/myélome multiples (171)) et dans les cancers solides (rein, colon, sein, carcinome hépatocellulaire, prostate). Deux études de phase précoces ont évalué le zolédronate +/- IL-2 chez des patients atteints de cancer de la prostate métastatique résistant à la castration. Dans l'étude de Dieli, 18 patients ont reçu du zolédronate +/- IL-2. Deux patients sur 9 ayant reçu du zolédronate seul ont présenté une réponse clinique. Dans le bras zolédronate + IL-2, 6/9 étaient en réponse (172). Dans une seconde étude, 3 patients sur 11 ont montré une baisse des taux de PSA, et 5 un ralentissement de l'augmentation (173). Cependant, aucune réponse complète n'a été observé dans ces deux études mais cela témoigne de l'activité potentielle des lymphocytes T Vγ9Vδ2 dans le cancer de la prostate métastatique.

A ce jour, de nouvelles stratégies sont en développement pour activer les lymphocytes T Vγ9Vδ2 *in vivo* dans le cadre d'immunothérapie antitumorale. Le développement d'anticorps activateurs ou inhibiteurs de BTN3A permet de moduler l'activité des lymphocytes T Vγ9Vδ2 *in vitro* ou *in vivo*. Le clone 103.2 permet le blocage de l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 (174) ; le clone 20.1 permettra quant à lui une activation (175) notamment contre les cellules tumorales solides ou hématologiques (158). Un anticorps activateur ciblant les 3 isoformes de BTN3A, ICT-01, se fixant sur un site de liaison englobant celui du 20.1, est en cours de développement clinique chez l'Homme. L'essai EVICTION est une étude de phase I/IIa visant à évaluer la sécurité, la tolérance et l'activité de ICT-01 en monothérapie ou en association au pembrolizumab chez des patients avec des cancers solides ou hématologiques avancés. Il a été montré une activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 en dehors de la circulation sanguine et permet une augmentation de l'infiltration immune tumorale en lymphocytes T CD8, lymphocytes NK et lymphocytes T Vγ9Vδ2 (176). L'association ICT01/pembrolizumab montre également des signaux d'activité, notamment chez les patients en échec d'inhibiteurs de checkpoints immuns, tels quel le cancer de la vessie, du poumon non à petites cellules ou le mélanome (177) avec des taux de contrôle de la maladie de 22-42%. Une phase d'expansion de cohorte est en cours incluant des patients avec cancer de l'ovaire ou de la tête et du cou. Une seconde étude de phase I/IIa,

EVICTION-2 est en cours pour évaluer l'association ICT01 avec de faibles doses d'IL-2 sous cutanée chez des patients atteints de tumeurs solides avancées (prostate, pancréas, ovaire ou colorectal) (178).

Une autre approche d'immunothérapie impliquant les lymphocytes T Vγ9Vδ2 consiste à réinjecter aux patients des lymphocytes T Vγ9Vδ2 expandus *ex vivo* à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). Ces expansions peuvent se faire à partir des PBMC du patient lui-même, mais également à partir de PBMC d'autres donneurs sains. La première application de cette approche a été décrite chez 7 patients atteints de cancer du rein métastatique avec administration de T Vγ9Vδ2 autologue, expandus à l'aide d'un phosphoantigène, le 2-methyl-3-butenyl-1-pyrophosphate (2M3B1-PP) et de l'IL-2. Six injections de 9.10^9 de cellules associées à un agoniste du récepteur de l'IL-2 (teceleukin) ont été réalisées avec une tolérance globale correcte. 3 patients sur 7 ont montré un ralentissement de la progression tumorale (179). D'autres études de faibles effectifs ont évalué cette approche dans le cancer du rein (180), le myélome multiple (181) ou le carcinome hépatocellulaire (182) avec des résultats cliniques limités.

L'intérêt de l'expansion *ex vivo* de T Vγ9Vδ2 est également de pouvoir les modifier génétiquement afin d'améliorer leur efficacité anti tumorale, notamment avec la fabrication de CAR T γδ. L'introduction d'un TCR transgénique dans les lymphocytes T Vγ9Vδ2 permettra une expression stable d'un récepteur spécifique d'intérêt dirigé contre un antigène tumoral spécifique. Comme discuté plus haut, ils offrent la possibilité de transfert allogénique, et ainsi de faciliter leur production et de limiter les toxicités par relargage de cytokines. Les CAR T γδ dirigés contre l'antigène PSCA sont en cours de développement avec une activité antitumorale dans un modèle murin (132). Ces CAR (MSGV1-PSCA-8T28Z) sont en cours d'évaluation dans un essai de phase I ouvert en 2024 (NCT06193486).

IV. Les checkpoints immuns solubles : formes et rôles en cancérologie

Cette partie s'inspire largement d'un article publié dans la revue Immunité et Cancer « Hétérogénéité des checkpoints immuns solubles et leur impact en cancérologie » par Emilien Billon, Laurent Gorvel, Daniel Olive en 2023. L'article original publié est en ***Annexe 1****.*

L'identification et la caractérisation de nouveaux biomarqueurs pronostics et/ou prédictifs de réponse aux traitements, revêt une priorité en cancérologie dans cette situation où les alternatives thérapeutiques se multiplient, afin d'adapter au mieux le traitement à chaque patient pour améliorer leur survie et en limitant au mieux les toxicités.

De plus, la généralisation de l'utilisation de stratégies moins invasives dans le diagnostic des cancers (biopsie à l'aiguille…) ainsi que l'augmentation des indications de traitements néoadjuvants limitent la quantité de matériel tumoral disponible en début de prise en charge des patients.

Pour toutes ces raisons, un intérêt particulier est porté ces dernières années sur l'impact clinique et biologique des formes solubles de différents checkpoints immuns dans de nombreuses pathologies en oncologie. Leur caractère pronostic et/ou prédictif de réponse aux traitements est maintenant documenté dans de multiples pathologies et la compréhension des mécanismes de leur régulation a permis de mettre en lumière de nouvelles voies de résistance aux traitements et stratégies pour améliorer leur efficacité.

1. L'hétérogénéité des checkpoints solubles en cancérologie

La forme soluble des checkpoints peut être produite par différents mécanismes variant selon la molécule intéressée, ainsi que son origine cellulaire.

PD-L1 est probablement le checkpoint immun pour lequel la forme soluble (sPD-L1) est la plus étudiée à ce jour, 3 mécanismes de production sont décrits :

Le premier, correspond au clivage de la forme membranaire de PD-L1 (mPD-L1), notamment par différentes métalloprotéases (MMP), aboutissant à la formation d'une forme soluble, libre de PD-L1 (sPD-L1). Il a été montré, à partir de lignées de carcinome épidermoïde buccal OSC-19 et OSC-20 que mPD-L1 peut être clivé en sPD-L1 par les MMP-7 et MMP-13 (183). Des résultats similaires ont été rapportés à partir de myofibroblastes PD-L1$^+$ intestinaux dans la maladie de Crohn où mPD-L1 est clivé par MMP-10, limitant ainsi l'immunorégulation de ces myofibroblastes sur les lymphocytes T (184).

D'autre part, sPD-L1 peut également être produit par une voie non-protéolytique, par épissage alternatif. Plusieurs variants d'épissages de PD-L1 conduisent à la formation de sPD-L1, avec des conséquences biologiques distinctes. Les principales formes correspondent à la perte du domaine transmembranaire du récepteur, décrit par exemple dans le cancer du poumon non à petites cellules,

le mélanome ou la leucémie aigüe (185). Il a aussi été décrit des variants d'épissage conduisant à la production de PD-L1 par l'acquisition d'un élément intronique, LINE-2A, dans le gène *CD274* codant pour PD-L1 (processus dit d'exaptation). Ceci entraîne l'omission du domaine transmembranaire et de la séquence régulatrice associée. Le transcrit qui en résulte code pour une forme de sPD-L1 dépourvue d'activité inhibitrice sur les cellules T (186). Il existe des variants d'épissage conduisant à une forme soluble de PD-L1 agissant comme un « leurre » à l'encontre des anticorps anti-PD-L1, et étant de ce fait un potentiel mécanisme de résistance à ces thérapies (187). Inversement, un variant d'épissage dépourvu du domaine transmembranaire produit une forme sécrétée de PD-L1 spécifique, avec ajout d'une chaine de 18 acides aminés, capable d'homodimérisation. Ce variant est doté de capacité immunosuppressives sur les cellules T du microenvironnement tumoral supérieures à celle de sPD-L1 produit par perte simple du domaine transmembranaire (188).

La troisième voie par laquelle PD-L1 peut se retrouver sous une forme libre est la libération de mPD-L1 par l'intermédiaire de vésicules extracellulaires, notamment par les exosomes. Ces vésicules, dotées d'une couche lipidique comparable à la membrane cellulaire, peuvent récapituler l'effet de PD-L1 à la surface des cellules et moduler de manière significative la réponse au traitement par anticorps anti-PD-1/PD-L1 (189).

Ces trois formes de sPD-L1 peuvent être détectées dans le plasma des patients, mais l'identification du mécanisme de formation peut s'avérer plus délicate. En effet, les méthodes usuelles utilisées (ELISA par exemple) pour doser les checkpoints solubles dans les fluides biologiques détectent indistinctement les différentes formes des checkpoints, y compris les formes associées aux vésicules extracellulaires. Ces formes pouvant avoir des actions biologiques différentes et leur proportion diffère en fonction des pathologies. Cela peut expliquer les résultats contradictoires sur le rôle des checkpoints solubles décrits dans la littérature ; montrant l'enjeu technique sous tendu par l'étude de ces checkpoints.

2. Checkpoints solubles et vésicules extracellulaires

Il est aujourd'hui établi que les phases d'initiation et de progression du cancer sont facilitées par la communication entre les cellules pré-néoplasiques/malignes émergentes et les autres cellules du TME. La communication intercellulaire peut faciliter les changements dans le microenvironnement pour influencer la croissance de la tumeur et la dissémination des cellules cancéreuses. Cette communication peut se faire par la sécrétion de facteurs solubles ou par l'échange de vésicules extracellulaires. Les vésicules extracellulaires sont des fragments de double membranes lipidiques fermés, sécrétés par de nombreux types de cellules eucaryotes comme procaryotes. Ces dernières ont été trouvés dans des fluides corporels tels que le sang, l'urine, la bile, le lait maternel et les fluides

synoviaux, lacrymaux, séminaux, d'ascite et de lavage broncho-alvéolaire, ainsi que dans les selles (190). Elles peuvent être libérées en réponse à l'activation cellulaire, aux changements de pH, à l'hypoxie, à l'irradiation, aux blessures, à l'exposition aux protéines du complément et au stress cellulaire. Elles contiennent des protéines, des lipides, des métabolites, de l'ARN et de l'ADN, qui peuvent potentiellement être transférées aux cellules réceptrices pour influencer leurs fonctions. Les vésicules extracellulaires se composent de deux grandes catégories : les exosomes dérivés du corps multivésiculaires mesurant de 40 à 180nm, et les ectosomes, provenant de la membrane plasmique, mesurant de 100 à 1000nm (191). Cependant, il existe une grande diversité de vésicules extracellulaires selon leur modalité de production. Après libération, ces vésicules vont pouvoir diffuser dans le microenvironnement vers la circulation et disséminer dans tout l'organisme (**Figure 21**).

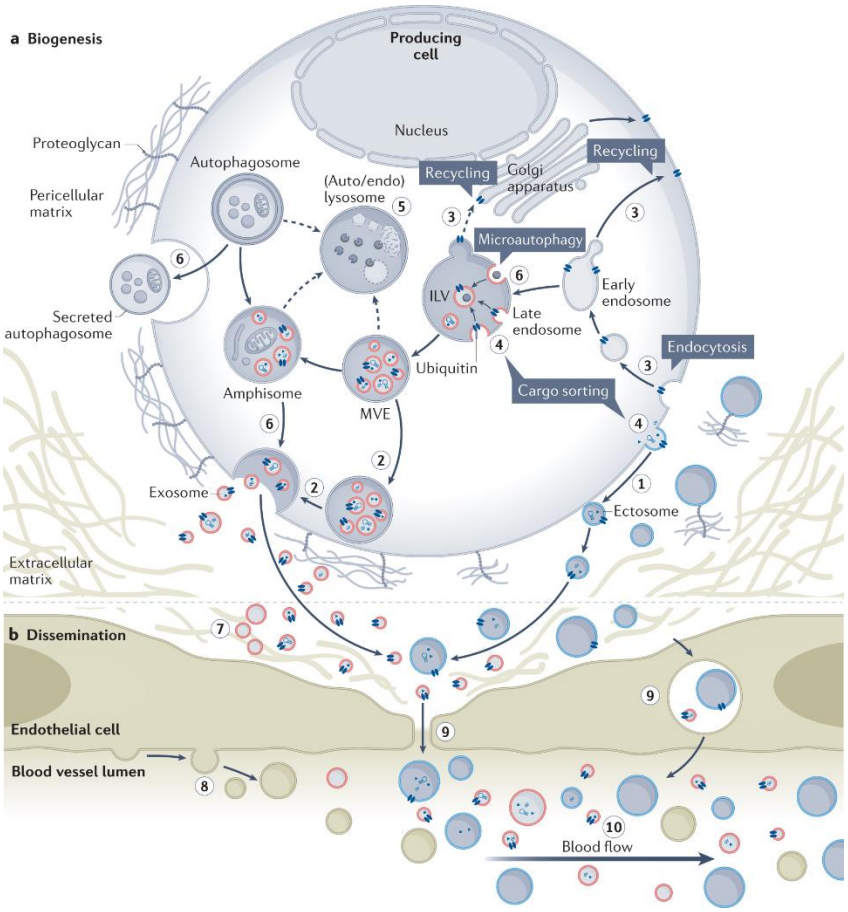


Figure 21. Biogénèse des vésicules extracellulaires et dissémination (d'après van Niels et al. (192))
a. Deux principaux sous-types de vésicules extracellulaires (EV) comprennent les ectosomes et les exosomes (numéros 1 à 6). Les ectosomes bourgeonnent directement à partir de la membrane plasmique (1), tandis que la libération d'exosomes implique la formation de corps multivésiculaires (MVE) qui, lors du transport vers la membrane plasmique et de sa fusion, libèrent leurs vésicules

intraluminales (ILV) sous forme d'exosomes (2). L'endocytose et le recyclage vésiculaires régulent la formation de ces vésicules (3). Différents mécanismes de tri, liés à des modifications post-traductionnelles des divers éléments cargos induisent le bourgeonnement et la fission de microdomaines membranaires enrichis en protéines, lipides et acides nucléiques (4). La libération des exosomes nécessite des étapes supplémentaires pour empêcher la dégradation lysosomale (5). Le processus de libération d'EV peut également recouper l'autophagie (6), notamment le rôle de la microautophagie dans la génération d'ILV et la formation d'amphisomes sécrétoires lors de la fusion des autophagosomes et des MVE. Ceux-ci peuvent libérer un contenu hétérogène dans l'espace extracellulaire. De plus, les autophagosomes matures peuvent également fusionner avec la membrane plasmique pour générer des autophagosomes sécrétoires. Ces mécanismes élargissent la variété des sous-populations de vésicules extracellulaires et montrent que leur génération implique plusieurs voies. b | Une fois libérés (numéros 7 à 10), les vésicules extracellulaires peuvent interagir directement avec la matrice péricellulaire et extracellulaire, ce qui influencera leur dissémination (7). Les vésicules peuvent être directement libérées dans les fluides biologiques (8) ou y parvenir par transcytose ou en passant par des brèches de barrières biologiques (9) pour diffuser dans l'organisme via la circulation (10).

Il est bien établi que les cellules tumorales, tout comme les cellules du microenvironnement tumoral, sont en mesure de produire des vésicules extracellulaires pouvant moduler l'activité du système immunitaire face au cancer. Ces vésicules extracellulaires peuvent interagir avec l'ensemble des acteurs immuns et moduler leur activité par des mécanismes variés (193).

L'expression de checkpoints immuns fait partie de ces mécanismes de régulation. En effet, ces vésicules extracellulaires présentent l'intérêt de pouvoir exprimer les checkpoints immuns à leur surface, en plusieurs copies. Mais elles peuvent également co-exprimer plusieurs checkpoints pouvant avoir ainsi un effet synergique sur les cellules cibles. De plus, l'expression de checkpoints peut servir de « signal d'adressage » permettant aux vésicules de délivrer plus spécifiquement leur contenu à certains sous types cellulaires (194).

Si on poursuit l'exemple de PD-L1 (195), il a été montré que des exosomes PD-L1$^+$ peuvent être retrouvés dans le plasma de patients atteints de mélanome avancé, et que des taux élevés sont associés à une moins bonne réponse aux anti-PD1, ainsi qu'à une moins bonne survie (189). Dans cette même étude, les auteurs montrent que les exosomes PD-L1$^+$ produits par les lignées de mélanome altèrent les fonctions de lymphocytes T CD8$^+$ *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin ; et favorisent la croissance tumorale. Des résultats comparables ont été obtenu avec les exosomes PD-L1+ dérivés de cellules tumorales prostatiques dans lequel le blocage production de ces exosomes permet une

réduction de la croissance tumorale et la restauration des fonctions immunes notamment mémoires (196). Dans une cohorte de 69 patients opérés pour un cancer de l'estomac, la présence d'exosomes PD-L1$^+$ dans le plasma des patients avant chirurgie est corrélée à une moins bonne survie globale, alors que la concentration plasmatique en sPD-L1 n'est pas corrélée à la survie (197).

Dans un modèle murin de cancer du sein, Wen et al. montrent que les exosomes dérivés de la tumeur s'accumulent particulièrement dans le foie et les poumons des souris, où ils altèrent l'activité des cellules T CD4, T CD8 et NK, favorisent l'accumulation des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSCs) et le développement de métastases (198).

D'autre part, les cellules immunes sont elles aussi capables de produire des vésicules extracellulaires capables de moduler la réponse immune antitumorale. Il a ainsi été montré que les vésicules extracellulaires CD19$^+$ peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T CD8 par hydrolyse de l'ATP via l'expression des molécules CD39 et CD73. Cette inhibition va être responsable d'une baisse de l'activité cytotoxique associée à la chimiothérapie dans un modèle murin de cancer du côlon, et la présence de ces vésicules extracellulaires CD19$^+$ dans le plasma est inversement corrélée à la survie dans une cohorte de patients atteints de cancer du côlon traités par chimiothérapie (199).

3. Valeur pronostique des checkpoints solubles en cancérologie

Si la fonction exacte de la forme soluble des checkpoints immuns est encore inconnue à ce jour, de nombreuses équipes se sont intéressées à la valeur pronostique ou prédictive de réponse aux traitements de nombreux checkpoints immuns en cancérologie.

Premièrement, la concentration plasmatique de nombreux checkpoints est plus élevées chez les patients atteints de cancer que chez les volontaires sains. C'est par exemple le cas pour sPD-L1 et sPD-1 dans les cancers du poumon non à petites cellules et à petites cellules, le cancer de l'estomac, le carcinome hépatocellulaire, le cancer colorectal, les cancers de la tête et du cou, les gliomes, le cancer du rein ou encore le cancer de la prostate. Des données sont également disponibles concernant sCTLA4, sCD80, sTIM3, sLAG3, sB7-H3, sBTLA, et sHVEM (200). Les taux plasmatiques des checkpoints sont aussi souvent corrélés au stade et à l'agressivité de la maladie. Les taux de sPD-L1 augmentent, par exemple, avec l'agressivité de la maladie dans les cancers de l'estomac, le carcinome hépatocellulaire, le cancer du sein triple négatif, et le carcinome rénal à cellules claires. Dans le cancer de la prostate localisé, le taux plasmatique de sPD-L1 augmente avec le score de Gleason (201). Toutefois, dans cette étude, il n'y avait pas de corrélation entre le taux de sPD-1 et le score de Gleason.

Une étude menée sur 190 patients atteints de cancer de la prostate localisé a montré que des taux solubles de TIM-3 et BTLA dans le sérum des patients avant traitement spécifique étaient associés à des score de Gleason plus élevés et donc à une plus grande agressivité de la maladie. Dans cette même

étude, les taux solubles de sCD28, sCTLA4, sHVEM, sIDO, sGITR, et sCD80 étaient corrélés à la survie sans rechute biologique et les taux de sCD28, sCTLA4, sGITR, sHVEM, sIDO, sPD-1 et sPD-L2 à la survie sans progression radiologique (202).

L'association des checkpoints solubles à la survie de patients également été évaluée. De nombreuses études sont publiées concernant l'impact de sPD-L1 ou sPD-1 chez des patients traités par immunothérapie ou chimiothérapie conventionnelle, avec des résultats contradictoires. Un taux élevé de sPD-L1 avant traitement est par exemple associé à des durées de réponse plus courte sous anti-PD1 ou anti-PD-L1, et à des survies globales également diminuées chez des patients traités pour un cancer du poumon non à petites cellules (203,204). D'autres études similaires n'ont en revanche pas démontré d'association avec la survie sans progression ou la survie globale (205,206). Dans le cancer du rein traité par immunothérapie, le taux plasmatique de sPD-L1 est associé à un pronostic défavorable dans l'essai CheckMate 009 (188), alors que des taux élevés de sPDL1 sont associés à une PFS allongés dans l'étude de Incorvaia et al. (207). Les populations étudiées sont proches, à savoir des patients atteints de cancers du rein métastatiques majoritairement prétraités par anti-angiogéniques. On constate également des disparités techniques entre ces études, qui peuvent expliquer les différences de résultats, avec des différences de pré-analytiques des échantillons sanguins : heures et technique de prélèvement, tubes prélevés (tube sec / EDTA), délai de traitement, protocole de séparation, type de conservation ; mais également des différences analytiques dans les techniques de dosages utilisées (ELISA ; kits de dosage multiplex…). Ces considérations peuvent expliquer les résultats pouvant être contradictoires en fonction des études, dans lesquelles les concentrations seuils retenues permettant de séparer les populations de patients vont être différents, de même que l'impact clinique observé. Cela rend également difficile, en l'état, l'utilisation en routine clinique de ces biomarqueurs.

L'association checkpoints solubles et survie a le plus souvent été évaluée sur des cohortes rétrospectives, avec un seul bras de traitement (traitement standard) ne permettant pas d'affirmer le caractère pronostic ou prédictif de réponse de ces checkpoints. Une étude récente a évalué l'impact de sPD-L1, sPD-1 et sCTLA-4 chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules métastatiques. Les patients étaient issus de cinq cohortes différentes, une premières cohortes d'apprentissages, prospectives, incluant 50 patients traités par nivolumab en monothérapie ; deux cohortes de validation rétrospectives, de 149 et 28 patients traités par anti-PD1 ou anti-PD-L1 en monothérapie ; une cohorte de 42 patients traités par chimiothérapie conventionnelle et une dernière cohorte de 43 patients traités par thérapie ciblée. Les auteurs ont montré que des taux élevés de sPD-L1 et sCTLA-4 combinés étaient associés à une survie sans progression moins bonne chez les patients traités par inhibiteurs de checkpoints immuns, notamment chez les patients avec expression élevée de PD-L1 intratumorale. Cet impact n'a pas été retrouvé dans les cohortes de patients traités par

chimiothérapie conventionnelle ou thérapie ciblée, confirmant le caractère prédictif de réponse de ces checkpoints (208).

La cinétique d'évolution des checkpoints solubles peut également être informative. La décroissance des taux circulant de sPD-L1 et sPD-1 après 2 à 4 cycles de traitement est associée la réponse sous inhibiteurs de checkpoints immuns de plusieurs pathologies telles que le cancer du poumon non à petites cellules (209,210), le cancer du rein (207), le cancer de l'estomac ou de la vessie (206). A l'inverse, d'autres études ont montré que l'augmentation des taux plasmatiques de sPD-1 post inhibiteur de checkpoints était associée à une survie sans progression et une survie globale supérieure (204,211).

Là encore, les résultats divergents des études rendent difficile la transposition en clinique de ces biomarqueurs. L'intérêt croissant dans la littérature pour l'impact clinique de ces checkpoints est ainsi fortement limité par le caractère purement descriptif des études, s'intéressant peu aux mécanismes de régulation de ces checkpoints solubles qui restent à élucider.

Objectifs des travaux de recherche

Ce projet de thèse s'inscrit dans une démarche translationnelle visant à améliorer les connaissances sur le cancer de la prostate métastatique hormonosensible pour améliorer la prise en charge des patients.

1) L'objectif premier de ce projet est d'identifier un ou des nouveau(x) biomarqueur(s) immun(s) à partir de biopsie liquide dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible afin de mieux stratifier les patients dès leur diagnostic.

Cette première phase nous a permis d'identifier la forme soluble, plasmatique, de BTN2A1 au diagnostic comme facteur pronostic dans une cohorte de 66 patients atteints de cancer de la prostate métastatique d'emblée.

Les autres objectifs du projet ont par la suite consisté à :

2) Etudier les mécanismes de production de la forme soluble de BTN2A1 dans le cancer de la prostate métastatique ainsi que son origine cellulaire.

3) Comprendre l'impact de la forme soluble de BTN2A1 sur l'immunité antitumorale dans le cancer de la prostate, dans des modèles *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*, notamment l'impact sur les lymphocytes T Vγ9Vδ2.

4) Etudier la régulation de BTN2A1 à la surface des cellules en condition physiologique et pathologique.

5) Evaluer le rôle pronostique de la forme soluble de BTN2A1 dans d'autres pathologies tumorales, notamment dans une cohorte de patients atteints de cancer du rein métastatique traités par anti-PD1.

PARTIE I: Les vésicules extracellulaires BTN2A1+ sont associées à un pronostic défavorable et altèrent les fonctions des lymphocytes T Vγ9Vδ2 dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible

La première partie de ce travail de thèse décrite ici visait à identifier un ou des nouveau(x) biomarqueur(s) immun(s) à partir de biopsie liquide dans le cancer de la prostate métastatique et à comprendre les mécanismes impliqués.

Ce travail a fait l'objet d'un poster au congrès annuel de l'American Society of Clinical Oncology GenitoUrinary en Janvier 2024:

BTN2A1^{+} extracellular vesicles are associated with poorer outcomes and highlight γδ T cells as potential therapeutic target in patients with hormone sensitive metastatic prostate cancer. Emilien Billon, Caroline Imbert, Laurent Gorvel, Manon Richaud, Rania Ghossoub, Virginie Girault, Thierry Fest, Gwenaelle Gravis, Daniel Olive

Matériels et méthodes

I. Collection des échantillons biologiques humains

Les échantillons biologiques humains analysés et décrits dans cette thèse sont issus d'un essai clinique, le prostate NKProstate-IPC2015-019. Les échantillons de sang de volontaires sains ont été acquis dans le cadre d'une convention auprès de l'Etablissement Français du Sang.

Protocole NKProstate-IPC2015-019

Le protocole NK-PROSTATE est une étude prospective, monocentrique conduite à l'institut Paoli-Calmettes par le Dr Gwenaelle GRAVIS. Protocole approuvé par le COS N°2016-A00025-46 après validation par le CPP SUD Méditerranée 1 en date du 11/05/2016.

Les patients avec cancer de la prostate métastatique hormonosensible répondant aux critères d'inclusion/non inclusion (*cf ci-après*) pouvaient être inclus après signature d'un consentement éclairé. A l'inclusion, les patients bénéficiaient d'un examen physique et d'un prélèvement sanguin (6 tubes EDTA et 1 tube sec). Les patients étaient ensuite suivis dans le cadre de leur maladie pour une durée prévue de cinq ans avec dosage du PSA tous les trois mois. En cas d'élévation confirmée du PSA ou apparition de nouveaux symptômes, un scanner thoracique abdominal et pelvien ainsi qu'une scintigraphie osseuse ont été réalisés. Un nouveau prélèvement sanguin selon les mêmes modalités a été réalisé à trois ans de suivi ou en cas de progression si elle survient pendant cette période.

Les prélèvements sanguins issus des patients ont été transférés dans les 2 heures dans le laboratoire d'Immunologie des Tumeurs de l'Institut Paoli-Calmettes (Inserm 1068, Pr Daniel Olive). Le plasma et les cellules mononuclées du sang périphériques (PBMC) ont été isolés après centrifugation par gradient de densité à partir des tubes EDTA. Le plasma a été congelé et les cellules re-suspendues en milieu Roswell Park Memorial Institute (Gibco RPMI 1640) puis congelées jusqu'à analyses.

- Patients à l'étude

Pour pouvoir être inclus, les patients devaient :

- Avoir un cancer de la prostate métastatique d'emblée
- Être âgés de 18 ans ou plus
- Avoir un état général conservé (ECOG = 0 à 2)
- Être en période sensibilité à la castration depuis moins d'un an ou être naïf de traitement hormonal
- Avoir signé un consentement éclairé
- Être affiliés à un régime de sécurité sociale

Les patients ne devaient pas :

- Recevoir un traitement par chimiothérapie lors du prélèvement initial
- Recevoir de corticothérapie systémique lors du premier prélèvement
- Être en situation d'urgence ou les personnes majeures faisant l'objet d'une mesure de protection légale ou hors d'état d'exprimer son consentement

ç

II. Exploration des formes solubles des checkpoints immuns

1. Détermination des concentrations des checkpoints solubles dans les fluides biologiques

Les concentrations de PD-1, pan-BTN3A, BTN3A1, BTN2A1 et BTLA solubles ont été déterminées par test immuno-enzymatique (ELISA). Tous les échantillons de plasma ont été dilués au 1/4 avant le test, les échantillons d'urine au 1/100eme. Les plaques ont été coatées sur la nuit avec l'anticorps sélectionné pour la capture, puis lavées. Les sites de liaison restants ont été bloqués pour minimiser le bruit de fond en BSA (Bovine Serum Albumin). Les échantillons à tester sont incubés pendant 2 heures, puis lavés. L'anticorps biotinylé sélectionné pour la détection a été incubé pendant 2 heures, suivi d'une incubation de 1 heures avec le conjugué avidine-peroxydase. Ensuite, le substrat tétraméthylbenzidine (TMB) a été ajouté, la réaction arrêtée avec HCl 2N lorsque la gamme est développée et la densité optique lue à 450 nm sur un instrument ClarioStar (BGM Labtech). Les concentrations ont été établies par comparaison avec une gamme obtenue avec des concentrations connues de l'antigène recombinant. Les anticorps monoclonaux utilisés étaient des produits au laboratoire. Tous étaient d'isotype IgG1.

2. Caractérisation des vésicules extracellulaires à partir des différents fluides biologiques

a. Purification des vésicules extracellulaires

L'isolation des larges vésicules extracellulaires est réalisée par ultracentrifugation séquentielle à partir des différents liquides biologiques. Une première centrifugation à 1000g pendant 15min est réalisée pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite centrifugé à 10 000g pendant 30min pour faire précipiter les larges vésicules avec une centrifugeuse Optima L90K (*Beckman Coulter*) pour les volumes > 5mL ou sur une centrifugeuse Opti Max-XP (*Beckman Coulter*) pour les plus faibles volumes. Le culot est resuspendu dans 1.5mL de PBS froid puis centrifugé à 10 000g avec une centrifugeuse Opti Max-XP (Beckman Coulter).

Une fois isolées, les vésicules extracellulaires vont être caractérisées selon les recommandations MISEV (Minimal information for studies of extracellular vesicles) 2018 (212), actualisées en 2023 (213).

La suspension de vésicules extracellulaires sera qualifiée en taille/structure/concentration par Nanoparticle Tracking Analysis (NanoSight NS300, *Malvern Panalytical*).

La quantification protéique des échantillons sera effectuée à l'aide du kit Pierce™ BCA Protein Assay (ThermoFisher) selon les recommandations du fabricant. Avant analyses, les vésicules sont lysées à l'aide d'une solution de Tris-Triton 1% [H2O ; Tris HCL 25mM, pH 7.5 ; NaCl 120mM ; Triton X100 1%]. La détermination de la concentration protéique de chaque échantillon sera utilisée pour standardiser la quantité de vésicules extracellulaires pour chaque expérience (utilisation de l'équivalent de 1µg ou 10µg de protéines de vésicules intactes).

L'expression des tétraspanines CD9, CD63 et/ou CD81 a été réalisée par cytométrie spectrale (*cf section suivante*) en utilisant des anticorps anti CD9, CD63 et CD81 couplés en APC (*Miltenyi Biotec*).

b. Phénotypage simple par cytométrie spectrale

Le phénotypage simple des vésicules extracellulaires est réalisé à partir du plasma complet (après centrifugation 15min à 1000g pour éliminer les débris cellulaires) ou à partir des vésicules concentrées et purifiées pour les urines et les surnageants de culture. Trente microlitres de solution d'intérêt seront marqués en tube 5mL en polypropylène avec CellTrace™ Calcein violet 1µM pendant 20min à température ambiante puis ajout de 1µL de chaque anticorps d'intérêt, prédilués selon titration préalable. Incubation 20min à température ambiante. L'échantillon est ensuite dilué par adjonction de 500 à 1000µL de Phosphate Saline Buffer (PBS) selon la concentration initiale en vésicules extracellulaires avant lecture dans les 2 heures sur un cytomètre spectral Aurora (*Cytek Biosciences*). La calibration de l'instrument a été réalisée avant le début des expérimentations, et est contrôlée avant chaque acquisition, à l'aide du Mégamix-Plus SSC (*Biocytex*) (**Figure 22**) selon les recommandations du fournisseur.

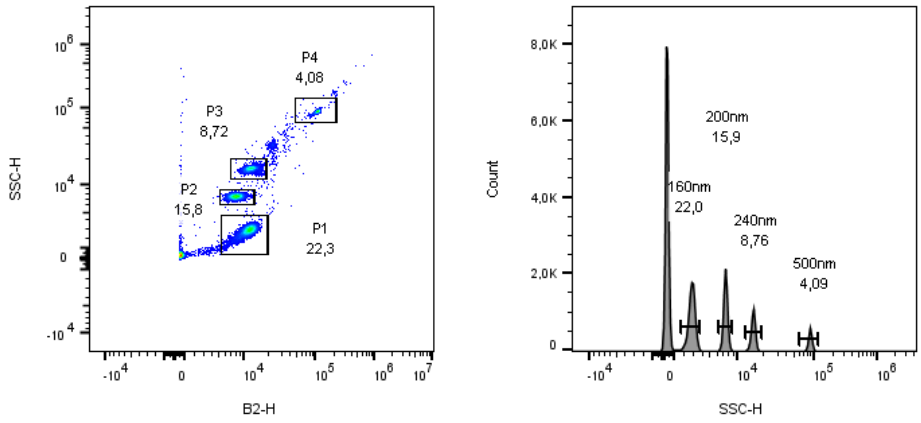


Figure 22. Détection des billes Mégamix-Plus SSC sur cytomètre spectral Aurora (Cytek). *La discrimination des différentes tailles de billes sur fait sur le détecteur SSC-H avec une aide à la détection*

en fluorescence (FITC, identifiée sur le détecteur B2). Un threshold SSC-H à 4182 est ensuite appliqué selon les recommandations du fournisseur, permettant une analyse des vésicules extracellulaires > 200nm.

c. Phénotypage étendu des vésicules extracellulaires

Le phénotypage étendu des vésicules extracellulaires sera réalisé à partir de vésicules extracellulaires concentrées et purifiées quelle que soit la nature de l'échantillon, grâce au kit **MacsPlex EV IO, human** (*Miltenyi Biotec*). L'équivalent de 10µg de protéines de vésicules extracellulaires sont marquées selon les recommandations du fournisseur. L'anticorps de détection utilisé est un anti-BTN2A1-AF647 (clone 7.48, *homemade*), permettant ainsi d'évaluer l'expression relative de BTN2A1 à la surface des vésicules extracellulaires en fonction de 37 marqueurs immuns et non immuns à l'aide de billes de capture (**Figure 23**). La mesure des fluorescence en PE, FITC et AF647 des échantillons sera réalisée sur un cytomètre spectral Aurora (*Cytek Biosciences*). L'analyse des fichiers sera réalisée à l'aide du logiciel FlowJo (v10.8.1, *BD Biosciences*), les analyses statistiques à l'aide des logiciels Phantasus et GraphPad Prism (version 9.5.1).

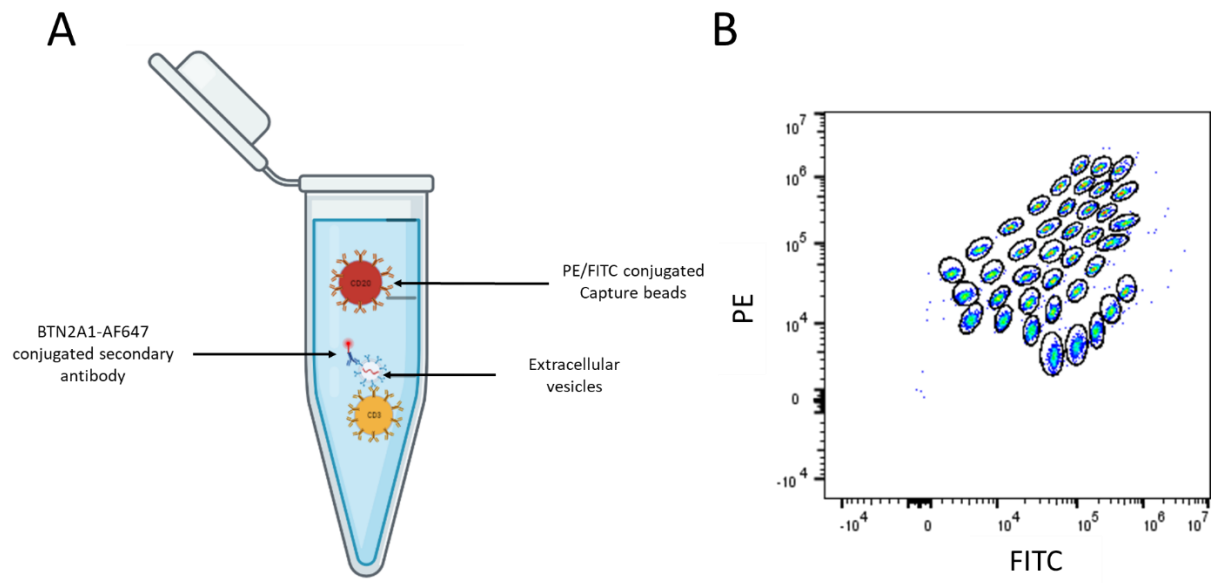


Figure 23. Mesure de l'expression de BTN2A1 à la surface des vésicules extracellulaires en fonction des différents marqueurs d'origine. A. Schéma expérimental du marquage. B. Détection des sous-population de billes de capture selon les marquages PE/FITC permettant de mesurer l'expression de BTN2A1 sur l'ensemble de ses sous populations spécifiques.

III. Caractérisations des populations immunes à partir des PBMC de patients par cytométrie spectrale

1. Protocole de marquage des échantillons

Les PBMC des patients et/ou des volontaires sains sont d'abord décongelés à 37°C, et lavés à 2 reprises dans du RPMI supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Le culot est ensuite récupéré en RPMI10%SVF et laissé en *resting* 30min à 37°C/5% CO2. Les cellules sont ensuite filtrées sur un filtre 70µm pour éliminer les agrégats puis comptées. Le marquage cellulaire sera réalisé sur 1.000.000 de cellules vivantes.

Les cellules sont d'abord marquées en LiveDead Blue (*Thermofisher*) pendant 15minutes à température ambiante en plaque 96 puits dans un volume de 50µL de PBS. Après 2 lavages en PBS, les cellules sont incubées avec du FcBlock (*BD Biosciences*) et certains anticorps nécessitant d'être pré-incubés pendant 10minutes, avant ajout des différents mix extracellulaires (*cf section suivantes*). Les mix extracellulaires sont incubés 25minutes à température ambiante avant 2 lavages en PBS. Les cellules sont ensuite récupérées dans 300µL de PBS en tube FACS de 5mL avant lecture sur un cytomètre spectral Aurora (*Cytek Biosciences*) à l'aide du logiciel SpectroFlow (*v3.2.1, Cytek Biosciences*).

Un échantillon contrôle, issus d'un même donneur (CLP contrôle), a été inclus lors de chaque session afin de pouvoir évaluer et corriger le *batch effect* inhérent à ce type de protocole.

2. Panels utilisés

Les cellules sont marquées à l'aide de deux panels permettant de phénotyper les cellules B et T follicular helper (**Panel 1**) et les cellules T et NK (**panel 2**).

Panel 1 Panel B TFH

Target	Fournisseur	Fluorochrome
Live dead blue	ThermoFisher	UV6

Target	Fournisseur	Fluorochrome
CXCR3	Biolegend	BV650
CCR6	Biolegend	BV711
CXCR5	Biolegend	BV750
CD45	Biolegend	Percp
Mix avec FcBlock; 10 min RT		

Target	Fournisseur	Fluorochrome
CD20	BD Biosciences	BUV395
CD4	BD Biosciences	BUV563
CD69	BD Biosciences	BUV737
CD19	BD Biosciences	BUV805
ICOS	Biolegend	BV421
IgD	BD Biosciences	BV480
CD3	Biolegend	BV510
IgG	BD Biosciences	BV605
Mix dans Brilliant Buffer; 25min RT		

Target	Fournisseur	Fluorochrome
CD138	Biolegend	FITC
CD21	BD Biosciences	BB700
PD1	Biolegend	PE
CD24	Biolegend	PE Dazzle594
IgA	Miltenyi	Pe Vio 770
BTN2A1	Maison	AF647
IgM	Biolegend	AF700
CD27	Biolegend	APC-Cy7
CD38	Biolegend	APC fire 820
Mix dans True Stain Monocyte Blocker; 25min RT		

Panel 2 Panel T/NK

Target	Fournisseur	Fluorochrome
Live dead blue	ThermoFisher	UV6

Target	Fournisseur	Fluorochrome
CCR7	Biolegend	BV605
Mix avec FcBlock; 10 min RT		

Target	Fournisseur	Fluorochrome
CD45RA	BD Biosciences	BUV395
CD16	BD Biosciences	BUV496
CD4	BD Biosciences	BUV563
NKG2C	BD Biosciences	BUV615
NKG2D	BD Biosciences	BUV737
CD8	BD Biosciences	BUV805
NKG2A	BD Biosciences	BV421
CD3	Biolegend	V500
CD56	Biolegend	BV570
CD28	Biolegend	BV650
PD1	Biolegend	BV785
Mix dans Brilliant Buffer; 25min RT		

Target	Fournisseur	Fluorochrome
CD57	Biolegend	FITC
CD45	Biolegend	Percp
NKp30	Biolegend	PE
CD14	Biolegend	PECY5
Siglec7	Biolegend	PE-Cy7
BTN2A1	Maison	AF647
NKp46	Biolegend	APC
VD2	Biolegend	AF700
Mix dans True Stain Monocyte Blocker; 25min RT		

3. Pipeline d'analyses

Après acquisition sur le cytomètre, les fichiers .FCS sont traités avec le logiciel SpectroFlow (*v3.2.1, Cytek Biosciences*) afin de corriger fichier par fichier l'*unmix* et ainsi s'assurer de la qualité des données générées. La correction de l'effet batch sera ensuite réalisée avec l'outil *CytobatchNorm (*https://github.com/i-cyto/cytoBatchNorm) avec R. Il s'agira d'identifier les variations d'intensité de signal de chaque canal sur l'échantillon contrôle d'un batch à l'autre, d'appliquer si nécessaire une correction pour « aligner » ces intensités à chaque batch. Cette même correction sera appliquée à l'ensemble des échantillons du batch en question, permettant d'améliorer la comparaison entre les différents échantillons des différents batchs.

Les fichiers .FCS corrigés seront importés sur la plateforme en ligne OMIQ (*Dotmatics*) pour analyses. L'ensemble des analyses décrites seront réalisées à partir des cellules vivantes identifiées comme étant négatives pour le LiveDead Blue.

Concernant le panel T, les différentes populations T CD4, T CD8, T γδ2 et NK ont été fenêtrées manuellement (Stratégie de gating, **Figure 24**) et un échantillonnage aléatoire a été réalisé pour sélectionner 2000 T CD8, 2000 T CD4+, 500 T γδ2 et 1000 NK par patients.

Pour le panel B, 2000 cellules CD19+ ont été sélectionnées par patients après gating manuel.

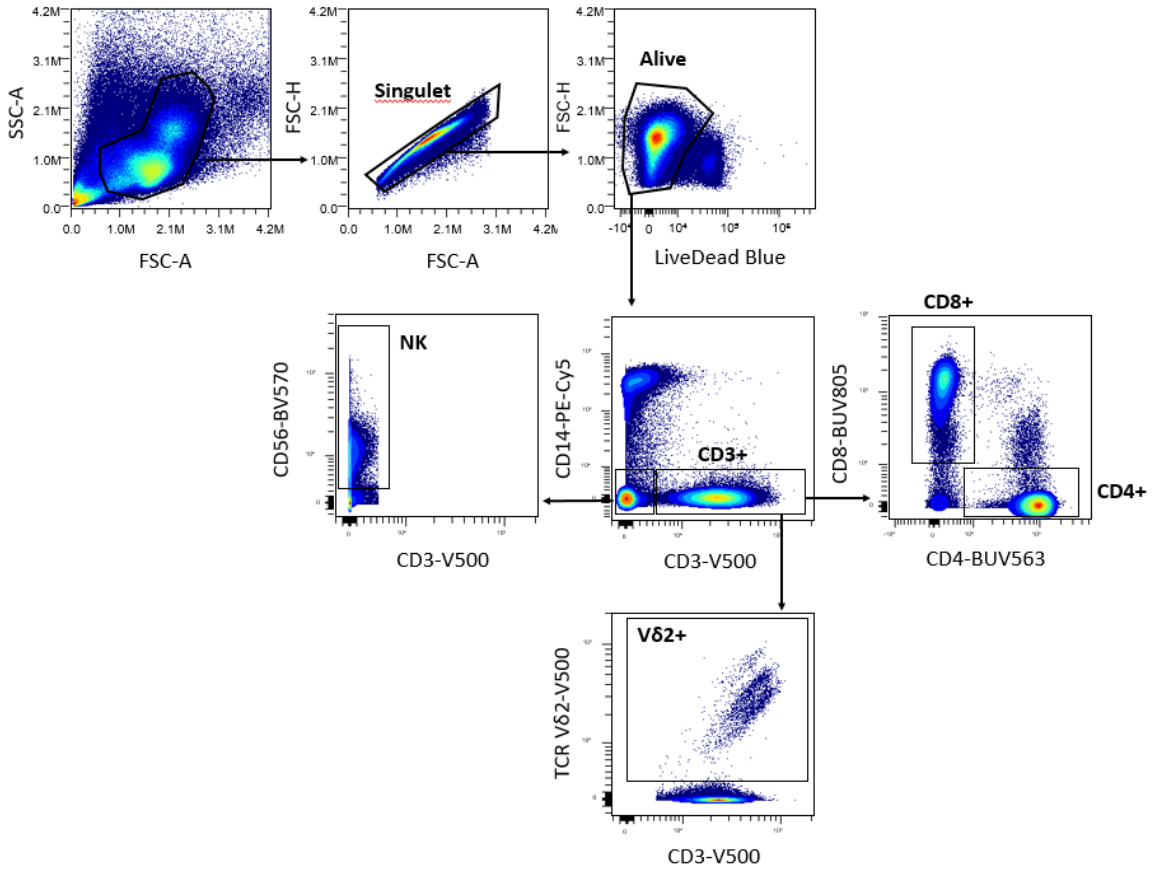


Figure 24. Stratégie de gating manuel utilisée pour isoler les grandes populations immunes dans le panel 2 T/NK

A partir de chacune des sous-populations cellulaires sélectionnées il a été réalisé une réduction de dimension en l'utilisant l'algorithme UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction). Ce dernier permet d'une représentation dans un espace en deux dimensions de l'ensemble des cellules (214). Un clustering non supervisé sera ensuite réalisé avec l'algorithme Phenograph, permettant de regrouper en différents clusters des cellules ayant un phénotype proche (215). Les proportions des différents clusters seront exportées, et rapportées à l'ensemble de la population cellulaire. La contribution relative de chaque cluster pour expliquer une variable biologique d'intérêt sera évalué par BGA (Between Group Analyses) en utilisant R studio (*R version 4.2.2 ; package made4*). Les phénotypes d'intérêt seront ensuite validés par gating manuel.

IV. Expérimentations in vitro

1. Cultures cellulaires

Les différentes lignées cellulaires utilisées sont cultivées en incubateur humide à 37°C, 5% CO2 dans leur milieu de culture respectif (RPMI10%SVF pour LNCaP et DU145 ; DNEM10%SVF pour PC3 et les différentes formes de HEK293T). Elles sont maintenues en culture < 1 mois pour limiter le nombre de passage, et testées régulièrement pour éliminer une éventuelle contamination au mycoplasme.

Si l'analyse des vésicules extracellulaires est prévue à partir du surnageant de culture, le milieu de culture est filtré en 0.22µm avant son utilisation pour éliminer les vésicules extracellulaires de grande taille pouvant être présentes dans le sérum de veau fœtal.

2. Génération des lignées HEK293T BTN2A1KO et BTN2A1 surexprimé

Les lignées HEK293T BTN2A KO a été générée par technique CRISPR-Cas-9 selon la méthode décrite par Cano et al. (158). Pour la génération de particules lentivirales, les cellules HEK293T ont été transfectées avec le vecteur d'expression lentiviral pMD2.G, psPAX2 et pLV, vide ou codant pour le gène BTN2A, en utilisant le réactif TurboFect (*ThermoFisher*) conformément aux instructions du fabricant. Le milieu de transfection a été remplacé par OptiMEM™ (*ThermoFisher*) après 24 heures. Le surnageant de culture contenant des particules lentivirales a été collecté après 24 heures et 48 heures et concentré dans un concentrateur LentiX (*Takara*) conformément aux instructions du fabricant. Les cellules HEK293T ont été ensemencées dans des plaques à 12 puits (2,5 x 10^5 cellules/puits) et 25 µL de particules lentivirales concentrées ont été ajoutées à la culture. Après 24 heures, les cellules ont été lavées deux fois dans un milieu complet et cultivées dans leur milieu de culture habituel pendant 48 heures. Pour l'inactivation du gène BTN2A, des séquences cibles CRISPR optimisées ciblant les deux isoformes BTN2A (guide 44) ont été clonées dans le vecteur lentiCRISPR-v2. La sélection des cellules

transduites a été faite en puromycine 1µg/mL. Le contrôle de l'inactivation a été régulièrement vérifié au niveau de l'expression de la protéine par cytométrie en flux.

Les lignées HEK293T BTN2A1 surexprimé sauvage ou mutant ont été générées à partir de la lignée BTN2A KO décrite précédemment, par transduction d'un plasmide BTN2A1-YFP_pGenlenti ou R>A_BTN2A1-YFP_pGenlenti. La transduction a été réalisée selon le même procédé que décrit précédemment en utilisant le réactif Fugene HD (*Promega*) en lieu et place du TurboFect. Le contrôle de transduction est réalisé en analysant l'expression de la protéine BTN2A1 et de l'YFP par cytométrie en flux (*CANTO II, BD Biosciences*).

3. Expansion de lymphocytes T Vγ9Vδ2

Les PBMC de volontaires sains sont décongelés en RPMI 10%SVF puis mis en culture après 2 lavages en RPMI 10%SVF à la concentration de 1.5M/ml avec IL-2 200UI/mL (*Proleukin, Clinigen Healthcare*), et acide zolédronique 1µM (*Sigma-Aldrich*). A partir de J5, les cellules sont maintenues à la concentration de 1.10^6/ml par dilution successives du milieu et supplémentation en IL2 200UI/ml tous les 2 ou 3 jours. A J14, la viabilité et la pureté de la suspension cellulaire sont vérifiés par cytométrie en flux (CANTO II, *BD Biosciences*), le produit étant considéré comme valide et utilisable si viabilité > 90% et pureté en VD2 > 80%. Les lymphocytes T Vγ9Vδ2 ainsi expandus pourront être congelés et utilisés ultérieurement après 12-24 heures de resting en RPMI10%SVF + IL-2 200UI/ml.

4. Tests fonctionnels in vitro

a. Analyses des formes solubles de BTN2A1 dans le surnageant de culture de lignées de cancer de prostate

Un million de cellules de lignées de cancer de prostate PC3 et DU145 sont cultivés dans 1.5ml de leur milieu de culture respectif filtré à 0.22µm, en plaque 6 puits, avec adjonction d'IFN-γ 50ng/ml (*PreProtech*) et TNFα 10ng/ml pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite décollées à l'aide d'une solution de PBS-EDTA 5mM pour évaluation de l'expression de BTN2A1 en cytométrie en flux (anti-BTN2A1-AlexaFluor647 clone 7.48). Le surnageant de culture est récupéré, centrifugé à 1000g pendant 15 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite centrifugé à 10 000g pendant 30 minutes pour faire précipiter les larges vésicules extracellulaires. Le surnageant de 10 000g est récupéré pour centrifuger à 100 000g pendant 90min pour faire précipiter les petites vésicules extracellulaires. La concentration en BTN2A1 soluble est déterminée par ELISA sur l'ensemble des fractions de surnageants, comme décrit plus haut.

b. Analyses d'interaction T Vγ9Vδ2 – Vésicules extracellulaires

Pour évaluer l'interaction entre les lymphocytes T Vγ9Vδ2 et les vésicules extracellulaires dérivées des différentes lignées HEK293T modifiées, 1µg équivalent protéines de vésicules extracellulaires ont été incubés avec 200.000 T Vγ9Vδ2 expandus décongelés pendant 2 heures à 37°C/5%CO2 en plaque 96 puits. Les cellules ont ensuite été directement fixées en Formaldéhyde 4% solution (*Thermoscientic*) pendant 15min à température ambiante avant d'être lavées 2 fois en PBS. Les cellules sont ensuite marquées avec un panel soit pour analyse en cytométrie en flux (LiveDead NIR [ThermoFisher], αCD3-BV421, clone SK7 [*BD Biosciences*], αTCR panγδ-PE, clone REA591 [*Miltenyi Biotec*], αBTN2A1-AF647 7.48 [home made]) ; soit pour analyse en microscopie confocale (DAPI [*Miltenyi Biotec*], αTCR panγδ-PE, clone REA591 [*Miltenyi Biotec*]). Les images ont été réalisé sur un instrument Zeiss LMS 880 Airyscan et analysées avec ImageJ (v 1.53T).

c. Tests de cytotoxicité

Pour déterminer l'impact des vésicules extracellulaires sur la cytotoxicité des lymphocytes T Vγ9Vδ2, 10.000 T Vγ9Vδ2 ont été mis en culture avec 10.000 cellules de lignées tumorales (LNCaP, DU145 ou PC3) avec 1µg d'équivalent protéine de vésicules extracellulaires dérivées de HEK293T. L'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 a été réalisée par ajout de l'agoniste de BTN3A 20.1 (1µg/mL). La coculture a été réalisée pendant 1 heure avant l'adjonction du réactif Caspase Glo 3/7 Assay (*Promega*) permettant d'évaluer l'activité caspase 3/7 dans le système. La mesure de la luminescence a été réalisée avec un instrument Clariostar.

5. Modèle murin

Les souris NSG males entre 8 et 12 semaines ont été obtenues auprès de l'animalerie du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM). L'ensemble des expérimentations ont été réalisées à l'animalerie du CRCM, par la plateforme d'essais pré-clinique TrGET dans le respect des règlementations françaises et européennes.

5.10^6 de cellules PC3 ont été greffées en sous cutanée, deux tumeurs par souris. Les administrations de lymphocytes T Vγ9Vδ2 expandus J14 (ou de PBS) débutent dès que les tumeurs mesurent plus de $30mm^3$, 1.10^6 cellules sont administrées par voie intraveineuse chaque semaine pendant 3 semaines. Chaque souris recevra également une injection hebdomadaire intraveineuse d'IL-15 humaine (0.5µg/souris ; *Biotechne*) et d'IL15Rα humain (3µg/souris) et d'anticorps anti-BTN3A agoniste 20.1 (10mg/kg) afin d'assurer la trophicité et l'activation *in vivo* des lymphocytes T Vγ9Vδ2. L'administration des vésicules extracellulaires est réalisée à la dose de 10µg par injection, 2 fois par semaine pendant 3 semaines. La taille tumorale est mesurée 2 fois par semaine, pour ne pas dépasser

une taille tumorale maximal de 1500mm^3 par souris (somme des 2 tumeurs). En fin d'expérimentation, les tumeurs sont récupérées, dissociées mécaniquement puis à l'aide d'une solution de dissociation non enzymatique (*Gentle Cell Dissociation Reagent, StemCell Technologies*), avant phénotypage des lymphocytes T Vγ9Vδ2 humains par cytométrie spectrale.

V. Statistiques

Les analyses de survie ont été réalisées en utilisant des courbes de Kaplan-Meyer et un test de Log-rank. Les comparaisons de données quantitatives entre deux groupes ont été réalisées en utilisant un t-test pour les données paramétriques ou un test de Mann-Whitney pour les données non paramétriques. Les comparaisons de données quantitatives entre plusieurs groupes (> 2) ont été réalisées en utilisant un test ANOVA. Les analyses multivariées ont été réalisée par régression de Cox. L'ensemble de ces analyses ont été réalisée en utilisation les logiciels GraphPad Prism (version 9.5.1). Les tests sont considérés sont significatif pour des valeurs de $p < 0.05$.

Résultats

I. La forme soluble de BTN2A1 est un biomarqueur pronostique dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible

1. Caractéristiques des patients inclus dans le protocole NK-Prostate

Entre 2015 et 2017, des échantillons de sang de 66 patients atteints de cancer de la prostate métastatique hormonosensible ont été collectés. Les patients ont été inclus dans l'essai clinique NK-PROSTATE (NCT02963155) à l'Institut Paoli-Calmettes. Avec un suivi médian de 46.2 mois, la survie globale médiane de cette cohorte n'a pas été atteinte (26 événements/66) et la survie sans progression était de 21.5 mois (IC à 95 % 2.9 à 60.0 mois). Les caractéristiques des patients sont présentées dans la **Table 5**.

Caractéristiques	Valeurs
Age au diagnostic, ans (min -max)	68 (46 - 83)
Gleason score, n (%)	
6	2 (3,6)
7	22 (39,3)
8-10	32 (57,1)
Inconnu	10
Volume de la maladie, n (%)	
Haut	45 (68,2)
Bas	21 (31,8)
Metastases viscérales, n (%)	
Absence	51 (77,3)
Présence	15 (22,7)
Performans status, n (%)	
0	55 (83,3)
1-2	11 (16,7)
Douleurs osseuses, n (%)	
Présentes	31 (47,0)
Absentes	35 (53,0)
PSA au diagnostic, ng/mL (min - max)	48,7 (0,69 - 36 000)
Taux d'hémoglobine, n (%)	
Normal	42 (67,4)
Anémie	20 (32,6)
Inconnu	4
Phosphatases alcalines, n (%)	
< normale	25 (49,0)
> normale	26 (51,0)
Inconnu	15
Traitements, n (%)	
HT	8 (12,1)
HT+CT	43 (65,2)
HT+NHT	3 (4,5)
HT+CT+NHT	12 (18,2)

HT, déprivation androgénique; CT, chimiothérapie; NHT, hormonothérapie de nouvelle génération

Table 5. Caractéristiques des patients de la cohorte NK-Prostate

Soixante-huit pour cent des patients présentaient une maladie de haut volume selon la définition de l'essai CHAARTED (un volume élevé étant défini comme la présence de métastases viscérales et/ou ≥ quatre métastases osseuses avec au moins une en dehors de la colonne vertébrale et le bassin). Tous les patients ont reçu un traitement par privation androgénique et 65,2 % ont reçu une chimiothérapie par docétaxel (43/66).

2. sBTN2A1 est un facteur pronostique dans le cancer de la prostate hormonosensible

Nous avons utilisé cinq tests ELISA spécifiques pour déterminer les taux plasmatiques de sPD-L1, sPan-BTN3A, sBTN3A1, sBTN2A1 et sBTLA. Les valeurs médianes étaient de 0,21 ng/mL (0 à 5,42 ng/ml) pour sPD-L1, de 0,91 ng/ml (0 à 16,48 ng/ml) pour sPan-BTN3A, de 0,0 (0 à 14,31 ng/ml) pour sBTN3A1, 3,81 ng/ml (1,8 – 14,4) pour sBTN2A1 et 3,81 ng/ml (1,80 à 14,43 ng/ml) pour sBTLA dans l'ensemble de la cohorte. Les taux plasmatiques ont été analysés en fonction de la survie globale des patients, supérieure ou inférieure à 50 mois (**Figure 25**). Seul le taux plasmatique de BTN2A1 est associé à une survie supérieure à 50 mois (5.38 ng/ml pour le groupe < 50 mois vs 3.91 ng/ml dans le sous-groupe OS ≥ 50 mois, p = 0,0358).

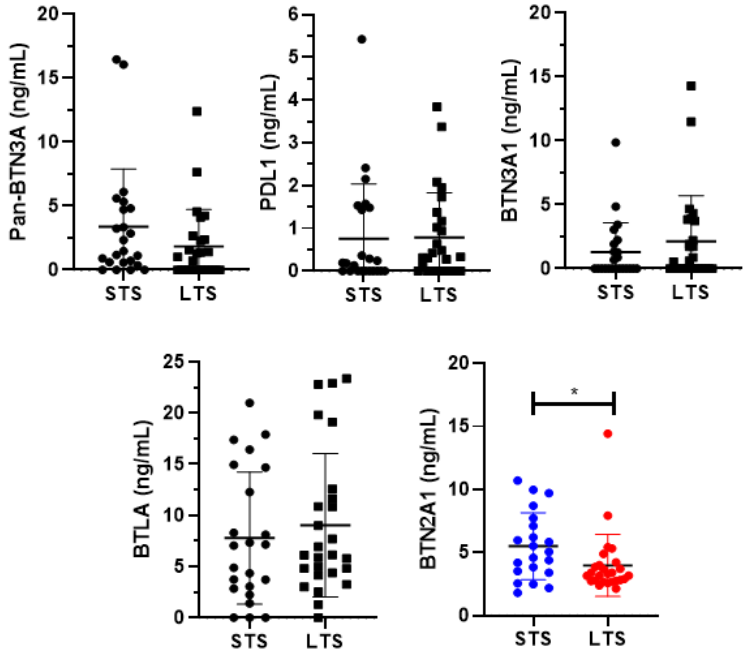


Figure 25. Mesure de la concentration de différents checkpoints solubles dans le plasma de patients atteints de cancer de la prostate métastatique hormonosensible au diagnostic. *Les patients ont été séparés selon leur survie globale supérieure ou inférieure à 50 mois (STS = short term survival ; LTS = Long term survival). Moyenne +/- SEM. T-test : *, p<0.05*

Nous avons utilisé l'analyse de la courbe ROC pour déterminer le cut-off optimal de sBTN2A1 qui discrimine les patients selon leur survie globale (**Figure 26**). Le cut-off optimal était de 3,47ng / ml (AUC 0,6789, Sensibilité 76.2%, Spécificité 61.5%). Les patients ont été classés en taux élevé et faible en fonction de ce cut-off. Les patients avec un taux élevé de BTN2A1 avaient une moins bonne survie sans progression (PFS) que les patients avec un taux élevé (16.8 mois vs 48.1 mois, HR 2,73, IC à 95% [1.48-5.05], p = 0,0014). Les patients avec un taux élevé de BTN2A1 plasmatique présentaient également une survie globale moins bonne (45.8 mois vs médiane non atteinte, HR 2.91, IC à 95% [1.33-6.33], p = 0,0072) (**Figure 26**).

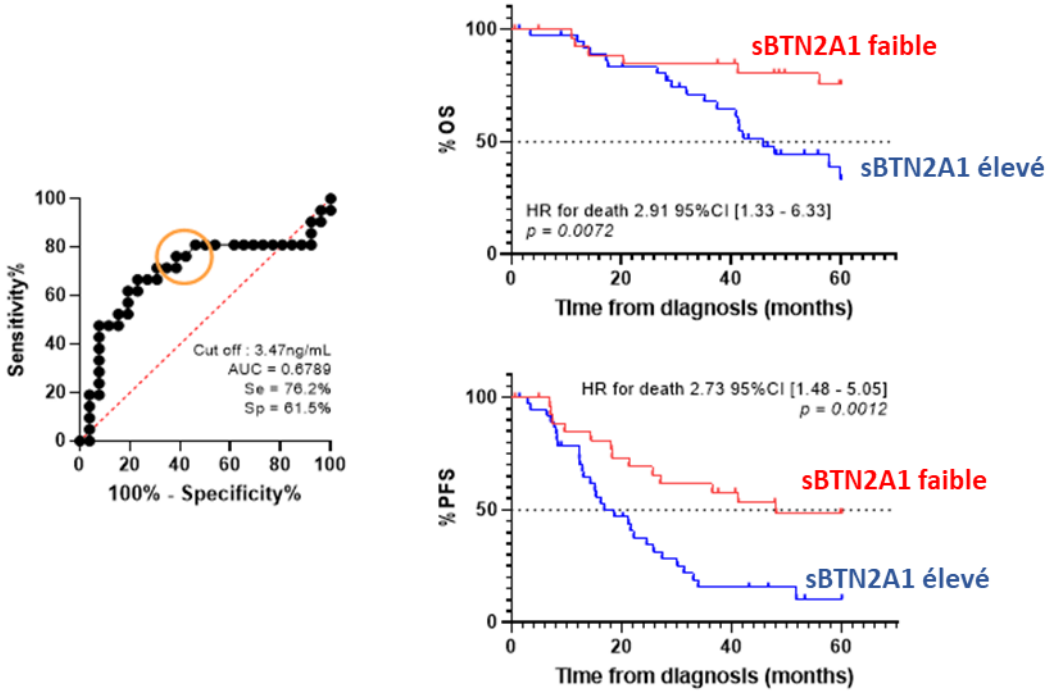


Figure 26. Evaluation de la survie sans progression et de la survie globale en fonction du taux de BTN2A1 soluble au diagnostic. *A gauche, courbe ROC permettant de sélectionner le cut-off de BTN2A1 séparant les patients longs répondeurs et courts répondeurs. A droite, courbes de Kaplan-Meyer comparant les survies, globale et sans progression en fonction du taux de BTN2A1 plasmatique. Log-rank test. PFS : progression-free survival ; OS : overall survival*

En analyses multivariées intégrant les paramètres pronostiques reconnus dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible, la valeur plasmatique de BTN2A1 au diagnostic reste un facteur pronostic indépendant de survie globale (HR 12,13 ; 95%CI [2,68 - 54,8] ; p=0,00119) (**Table 6**).

Paramètres	Hazard ratio	95%CI	*p*
Age au diagnostic	0,9387	0,88-1,003	*0,061*
Traitements			
HT	1		
HT+CT	0,2082	0,032-1,35	*0,099*
HT+CT+NHT	0,1594	0,016-1,62	*0,121*
HT+NHT	3,82E-09	0,00-Inf	*0,998*
Volume tumoral			
Faible	1		
Haut	6,075	1,53-24,13	*0,0104*
PSA à 7 mois			
≤4ng/mL	1		
>4ng/mL	2,605	1,07-6,31	*0,0339*
sBTN2A1 (ng/mL)			
<3,47	1		
>3,47	12,13	2,68 - 54,81	*0,00119*

Table 6. Analyse multivariée de la survie globale par régression de Cox. *HT : hormonothérapie ; CT : chimiothérapie ; NHT : Hormonothérapie de nouvelle génération.*

II. BTN2A1 peut être identifié à la surface de vésicules extracellulaires dans le plasma de patients atteints de cancer de la prostate métastatique hormonosensible

Afin de caractériser l'impact de la forme soluble de BTN2A1 dans le contexte de cancer de la prostate métastatique, nous avons d'abord cherché à déterminer sous quelle(s) forme(s) BTN2A1 pouvait être détecté dans un modèle *in vitro* dans cancer de prostate. Pour cela, nous avons mesuré la concentration en BTN2A1 par ELISA dans le surnageant de culture de lignées de cancer de prostate humain (DU145, et PC3), après 48 heures de culture avec ou sans stimulation par IFN-γ et TNFα.

Nous avons pu confirmer que les cellules DU145 et PC3 expriment à leur surface BTN2A1 et BTN3A en condition basale, et que la stimulation par IFN-γ et TNFα augmente l'expression de BTN3A à la surface des cellules mais pas celle de BTN2A1 (**Figure 27**).

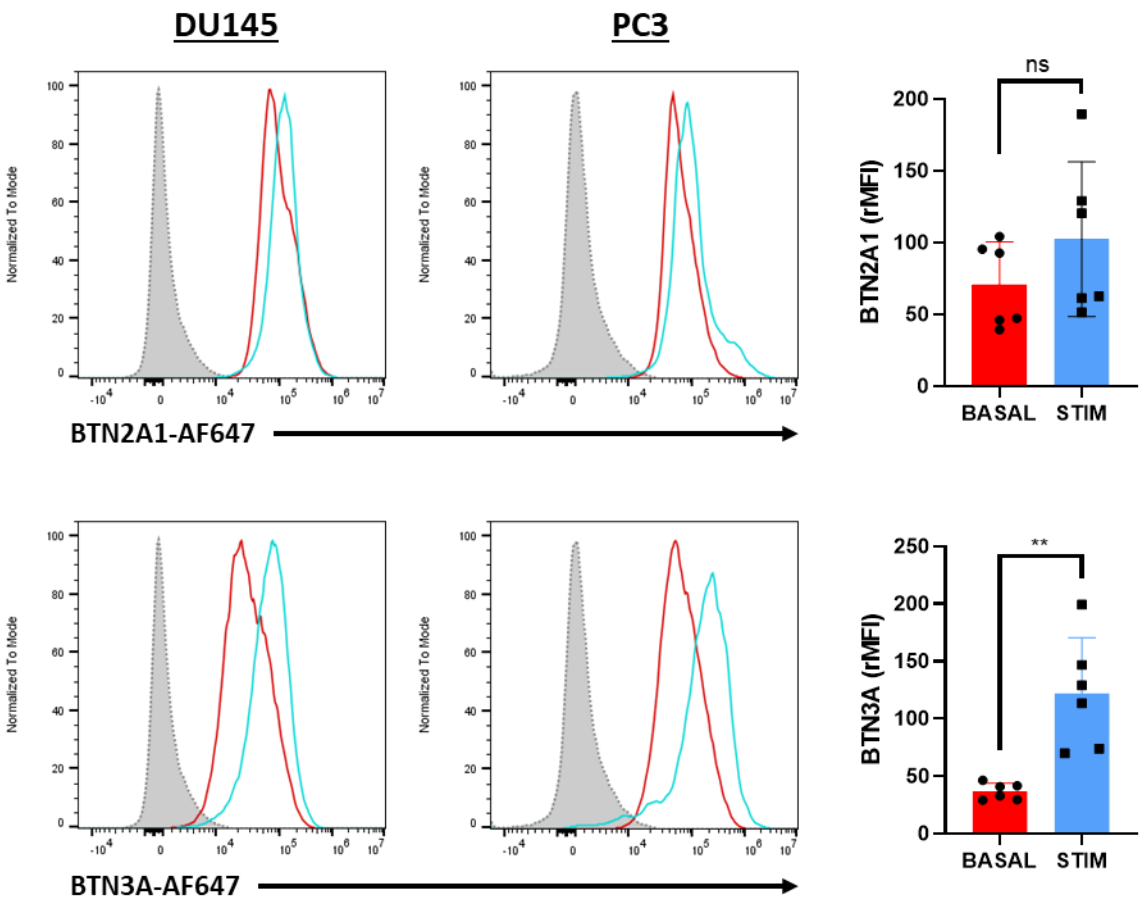


Figure 27. Expression de BTN2A1 à la surface des lignées de cancer de prostate. *Evaluation de la MFI en cytométrie spectrale sur les lignées PC3 et DU145 en condition basale et stimulée. 3 mesures par lignée et par condition. Expression du ratio en l'isotype AF647 (courbe grise). Moyenne +/- SEM. Test de Mann-Whitney : **, p < 0.01 ; ns : non significatif. rMFI : ratio de fluorescence mesurée de l'échantillon sur celle de l'isotype contrôle.*

On constate également que BTN2A1 peut être détecté dans le surnageant de culture à 48 heures pour les deux lignées, et qu'après stimulation, la concentration en BTN2A1 est multipliée par 8,8. Cette augmentation étant indépendante de l'expression membranaire de BTN2A1, nous pouvons donc supposer que la stimulation agit sur la production de la forme soluble de BTN2A1.

Après déplétion des vésicules extracellulaires (EVs) dans le surnageant de culture par ultracentrifugation séquentielle à 10 000g puis 100 000g, on constate une diminution de la concentration en BTN2A1 dans le surnageant, de 38.7% en condition basale, et 13.8% en condition stimulée ; témoignant de la participation probable de forme associées aux vésicules extracellulaires dans le contingent « soluble » de BTN2A1 mesuré (**Figure 28**).

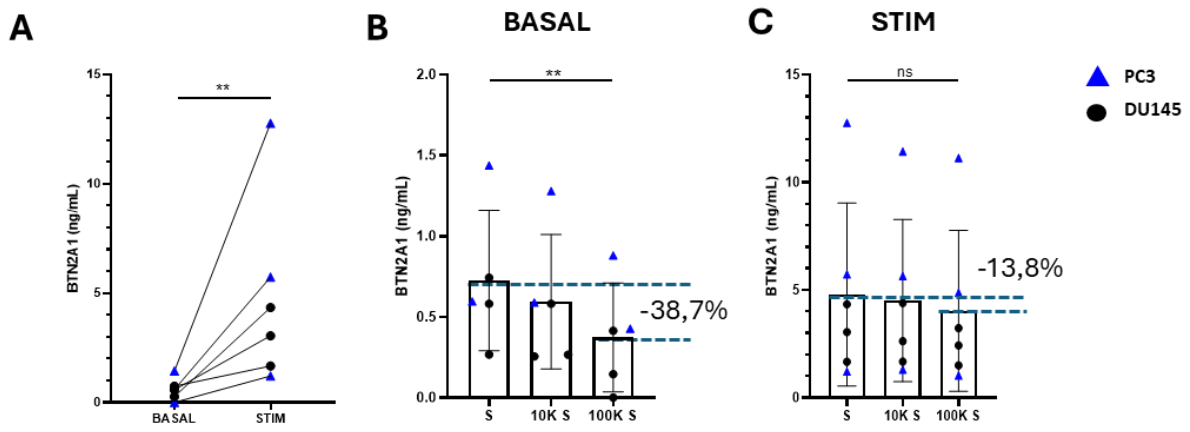


Figure 28. Mesure de la concentration en BTN2A1 dans le surnageant de culture de lignées de cancer de la prostate. (A) *Evaluation dans le surnageant complet. Mesure après ultracentrifugation séquentielle en condition basale* ***(B)*** *et stimulée* ***(C)****. S : Surnageant total ; 10K S : Surnageant après ultracentrifugation à 10 000g ; 100K S : Surnageant après ultracentrifugation à 100 000g. Moyenne +/- SEM. Test ANOVA : **, p<0.01*

Afin de confirmer la présence de vésicules extracellulaires dans le surnageant de culture de lignées, nous avons réalisé un phénotypage de ces vésicules extracellulaires en cytométrie spectrale, à partir du culot obtenu après ultracentrifugation à 10 000g. Nous avons pu identifier la présence de vésicules extracellulaires BTN2A1$^+$ dans le surnageant de culture pour les deux lignées testées, en condition basale mais surtout après stimulation par IFN-γ et TNFα. On constate également que les vésicules extracellulaires BTN2A1$^+$ sont de plus grande taille que les vésicules BTN2A1$^-$ (**Figure 29**), plus de 86% de ces dernières étant situées dans la fenêtre des « LARGE EVs » définies à partir de la calibration avec le Mégamix-SSC plus, soit > 200-240µm eq SSC environ.

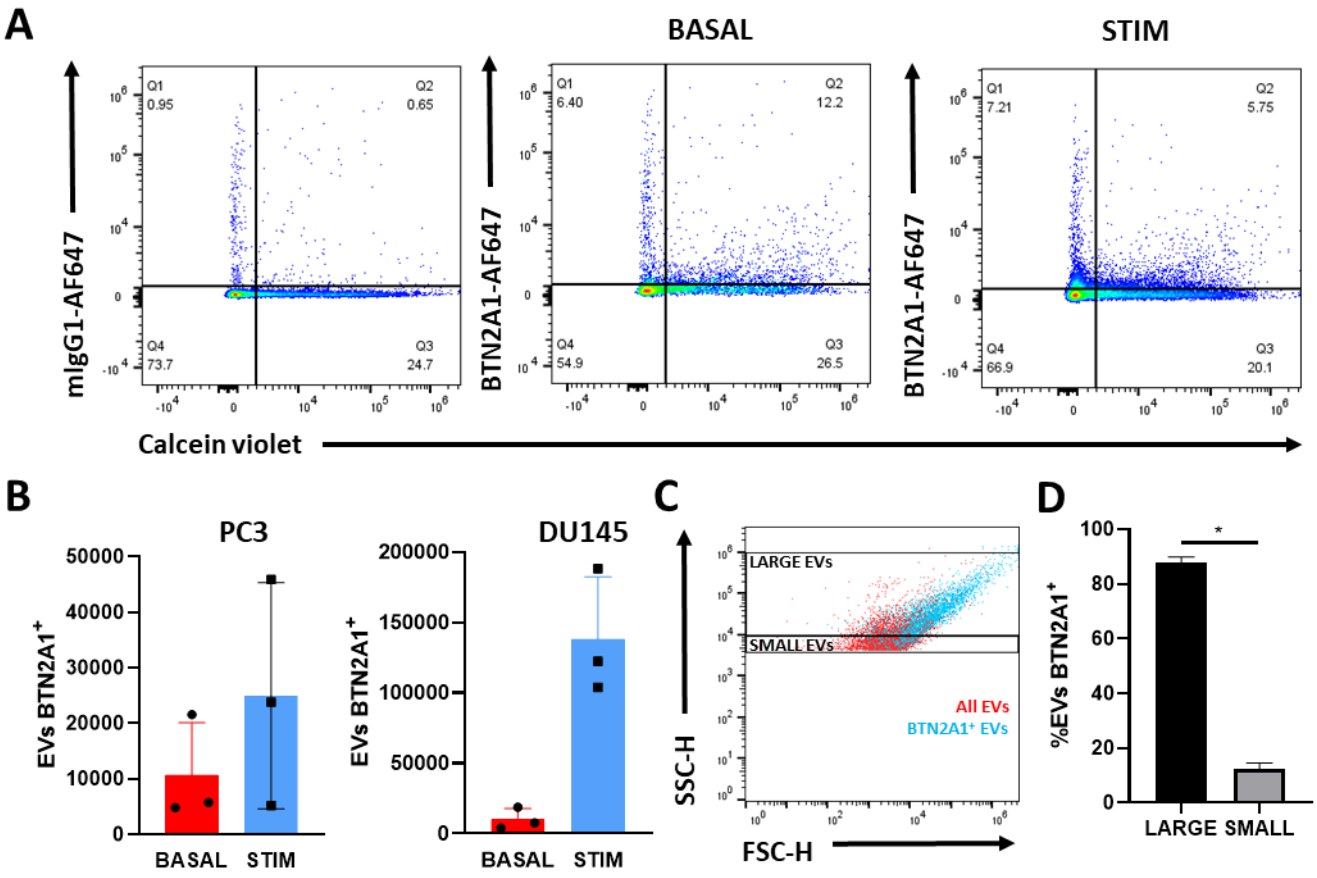


Figure 29. Caractérisation par cytométrie spectrale des vésicules extracellulaires du surnageant de culture des différentes lignées de cancer de la prostate. (A) *Représentation en cytométrie de l'expression de la calceine violet et de BTN2A1 sur les vésicules extracellulaires en condition basale et stimulée, en comparaison au marquage avec l'isotype mIgG1-AF647.* ***(B)*** *Quantification normalisée du nombre de vésicules extracellulaire BTN2A1+ dans les surnageants de culture.* ***(C)*** *Visualisation par retrofénétrage de la population de vésicules BTN2A1+ en FSC/SSC en projection dans la gate des LARGE EVs, et quantification relative* ***(D)****. Moyenne +/- SEM. Test de Mann-Whitney *, p<0.05*

La présence de vésicules extracellulaires BTN2A1 a par la suite été confirmée dans le plasma des patients de la cohorte NK-Prostate par cytométrie spectrale, en nombre variable. On constate ici encore que les vésicules BTN2A1$^+$ sont de plus grande taille que les vésicules BTN2A1$^-$. On remarque également que si elles sont détectables en grande concentration dans le plasma des patients, elles sont à peine détectable dans le plasma des volontaires sains (372.2 EVs BTN2A1+/µL chez les HV versus 24 746 chez les patients, *p=0.0004*) (**Figure 30**).

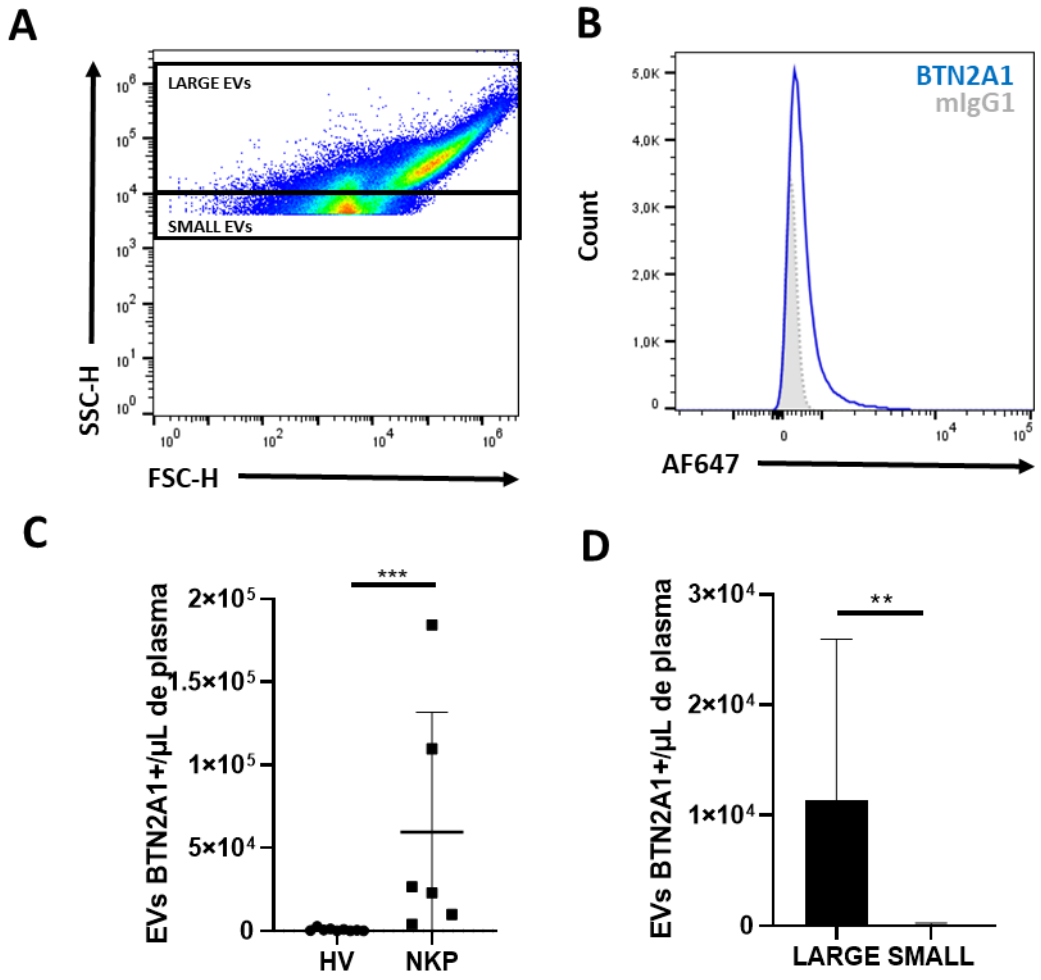


Figure 30. Caractérisation par cytométrie spectrale des vésicules extracellulaires dans le plasma de patients atteints de cancer de prostate métastatique d'emblée (n = 6) ou de volontaires sains (n = 9). *(A) Représentation du profil cytométrique FSC-H/SSC-H des vésicules analysées chez un patient. (B) Expression de BTN2A1 à la surface des vésicules extracellulaires calceïne positive. (C) Quantification absolue des vésicules extracellulaires BTN2A1⁺ chez les patients et les volontaires sains. (D) Expression de BTN2A1 à la surface des vésicules extracellulaires plasmatiques selon leur taille. Moyenne +/- SEM. Test de Mann-Whitney : *, p<0.05 ; **, p<0.01 ; ***, p<0.001.*

III. Les vésicules extracellulaires BTN2A1+ interagissent avec les lymphocytes T Vγ9Vδ2 et altèrent leurs fonctions

Afin d'étudier l'impact spécifique des larges vésicules extracellulaires BTN2A1 sur les lymphocytes T Vγ9Vδ2, nous avons créé plusieurs lignées cellulaires HEK293T modifiées génétiquement pour produire des vésicules extracellulaires spécifiques.

La lignée HEK293T présentant une expression basale faible de BTN2A1, nous avons tout d'abord généré une lignée HEK293T BTN2A1 KO par technologie CRISPR-Cas9 comme décrit dans le Matériel et Méthodes. A partir de cette lignée BTN2A1 KO nous avons généré des lignées surexprimant BTN2A1-YFP, dans sa forme sauvage (Lignée HEK293T BTN2A1 KI WT) ou bien surexprimant une forme mutée de BTN2A1 (Lignée HEK293T BTN2A1 KI Mut). Ce mutant ***R65A*** a été conçu pour être exprimé à la surface des cellules, être détecté par l'anticorps anti-BTN2A1 7.48 mais pour empêcher l'interaction de BTN2A avec la chaine Vγ9 du TCR γδ (**Figure 31**).

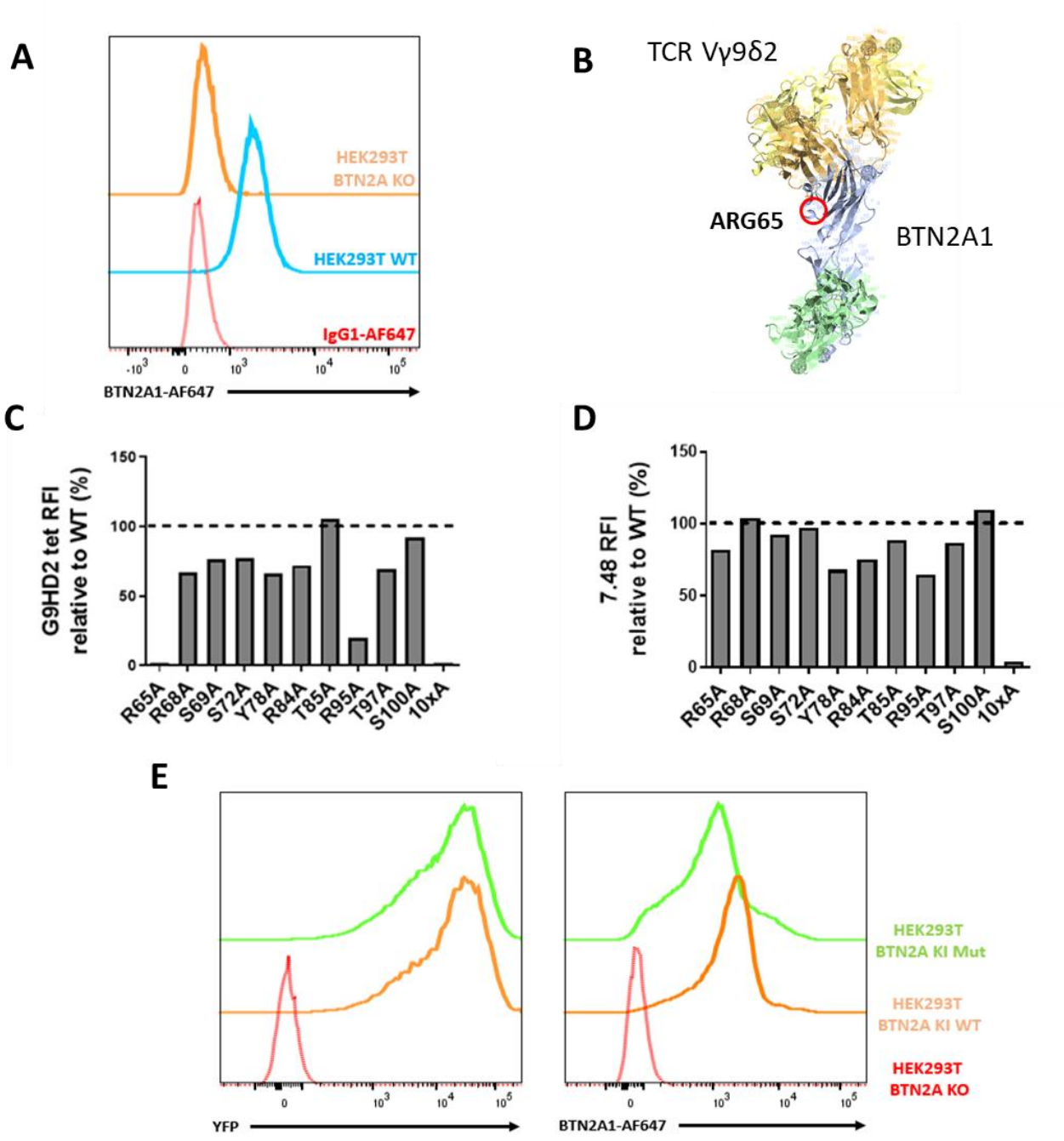


Figure 31. Génération des lignées HEK293T BTN2A1 surexprimé. ***(A)*** *Mesure de l'expression de BTN2A1 sur les lignées HEK293T sauvage et BTN2A1 KO.* ***(B)*** *Structure de BTN2A1 et du TCR Vγ9Vδ2.* ***(C)*** *Mesure de l'interaction de différents mutants de BTN2A1 avec la chaine Vγ9 du TCR.* ***(D)*** *Mesure de l'interaction des mutants de BTN2A1 avec l'anticorps anti-BTN2A1 7.48.* ***(E)*** *Mesure de l'expression de BTN2A1 en cytométrie en flux à la surface des cellules HEK293T après transduction.*

Les larges vésicules extracellulaires ont été isolées par ultracentrifugation séquentielle du surnageant de culture à 48 heures des différentes lignées. La taille structure de ces vésicules a été analysées par nanoparticule tracking analysis (NTA) et l'expression des tétraspanines (CD9, CD63 et CD81) et de BTN2A1 évaluée par cytométrie spectrale. Les données de NTA montrent que les vésicules BTN2A1 KI WT et BTN2A1 KI Mut ont une taille comparable, compatible avec des vésicules extracellulaires, et sont produites en quantité comparable. En cytométrie spectrale, ces vésicules marquent la calceïne violet et surexpriment bien les tétraspanines, marqueurs structurels de vésicules extracellulaires (**Figure 32**). L'expression de BTN2A1 à la surface de ces vésicules est également comparable en cytométrie spectrale entre les conditions BTN2A1 KI WT et BTN2A1 KI Mut.

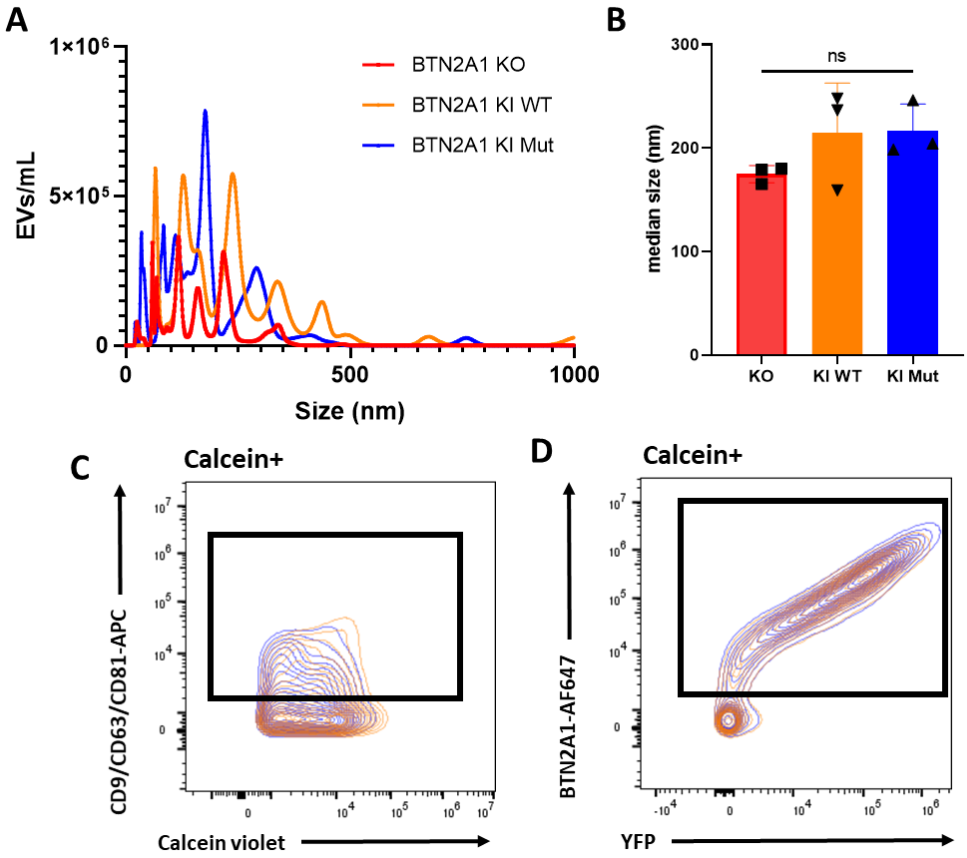


Figure 32. Caractérisation des vésicules extracellulaires dérivées des lignées HEK293T BTN2A1 KI WT et Mut. (A) *Mesure de la taille des vésicules par nanoparticules tracking analysis.* ***(B)*** *Comparaison des tailles médianes, mesures réalisées en triplicat. Moyenne +/- SEM Test de Mann-Whitney. Evaluation de l'expression des tétraspanines CD9, CD68 et CD81* ***(C)*** *et de BTN2A1* ***(D)*** *par cytométrie spectrale à la surface des vésicules extracellulaires calcéine violet positives.*

L'interaction des vésicules extracellulaires BTN2A1 avec les lymphocytes T Vγ9Vδ2 a été mesurée *in vitro* en réalisant une coculture de 1µg d'équivalent protéines de vésicules extracellulaires avec 1.10^6 lymphocytes pendant 2 heures. L'analyse en cytométrie en flux des lymphocytes T Vγ9Vδ2 après coculture montrent une augmentation de l'expression de l'YFP lors de la coculture avec les vésicules

BTN2A1 KI WT (environ 25% des lymphocytes T Vγ9Vδ2), alors qu'elle est quasi absente avec les vésicules BTN2A1 KI Mut et absente avec les vésicules BTN2A1 KO. De plus, on constate également une augmentation de l'expression de BTN2A1 à la surface des cellules avec les vésicules BTN2A1 KI WT mais pas dans les autres conditions signifiant de la présence des vésicules sur le versant extracellulaire des lymphocytes T Vγ9Vδ2 (**Figure 33**). On constate également l'absence de marquage YFP des cellules non T Vγ9Vδ2 résiduelles post-expansion, témoignant de la spécificité de l'interaction. Cette interaction a également été confirmée en microscopie confocale (**Figure 33C**). Ces résultats démontrent que les vésicules BTN2A1 KI WT sont bien capables d'interagir avec les lymphocytes T Vγ9Vδ2, de façon TCR spécifique, et qu'à 2 heures de coculture, les vésicules extracellulaires BTN2A1+ sont toujours présentes à la membrane plasmique.

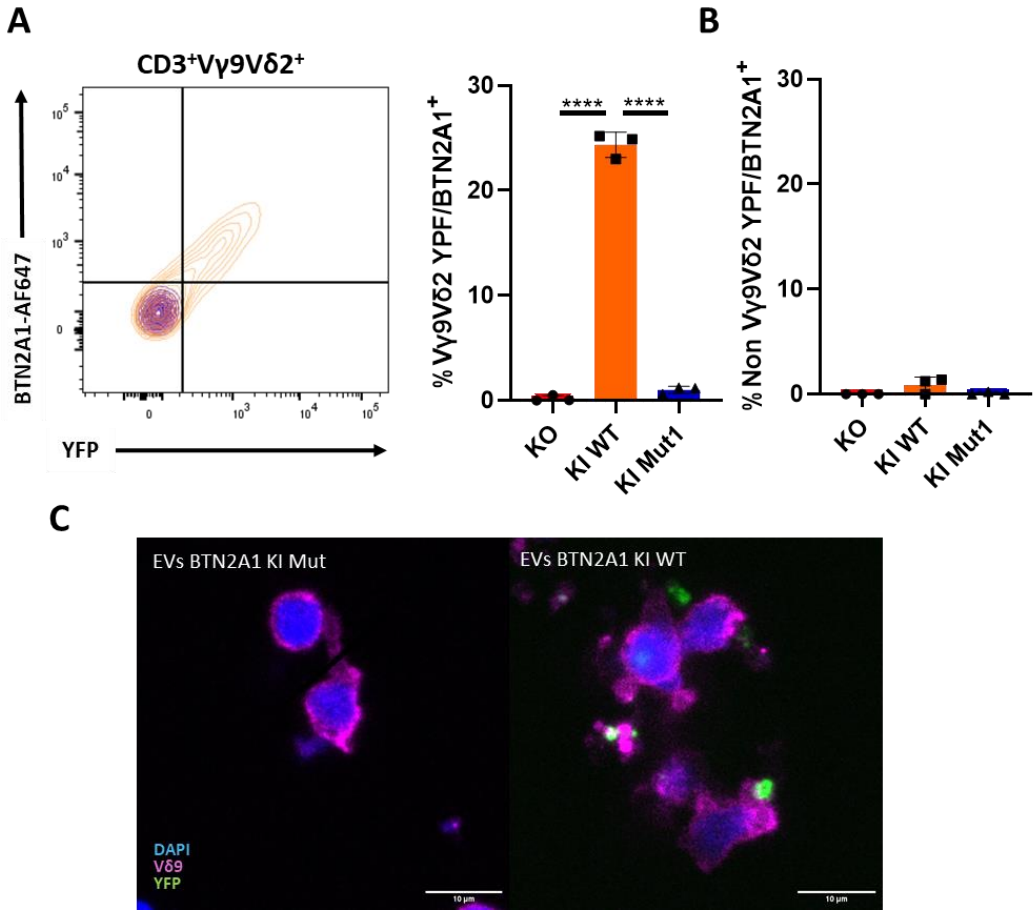


Figure 33. Interaction des vésicules extracellulaires BTN2A1 KI avec les lymphocytes T Vγ9Vδ2. (A) *Expression de la protéine fluorescente YFP et de BTN2A1 à la surface des lymphocytes T Vγ9Vδ2. A gauche, représentation cytométrique. A droite Quantification sur n = 3 donneurs. Moyenne +/- SEM. Test ANOVA : ****, p < 0.0001.* ***(B)*** *Expression de BTN2A1 et de l'YFP sur les cellules non T Vγ9Vδ2 (n = 3 donneurs).* ***(C)*** *Visualisation en microscopie confocale de l'interaction des vésicules extracellulaires BTN2A1 avec les lymphocytes T Vγ9Vδ2. Grossissement X40.*

L'impact fonctionnel de cette interaction a ensuite été évalué au cours d'une coculture entre lymphocytes T Vγ9Vδ2 et lignées de cancer de la prostate humain (LNCaP, DU145, PC3 ; ratio Effecteur : Cible = 1 : 1 ; coculture pendant 1 heure) en présence de l'anti-BTN3A activateur 20.1 et de 1µg des différentes vésicules extracellulaires. L'activité cytotoxique des lymphocytes T Vγ9Vδ2 a été évaluée par la mesure de l'activité Caspase 3/7 par test CaspaseGlo. On constate une diminution de l'activité caspase 3/7 en présence des vésicules BTN2A1 KI WT mais pas avec les vésicules BTN2A1 KI Mut, témoignant d'une diminution de l'activité cytotoxique des lymphocytes T Vγ9Vδ2 (**Figure 34**).

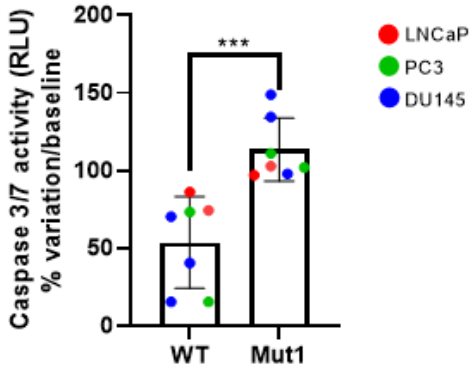


Figure 34. Cytotoxicité des lymphocytes T Vγ9Vδ2+ contre les lignées tumorales de cancer de la prostate. *Expression en pourcentage de variation de la RLU (Relative Light Unit) par rapport à la condition contrôle (PBS + 20.1). *** ; Moyenne +/- SEM. p<0.0001 Mann Whitney test.*

Nous avons ensuite cherché à montrer l'impact *in vivo* des vésicules BTN2A1+ sur les lymphocytes T Vγ9Vδ2 dans un modèle murin de cancer de la prostate. Il n'existe pas d'équivalent de BTN2A1 et des isoformes de BTN3A chez la souris, nous avons donc développé un modèle de souris NOD SCID avec xénogreffe sous cutanée de cellules tumorales prostatiques PC3 et injections IV hebdomadaire de lymphocytes T Vγ9Vδ2 humains expandus. L'administration des vésicules extracellulaires est réalisée à la dose de 10µg par injection, 2 fois par semaine pendant 3 semaines. La taille tumorale est mesurée 2 fois par semaine, pour ne pas dépasser une taille tumorale maximal de 1500mm3 par souris (somme des 2 tumeurs).

La croissance tumorale ainsi que l'infiltration tumorale en lymphocytes T Vγ9Vδ2 humain ont été évaluées. Dans ce modèle nous n'avons pas pu montrer de modification de croissance tumorale en lien avec l'injection de lymphocytes T Vγ9Vδ2 ou avec l'administration des vésicules extracellulaires. En revanche, l'administration des vésicules extracellulaires BTN2A1 KI WT est associée à une nette diminution de l'infiltration en T Vγ9Vδ2 dans les tumeurs en comparaison avec les vésicules BTN2A1 KI Mut (**Figure 35**). Ces résultats sont compatibles avec ceux obtenus *in vitro*, témoignant d'un défaut d'interaction des lymphocytes T Vγ9Vδ2 avec les cellules tumorales cibles.

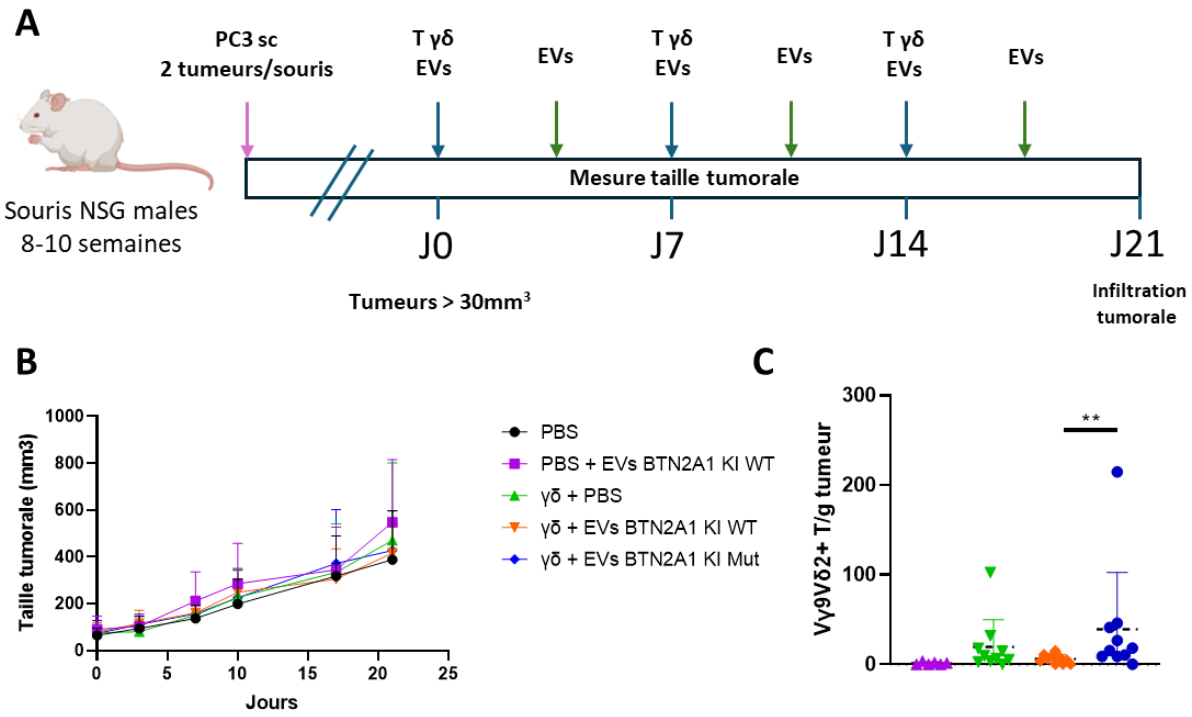


Figure 35. Evaluation in vivo de l'effet des vésicules extracellulaires BTN2A1+ sur les lymphocytes T Vγ9Vδ2. (A) *Schéma général de l'expérimentation (n = 5 souris par groupe, 2 tumeurs par souris).* ***(B)*** *Evolution de la taille tumorale en mm3 en fonction du groupe de traitement.* ***(C)*** *Mesure de l'infiltration tumorale en lymphocytes T Vγ9Vδ2 par cytométrie spectrale. EVs : Extracellular vésicules (vésicules extracellulaires). Moyenne +/- SEM. Test de Mann Whitney : **, p < 0.01.*

Ensemble, ces résultats démontrent la capacité des vésicules extracellulaires BTN2A1⁺ à interagir avec les lymphocytes T Vγ9Vδ2 de façon TCR spécifique, et à bloquer leur activité cytotoxique face à des cellules tumorales cibles et limiter leur infiltration tumorale dans un modèle murin de cancer de la prostate.

IV. Les vésicules extracellulaires BTN2A1+ dérivées des lymphocytes B sont associées à un pronostique défavorable dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible

Afin de caractériser l'origine des vésicules extracellulaires BTN2A1⁺ chez les patients atteints de cancer de la prostate métastatique d'emblée, nous avons évalué l'expression de BTN2A1 sur différentes populations de vésicules extracellulaires immunes et non immunes à partir du plasma de 65 patients de la cohorte NK-PROSTATE grâce au kit MACsPlex Exosome IO. L'analyse en clustering non supervisé permet d'identifier un groupe de 13 patients présentant une expression plus forte de BTN2A1, notamment sur les populations de vésicules CD19, CD20, CD24 et CD40 (**Figure 36**). La pondération de l'expression de BTN2A1 sur les vésicules dérivées de lymphocytes B par le taux de sBTN2A1 (Score B

∑BTN2A1expCD19+CD20+CD24+CD40)*sBTN2A1) permet de mieux stratifier les patients sur leur survie globale (survie globale médiane de 41.3 mois dans le groupe score élevé, non atteinte dans le groupe score faible, HR 4.422 95%CI [2.003 – 9.760], p = 0.0002).

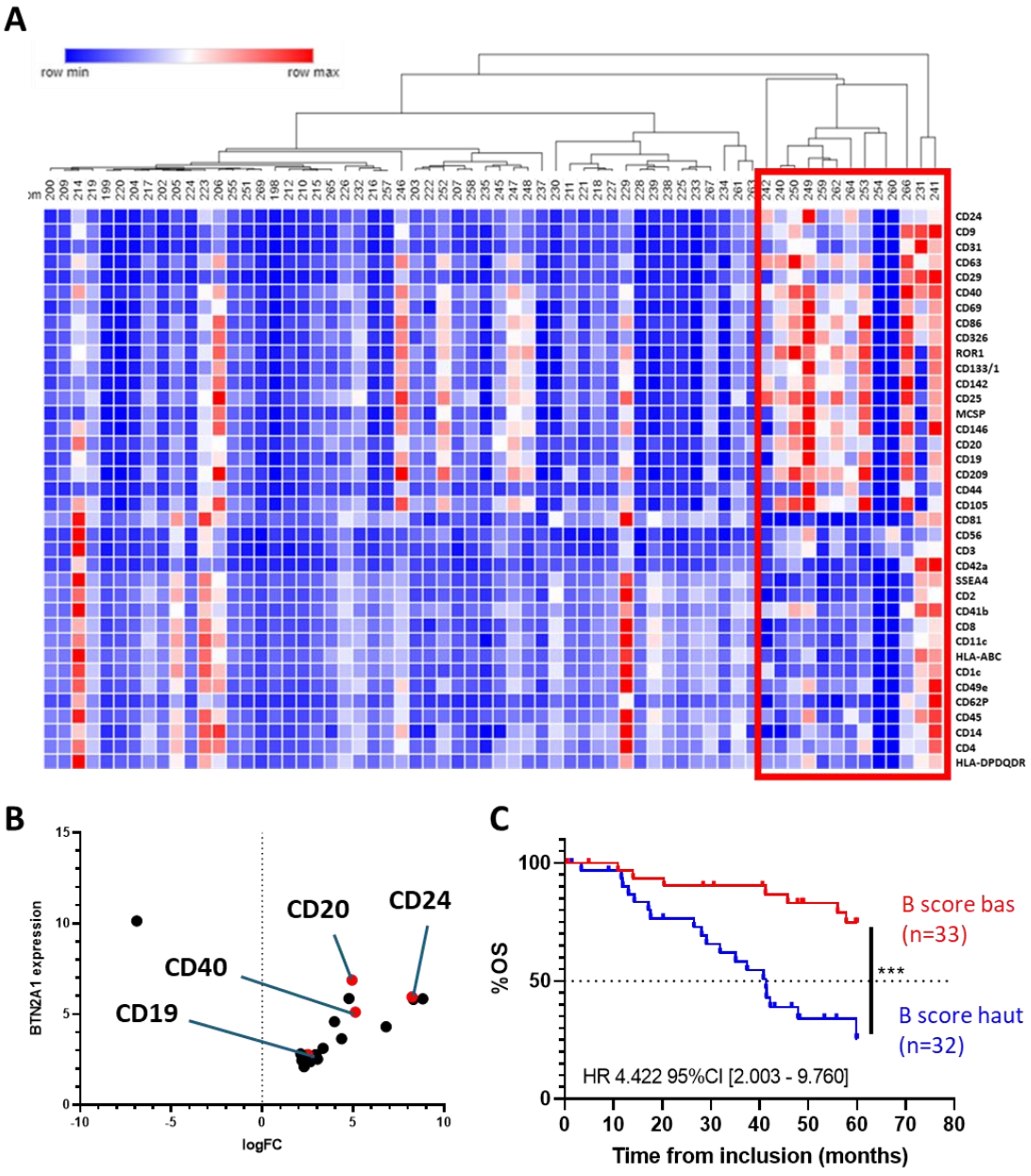


Figure 36. Phénotype étendu des vésicules extracellulaires BTN2A1+. (A) *Expression de BTN2A1 à la surface de vésicules extracellulaires en fonction de leur origine. Expression de BTN2A1 normalisée par patient. Clustering hiérarchique non supervisé permettant d'identifier un groupe de patients avec un profil d'expression différent.* ***(B)*** *Expression différentielle de BTN2A1 dans le sous-groupe d'intérêt. Evaluation par Limma.* ***(C)*** *Evaluation de la survie globale en fonction du score B. Analyse de Kaplan-Meyer. Log-rank-test *** p < 0.01*

Afin de confirmer que les lymphocytes B étaient en mesurent de produire des vésicules extracellulaires BTN2A1$^+$, nous avons analysé l'expression de BTN2A1 sur les vésicules extracellulaires présentes dans le surnageant de culture de lymphocytes B isolés à différentes phases de leur activation et différentiation *in vitro* (échantillons de surnageants de culture fournis par le Pr Thierry FEST, selon le protocole préalablement publié (216)). On constate une production majeure de vésicules BTN2A1$^+$ dans le surnageant de culture de lymphocytes B activés par l'IL-2, un anti-BCR, du CD40L et CpG, alors qu'elles sont quasi absentes à dans le surnageant de lymphocytes B naïfs ou en fin de différentiation (**Figure 37**).

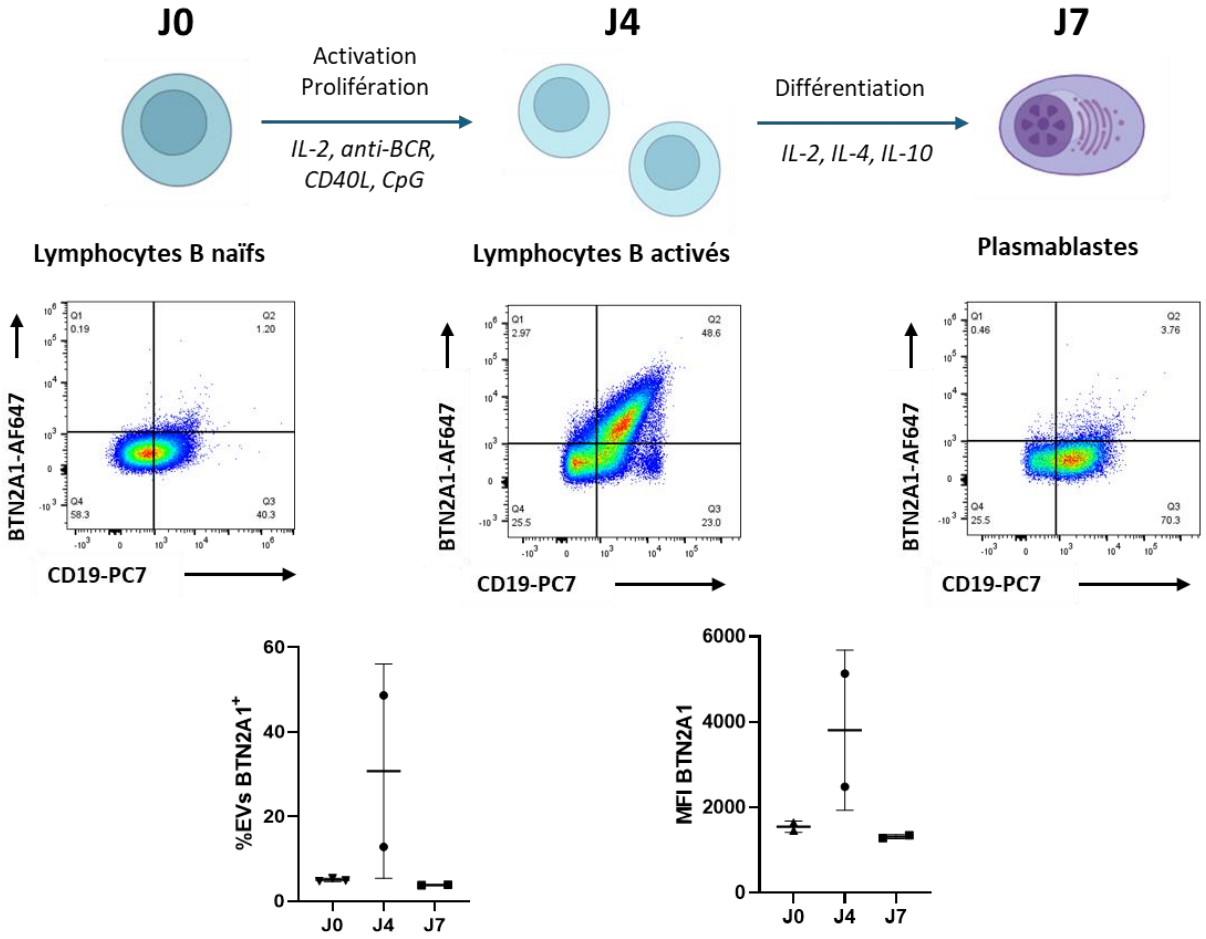


Figure 37. Production de vésicules extracellulaires par les lymphocytes B au cours de leur activation. *Schéma expérimental en haut, et quantification des vésicules extracellulaires BTN2A1$^+$ dans le surnageant de culture à J0, J4 et J7 (n = 2 donneurs). Moyenne +/- SEM.*

V. Les vésicules extracellulaires BTN2A1+ dérivées des lymphocytes B sont associées à des altérations phénotypiques des lymphocytes T Vγ9Vδ2 dans le cancer de la prostate hormonosensible

Afin de caractériser l'état immunologique des patients atteints de cancer de la prostate métastatique hormonosensible en fonction de la présence de vésicules extracellulaires BTN2A1^{+} dérivées de lymphocytes B, les PBMC de 28 patients ont été phénotypés par cytométrie spectrale. Deux panels ont été utilisés pour caractériser les populations B et T/NK (*cf Matériels et Méthodes*). Sur les 28 patients, 13 présentent un *B score* bas, et 15 un *B score* haut. Les populations immunes ont été fenêtrées manuellement pour chaque panel (Lymphocytes B pour le panel B, Lymphocytes T CD4, T CD8, T Vδ2 et NK pour le panel T NK, **Figure 24**). Une réduction de dimension UMAP suivie d'un clustering non supervisé Phenograph ont été appliqué à chaque sous population permettant d'identifier 111 clusters de cellules immunes (22 clusters B, 22 clusters CD4, 27 clusters CD8, 22 cluster NK, et 19 clusters T Vδ2) (**Figure 38**).

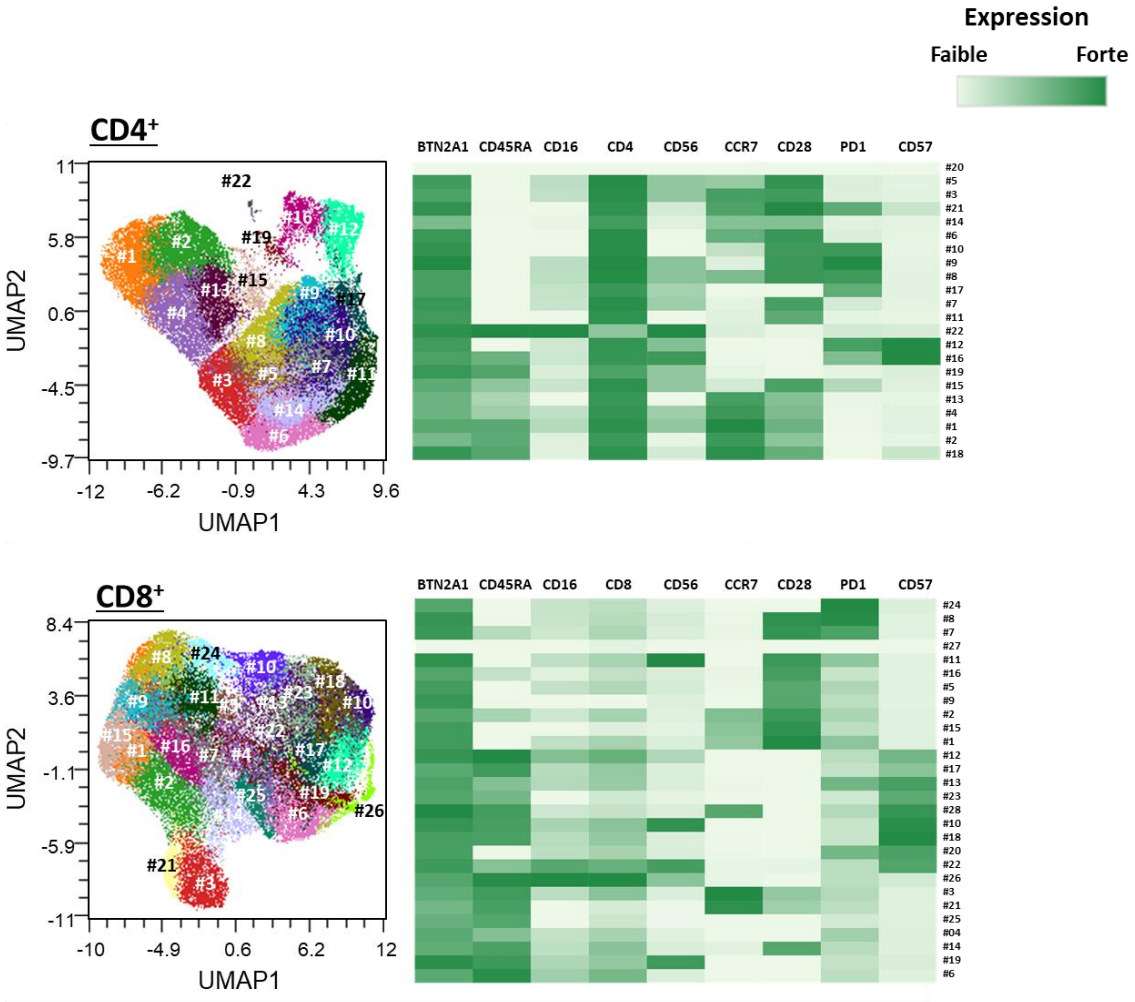


Figure 38 (Suite)

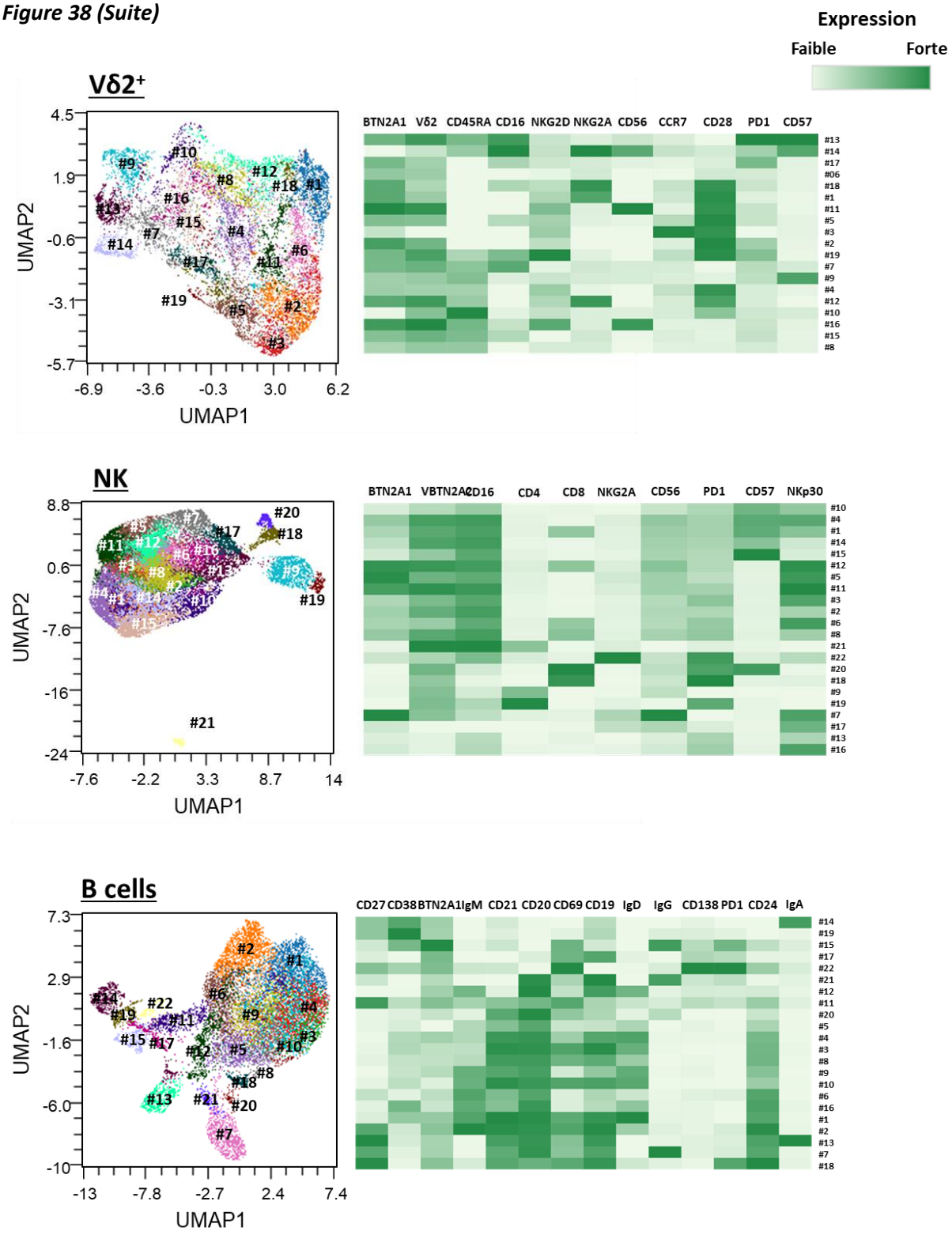


Figure 38. Clusterisation des différentes populations lymphocytaires circulantes. *Pour chaque population est représenté la réduction de dimension UMAP ainsi que les différents clusters identifiés par l'algorithme Phenograph (à gauche), ainsi que l'expression des différents marqueurs cellulaires en fonction de chaque cluster (Heatmap, à droite).*

Une analyse en BGA (*Between Group Analysis*) a été effectuée afin d'identifier les clusters cellulaires permettant de séparer les patients avec un score B faible (n = 13) et ceux avec un score B élevé (n = 15). Les clusters de lymphocytes T Vδ2 sont ceux qui permettent de discriminer au mieux les deux groupes de patients avec un enrichissement de nombreux clusters dans le groupe de patients avec un score faible (**Figure 39**).

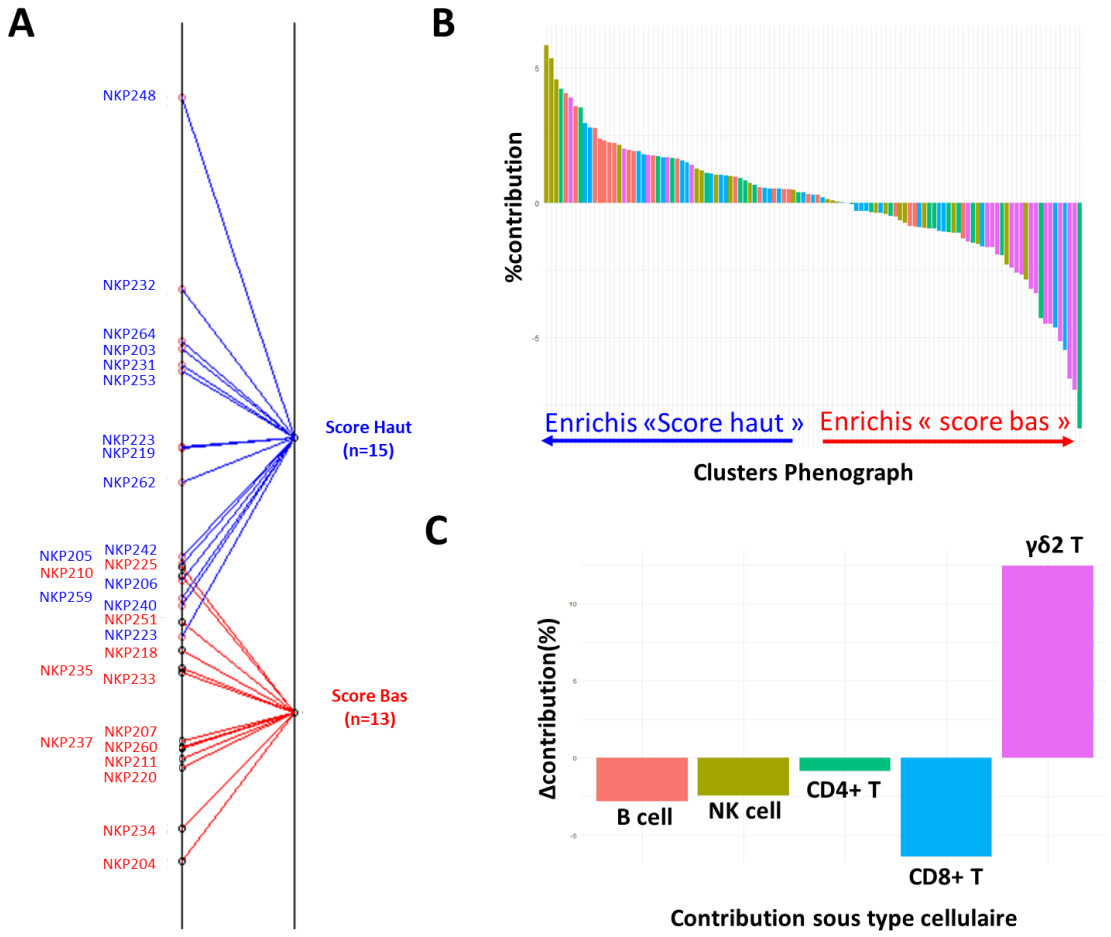


Figure 39. Les altérations des lymphocytes T Vγ9Vδ2 circulants contribuent à discriminer les patients avec un score B faible et un score B haut. *Résultats de la BGA réalisée à partir de 111 clusters de PBMC. (A) L'axe gauche affiche la projection de tous les patients analysés. Les échantillons annotés en rouge correspondent aux PBMC de patients avec un score B bas, ceux en bleu aux patients avec un score élevé. L'origine de chaque échantillon est liée à son propre groupe (trait noir). Les distances entre les origines des échantillons fournissent des informations sur le degré auquel les échantillons ont été séparables. (B) Waterfall plot montrant le pourcentage de contribution respective de chaque variable dans la discrimination des patients avec score B élevé ou faible. Un pourcentage positif est associé au groupe Score haut, un pourcentage négatif avec le groupe score bas. (C) Diagramme en barre illustrant la*

différence entre la contribution observée de chaque population immune avec leur contribution théorique dans la discrimination des 2 groupes de patients.

On constate notamment l'accumulation de lymphocytes T Vγ9Vδ2 CD45RA$^+$ / CD16$^+$ / CD57$^+$ / PD-1$^+$ chez les patients du groupe « Faible score », alors qu'ils sont faiblement présents chez les patients du groupe « Haut score » (*23.9% vs 8.1% des* de lymphocytes T Vγ9Vδ2*, p=0.0133*). Ces lymphocytes T Vγ9Vδ2 CD45RA$^+$ / CD16$^+$ / CD57$^+$ / PD-1$^+$ ont été décrit comme T_{EMRA} « sénescents », et seraient le stigmate de l'activation des T Vγ9Vδ2. La moindre présence de cette population dans le groupe « Haut score » témoignerait ainsi d'un défaut d'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 sous l'influence des vésicules extracellulaires BTN2A1+ (**Figure 40**).

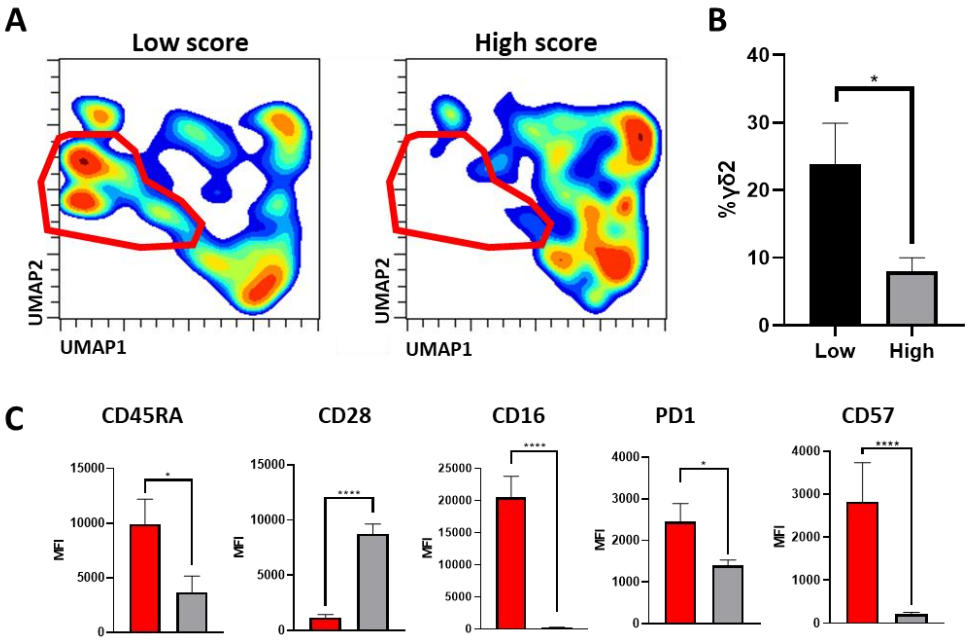


Figure 40. Altérations phénotypiques des *lymphocytes T Vγ9Vδ2 associées à la présence de vésicules extracellulaires BTN2A1+. (A)* *Représentation des populations T Vγ9Vδ2 selon le groupe de patients « Haut score » ou « Bas score ». **(B)** Expression en pourcentage de T Vγ9Vδ2 du cluster entouré en rouge sur la UMAP, correspondant aux clusters #13, #14,#7 et #17. **(C)** Expression en intensité de fluorescence de marqueurs différentiellement exprimés par ces clusters en comparaison aux reste de la population de T Vγ9Vδ2. Moyenne +/- SEM. T-test : *, p<0.05 ; ** ; p<0.01 ; ***, p<0.001 ; ****, p<0.0001*

Discussion

1. Synthèse et limites de l'étude clinique

Ce travail de thèse permet d'identifier la forme soluble de BTN2A1 comme un potentiel biomarqueur immun dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible. Il permet de stratifier, dès le diagnostic, les patients longs survivants et patients ayant une survie plus courte ; et ce de façon indépendante des biomarqueurs précédemment décrits, tels que le volume tumoral (66,67) ou la décroissance du PSA à 7 mois (63). Il s'agit d'un biomarqueur simple, accessible, et peu couteux, puisque mesurable par ELISA dans le plasma des patients au diagnostic. Il s'agit également du premier biomarqueur immun sur biopsie liquide décrit dans le cancer de la prostate métastatique. L'intégration du dosage de BTN2A1 soluble dans la stratégie diagnostic du cancer de la prostate pourrait ainsi être un outil permettant de mieux stratifier les patients dès le début de leur prise en charge et secondairement, adapter la stratégie thérapeutique. Cependant, avant d'être transposable en clinique, il est nécessaire de confirmer le caractère pronostique de sBTN2A1 sur une cohorte indépendante de validation. Ce travail est actuellement en cours au sein de notre équipe.

Une seconde limite vient du schéma de l'étude NK-Prostate qui ne nous permet pas de conclure à la nature pronostique stricte ou prédictive de réponse aux traitements de sBTN2A1. En effet, la totalité des patients ont bénéficié d'une déprivation androgénique et la majorité d'entre eux ont également reçu une chimiothérapie par docétaxel. Nous ne pouvons ainsi pas conclure si les différences de survie observées sont spécifiques d'un traitement reçu. La cohorte NK-Prostate est également une cohorte « ancienne » puisqu'aujourd'hui les hormonothérapies de nouvelle génération sont largement prescrites en première ligne thérapeutique (seulement 22% des patients de la cohorte NK-Prostate en ont reçu) ; et les patients de « faible volume » bénéficieront également d'une radiothérapie prostatique. La constitution d'une cohorte de validation devra prendre en compte ces évolutions thérapeutiques majeures.

D'autres études ont cherché à évaluer la place des butyrophilines solubles comme biomarqueurs en pathologies tumorales. Benyamine et al. ont montré que les formes solubles de BTN3A et de BTN3A1 sont associées à un pronostic défavorable dans une cohorte de patients atteints de cancer du pancréas (160). Il n'y a pas d'information concernant sBTN2A1 dans cette cohorte. Dans le cancer du cancer du poumon non à petites cellules, sBTN2A1 est un facteur prédictif de réponse aux inhibiteurs de checkpoints immuns dans une cohorte de 90 patients métastatiques (217). Nous avons également montré que sBTN2A1 pouvait être un facteur pronostique défavorable dans un cohorte de patients traités pour un cancer du rein métastatique par nivolumab en deuxième ligne ou plus (*cf Partie III*) (218). En revanche, dans ces travaux, on ne retrouve pas de données concernant la forme de ces

checkpoints (libres ou associées à des vésicules extracellulaires) ou bien si cette forme soluble a un impact direct sur le système immunitaire expliquant leur valeur pronostic.

2. Impact de la forme soluble de BTN2A1

Dans ce travail, nous avons cherché à comprendre le rôle propre de la forme soluble de BTN2A1 dans le cancer de la prostate métastatique. En effet, comme discuté en introduction, le dosage ELISA des formes solubles des checkpoints permet la détection de ces checkpoints sous toutes leurs formes, libre et associées aux vésicules extracellulaires ; et il est important de comprendre si sBTN2A1 à une action directe spécifique ou s'il n'est que le reflet d'un processus immun plus large.

Nous avons ainsi pu montrer que BTN2A1 peut être produit sous une forme libre mais également sous une forme associée aux vésicules extracellulaires, dans un modèle *in vitro* mais également dans le plasma des patients atteints de cancer de la prostate.

Le versant « forme libre » de BTN2A1 n'est pas abordé dans ce manuscrit. Nous n'avons pas été en mesure de confirmer avec certitude que BTN2A1 pouvait être clivé à la surface des cellules tumorales dans des expérimentations *in vitro* ; ou à moduler ce clivage. Benyamine et al. ont montré que les isoformes de BTN3A pouvaient être clivé par des MMP, que le blocage large de l'activité des MMP par le TAPI-1 diminuait en partie la concentration en sBTN3A dans le surnageant de culture (160). Cette observation n'a pas pu être reproduite pour BTN2A1 dans le cadre de nos travaux. Les données *in silico* générées à partir de la séquence de BTN2A1 ne permettent pas non plus d'identifier de variant d'épissage de BTN2A1 pouvant générer directement sous forme soluble de BTN2A1. De plus, les données de la littérature montrent que l'utilisation de BTN2A1 recombinant seul ne permet pas de modifier l'activité des lymphocytes T Vγ9Vδ2 *in vitro*. Ce sont pour toutes ces raisons que les efforts se sont orientés vers la formes associée aux vésicules extracellulaires de BTN2A1 dans le cadre de ce travail.

La présence de vésicules extracellulaires, a fortiori BTN2A1 positives, semble discriminer les volontaires sains des patients. Nous avons ainsi pu montrer que la forme de BTN2A1 associée aux vésicules extracellulaires semble fonctionnelle, en interagissant spécifiquement avec les lymphocytes T Vγ9Vδ2, en diminuant leur cytotoxicité *in vitro* et leur recrutement au niveau tumoral dans un modèle *in vivo*. L'altération des fonctions des lymphocytes Vγ9Vδ2 par ces vésicules pourrait ainsi expliquer l'association avec un mauvais pronostic et ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour restaurer les fonctions de ces cellules. Nous n'avons cependant pas pu montrer que les vésicules extracellulaires BTN2A1$^+$ altéraient la cytotoxicité des lymphocytes T Vγ9Vδ2 dans le modèle *in vivo*. Toutefois, dans notre étude, le modèle choisi peut ne pas être adapté pour cela. BTN2A1 n'étant pas exprimé chez la souris, nous avons choisi un modèle de souris NSG avec xénogreffe PC3 et de

lymphocytes T Vγ9Vδ2, sur la base d'un modèle existant et publié (150), mais le contrôle tumoral était sous optimal même en condition contrôle.

3. Caractérisation des vésicules extracellulaires

L'analyse des vésicules extracellulaires est d'intérêt croissant en cancérologie. La caractérisation des vésicules étudiées est centrale dans ces études, et fait l'objet de recommandations internationales (213).

Dans ces travaux, nous avons favorisé les techniques d'analyses compatibles avec une utilisation en routine clinique, dans le but de développer un biomarqueur. Ainsi la cytométrie spectrale est au centre de ce travail. Elle permet d'évaluer l'expression de molécules d'intérêt à la surface des vésicules extracellulaires dans un échantillon donné. Elle permet également d'évaluer la taille des populations vésiculaires analysées. L'analyse des vésicules extracellulaires cytométrie en flux ou spectrale est bien codifiées à ce jour, et nécessite une rigueur dans l'optimisation des techniques de marquages (219). L'optimisation des techniques de marquage et le paramétrage de l'instrument représente une grande partie de ce travail de thèse, qui ne sont pas détaillés dans ce manuscrit.

Nous avons choisi d'utiliser la calceïne violet comme marqueur de vésicules extracellulaires dans ce travail. Il s'agit d'une molécule marquant les amines intracellulaires (ou vésicules dans notre cas), qui devient fluorescente après activation par les estérases intracellulaires, permettant ainsi de discriminer les vésicules fermées du bruit de fond. Le plasma étant isolé à partir de tube EDTA, l'utilisation de la calceïne est possible sur des échantillons de plasma, contrairement au marquage par l'Annexine-V, liant les phosphatildylsérines. En effet, le marquage Annexine-V est calcium dépendant, l'EDTA présent dans le plasma étant un puissant chélateur calcique, il va empêcher ce marquage. C'est pourquoi nous avons préféré le marquage calceïne, plus compatible avec les cohortes cliniques, collectant des tubes EDTA. De plus, l'ensemble des anticorps utilisés pour phénotyper les vésicules extracellulaires ont été titrés afin de définir la concentration optimale d'utilisation pour chacun. Les concentrations retenues et les gains des détecteurs du cytomètre ont été choisis pour privilégier la spécificité du marquage par rapport au bruit de fond et sous-estime très probablement l'expression réelle de ces marqueurs.

Les modalités de prélèvements de ces tubes sont également critiques dans ces analyses. Dans notre étude, les prélèvements ont été fait de façon standardisés pour chaque patient, et techniqués dans les 2 heures suivant leur acheminement au laboratoire. Cependant, les patients n'ont pas forcément été prélevés au moment de la journée et nous ne disposons pas d'information sur le statut du patient au moment du prélèvement (à jeun, état clinique…), ce qui peut induire une variabilité dans les analyses.

La nature exacte de ces vésicules extracellulaires impliquées dans notre étude n'a pas été déterminée. Nous avons pu mettre en évidence la présence de BTN2A1 à la surface des vésicules extracellulaires >

200-240nm eq SSC en cytométrie spectrale, soit les vésicules de grandes tailles, plutôt évocatrice d'ectosomes. Nous n'avons pas pu identifier BTN2A1 à la surface des vésicules de petites tailles par cytométrie dans le plasma des patients, alors que BTN2A1 est retrouvée sur ces vésicules *in vitro*. Cependant, la taille des vésicules ne permet pas à elle seule d'en affirmer l'origine subcellulaire, qui reste difficile à caractériser (213). De plus, l'absence de détection de BTN2A1 à la surface des vésicules de petite taille peut être liée à une limitation technique ; la cytométrie étant moins adaptée à l'étude de ces vésicules. L'analyse des vésicules extracellulaires de petites tailles (< 200nm) se fait classiquement par Western blot ; cependant, nous n'avons pas pu optimiser l'analyse de BTN2A1 par Western blot malgré plusieurs clones et conditions testées.

4. Vésicules extracellulaires et cancer de la prostate

De nombreuses études ont évaluées la place des vésicules extracellulaires dans le cancer de la prostate localisé ou métastatique, tant sur le versant diagnostic que pronostic (220,221). La prostate étant branchée sur l'arbre urinaire, la détection et l'analyse des vésicules extracellulaires est possible dans le sang, dans les urines ou dans le liquide séminal des patients.

L'analyse des vésicules extracellulaires peut être un outil d'aide au diagnostic précoce des cancers de la prostate et aide à la discrimination avec les volontaires sains. De nombreux marqueurs ont été associés au cancer de la prostate, la plupart étant des ARN messagers (comme *PCA3, ERG, TMPRSS2* ou le transcrit de fusion *TMPRSS2:ERG* (222)) ou des micro ARN (principalement *miR-21* (221)). L'analyse des exosomes urinaires permet même de discriminer les patients avec cancer de la prostate, des patients avec hyperplasie bénigne de la prostate. Quelques études se sont intéressés aux marqueurs protéiques associés aux vésicules extracellulaires. Les principales cibles identifiées sont le PSA (223), PTEN (224) ou les tétraspanines (CD9, CD63) (225) dont l'expression sur les vésicules extracellulaires dans le plasma ou les urines des patients est associée au cancer de la prostate. Cependant, malgré leurs capacités diagnostiques, l'hétérogénéité dans les méthodes d'analyses limitent la transposabilité clinique de ces biomarqueurs. Un test urinaire est à ce jour commercialisé, ExoDx™ Prostate IntelliScore (EPI-CE), analysant les ARN messagers des vésicules extracellulaires urinaires chez des patients présentant une lésion prostatique avant la réalisant de l'IRM et de la biopsie permettant de prédire la présence de lésions de haut grade (226). La réalisation de ce test n'est toutefois pas retenue dans les recommandations françaises ou européennes.

Le rôle pronostic des vésicules extracellulaires dans le cancer de la prostate est moins documenté. Là encore, la présence de micro ARN spécifique (*miR-1290* et *miR-375*) a été associée à un pronostic défavorable chez des patients avec cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (227). La détection du variant d'épissage AR-V7 du récepteur aux androgènes (connu comme mécanismes de

résistance à la castration) dans les vésicules extracellulaires plasmatiques ou urinaires des patients atteints de cancer de la prostate résistant à la castration est associées à un pronostic défavorable (228).

Les vésicules extracellulaires ont une place importante comme biomarqueurs dans le cancer de la prostate. Peu d'études en revanche se sont intéressées aux mécanismes associés à ces vésicules extracellulaires qui sont considérées comme le reflet de l'agressivité tumorale. Dans notre étude, nous nous sommes justement intéressé à l'impact des vésicules BTN2A1$^+$ permettant d'identifier des cibles immunes potentielles dans ce cancer.

5. Place des lymphocytes B dans le cancer de la prostate

Le phénotypage extensif des vésicules extracellulaires BTN2A1$^+$ permet de leur suggérer une origine lymphocytaire B. Nous n'avons pas pu identifier, dans le sang périphérique, de différence dans les populations de lymphocytes B entre les patients présentant une grande quantité de vésicules BTN2A1 dérivées de B et les autres. Les populations lymphocytaires B impliquées sont donc probablement non circulantes (adénopathies / microenvironnement tumoral), en accord avec nos données expérimentales qui montrent une production de vésicules extracellulaires par les lymphocytes B activés, l'activation lymphocytaire B se faisant majoritairement en dehors de la circulation, dans les organes lymphoïdes secondaires (229). Malheureusement, la cohorte NK-Prostate ne prévoyait pas la collection de matériel tumoral qui aurait permis de répondre à cette question. Des explorations sont actuellement en cours sur une seconde cohorte de patients avec matériel tumoral disponible.

Le rôle des lymphocytes B dans le cancer de la prostate est sujet à controverse. L'infiltration en lymphocytes B est classiquement associée à un bon pronostic dans un grand nombre de tumeurs solides, notamment lorsqu'ils sont organisés avec les lymphocytes T et les cellules dendritiques en *Tertiary Lymphoid Structure* (TLS). Cependant, les données sont contradictoires concernant le cancer de la prostate. Il est décrit une augmentation de l'infiltration en lymphocytes B dans le tissu tumoral prostatique en comparaison au tissu péritumoral (114), mais également dans les adénopathies drainant la tumeur (230), suggérant leur implication dans la physiopathologie de ce cancer. L'infiltration en plasmocytes (forme terminale de différentiation des lymphocytes B, productrice d'anticorps) serait associée à un pronostic favorable dans le cancer de la prostate localisé (117). A l'inverse, il existe des formes lymphocytaires B régulatrices, productrices d'IL10, infiltrant la tumeur qui sont associées à un pronostic défavorable (115,116). Il a de plus été récemment montré que les adénopathies drainant la tumeur étaient plus infiltrées en lymphocytes B activés que les adénopathies ne drainant pas directement la tumeur. Il est donc possible que ce soit ses populations ganglionnaires activées qui soient à l'origine de la production de vésicules extracellulaires BTN2A1 positives, expliquant l'absence d'anomalie dans le sang périphérique. Il est également à envisager la possibilité

que les vésicules extracellulaires BTN2A1$^+$ soient produites par les lymphocytes B régulateurs. En effet, il a été montré que l'activation *in vitro* des lymphocytes B augmente la proportion de lymphocytes B régulateurs dans le milieu de culture (231), pouvant expliquer l'excès de vésicules extracellulaires observées à J4 dans nos expériences. On pourrait ainsi supposer que ces vésicules extracellulaires exprimeraient des marqueurs « B régulateurs » tels que l'IL-10, le TGF-β, l'IL-35 ou encore le granzyme B (232) et être adressé aux lymphocytes T Vγ9Vδ2 grâce à l'expression de BTN2A1 et ainsi altérer encore leurs fonctions. Il a par ailleurs été montré que les vésicules extracellulaires dérivées des lymphocytes B pouvaient exprimer le MHCII et FasL et induire l'apoptose des cellules T CD4+ (233) ou encore le CD39 et le CD73 et altérer les fonctions des lymphocytes T CD8+ par l'intermédiaire de l'augmentation de la concentration en adénosine dans le microenvironnement tumoral (199). Ces mécanismes peuvent participer à expliquer l'impact négatif des vésicules extracellulaires BTN2A1+ dérivées des lymphocytes B dans notre cohorte de patients mais de façon plus large l'impact délétère observés de certaines sous populations B dans le cancer de la prostate.

6. L'immunomodulation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 : une nouvelle piste dans le cancer de la prostate métastatique ?

Nous avons pu identifier, *ex vivo*, des altérations phénotypiques des lymphocytes T Vγ9Vδ2 circulants associées aux vésicules extracellulaires BTN2A1$^+$ dérivées de B. On constate une diminution de la population en lymphocytes T Vγ9Vδ2 T_{EMRA} CD16$^+$ CD57$^+$ PD1$^+$ en présence de ces vésicules extracellulaires. Il s'agit d'une population de lymphocytes T Vγ9Vδ2 terminallement activée. L'expression du CD57 sur cette population est associée à la senescence réplicative, avec des capacités de prolifération moindre sous l'influence des phosphoantigènes que les cellules CD57$^-$, ainsi que des télomères plus courts (234). Cette senescence ne semble toutefois pas associée à l'âge des sujets, ni à leur statut infectieux CMV, contrairement à ce qui est observé avec les lymphocytes T αβ ou γδ1. L'accumulation de T Vγ9Vδ2 T_{EMRA} CD57$^+$ a également été décrite dans d'autres pathologies tumorales, notamment dans le cancer du côlon métastatique traité par chimiothérapie (235). Cependant, les capacités fonctionnelles, notamment antitumorale, de cette population ne sont pas clairement établies. Cette population, comme dans notre étude, a été associée à l'expression du CD16. Le CD16 ou FcγRIII est un récepteur membranaire aux IgG couplé aux antigènes, médiant des activités de phagocytose, ou de cytotoxicité médiée par les anticorps. Il a été montré que le CD16 peut être exprimé par les lymphocytes T Vγ9Vδ2 et que ce récepteur est fonctionnel (168,236). Cette expression semble s'intégrer dans une différentiation terminale spécifique des T Vγ9Vδ2, avec un pattern d'activation spécifique : une diminution de l'activation par l'intermédiaire du TCR et donc une diminution de la sensibilité aux phosphoantigènes (diminution de la production d'IFN-γ et de TNF-α) mais une activité augmentée lors de l'engagement avec des immunoglobulines (ADCC) (169,237). Il a

également été montré que les lymphocytes T Vγ9Vδ2 expandus à partir de donneurs présentant plus de 35% de T Vγ9Vδ2 $CD16^+$ ont une activité antitumorale *in vitro* supérieure à ceux obtenus à partir de donneurs ayant un taux inférieur à 20%, avec des capacités de production d'IFN-γ, de perforines et granzymes supérieures (238).

Ainsi la diminution de la proportion de lymphocytes T Vγ9Vδ2 $CD57^+$ $CD16^+$ associée aux vésicules extracellulaires BTN2A1 dérivées des lymphocytes B peut témoigner d'une altération des capacités d'activation et de différentiation de lymphocytes T Vγ9Vδ2. Ces données sont en accord avec nos données expérimentales où les vésicules extracellulaires BTN2A1 altèrent la cytotoxicité et l'influx des lymphocytes T Vγ9Vδ2 au niveau tumoral.

Ces considérations doivent cependant être contrebalancées par le fait que les données ne concernent que les cellules circulantes périphériques. La cohorte NK-Prostate ne prévoyait pas de recueil tumoral. Ainsi, il n'est pas possible d'affirmer si les modifications phénotypiques observées dans le sang circulant correspondent à de réelles altérations fonctionnelles des lymphocytes T Vγ9Vδ2 ou bien à une répartition différente des populations cellulaires entre le sang circulant et les tissus tumoraux et non tumoraux.

7. Perspectives générales

Comme discuté, ce travail doit être validé sur une cohorte indépendante, avec idéalement, une étude conjointe du tissu tumoral afin de confirmer les observations faites. Il ouvre cependant de multiples perspectives sur la place de la biopsie liquide dans le cancer de la prostate hormonosensible. Il démontre que l'identification de biomarqueurs circulants, facilement mesurable dans le plasma des patients, est faisable ; et ouvre des perspectives nouvelles sur la place du système immunitaires dans cette pathologie. Ces travaux permettent d'identifier de nouveaux acteurs potentiels impliqués dans l'immunité antitumorale du cancer de la prostate métastatique.

Les altérations phénotypiques des lymphocytes T Vγ9Vδ2 observées font de ces cellules des cibles thérapeutiques potentielles. Revigorer l'activité des lymphocytes T Vγ9Vδ2 peut sembler être une approche bénéfique dans le cancer de la prostate métastatique hormonosensible ; et nous avons identifié différents « états » pouvant nécessiter des approches différentes. Dans un cas, en renforçant une activité déjà présente mais qui aboutit à un épuisement cellulaire, en utilisant par exemple des inhibiteurs de checkpoints immuns. Dans l'autre cas, essayant de forcer l'activation des lymphocytes Vγ9Vδ2 afin de restaurer leur différentiation terminale, en utilisation des activateurs spécifiques tels que l'acide zolédronique ou les anticorps agonistes des butyrophilines. Cependant la présence et la persistance de cette forme soluble de BTN2A1 pourra jouer comme mécanisme de résistance à ces approches thérapeutiques, et serai alors utile comme biomarqueurs prédictifs de réponse.

Une autre approche consisterait alors à bloquer l'action de cette forme soluble, notamment de ses vésicules extracellulaires BTN2A1^{+}. Il pourrait s'agir d'en limiter la production en modulant l'activité des cellules productrices (par exemple, moduler l'activité des lymphocytes B dans notre modèle). De nombreux agents pharmacologiques ont été évalué *in vitro* ou dans des modèles *in vivo* pour diminuer spécifiquement la production de vésicules extracellulaires (comme la calpeptine, la panthenine, ou la cytochalasine D…) (239). Cependant le caractère ubiquitaire de la production de vésicules extracellulaires, leur place fondamentale en physiologie et l'absence de spécificité de ces approches les rendent difficilement transposable en clinique à l'heure actuelle. D'autres approches plus ciblées sont en cours de développement, visant notamment à stopper in vivo, dans la circulation, les vésicules extracellulaires exprimant des marqueurs d'intérêt pour leur empêcher d'exercer leur action à distance.

PARTIE 2: BTN2A1 acquisition through trogocytosis enhances Vγ9Vδ2 T cell cytotoxicity against autologous and cancer cells

Dans cette partie, nous avons cherché à mieux comprendre les mécanismes de régulation de BTN2A1 à la surface des cellules. Nous avons montré qu'il existait des échanges membranaires, appelés trogocytose, impliquant BTN2A1, entre les populations lymphoïdes et myéloïdes. Cette augmentation d'expression de BTN2A1 sur les cellules lymphoïdes était associée à une plus grande susceptibilité à la lyse par les lymphocytes T Vγ9Vδ2 autologues, et permettait de rendre sensible à la lyse par les lymphocytes T Vγ9Vδ2 des cellules Daudi BTN2A1 KO, conçues pour leur être insensible.

Ce travail fait l'objet d'un article, en cours de soumission :

BTN2A1 acquisition through trogocytosis enhances Vγ9Vδ2 T cell cytotoxicity against autologous and cancer cells

Emilien Billon, Caroline Imbert, Damien Bruyat, Pierre Grassi, Lucie Robert, Téo Fernez, Philippe Livrati, Amira Ben Amara, Marie-Sarah Rouvière, Manon Richaud, Nicolas Boucherit, Jacques A. Nunès, Renaud Sabatier, Éric Lambaudie, Anne-Sophie Chrétien, Gwenaëlle Gravis, Laurent Gorvel, Daniel Olive

BTN2A1 acquisition through trogocytosis enhances Vγ9Vδ2 T cell cytotoxicity against autologous and cancer cells

Emilien Billon[1,2,3], Caroline Imbert[1,2], Damien Bruyat[1,2], Pierre Grassi[1,2], Lucie Robert[1,2], Téo Fernez[1,2], Philippe Livrati[1,2], Amira Ben Amara[1,2], Marie-Sarah Rouvière[1,2], Manon Richaud[4], Nicolas Boucherit[1,2], Jacques A. Nunès[1], Renaud Sabatier[3], Éric Lambaudie[1,2,5], Anne-Sophie Chrétien[1,2], Gwenaëlle Gravis[1,2,3], Laurent Gorvel[1,2], Daniel Olive[1,2]

Affiliations:

1. Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Immunity and Cancer Team, Institut Paoli-Calmettes, Inserm, CNRS, Aix Marseille Univ, Marseille, France.
2. Immunomonitoring department, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France.
3. Medical Oncology department, Institut Paoli-Calmettes, 13009 Marseille, France.
4. Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Cytometry platform, Institut Paoli-Calmettes, Inserm, CNRS, Aix Marseille Univ, Marseille, France.
5. Department of Surgical Oncology, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France.

Running title: BTN2A1 trogocytosis enhanced Vγ9Vδ2 T cell cytotoxicity

Corresponding author: Daniel Olive, 232, Boulevard Sainte Marguerite, 13273 Marseille Cedex 09, France. Phone: +33486977271; E-mail: daniel.olive@inserm.fr

Conflict of interest disclosure statement:

Word count: 4159

Number of figures: 5

Supplementary materials: 8

Abstract

Butyrophilins (BTNs) are emerging as novel immune target in oncology, promoting the activation of γδ T cells against cancer cells. Therapies targeting BTN3A or BTN2A1 molecules are under development, but their regulation in normal and pathological conditions is poorly understood. Here, we report that B and T cells' BTN2A1 expression increased with CD3/CD28 stimulation, mediated by trogocytosis in presence of activated myeloid cells. For instance, BTN2A1 could be acquired by BTN2A1KO (*BTN2A1* gene inactivated) B cell line through trogocytosis when cultured with monocytes. In addition, cytotoxicity assays determine that BTN2A1-acquired normal or tumor cells exhibited higher sensitivity to Vγ9Vδ2 T cell lysis. Finally, peripheral blood mononuclear cells analyses from endometrial cancer patients by mass cytometry revealed that BTN2A1 trogocytosis is associated with cancer aggressivity and involves activated monocytes. This study provides new insights about into the regulation and functions of BTN2A1, but also highlights the potential impact of trogocytosis in regulating the expression of immune checkpoints in normal and pathological conditions.

Key words: Butyrophilins; BTN2A1; γδ T cells ; Trogocytosis ; Endometrial cancer

INTRODUCTION

Gamma delta (γδ) T cells correspond to an unique T cell subpopulation that exhibits characteristics specific to both innate and adaptive immunity (1). Vγ9Vδ2 T cells are the major γδ T cell subtype in human peripheral blood, representing 1 to 10% of T cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy volunteers. They sense stress signals of transformed or infected cells recognizing phosphoantigen metabolite intermediates of the mevalonate and non-mevalonate pathway from bacterial or malignant cells (2–4), through Vγ9Vδ2 TCR interaction with the complex butyrophylin (BTN) 3A-2A.

Butyrophilins (BTNs) are part to the B7 family, characterized by immunoglobulin (Ig)C-IgV extracellular domains, a unique transmembrane domain and a B30.2 intracellular domain (5). *BTN2A* (2A1/2A2) and *BTN3A* (3A1/3A2/3A3) genes are mapping into the human chromosome 6, close to the MHC class I region. BTN2A and BTN3A molecules are expressed in a large number of human healthy and tumor tissues. BTN3A subfamily members are also widely overexpressed in several cancer types (6). BTN3A regulation is associated with Th1 response in healthy tissues and in pathological conditions ; cytokines stimulation or hypoxia-associated factors are associated with BTN3A upregulation (7).

Recently, BTN2A1 has been described as essential for the phosphoantigen-driven Vγ9Vδ2 T cells activation against cancer cells but also BTN3A1 regulation (8). BTN2A/BTN3A complex is activated by the engagement of the phosphoantigen with the intracellular domain of BTN3A1 (B30.2)(9) and this engagement allows BTN2A1 interaction with Vγ9Vδ2 T cells via an invariant germline-encoded region of Vγ9 (10–12). BTN2A1 expression in cancer cell lines is correlated with Vγ9Vδ2 T cells cytotoxicity (8). However, little is known concerning BTN2A1 regulation in physiological and pathologic conditions. Recently, Mamedov et al. suggested that BTN2A1 and BTN3A1 regulation in Daudi B cell line could be dependent on AMP-activated kinase (AMPK) activation, especially during metabolic crisis (13). However, data are missing concerning BTN2A1 regulation in healthy and tumor tissues.

In this study, we aimed to decipher BTN2A1 regulation in both normal and tumor cells. We found that BTN2A1 could be acquired in normal B and T cells by CD3/CD28 stimulation through trogocytosis, an intercellular transfer of membranes with activated myeloid cells, but also on BTN2A1KO Daudi B cells. Cytotoxicity assay confirmed that BTN2A1-overexpressing cells exhibited higher sensitivity to Vγ9Vδ2 T cell lysis. Finally, peripheral blood mononuclear cells analyses from endometrial cancer patients by mass cytometry revealed that BTN2A1 trogocytosis is associated with cancer aggressivity and involves activated monocytes.

MATERIALS AND METHODS

PBMC preparation

Human blood samples from healthy volunteers were obtained from the EFS (Etablissement Français du Sang); [authorization number AC-2019-3428, issued by the Ministry of Higher Education, Research and Innovation]. Human blood from endometrial cancer patients were obtained from the GCBio protocol (NCT01977274), at Institut Paoli-Calmettes, France. All participants gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The institutional review board of the Institut Paoli-Calmettes and the Committee for the protection of persons (CPP) Sud Mediterranée approved the protocol. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were isolated using Lymphoprep (*Eurobio*) gradient centrifugation.

In stimulated experiments, PBMC (10^6 cells/mL) were cultured with Dynabeads T cell activator CD3/CD28 (1 bead for 10 cells ratio, *Gibco™*) or loxoribine (250µM; *Invitrogen*) and recombinant human Interferon α 2b (400UI/mL; *ImmunoTools*) for 48 or 120 hours in 6-well plate. When specified, cyclosporin A (*Sandimmune, Novartis*) 100ng/mL or 1000ng/mL was added at day 0.

$CD14^+$ and $CD14^-$ cells were isolated from 20 x 10^6 PBMCs using CD14 Microbeads, human kit (*Miltenyi Biotec*) according to manufacturer's instructions.

Spectral flow cytometry

Cells (1 x10^6) were washed in Phosphate Buffer Saline (PBS) and then stained with LiveDead Blue (*Invitrogen*) for 15 min at room temperature (RT) to identify dead cells. Cells were then washed in PBS and stained with specific primary antibodies (**Table S1**) for 30min at RT. Cells were washed again in PBS, and resuspended in PBS for sample acquisition using an Aurora cytometer (*Cytek Biosciences*). The number of AlexaFluor-647 molecules displayed at the plasma membrane (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome, MESF) was assessed using the Quantum™ Simply Cellular® anti-Mouse IgG Kit (Bangs Laboratories, Inc) according to the manufacturer's recommendations. Data were analyzed using SpectroFlow (version 3.2.1 Cytek Biosciences) and FlowJo (v 10.8.1; Tree Star Inc.) softwares. Gating strategy is shown in **Supplementary Figure 1**.

Quantitative RT-PCR

BTN2A1 mRNA relative expression in PBMCs or Daudi cell line was measured by quantitative reverse transcriptase PCR. Nucleic acids were extracted from cells using TRIzol extraction (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to manufacturer's instructions. RNA quality was assessed with an Agilent Bioanalyzer 2100 (for human cells) or by spectrophotometry with NanoDrop 2000 (absorbance ratios were

measured at A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} to determine protein contamination and RNA quantity) for cell line. RNAs were store at -80°C until use. Reverse transcriptase was performed using SuperScript™ II Reverse Transcriptase kit (*Invitrogen, Carlsbad, CA*) according to the manufacturer's instructions. Forty ng of cDNA were amplified by quantitative PCR (qPCR) using SYBR Green (UNIV SYBR SUPMIX, Bio-Rad) and forward and reverse primers according to manufacturer's instructions. Human *BTN2A1* qPCR Primer Pair and human *GAPDH* qPCR Primer Pair were purchased from *Sino Biological* (references HP101899 and HP100003 respectively). Transcript levels (Ct) were normalized to those of *GAPDH* as a housekeeping gene (ΔCt) and subsequently to the mean ΔCt of the reference sample (ΔΔCt). Results were reported as relative quantities ($FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$).

In vitro experiments

For conditioned supernatant assay, PBMCs were seeded at 1 x 10^6/mL with Dynabeads T cell activator CD3/CD28 (1:10 ratio) for 5 days. Conditioned supernatant was collected by centrifugation at 410g for 5min, 0.22 µm-filtered and diluted 1:1 with fresh Roswell Park Memorial Institute medium (*Gibco*™ RPMI 1640) supplemented with 10% fetal calf serum; and added to PBMC (10^6/mL) for 48 hours. Cells were then collected, washed in PBS and stained with LiveDead-NIR (*Invitrogen*), CD19-FITC, CD3-PE, CD33-PE/Cy7, and BTN2A1-AlexaFluor647 (**Table S2**) before being analyzed on a CANTO II cytometer (*BD Biosciences*).

For transwell experiments, PBMCs were seeded at 1 x 10^6 cells/mL with Dynabeads T cell activator CD3/CD28 (1:10 ratio) in 6-well plate. Autologous PBMCs were seeded at 1 x 10^6 cells/mL in a 400nm-transwell chamber (*Millicel*™) without stimulation. Cells in each compartment were collected and analyzed as described by spectral flow cytometry.

For membrane exchange experiments, $CD14^+$ cells or THP-1 cells were stained with PKH67 (PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling, *Sigma-Aldrich*) and then pooled with cells of interest before being seeded in 6-well plate with or without stimulation and analyzed by spectral flow cytometry (PBMCs), conventional flow cytometry (Daudi-THP1 experiments) or confocal microscopy (**Table S2**).

Confocal Microscopy

Cells (2 x 10^5) were washed in PBS and then fixed with BD Cytofix buffer for 30 min. Cells were incubated with CD19-PEdazzle594 (HBI19; *Biolegend*) in PBS for 30 min at RT and then washed twice. Cells were then incubated with DAPI for 10 min at RT, washed twice and resuspended in Prolong Gold Antifade Montant (*Invitrogen*) before being placed on slide. Acquisition was performed with a LMS 880

with AiryScan (*Zeiss*) and Zen Blue software (*Zeiss*) and images were processed with ImageJ (version 1.53t).

Cell lines

Daudi (B lymphoblasts) and THP-1 (monocytic leukemia) cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO2 in RPMI medium, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Cell line were regularly tested for mycoplasma contamination. BTN2AKO Daudi cells were obtained using CRISPR-Cas9 technology, as previously described (8). Briefly, optimized CRISPR target sequences targeting both BTN2A isoforms (guide 44) were cloned into the lentiCRISPR-v2 vector. BTN2AKO Daudi cells were obtained by transducing Daudi cell line with the above-mentioned lentiviral guide 44 vector.

Human Vδ2 T cell expansion

PBMCs from healthy donors were seeded at 1.5 x 10^6/mL in RPMI 1640 medium + 10% FCS with IL-2 200UI/mL (*PROLEUKIN 18MUI, Clinigen*) and zoledronic acid 1µM (*Sigma-Aldrich*) for 14 days, with IL-2 supplementation every 2 days after day 5. Vδ2 T cell purity was evaluated at day 14 by flow cytometry, and was considered satisfactory if it is ≥ 90%.

Cytotoxicity assay

For PBMC assay, $PKH67^+$ and $PKH67^-$ cells were sorted using FACS ARIA III (BD) after 120 hours of PBMC stimulation. $PKH67^+$ and $PKH67^-$ PBMC were cocultured with autologous D14 expanded Vδ2 T cells at a 1:1 ratio for 1 hour in 96-well plate.BTN3A-agonist 20.1 antibody (1mg/mL, *homemade*) was added to enhance Vδ2 T cells activation. Then, Caspase Glo 3/7 assay (*Promega*) was performed according to manufacturer's recommendations. Caspase 3/7 activity was assessed by luminescence using CLARIOstar (*BMG Labtech*). Cells were also stained with propidium iodide before evaluation by BD FACSCanto™ II Flow Cytometer.

For assay with cell lines, BTN2A1KO or CRISPR_IRR Daudi cells were seeded in 6-well plates with THP-1 cell line at different ratios with or without stimulation; and coculture for 48 hours. Daudi cells were sorted using BD FACSAria™ III Cell Sorter, stained with Cell Proliferation Dye eFluor™ 670 to be identified easily (*Thermo fisher Scientific*) and cocultured with D14 expanded Vδ2 T cells with 1:1 ratio for 1 hr in 96-well plate with BTN3A-agonist 20.1 antibody (1mg/mL, *homemade*). Caspase 3/7 activity was assessed by Caspase Green assay (CellEvent™ Caspase-3/7 Detection Reagents, *Invitrogen*) according to the manufacturer's instructions. Cells were analyzed by BD FACSCanto™ II Flow Cytometer.

Mass cytometry analysis

PBMCs were collected and cryopreserved in RPMI 10%FCS 10%DMSO until use. A total of 87 samples were analyzed. PBMCs were thawed and processed as previously described (14). PBMCs were washed with RPMI medium 1640 with 10% FCS and incubated in RPMI 1640 with 2% FCS and Pierce Universal Nuclease (ThermoFisher Scientific) diluted at 1:10000 (2.5 kU/mL) at 37°C with 5% CO_2 for 30 min. Cells were incubated with rhodium 1 µM 15min at 37°C to identify dead cells (*Standard Biotools*). Unspecific staining was avoided using 10% FCS for 10 minutes at 4°C. A panel of 40 antibodies were developed for deep phenotyping of myeloid cells (**Table S3**).

A total of 3 x 10^6 PBMCs were incubated for 1 hour at 4°C with the extracellular antibodies. Extracellular staining was fixed using 2% Formaldehyde (*Invitrogen*). Cells were washed and permeabilized with the Foxp3 Staining Buffer Set (*eBioscience*) for 30 min at 4°C. Intracellular antibodies were incubated for 30 min at 4°C in Foxp3 Staining Perm Wash buffer. Cells were then washed and incubated overnight with 125 nM iridium intercalator (*Standard BioTools*) in 2% formaldehyde. Finally, cells were diluted in EQ™ Four Element Calibration Beads (*Standard Biotools*) before acquisition on a Helios™ instrument (*Standard BioTools*). Raw files were manually pretreated using FlowJo v10.8.1 to remove beads, debris and dead cells from the analysis based on iridium and rhodium positivity. Batch effect was analyzed and corrected using the CytoBatchNorm R package (https://github.com/i-cyto/cytoBatchNorm). Data analysis were performed with OmiQ (*Dotmatics*). Dimension reduction was performed using the Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) and clustering with DensVM algorithm, after downsampling to 2000 alive or $CD33^+$ cells.

Statistical analyses

Statistical analyses and graphs were performed using GraphPad Prism (version 9.5.1). Comparison between two groups was performed with Mann-Whitney test (two-tailed, unpaired) for *in vitro* experiments. Comparison between three groups was performed with ANOVA. For *ex vivo* experiment, comparison between groups was performed with t-test. P-value was considered as significant if < 0.05.

RESULTS

1. BTN2A1 is induced on immune cells by αCD3/αCD28 stimulation

To understand BTN2A1 regulation on immune cells, healthy volunteers PBMC were cultured for 120 hrs with or without a combination of CD3 and CD28 mAbs. BTN2A1 protein expression was stable during 5 days in basal condition on $CD4^+$ (mean MESF = 1272), $CD8^+$ (mean MESF = 952), γδ2 T (mean MESF = 2884), and NK cells (mean MESF = 2692). However, αCD3/αCD28 stimulation induced BTN2A1 overexpression in all cell subtypes analyzed, at D5 only (mean MESF for $CD4^+$ cells: 11288 versus 1350, diff: 9938 95%CI[1156 - 18720]; for CD8+ cells: 8763 versus 931.7, diff: 7831 95%CI[743.4 – 14919]; for γδ2 T cells: 13943 versus 2850, diff: 11092 95%CI[1165 – 21020]; for NK cells: 5908 versus 2463, diff 3445 95%CI[442.4 – 6448]) (**Figure 1 A-D**). At day 5, BTN2A1 induction was also observed on B cells (mean MFI 6256 versus 2771, p=0.0296) (**Figure 1E**). To confirm the causality of the αCD3/αCD28 stimulation on BTN2A1 regulation, ciclosporin A (CsA), a calcineurin/Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT)-pathway inhibitor, was added to the PBMC at D0, to prevent TCR-dependent lymphocyte activation. CsA diminished BTN2A1 induction significantly on all populations analyzed in terms of expression intensity, and in a dose-dependent manner, for the frequency of BTN2A1 (**Figure 1F and G**).

2. BTN2A1 is acquired by an exogenous pathway and require cell-cell interaction

To determine the origin of BTN2A1 acquisition, *BTN2A1* transcript expression levels were assessed on PBMC by qRT-PCR at D5 with or without αCD3/αCD28 stimulation. The stimulation was associated with a decreased expression of *BTN2A1* compared with basal condition (log FC=0,1950; p=0.0003, **Figure 2A**); suggesting an exogenous origin for the overexpression of the BTN2A1 protein. Therefore, we next investigated the ability of the conditioned supernatant to induce BTN2A1 overexpression on PBMCs. PBMCs were cultured for 48 hrs with D5 αCD3/αCD28 stimulated supernatant and fresh medium (1:1 ratio). B and T cell phenotyping after 48 hours revealed that, even if the αCD3/αCD28 stimulation was efficient, the supernatant alone was not sufficient to induce BTN2A1 expression variation (**Figure 2B**). On the hypothesis that the compound in the supernatant responsible for BTN2A1 induction is unstable (and therefore absent on D5), PBMC were co-cultured in a 400nm-transwell chamber with αCD3/αCD28-stimulated PBMCs. As described in the conditioned supernatant assay, supernatant was not sufficient to increased BTN2A1 on B and T cells in the transwell chamber (**Figure 2C**), confirming that BTN2A1 induction require cell-cell interactions. We also noticed the apparition of $CD3^+CD33^+$ and $CD19^+CD33^+$ cell populations at D5, only in the αCD3/αCD28 stimulation condition (42.8% of $CD3^+$ cells in stimulated conditions versus 5.66 % in the basal condition, p=0.0022; 36.1 % of $CD19^+$ cells in the stimulated conditions *versus* 5.16 % in the basal condition, p=0.0043). $CD3^+CD33^+$ and $CD19^+CD33^+$

cells presented higher expression of BTN2A1 compared to $CD33^-$ cells, especially in the stimulated condition (MFI BTN2A1 9920 for $CD3^+CD33^+$ cells versus 2229, p=0.0005; and 7008 for $CD19^+CD33^+$ versus 2401 for $CD19^+CD33^-$, p=0.0015; **Figure 2D**). We hypothesized that BTN2A1 could be acquired by trogocytosis from at least $CD33^+$ cells.

3. BTN2A1 is acquired by trogocytosis and BTN2A1^{high} cell are sensitive to Vδ2 T cell lysis

To analyze if that BTN2A1 induction on T and B cells is due to trogocytosis with myeloid cells, $CD14^+$ cells were isolated and membrane stained with PKH67 before culture with $CD14^-$ cells with or without stimulation (**Figure 3A**). In αCD3/αCD28 conditions, B and T cells shown PKH67 staining at D5 that correlate with BTN2A1 induction (**Figure 3B and C**). We tested a stimulation with TNFα and loxoribine (a TLR7 agonist) to specifically stimulate the B cells – myeloid cells axis (15). In this condition, only B cells presented a BTN2A1 and PKH67 induction at D5 (**Figure 3B and C**). BTN2A1 induction was correlated with PKH67 staining for each cell subtype and stimulation (R^2 = 0.8367, p<0.0001; **Figure 3D**) confirming that BTN2A1 induction is associated with trogocytosis with myeloid cells. Confocal microscopy confirmed the presence of PKH67 inclusion on the B cell membrane (**Figure 3E**).

To determine the impact of BTN2A1 acquisition by trogocytosis on PBMC, $PKH67^+$ and $PKH67^-$ lymphocytes were sorted by flow cytometry and cultured with D14 expanded Vδ2 T cells at a 1:1 ratio with anti BTN3A agonist 20.1 antibody (**Figure 3F**). $PKH67^+$ cells demonstrate higher sensitivity to Vδ2 T cells lysis, showing higher propidium iodide staining (0,4633% for PKH67- cells vs 20,13% for $PKH67^+$ cells, p<0.0001) (**Figure 3F**). PKH67+ cells showed also higher caspase 3/7 activity compared to $PKH67^-$ cells in Caspase Glo assay (RLU 2722 in $PKH67^-$ condition *versus* 419.550 in $PKH67^+$ condition) (**Supplementary Figure 2**). We can also notice that $CD14^-$ $PKH67^+$ cells alone exhibited higher propidium iodide staining than PKH67- even without Vδ2 T cells (7.84% versus 0,09%, p<0.0001), probably because of the presence of Vδ2 T cells in the $CD14^-$ fraction of cells.

4. BTN2A1 acquisition by trogocytosis could restore B lymphoblast sensitivity to Vδ2 T cell lysis

To confirm the specific impact of BTN2A1 trogocytosis in pathological condition, BTN2AKO Daudi cells, a B lymphoblastoid cell line, were co-cultured with PKH67 stained monocytic THP-1 cells for 48 hrs. As described for PBMCs, we noticed a BTN2A1 MFI elevation on Daudi cells proportionally to Daudi:THP1 ratio (**Figure 4A**) and BTN2A1 variation correlated with PKH67 variation (R^2 = 0.9732; *p < 0.0001*; **Figure 4B and C**). BTN2A1 acquisition on Daudi B cell line was independent of *BTN2A1* transcripts (**Figure 4D**), confirming the exogenous acquisition of BTN2A1 on Daudi cells by trogocytosis with THP-1 cells.

The Daudi cell line being sensitive to Vδ2 T cell lysis (13), we then wanted to define if BTN2A1 acquisition on BTN2AKO Daudi cells could restore this sensitivity. To this end, Daudi cells were cultured

with D14-expanded Vδ2 T cells at 1:1 ratio with 20.1 antibody; and cytotoxicity was assessed by Caspase 3/7 assay. First, we confirmed parental Daudi sensitivity to Vδ2 T cells lysis (46.0% of caspase 3/7 positive cells in coculture versus 0.20% for Daudi alone), and that BTN2AKO Daudi cells were resistant to Vδ2 T cell lysis (46.0% of caspase 3/7 control Daudi positive cells in coculture versus 0.97% for BTN2AKO Daudi*; $p < 0.0001$*; **Figure 4 E and F**). Coculture with THP-1 restores partially BTN2AKO Daudi sensitivity to Vδ2 T cells, in basal condition and with TNFα and loxoribine stimulation (respectively 7.7 % versus 0.97 %, p=0.0022; and 15.45 % versus 3.68 %; p=0.0087; **Figure 4F**). All together, these data confirm that BTN2A1 acquisition by trogocytosis could restore Vδ2 T cell lysis.

5. *Trogocytosed BTN2A1 is associated with activated monocytes in patients with endometrial cancer*

We next assessed if BTN2A1 trogocytosis could be identified *ex vivo*, in cancer patients. PBMCs of 87 patients with endometrial cancer and 5 healthy volunteers were analyzed by mass cytometry. Patients' characteristics were summarized in **Table S4**. We characterized "trogocytosed" cells as the concomitant expression of myeloid marker CD33 and CD3 or CD19 ($CD19^+CD33^+$ and $CD3^+CD33^+$ cells) (**Figure 5A and 5B**). UMAP reduction dimension was performed to identify $CD33^+$ B and T cells (**Figure 5C**). The proportion of "trogocytosed" cells ($CD33^+$ B cells and $CD33^+$ T cells) was higher in patients with higher disease extension (FIGO III/IV, 8.31 % versus 4.99 % for FIGO I/II; *$p = 0.0420$*) (**Figure 5D**). We confirmed that "trogocytosed" B and T cells presented higher expression of BTN2A1 compared to non-trogocytosed cells (**Figure 5E**). The cohort was divided in two subgroups according to the percentage of "trogocytosed" cells (cut-off = median = 3.51 %). The five healthy volunteers were in the "Low trogocytosis" subgroups, with 41 patients; 46 patients composed the "High trogocytosis" subgroups.

To understand which myeloid population is involved in the trogocytosis phenomenon, myeloid cell population was isolated by subsampling and clustered using DENSVM algorithm after UMAP dimensionality reduction (**Figure 5F**). "High trogocytosis" patients presented a higher level of activated monocytes (Cluster 2, **Figure 5G**), characterized by CD33, CD14, $HLA\text{-}DR^{high}$, CD86 expression compared to "low trogocytosis" patients that presented higher level of unactivated monocytes ($CD33^+$, $CD14^+$, $HLA\text{-}DR^{low}$, CD86low or negative; clusters 4 and 5; **Figure 5H and I and Supplementary Figure 3**). Manual gating (**Supplementary Figure 4**) confirmed activated monocytes accumulation in "High trogocytosis" patients (13.50% versus 6.63 %, *$p <0.0001$*) (**Figure 5J**).

DISCUSSION

Deciphering BTN2A1/BTN3A1 regulation is critical to improve Vγ9Vδ2 T cell activity against target cells, especially cancer cells. Our study discloses for the first time a mechanism of BTN2A1 expression regulation involving trogocytosis with activated monocytes.

Previous studies focused mostly on phosphoantigen metabolism pathways (16) and/or butyrophilin activity modulation to manipulate Vγ9Vδ2 T cells activity (17). Bisphosphonates are largely used to activate Vγ9Vδ2 T cells, increasing intracellular level of isopentenyl diphosphate (IPP) in target cells (18,19). Recently, anti-BTN3A or anti-BTN2A monoclonal antibodies demonstrated immunomodulatory activity on Vγ9Vδ2 T cells and contributed to elucidating the roles of BTN3A and BTN2A in their activation (6,8,20,21). BTN3A and BTN2A activators are also known to improve recognition and elimination of various tumor cells (both cell lines or primary) by Vγ9Vδ2 T cells *in vitro* and *in vivo* (8,17,22,23). However, all these approaches remain dependent on BTN3A1 and BTN2A1 expression; and were inefficient against BTN2A/BTN3A negative target cells (8).

Recent findings suggest BTN3A1 and BTN2A1 regulation by AMPK on Daudi B cell line, with modulation by energetic crisis (13). In our study, BTN2A1 regulation seems to be endogenous, and contributes to Vγ9Vδ2 T cell recognition and activation against stressed cells. Our results suggest the exogenous acquisition of BTN2A1 on PBMCs of healthy volunteers and Daudi cell line, specifically by plasma membrane exchanges, in cell activation conditions. This reflects the multiplicity of mechanisms involved in the regulation of immune checkpoints; as described for PD-1-PD-L1 axis (24–26). PD-1 trogocytosis was described for both NK and CD8+ T cells from leukemia cells. PD-1 acquired by trogocytosis is functional, and suppress NK cell antitumor activity in *in vitro* and *in vivo* assays. For BTN2A1 regulation, we cannot totally exclude that these mechanisms could be associated, especially in physiopathological conditions.

Trogocytosis may occur through different molecular pathways that are not fully understood (27). B and T cells could acquire different receptors by direct contact during priming phase with antigen presenting cells (APCs) (28); or during effector phase with tumor cells (29). Various impacts of trogocytosis have been described in this context. Cytotoxic T lymphocytes could acquire membrane from melanoma and display higher antitumor activity than conventional cytotoxic T lymphocytes. Conversely, CD9 acquisition by NK cell in high-grade serous ovarian tumor resulted in a negative modulation of NK antitumor activity and participates in the creation of an immune-tolerant microenvironment (30).

The reverse process is also described, with a tumor cell acquisition of immune checkpoints, such as CTLA-4 or TIM3 trogocytosis with immune cells in colon cancer. This facilitated tumor immune escape and progression (31).

In therapeutic landscape, lymphocytes trogocytosis could be increased and has been described as an escape mechanism. B cells decreased CD22 expression during treatment with a humanized CD22 mAb, epratuzumab, by trogocytosis with FcγR-expressing monocytes (32) resulting in a diminution of epratuzumab efficacy. Trogocytosis has also been described for CAR-NK that could express CD19 after tumor cell lysis, and be victim of “fratricide” which could participate to tumor escape (33). Similar mechanism was described for CD19-CAR T cells (34).

Membrane fragment could also be released by donor cells, as extracellular vesicles. T cells could release TCR enriched extracellular vesicles during TCR engagement and activation with APCs (35). Those extracellular vesicles are transferred to B cells or dendritic cells and could activate them (36). In our case, BTN2A1 regulation involves cell-cell interaction, and we could not demonstrate soluble compound participation.

Trogocytosed BTN2A1 was functional and restored tumor cell sensitivity to Vγ9Vδ2 T cell killing but could also induce fratricide against autologous lymphocytes *in vitro*. A similar phenomenon was described for NK cells and NKG2D/NKG2DL. Indeed, NKG2DL acquisition though trogocytosis was associated with NK cell fratricide by neighboring NK cells *in vitro* and *in vivo* (37). However, NKG2DL acquisition by T cells through trogocytosis with tumor cell was associated with NK cells activation and lysis against cancer cells (38). Trogocytosis could represent an additional mechanism of negative regulation of activated immune cells, but can also improve their antitumor activity depending on the actors involved in the membranous exchange.

BTN2A1 trogocytosis was also identified *ex vivo*, in patients with endometrial carcinoma; and is correlated with clinical stage. However, we did not observe trogocytosis on healthy volunteers. As previously described, our data confirmed that B and T cells trogocytosis implicate activated APCs/monocytes. It could reflect the immune response associated cancer progression, in the tumor microenvironment or in secondary lymphoid structures.

The impact of BTN2A1 trogocytosis in cancer conditions has to be elucidated, especially in the context of Vγ9Vδ2 T immunotherapy. Indeed, BTN2A1 overexpression on tumor cells could be beneficial for tumor detection and elimination; but overexpression of BTN2A1 on circulating or tumor infiltrating immune cells could have various effects. Fratricide against immunosuppressive cells (Tregs or MDSCs) will be beneficial and synergic in anti-tumor activity. But targeting anti-tumor competent immune cell, especially in tertiary lymphoid structures that concentrate high density of B and T cells with APCs (39), will have the opposite effect. This could explain resistance or hyperprogression with Vγ9Vδ2 T targeted immunotherapy (40).

Immune checkpoints regulation by trogocytosis and its role in the modulation of immune cell function is now well documented (41). Protein expression analyses are mandatory for immunomonitoring studies, especially with transcriptomic based approaches that will underestimate protein transfer between cells. The expression of the target could be underestimated on tumor cells as well as in non-tumor cells and be responsible of off-target toxicities of immunotherapies. This can also be problematic for multiparametric cytometry analyses of the tumor microenvironment or PBMCs, because dimensionality reduction and clustering algorithms process high numbers of parameters associated with cell characteristics and markers transfer between different cell types could reduce their ability to separate the different cell population or impair their clustering abilities.

REFERENCES

1. Adams EJ, Gu S, Luoma AM. Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition. Cell Immunol. 2015;296:31–40.

2. Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vγ2Vδ2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. Immunol Rev. 2007;215:59–76.

3. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. Nature. 1995;375:155–8.

4. Heuston S, Begley M, Gahan CGM, Hill C. Isoprenoid biosynthesis in bacterial pathogens. Microbiology. Microbiology Society,; 2012;158:1389–401.

5. Rhodes DA, Stammers M, Malcherek G, Beck S, Trowsdale J. The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex. Genomics. 2001;71:351–62.

6. Blazquez J-L, Benyamine A, Pasero C, Olive D. New Insights Into the Regulation of γδ T Cells by BTN3A and Other BTN/BTNL in Tumor Immunity. Front Immunol. 2018;9:1601.

7. Cubillos-Ruiz JR, Martinez D, Scarlett UK, Rutkowski MR, Nesbeth YC, Camposeco-Jacobs AL, et al. CD277 is a Negative Co-stimulatory Molecule Universally Expressed by Ovarian Cancer Microenvironmental Cells. Oncotarget. 2010;1:329–38.

8. Cano CE, Pasero C, De Gassart A, Kerneur C, Gabriac M, Fullana M, et al. BTN2A1, an immune checkpoint targeting Vγ9Vδ2 T cell cytotoxicity against malignant cells. Cell Rep. 2021;36:109359.

9. Sandstrom A, Peigné C-M, Léger A, Crooks JE, Konczak F, Gesnel M-C, et al. The Intracellular B30.2 Domain of Butyrophilin 3A1 Binds Phosphoantigens to Mediate Activation of Human Vγ9Vδ2 T Cells. Immunity. 2014;40:490–500.

10. Rigau M, Ostrouska S, Fulford TS, Johnson DN, Woods K, Ruan Z, et al. Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by γδ T cells. Science. 2020;367:eaay5516.

11. Karunakaran MM, Willcox CR, Salim M, Paletta D, Fichtner AS, Noll A, et al. Butyrophilin-2A1 Directly Binds Germline-Encoded Regions of the Vγ9Vδ2 TCR and Is Essential for Phosphoantigen Sensing. Immunity. 2020;52:487-498.e6.

12. Fulford TS, Soliman C, Castle RG, Rigau M, Ruan Z, Dolezal O, et al. Vγ9Vδ2 T cells recognize butyrophilin 2A1 and 3A1 heteromers. Nat Immunol. Nature Publishing Group; 2024;25:1355–66.

13. Mamedov MR, Vedova S, Freimer JW, Sahu AD, Ramesh A, Arce MM, et al. CRISPR screens decode cancer cell pathways that trigger γδ T cell detection. Nature. Nature Publishing Group; 2023;621:188–95.

14. Ben Amara A, Rouviere M-S, Fattori S, Wlosik J, Gregori E, Boucherit N, et al. High-throughput mass cytometry staining for deep phenotyping of human natural killer cells. STAR Protoc. 2022;3:101768.

15. Bekeredjian-Ding IB, Wagner M, Hornung V, Giese T, Schnurr M, Endres S, et al. Plasmacytoid Dendritic Cells Control TLR7 Sensitivity of Naive B Cells via Type I IFN.

16. Fowler DW, Copier J, Dalgleish AG, Bodman-Smith MD. Zoledronic acid causes γδ T cells to target monocytes and down-modulate inflammatory homing. Immunology. 2014;143:539–49.

17. De Gassart A, Le K-S, Brune P, Agaugué S, Sims J, Goubard A, et al. Development of ICT01, a first-in-class, anti-BTN3A antibody for activating Vγ9Vδ2 T cell–mediated antitumor immune response. Sci Transl Med. 2021;13:eabj0835.

18. Gober H-J, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. J Exp Med. 2003;197:163–8.

19. Li J, Herold MJ, Kimmel B, Müller I, Rincon-Orozco B, Kunzmann V, et al. Reduced expression of the mevalonate pathway enzyme farnesyl pyrophosphate synthase unveils recognition of tumor cells by Vgamma9Vdelta2 T cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2009;182:8118–24.

20. Starick L, Riano F, Karunakaran MM, Kunzmann V, Li J, Kreiss M, et al. Butyrophilin 3A (BTN3A, CD277)-specific antibody 20.1 differentially activates Vγ9Vδ2 TCR clonotypes and interferes with phosphoantigen activation. Eur J Immunol. 2017;47:982–92.

21. Yang Y, Li L, Yuan L, Zhou X, Duan J, Xiao H, et al. A Structural Change in Butyrophilin upon Phosphoantigen Binding Underlies Phosphoantigen-Mediated Vγ9Vδ2 T Cell Activation. Immunity. 2019;50:1043-1053.e5.

22. Benyamine A, Le Roy A, Mamessier E, Gertner-Dardenne J, Castanier C, Orlanducci F, et al. BTN3A molecules considerably improve Vγ9Vδ2T cells-based immunotherapy in acute myeloid leukemia. Oncoimmunology. 2016;5:e1146843.

23. Benyamine A, Loncle C, Foucher E, Blazquez J-L, Castanier C, Chrétien A-S, et al. BTN3A is a prognosis marker and a promising target for Vγ9Vδ2 T cells based-immunotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Oncoimmunology. 2017;7:e1372080.

24. Hasim MS, Marotel M, Hodgins JJ, Vulpis E, Makinson OJ, Asif S, et al. When killers become thieves: Trogocytosed PD-1 inhibits NK cells in cancer. Sci Adv. 2022;8:eabj3286.

25. Rekik R, Belhadj Hmida N, Ben Hmid A, Zamali I, Kammoun ns, Ben Ahmed M. PD-1 induction through TCR activation is partially regulated by endogenous TGF-β. Cell Mol Immunol. 2015;12:648–9.

26. Kawashima M, Carreras J, Higuchi H, Kotaki R, Hoshina T, Okuyama K, et al. PD-L1/L2 protein levels rapidly increase on monocytes via trogocytosis from tumor cells in classical Hodgkin lymphoma. Leukemia. Nature Publishing Group; 2020;34:2405–17.

27. Nakayama M, Hori A, Toyoura S, Yamaguchi S-I. Shaping of T Cell Functions by Trogocytosis. Cells. 2021;10:1155.

28. Schriek P, Ching AC, Moily NS, Moffat J, Beattie L, Steiner TM, et al. Marginal zone B cells acquire dendritic cell functions by trogocytosis. Science. 2022;375:eabf7470.

29. Machlenkin A, Uzana R, Frankenburg S, Eisenberg G, Eisenbach L, Pitcovski J, et al. Capture of tumor cell membranes by trogocytosis facilitates detection and isolation of tumor-specific functional CTLs. Cancer Res. 2008;68:2006–13.

30. Gonzalez VD, Huang Y-W, Delgado-Gonzalez A, Chen S-Y, Donoso K, Sachs K, et al. High-grade serous ovarian tumor cells modulate NK cell function to create an immune-tolerant microenvironment. Cell Rep. 2021;36:109632.

31. Shin JH, Jeong J, Maher SE, Lee H-W, Lim J, Bothwell ALM. Colon cancer cells acquire immune regulatory molecules from tumor-infiltrating lymphocytes by trogocytosis. Proc Natl Acad Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences; 2021;118:e2110241118.

32. Rossi EA, Goldenberg DM, Michel R, Rossi DL, Wallace DJ, Chang C-H. Trogocytosis of multiple B-cell surface markers by CD22 targeting with epratuzumab. Blood. 2013;122:3020–9.

33. Li Y, Basar R, Wang G, Liu E, Moyes JS, Li L, et al. KIR-based inhibitory CARs overcome CAR-NK cell trogocytosis-mediated fratricide and tumor escape. Nat Med. 2022;28:2133–44.

34. Hamieh M, Dobrin A, Cabriolu A, van der Stegen SJC, Giavridis T, Mansilla-Soto J, et al. CAR T cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumour antigen escape. Nature. Nature Publishing Group; 2019;568:112–6.

35. Choudhuri K, Llodrá J, Roth EW, Tsai J, Gordo S, Wucherpfennig KW, et al. Polarized release of TCR-enriched microvesicles at the T cell immunological synapse. Nature. 2014;507:118–23.

36. Kim H-R, Mun Y, Lee K-S, Park Y-J, Park J-S, Park J-H, et al. T cell microvilli constitute immunological synaptosomes that carry messages to antigen-presenting cells. Nat Commun. Nature Publishing Group; 2018;9:3630.

37. Nakamura K, Nakayama M, Kawano M, Amagai R, Ishii T, Harigae H, et al. Fratricide of natural killer cells dressed with tumor-derived NKG2D ligand. Proc Natl Acad Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences; 2013;110:9421–6.

38. Domaica CI, Fuertes MB, Rossi LE, Girart MV, Ávila DE, Rabinovich GA, et al. Tumour-experienced T cells promote NK cell activity through trogocytosis of NKG2D and NKp46 ligands. EMBO Rep. 2009;10:908–15.

39. Horeweg N, Workel HH, Loiero D, Church DN, Vermij L, Léon-Castillo A, et al. Tertiary lymphoid structures critical for prognosis in endometrial cancer patients. Nat Commun. 2022;13:1373.

40. Wermke M, Marabelle A, Jungels C, Bono JD, Vey N, Vicier C, et al. 503 Clinical activity of ICT01, an anti-BTN3A-targeted, γ9δ2-activating mAb, alone and in combination with pembrolizumab in patients with advanced/refractory solid tumors: EVICTION trial. J Immunother Cancer [Internet]. BMJ Specialist Journals; 2021 [cited 2024 Apr 9];9. Available from: https://jitc.bmj.com/content/9/Suppl_2/A535

41. Miyake K, Karasuyama H. The Role of Trogocytosis in the Modulation of Immune Cell Functions. Cells. 2021;10:1255.

ABREVIATIONS

ANOVA: analysis of variance

BTN: butyrophilin

CAR: chimeric antigen receptor

DMSO: dimethyl sulfoxide

IPP: isopentanyl-pyrophosphate

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting

FC: Fold-Change

FCS: Fetal Calf Serum

FIGO: Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique

MESF: Molecules of Equivalent Soluble Fluorophores

MFI: Median Fluorescence Intensity

PBMCs: peripheral blood mononuclear cells

PFA: Paraformaldehyde

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RT: Room Temperature

TCR: T cell receptor

TLR: Toll Like Receptor

TNFα: Tumor Necrosis Factor α

UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection

DATA AVAILABILITY

The data generated in this study are available upon request from the corresponding author.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Human blood sample from healthy volunteers were obtained from the EFS (Etablissement Français du Sang); [authorization number, issued by the Ministry of Higher Education, Research and Innovation, AC-2019-3428]. Human blood from endometrial cancer were obtained from the GCBio protocol (NCT01977274), in two centers in France (Institut Paoli-Calmettes, Marseille and Assistance Publique Hopitaux de Marseille, Marseille, France). All participants gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The institutional review board of the Paoli-Calmettes Institute and the Committee for the protection of persons (CPP) Sud Mediterranée I approved the protocol.

FIGURES AND TABLES

Figure 1. BTN2A1 induction by CD3/CD28 stimulation is a late process and dependent on NFAT pathway. BTN2A1 expression (MESF +/- SEM) assessed by spectral cytometry on $CD4^+$ T cells **(A)**, $CD8^+$ T cells **(B)**, γδ2 T cells **(C)**, and NK cells **(D)** of healthy donors (n = 3). BTN2A1 induction on immune cells with or without ciclosporin (n = 3). **(E)** Representative pseudocolor plot of 1 healthy donor. **(F)** Frequency of BTN2A1 positive cells (mean +/- SEM). **(G)** BTN2A1 Median Fluorescence Intensity (mean +/- SEM). Mann-Whitney test for two-group comparison. ANOVA for multiple groups comparison. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p< 0,001$; **** $p < 0,0001$

Figure 2. BTN2A1 expression is acquired by an exogenous pathway and requires cell-cell interactions. **(A)** BTN2A1 protein (left panel) and BTN2A1 mRNA (right panel) with (Stim) or without (Basal) stimulation at day 5 (n = 6) (mean +/- SEM). **(B)** Conditioned supernatant assay. BTN2A1 expression (% of positive cells +/- SEM) on T and B cells after 48 hours of culture without or without 5 days stimulated PBMC supernatant (SN). Stim reference correspond to 5 days stimulated-PBMCs (n = 3). **(C)** Transwell assay. BTN2A1 expression on B and T cells after 5 days of CD3/CD28 stimulation in normal or transwell condition (Tr) (n=3). **(D)** CD33 expression and BTN2A1 expression on T and B cells with ou without CD3/CD28 stimulation at D5 (mean +/- SEM). Mann-Whitney test for two-group comparison. ANOVA for multiple groups comparison. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p< 0,001$; **** $p < 0,0001$

Figure 3. BTN2A1 expression is acquired by trogocytosis and BTN2A1^{high} cells are sensitive to Vδ2 T cell lysis. (A) CD14+ cell staining with PKH67 and coculture with CD14- cells. BTN2A1 and PKH67 MFI on B cells **(B)** and T cells **(C)** after 5 days of culture in basal condition (B) or with αCD3/αCD28 (S1) or loxoribine/IFN α stimulation (S2) (mean +/- SEM) (n = 4) **(D)** Pearson correlation between BTN2A1 and PKH67 variation. **(E)** PKH67 inclusion on B cells membrane observed by confocal microscopy. *Magnification x40*. **(F)** Vδ2 T cells cytotoxicity assay against PKH67+ cells. Propidium iodide staining of PKH67^{+} and PKH67^{-} CD14^{-} PBMC after 1hr of culture with or without Vδ2 T cells. (mean +/- SEM) (left panel). Representative cytometry staining (right panel). Mann-Whitney test for two-group comparison. ANOVA for multiple groups comparison. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p< 0,001; **** p < 0,0001

Figure 4. BTN2A1 acquisition by trogocytosis could restaure Daudi cell line sensitivity to Vδ2 T cells lysis. BTN2A1 expression according to TPH-1 coculture. **(A)** BTN2A1 MFI variation in Daudi cells according to BTN2A1 KO Daudi:TPH-1 ratio. **(B)** Pearson Correlation between BTN2A1 and PKH67 variation. **(C)** BTN2A1 expression according to PKH67 status. **(D)** BTN2A1 mRNA expression levels in Daudi cells (mean +/- SEM). **(E)** BTN2A1 expression on Daudi cell line after 2 days of coculture with THP-1 cell line (ratio 1:5). **(F)** Caspase 3/7 assay after 1 hr of Daudi- Vδ2 T cell coculture for 1 hr. Representative staining (Top panel) and quantification (Bottom panel) (mean +/- SEM). Mann-Whitney test for two-group comparison. ANOVA for multiple groups comparison. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p< 0,001; **** p < 0,0001

Figure 5. Trogocytosed BTN2A1 is associated with activated monocytes in patients with endometrial cancer. Manuel gating of CD19+CD33+ **(A)** and CD3+CD33+ **(B)** cells. **(C)** UMAP dimensionality reduction of CD45+ cells. **(D)** Proportion of trogocyted cells according to clinical stage. **(E)** BTN2A1 expression on CD3 and CD19 cells according to trogocytosis status. **(F)** UMAP dimensionality reduction of CD33+ cells according to the trogocyted cells, and **(G)** DENSVM clustering. Heatmap **(H)** and histogram **(I)** representing the expression of the different markers according to DENSVM subgroups. **(J)** Manual gating of activated monocytes (mean +/- SEM). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p< 0,001; **** p < 0,0001

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 1. Spectral cytometry panel

Supplementary Figure 1. Gating strategy for spectral flow cytometry panel

Supplementary Table 2. Flow cytometry panels

Supplementary Table 3. Mass cytometry panel

Supplementary Figure 2. Vδ2 T cells cytotoxicity against PKH67+ cells assessed by Caspase Glo assay.

Supplementary Table 4. GCBio patients' characteristics

Supplementary Figure 3. DENVM cluster's proportion according to trogocytosis group

Supplementary Figure 4. Myeloid cells Gating strategy with mass cytometry panel

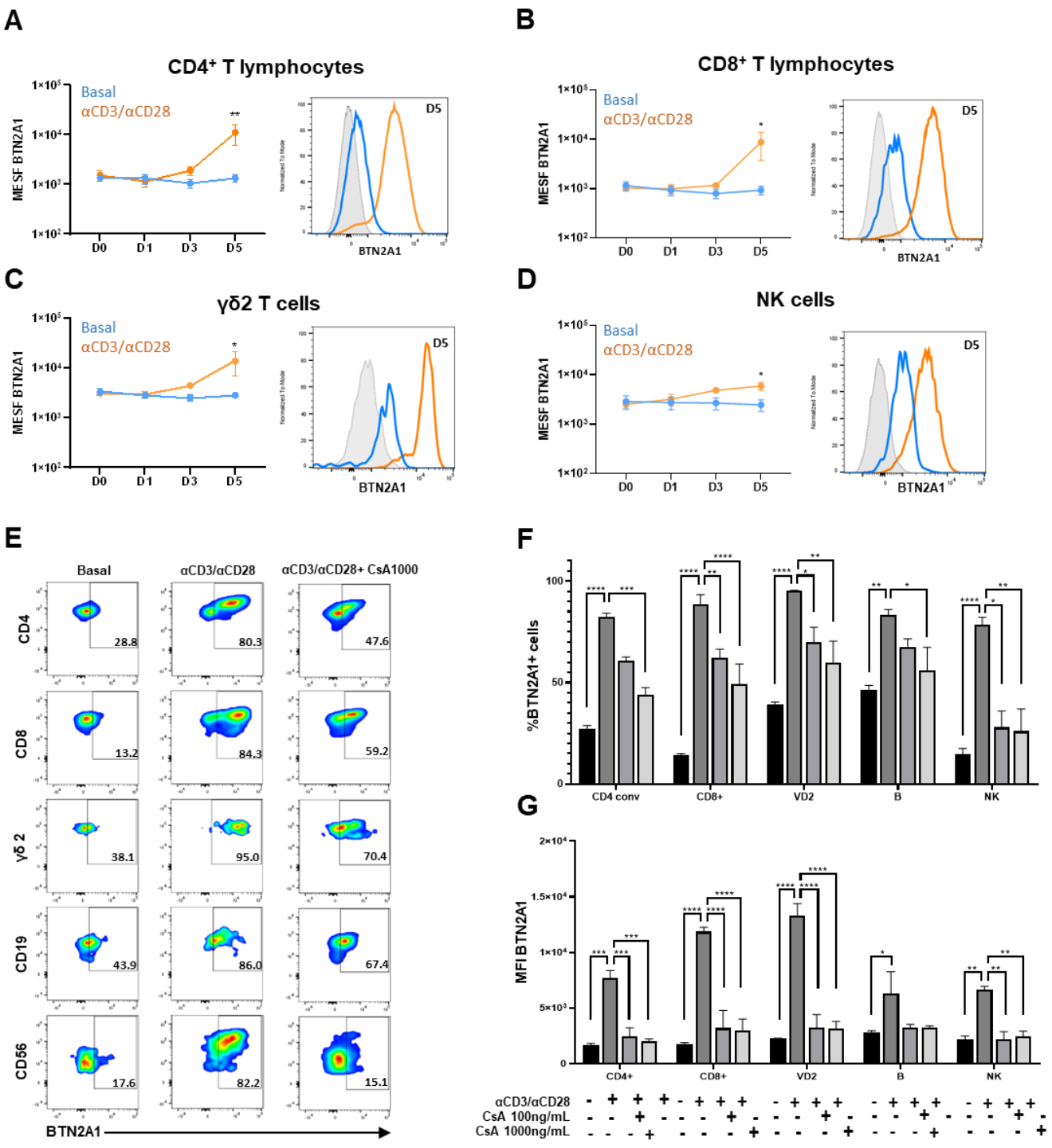


Figure 1. BTN2A1 induction by CD3/CD28 stimulation is a late process and dependent on NFAT pathway.
BTN2A1 expression (MESF +/- SEM) assessed by spectral cytometry on CD4⁺ T cells (**A**), CD8⁺ T cells (**B**), γδ2 T cells (**C**), and NK cells (**D**) of healthy donors (n = 3, 2 independant experiments). BTN2A1 induction on immune cells with or without cyclosporin A (CsA) (n = 3). (**E**) Representative pseudocolor plot of 1 healthy donor. (**F**) Frequency of BTN2A1 positive cells (mean +/- SEM). (**G**) BTN2A1 Median Fluorescence Intensity (mean +/- SEM). Mann-Whitney test for two-group comparison. ANOVA for multiple groups comparison.
* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p< 0,001; **** p < 0,0001

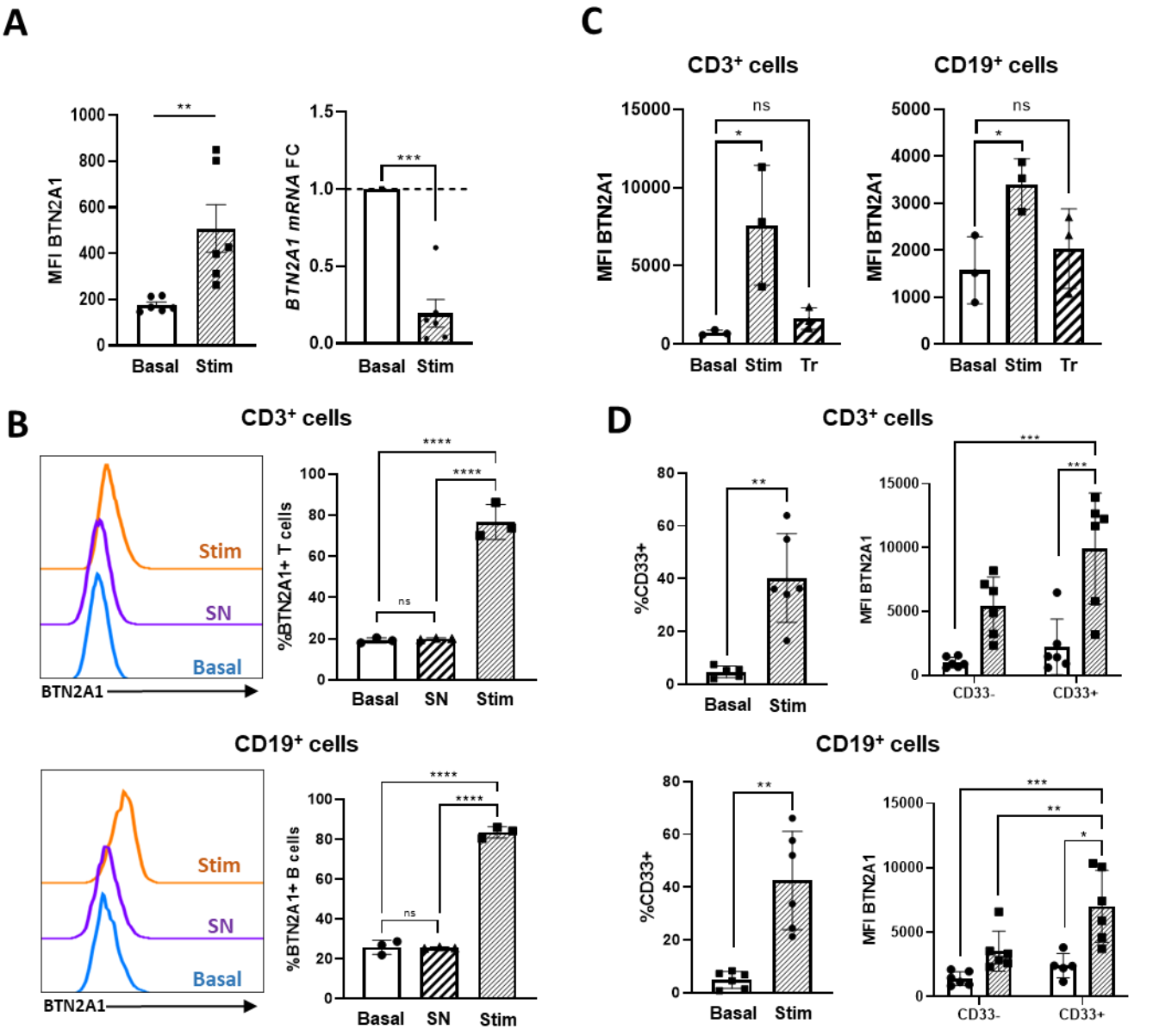


Figure 2. BTN2A1 expression is acquired by an exogenous pathway and requires cell-cell interactions.
(**A**) BTN2A1 protein (left panel) and *BTN2A1 mRNA* (right panel) with (Stim) or without (Basal) stimulation at day 5 (n = 6) (mean +/- SEM). (**B**) Conditioned supernatant assay. BTN2A1 expression (% of positive cells +/- SEM) on T and B cells after 48 hours of culture without or without 5 days stimulated PBMC supernatant (SN). Stim reference correspond to 5 days stimulated-PBMCs (n = 3). (**C**) Transwell assay. BTN2A1 expression on B and T cells after 5 days of CD3/CD28 stimulation in normal or transwell condition (Tr) (n=3). (**D**) CD33 expression and BTN2A1 expression on T and B cells with ou without CD3/CD28 stimulation at D5 (mean +/- SEM).
Mann-Whitney test for two-group comparison. ANOVA for multiple groups comparison.
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

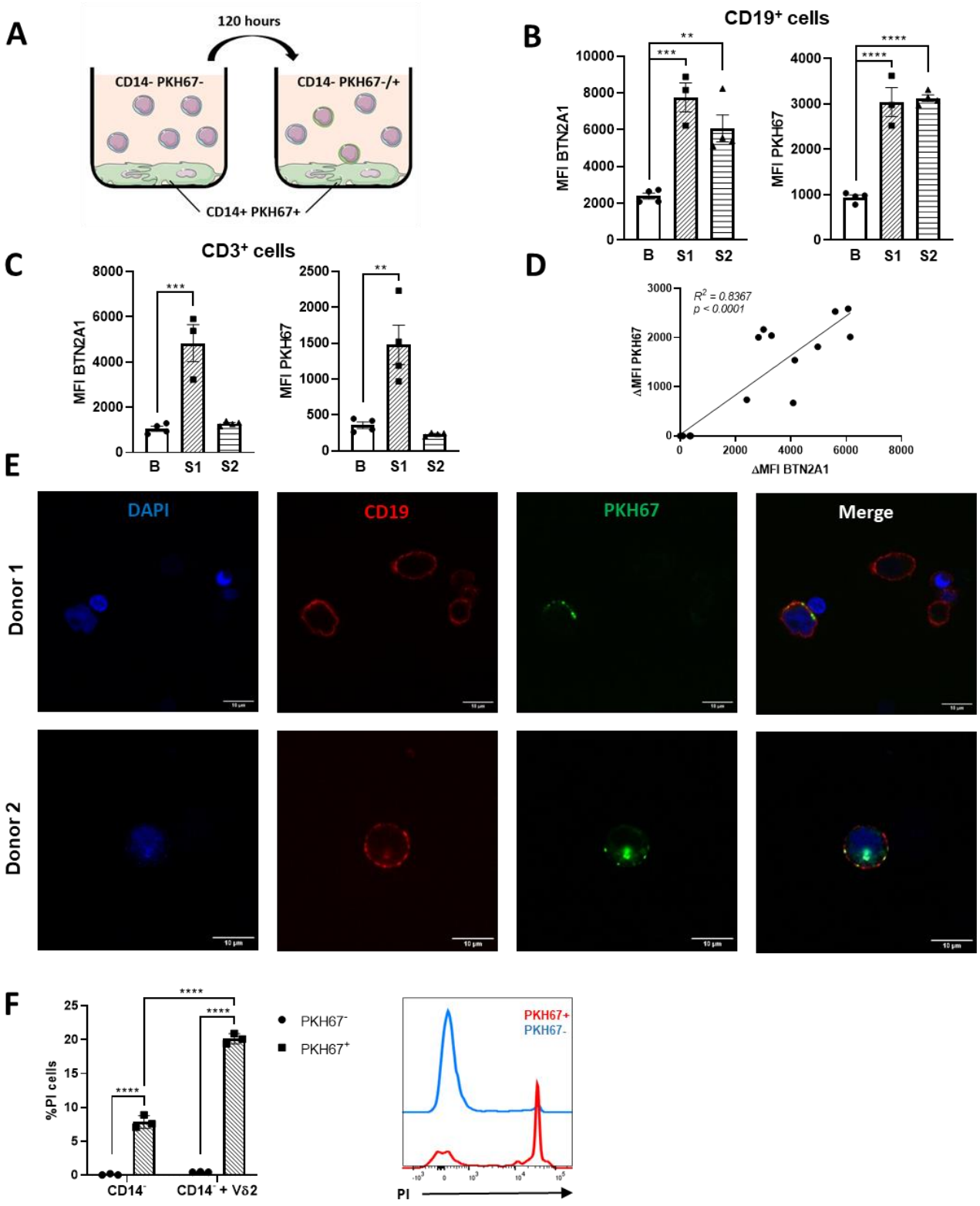


Figure 3. BTN2A1 expression is acquired by trogocytosis and BTN2A1^{high} cells are sensitive to Vδ2 T cell lysis.
(**A**) CD14+ cell staining with PKH67 and coculture with CD14- PBMC cells. BTN2A1 and PKH67 MFI on B cells (**B**) and T cells (**C**) after 5 days of culture in basal condition (B) or with αCD3/αCD28 (S1) or loxoribine/IFN α stimulation (S2) (mean +/- SEM) (n = 4) (**D**) Pearson correlation between BTN2A1 and PKH67 variation. (**E**) PKH67 inclusion on B cells membrane observed by confocal microscopy. *Magnification x40*. (**F**) Vδ2 T cells cytotoxicity assay against PKH67+ cells. Propidium iodide staining of PKH67$^+$ and PKH67$^-$ CD14$^-$ PBMC after 1hr of culture with or without Vδ2 T cells. (mean +/- SEM) (left panel). Representative cytometry staining (right panel).
Mann-Whitney test for two-group comparison. ANOVA for multiple groups comparison.
* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p< 0,001; **** p < 0,0001

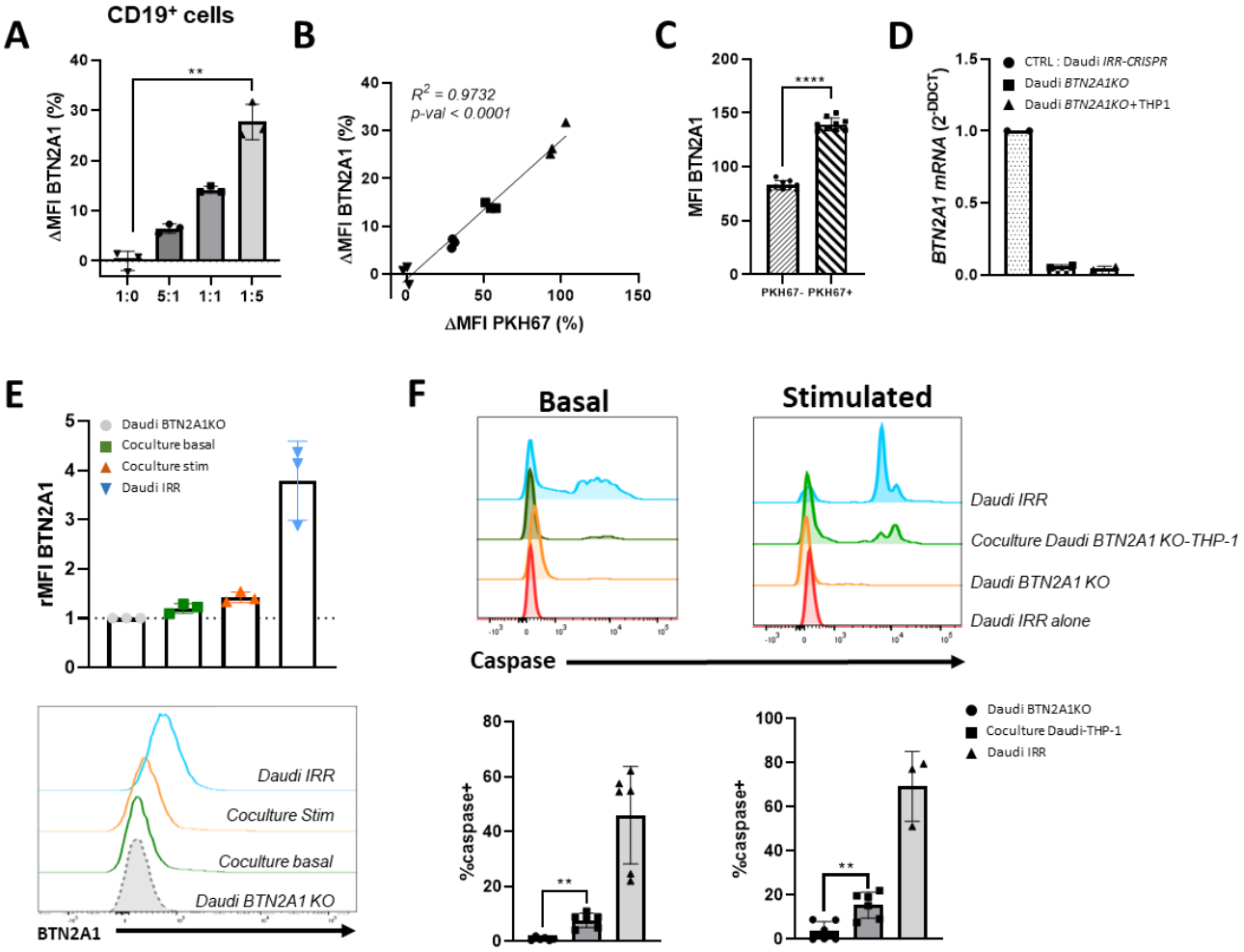


Figure 4. BTN2A1 acquisition by trogocytosis could restaure Daudi cell line sensitivity to Vδ2 T cells lysis

BTN2A1 expression according to TPH-1 coculture. (**A**) BTN2A1 MFI variation in Daudi cells according to BTN2A1 KO Daudi:TPH-1 ratio. (**B**) Pearson Correlation between BTN2A1 and PKH67 variation. (**C**) BTN2A1 expression according to PKH67 status. (**D**) *BTN2A1* mRNA expression levels in Daudi cells (mean +/- SEM). (**E**) BTN2A1 expression on Daudi cell line after 2 days of coculture with THP-1 cell line (ratio 1:5). (**F**) Caspase 3/7 assay after 1 hr of Daudi- Vδ2 T cell coculture for 1 hr. Representative staining (Top panel) and quantification (Bottom panel) (mean +/- SEM).

Mann-Whitney test for two-group comparison. ANOVA for multiple groups comparison.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p< 0,001; **** p < 0,0001

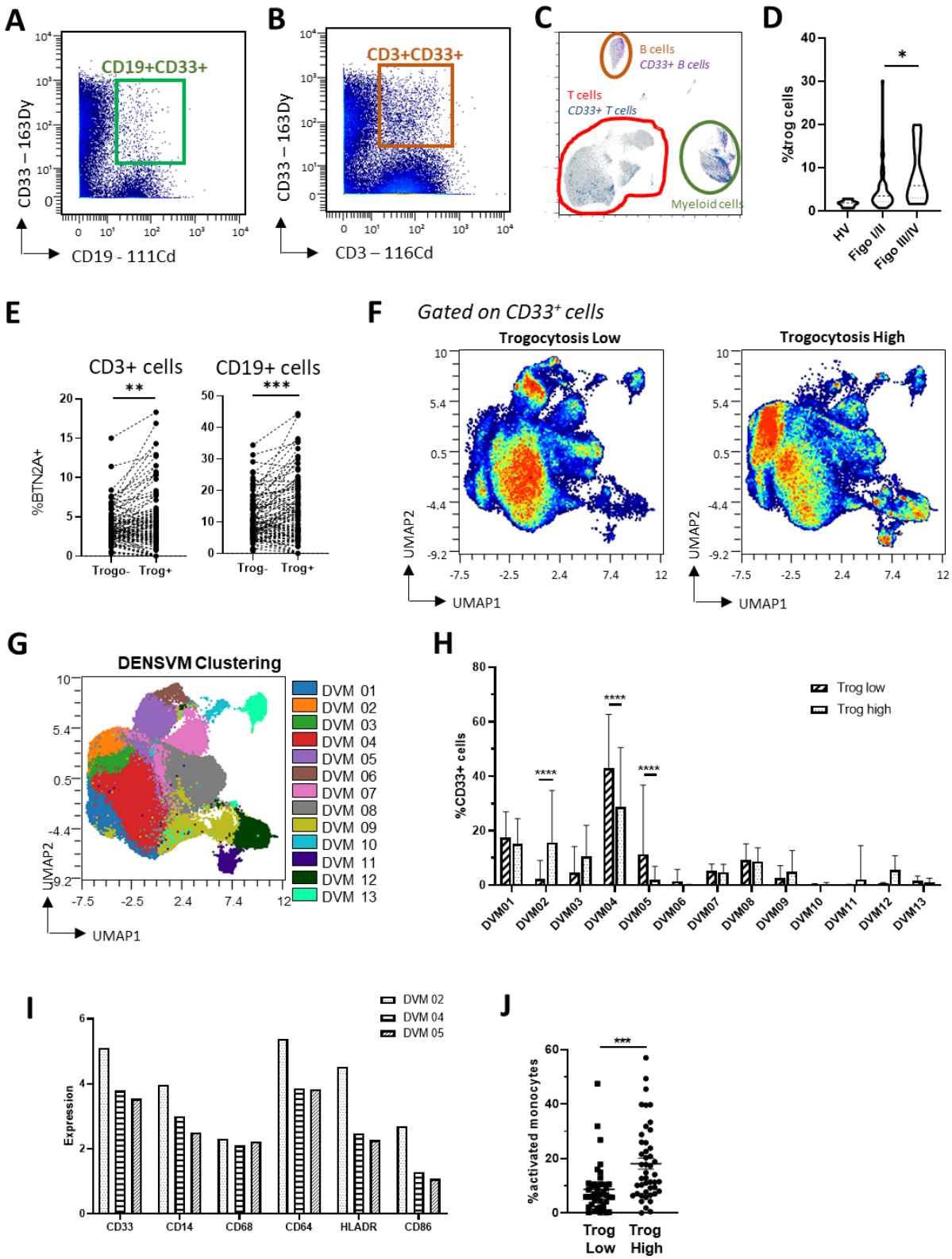
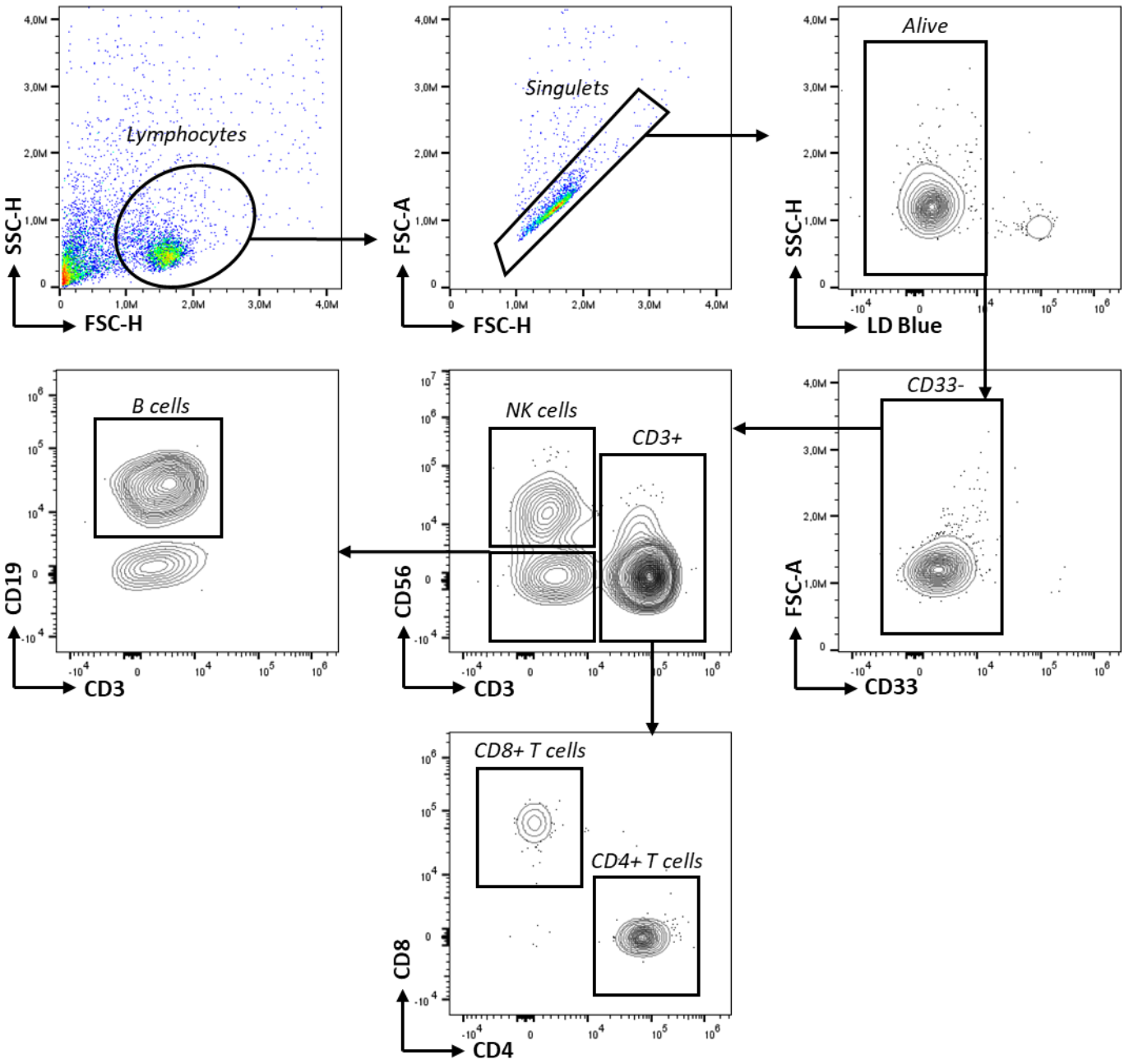


Figure 5. Captured BTN2A1 is associated with activated monocytes in patients with endometrial cancer. Manuel gating of CD19+CD33+ (**A**) and CD3+CD33+ (**B**) cells. (**C**) UMAP dimensionality reduction of CD45+ cells. (**D**) Proportion of trogocyted cells according to clinical stage. (**E**) BTN2A1 expression on CD3 and CD19 cells according to trogocytosis status. (**F**) UMAP dimensionality reduction of CD33+ cells according to the trogocyted cells, and (**G**) DENSVM clustering. (**H**) Distribution of DENSVM cluster according to trogocytosis status. (**I**) Histogram representing the expression of the different markers according to DENSVM subgroups. (**J**) Manual gating of activated monocytes. (mean +/- SEM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Supplementary Table 1. Spectral cytometry panel

Antibodies	Clone	Reference	Supplier
CD8-BUV395	RPA-T8	563796	BD Biosciences
LiveDead Blue		L23105	ThermoFisher Scientific
CD3-BUV496	UCTH1	612941	BD Biosciences
VD2-BUV615	B6	751368	BD Biosciences
PD-L1-BUV661	MIH1	741666	BD Biosciences
CD56-BUV737	NCAM16.2	612766	BD Biosciences
CD16-BUV805	3G8	748850	BD Biosciences
CD25-BV421	BC96	302629	Biolegend
CD19-BV570	HIB19	302235	Biolegend
CD4-BV605	RPA-T4	562659	BD Biosciences
CD33-BV750	P67.6	746985	BD Biosciences
LAG3-BV785	11C3C65	369321	Biolegend
BTN3A-AF488	108.5	Homemade	Homemade
BTLA-PE	MIH26	344505	Biolegend
CD127-PE-Dazzle594	A019D5	351335	Biolegend
TIM3-PECy5	F38-2E2	345051	Biolegend
VD1-PECy7	TS8.2	25-5679-41	Invitrogen
BTN2A1-AF647	7.48	Homemade	Homemade

Supplementary Figure 1. Gating strategy for spectral flow cytometry panel
LD; LiveDead



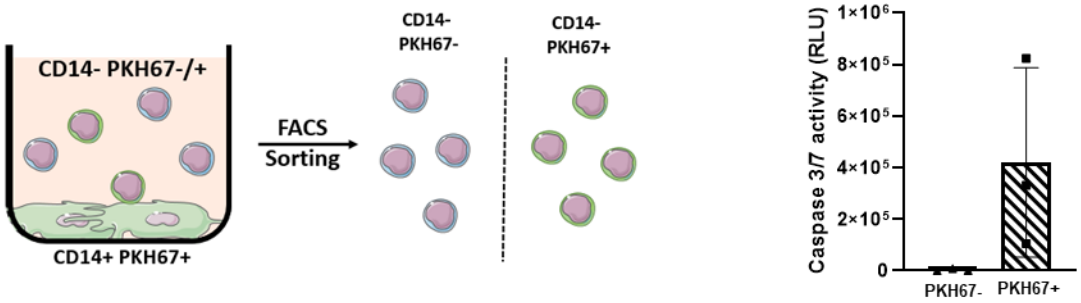
Supplementary Table 2. Flow cytometry panels

Antibodies	Clone	Reference	Supplier
Conditionned supernatant assay			
CD19-FITC	HIB19	302206	Biolegend
CD33-PECy7	WM-53	25-0338-42	eBioscience
CD3-PE	SP34-2	552127	BD Biosciences
BTN2A1-AF647	7.48	Homemade	Homemade
LiveDead NIR		L10119	Invitrogen
Membrane exchange experiments			
CD19-PECy7	SJ25C1	557835	BD Biosciences
BTN2A1-AF647	7.48	Homemade	Homemade
PKH67		MINI67-1KT	Sigma-Aldrich
LiveDead NIR		L10119	Invitrogen

Supplementary Table 3. Mass cytometry panel

Antibodies	Clone	Reference	Supplier
209Bi-CD11b	ICRF44	BLE318456	BioLegend
106Cd-CD10	HI10a	3158011B	Standard BioTools
110Cd-CD11c	BU15	BLE337221	Biolegend
111Cd-CD19	HIB19	RUO302201	Biolegend
112Cd-CD206	15-2	RUO321101	Biolegend
116Cd-CD3	UCHT1	SJ250416	IT
161Dy-CD80	2D10.4	3161023B	Standard BioTools
162Dy-CD209	DC-SIGN	RUO380402	Biolegend
163Dy-CD33	WM53	3163023B	Standard BioTools
164Dy-CD15	W6D3	323035	BioLegend
167Er-CD1a	HI149	3167012B	Standard BioTools
170Er-CD56	HCD56	318345	BioLegend
151Eu-CD24	ML5	311102	BioLegend
153Eu-CD192-CCR2	K036C2	3153023B	Standard BioTools
155Gd-CD1c	L161	331502	BioLegend
156Gd-TREM2	237920	FAB17291P	R&D Systems
158Gd-SIRPa	15-414	372102	BioLegend
160Gd-ICT01	20.1	homemade	ImCheck Ther.
165Ho-CD40	5C3	3165005B	Standard BioTools
115In-CD163	GHI/61	333602	BioLegend
175Lu-PD-L1	29E.2A3	3175017B	Standard BioTools
143Nd-CD123	6H6	3143014B	Standard BioTools
144Nd-CD195-CCR5	NP-6G4	3144007A	Standard BioTools
145Nd-CD16	3G8	3145008B	Standard BioTools
146Nd-CD64	10,1	3146006B	Standard BioTools
148Nd-CD14	RMO52	3148010B	Standard BioTools
150Nd-CD86	IT2.2	3150020B	Standard BioTools
141Pr-CD68	Y1/82A	333802	BioLegend
147Sm-CD303	201A	3147009B	Standard BioTools
149Sm-CD141	M80	344102	BioLegend
152Sm-ICT03	8.16	homemade	ImCheck Ther.
154Sm-IL6	MQ2-13A5	3154011B	Standard BioTools
159Tb-ICOSL	2D3	309402	BioLegend
169Tm-CD1d	51.1	350302	BioLegend
89Y-CD45	HI30	3089003B	BioLegend
171Yb-ILT4	42D1	900005981	BioLegend
172Yb-PD-L2	24F.10C12	3172014B	Standard BioTools
173Yb-HLADR	L243	3173005B	Standard BioTools
174Yb-PVR	TX24	900005970	BioLegend
176Yb-Nectin2	TX31	337402	BioLegend

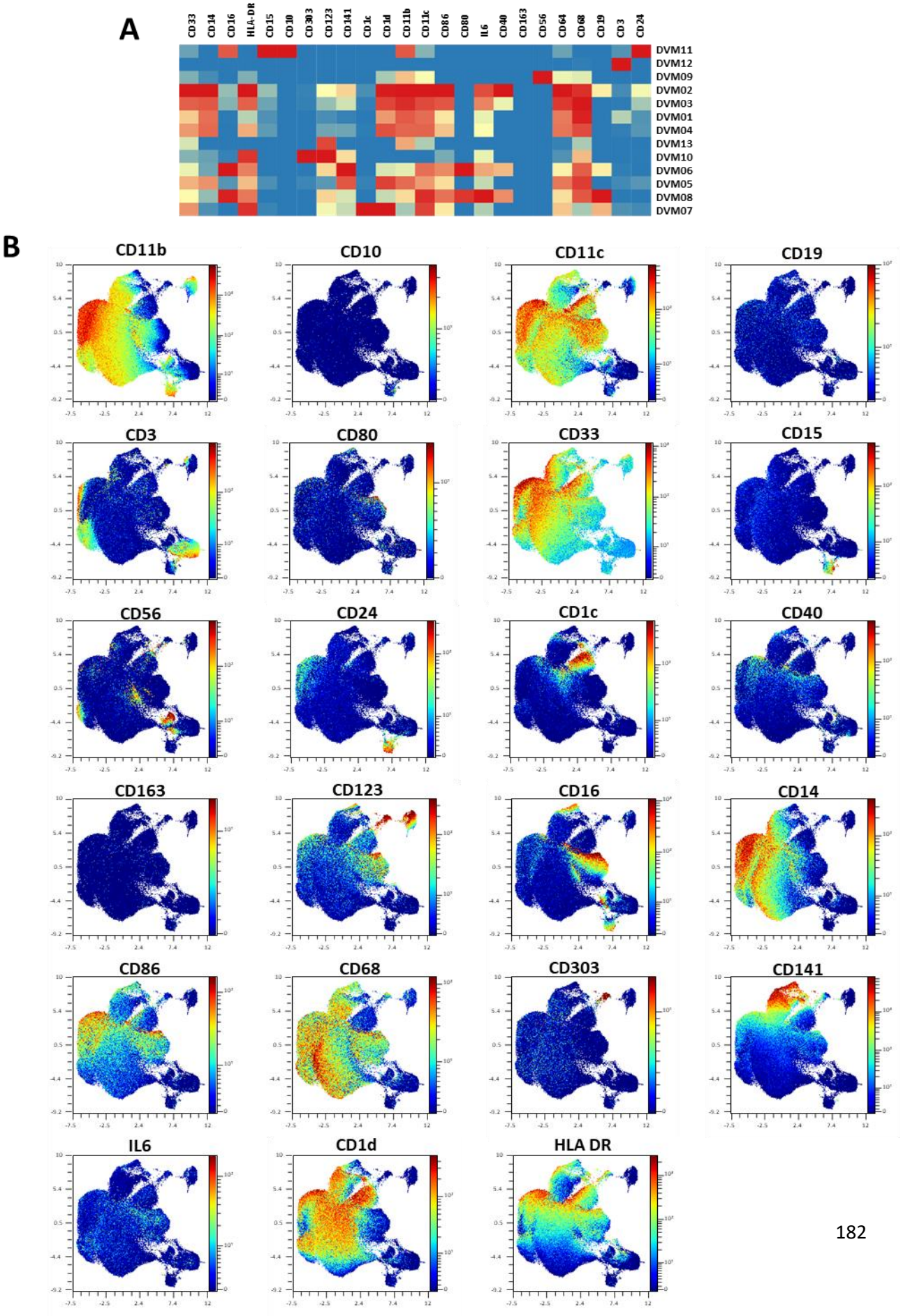
Supplementary Figure 2. Vδ2 T cells cytotoxicity against PKH67+ cells assessed by Caspase Glo assay. (Left panel) CD14- were incubated for 5 days with CD14+ PKH67+ cells. There were then sorted to isolate PKH67+ and PKH67-, and cocultured with Vδ2 cells (ratio 1:1) for 1 hour. (Right panel) Caspase Glow assay after 1h of coculture. (n = 3 independent experiments) (mean +/- SEM).



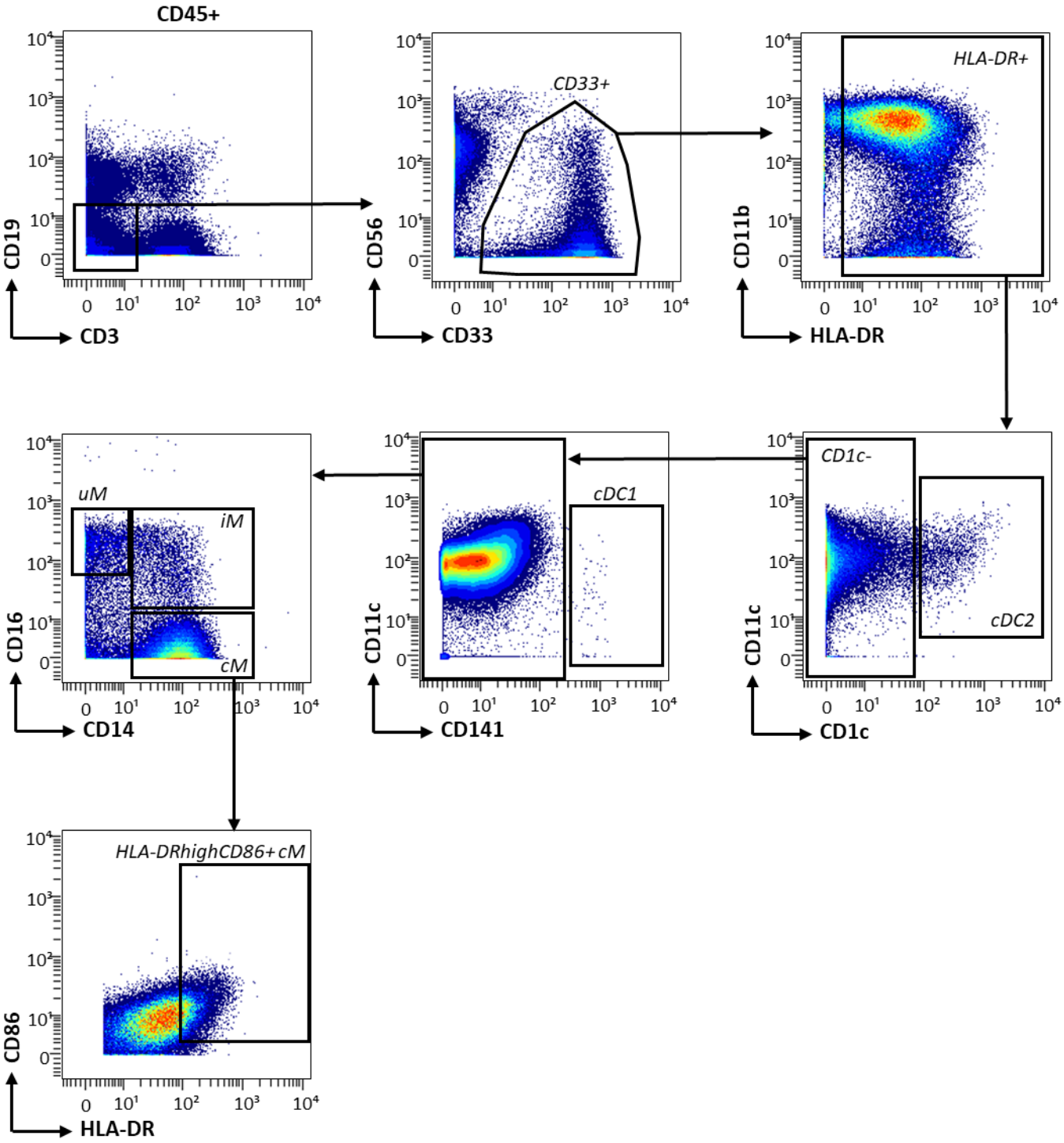
Supplementary Table 4. GCBio patients' characteristics

Characteristics	n (%)
Sex (Female)	67 (100)
Age, median (min - max)	68 (39 - 91)
FIGO	
I	54 (62,1)
II	8 (9,3)
III	12 (13,8)
IV	12 (13,8)
Histology	
Carcinosarcoma	6 (6,9)
Clear cell	1 (1,1)
Endometrioid carcinoma	70 (80,5)
Leiomyosarcoma	1 (1,1)
Serous	6 (6,9)
Mixed	3 (3,5)
De novo Metastatic	12 (13,8)
Lymphovascular space invasion	27 (31,0)

Supplementary Figure 2. High dimensional characterization of circulating myeloid cells.
(A) DEMVS clusters' phenotype assessed by mass cytometry.
(B) Markers' expression projected on UMAP (blue, low expression; red, high expression).



Supplementary Figure 3. Myeloid cells Gating strategy with mass cytometry panel.
uM; unconventional monocytes, iM; intermediaite monocytes, cM; conventional monocytes.



PARTIE 3: Soluble BTN2A1 Is a Potential Prognosis Biomarker in Pre-Treated Advanced Renal Cell Carcinoma

Une partie de mon projet de thèse a consisté à évaluer l'impact pronostique de la forme soluble de BTN2A1 dans d'autres pathologies tumorales. Nous avons pu ainsi identifier que le taux de sBTN2A1 dans le plasma était un facteur pronostic indépendant de survie sans progression dans une cohorte de patients traités pour un carcinome rénal à cellules claires métastatiques en 2ème ligne ou plus par nivolumab, une immunothérapie anti-PD1. Le taux de sBTN2A1 dans le plasma avant traitement permettrait notamment de mieux stratifier les patients considérés comme de bons pronostics (groupe IMDC favorable), ceux ayant un taux élevé de sBTN2A1 présentant des moins bonnes réponses au traitement, similaires aux patients IMDC intermédiaires ou défavorables.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue Frontiers in Immunology :

Soluble BTN2A1 Is a Potential Prognosis Biomarker in Pre-Treated Advanced Renal Cell Carcinoma Emilien Billon, Brice Chanez , Philippe Rochigneux, Laurence Albiges , Cecile Vicier, Geraldine Pignot, Jochen Walz, Anne-Sophie Chretien, Gwenaelle Gravis and Daniel Olive Front. Immunol. 12:670827. doi: 10.3389/fimmu.2021.670827

frontiers in Immunology

PERSPECTIVE
published: 20 April 2021
doi: 10.3389/fimmu.2021.670827

Soluble BTN2A1 Is a Potential Prognosis Biomarker in Pre-Treated Advanced Renal Cell Carcinoma

Emilien Billon[1,2,3], *Brice Chanez*[3], *Philippe Rochigneux*[1,2,3], *Laurence Albiges*[4], *Cécile Vicier*[3], *Géraldine Pignot*[5], *Jochen Walz*[5], *Anne-Sophie Chretien*[1,2], *Gwenaelle Gravis*[3] *and Daniel Olive*[1,2*]

[1] Team Immunity and Cancer, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Inserm, U1068, CNRS, UMR7258, Institut Paoli-Calmettes, Aix-Marseille University, UM105, Marseille, France, [2] Immunomonitoring Department, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France, [3] Department of Medical Oncology, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France, [4] Department of Cancer Medicine, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France, [5] Department of Urology, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Nathalie Labarriere, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), France

Reviewed by:
Maeva Dufies, Centre Scientifique de Monaco, Monaco
Yann-Alexandre Vano, APHP-Paris Centre, France

***Correspondence:**
Daniel Olive
daniel.olive@inserm.fr

Specialty section:
This article was submitted to Cancer Immunity and Immunotherapy, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: 22 February 2021
Accepted: 06 April 2021
Published: 20 April 2021

Citation:
Billon E, Chanez B, Rochigneux P, Albiges L, Vicier C, Pignot G, Walz J, Chretien A-S, Gravis G and Olive D (2021) Soluble BTN2A1 Is a Potential Prognosis Biomarker in Pre-Treated Advanced Renal Cell Carcinoma. Front. Immunol. 12:670827. doi: 10.3389/fimmu.2021.670827

The development of immune checkpoint inhibitors (ICI) has dramatically changed the landscape of therapies for metastatic renal cell carcinoma. However, many patients do not benefit from such therapy and prognostic or predictive validated biomarker validated for ICI are still needed to better select and treat patient. Plasmatic soluble immune checkpoints have been described as potential immune biomarkers in hematological malignancies and solids tumors, then, we would like to explore the prognostic value of different soluble immune checkpoints in patients with mRCC treated with nivolumab after TKI. We prospectively collected plasma samples before nivolumab infusion from 38 patients previously treated for mRCC with TKI at Paoli-Calmettes Institute, from the NIVOREN GETUG-AFU 26 study (NCT03013335). Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed for soluble forms of PD-1, PD-L1, global BTN3, BTLA, BTN3A1 and BTN2A1. Among the different soluble checkpoints analyzed, only high baseline plasmatic level of BTN2A1 was significantly associated with shorter PFS: median PFS was 3.95 months for sBTN2A1high vs 14.30 months for sBTN2A1low (sBTN2A1 cut-off: 6.7ng/mL; HR = 2.26, 95%CI [0.68 – 4.60], p = 0.0307). There was no statistical difference in OS between sBTN2A1high and sBTN2A1^{low}. Our results suggest that the baseline level of plasmatic BTN2A1 could be an independent prognosis factor of PFS after nivolumab for pre-treated patient with mRCC. However, these results need to be validated in a larger prospective cohort and the biological role of BTN subfamily and γδ T cell immunity in mRCC must be elucidated.

Keywords: renal cell carcinoma, butyrophilin, nivolumab, immunotherapy, γδ T cells

INTRODUCTION

The development of immune checkpoint inhibitors (ICI) has dramatically changed the landscape of therapies for metastatic renal cell carcinoma (mRCC), as such in first line associated to tyrosine kinase inhibitors (TKI) (1) or as monotherapy (2). However, many patients do not benefit from such therapy and prognostic or predictive validated biomarker validated for ICI are still needed to better select and treat patient according to the best genomic profiles. The International Metastatic RCC Database Consortium (IMDC) prognostic model (3) is used to predict survival and adapted treatment strategy of untreated mRCC patients and was validated for patients previously treated with TKI, before second line TKI. Identifying new prognostic biomarkers in this population is needed to improve treatment strategy for mRCC patients.

Plasmatic soluble immune checkpoints, such as programmed death protein (PD-1) with its ligands PD-L1 and PD-L2, the B7/butyrophilin-like receptors such as butyrophilin sub-family 3A (CD277) members (BTN3A) and butyrophilin sub-family 2A (CD209) members, and the B and T lymphocyte attenuator (BTLA) have been described as potential immune biomarkers in hematological malignancies (4) and solids tumors (pancreas (5), gastric (6), lung cancers (7) and hepatocarcinoma (8)). In localized RCC, sBTLA was associated with poorer relapse-free survival and overall survival (OS) after nephrectomy (9).

We aimed to explore the prognostic value of different soluble immune checkpoints in mRCC treated with nivolumab after TKI.

sBTN2A1 Is a Prognostic in Patients With Pre-Treated Advanced Renal Cell Carcinoma

To explore the prognostic value of different soluble immune checkpoints, we prospectively collected plasma samples before nivolumab infusion from patients previously treated for mRCC with TKI at Paoli-Calmettes Institute (Nivo-Rein cohort), from the NIVOREN GETUG-AFU 26 study (NCT03013335). Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed for soluble forms of PD-1, PD-L1, global BTN3, BTLA, BTN3A1 and BTN2A1. All patients provided informed consent prior to enrolment. The receiver operating characteristic (ROC) curves were generated for each marker. The areas under the curves (AUC) were assessed to evaluate each marker performance for discriminating short term responder (patients with PFS > median) from long-term responder (patients with PFS < median). Cut-off was selected to obtain the best sensitivity and specificity for discriminating long-term responders from short term responders. Survival analyses were performed using the Kaplan–Meier method and log-rank test. Multivariate analysis of survival was performed using the Cox-regression model, including all variables associated with progression-free survival (PFS) ($p < 0.1$).

We included 38 patients between March 2016 and November 2017. Patients' characteristics are summarized in **Table 1**. With a median follow-up of 19.8 months, 31 (82%) patients had tumor progression and 25 (66%) died. Among the different soluble checkpoints analyzed, only high baseline plasmatic level of BTN2A1 was significantly associated with shorter PFS. Cut-off retained was 6.7ng/mL, that approximate the median value of 6.8ng/mL. There was no significant difference between patients with $sBTN2A1^{low}$ and $sBTN2A1^{high}$ level; excepted for age (**Table 1**). Median PFS was 3.95 months for $sBTN2A1^{high}$ *vs.* 14.30 months for $sBTN2A1^{low}$ (**Figures 1A–C**) (HR = 2.26, 95% CI [0.68 – 4.60], p = 0.0307). There was no statistical difference in OS between $sBTN2A1^{high}$ and $sBTN2A1^{low}$ (median OS = 14.6 *vs.* 24.5 months, respectively, p = 0.326) (**Figures 1D, E**). There was no significant impact on survival of plasmatic level of BTLA (median PFS for $BTLA^{high}$ 14.3 vs. 7.1 months, HR = 0.57, 95%CI [0.22 – 1.51]; cut-off: 4.33ng/mL), PD-L1 (median PFS for PD-$L1^{high}$ 12.9 vs. 4.1 months, HR = 0.79, 95%CI [0.38 – 1.65]; cut-off: 0.88ng/mL), PD-1 (median PFS for PD-1^{high} 12.9 vs. 4.0 months, HR = 0.59, 95%CI [0.26 – 1.35; cut-off: 0.83ng/mL]), or BTN3A1 (median PFS for $BTN3A1^{high}$ 9.3 vs. 4.7 months, HR = 0.68, 95%CI [0.22 – 2.05]; cut-off: 1.55ng/mL) in this cohort (**Supplementary Figure 1**).

In univariate analysis, PFS was associated with baseline anemia, IMDC subgroups and sBTN2A1 level (**Table 2**). sBTN2A1 was associated with PFS in multivariate analysis (HR = 2.80, 95%CI [1.22-6.41], p=0.015) (**Table 3**). sBTN2A1 was able to discriminate two different prognostic groups among the subgroup of patients with favorable prognosis according to the IMDC model (**Figure 1F**): favorable IMDC/$sBTN2A1^{high}$ patients had lower PFS than favorable IMDC/$sBTN2A1^{low}$ patients, close to poor/intermediate IMDC patients (median PFS = 5.1months vs. ND, respectively, HR =18.1, p= 0.0067).

DISCUSSION

To our knowledge, this study is the first that described sBTN2A1 as potential prognostic biomarker in patients with pre-treated mRCC. In the previous NIVOREN GETUG-AFU 26 study, it was reported that tissue PD-1 and AXL expression by immunohistochemistry were associated with PFS and confirmed that PBRM-1 loss was a strong prognostic factor (10). Incorvaia et al. explored the prognostic value of soluble forms of PD-1, PD-L1, global BTN3, BTN3A1 and BTN2A1 in a prospective cohort of metastatic renal cell carcinoma patients (11). They identified sPD-1, sPD-L1 and sBTN3A1 as potential biomarkers. However, our study did not significantly confirm these results, with only a tendency for sPD-1 and sPD-L1 and this difference could be explained by the small number of patients in our cohort. Conversely, sBTN2A1 was not

Abbreviations: BTLA, B and T lymphocyte attenuator; BTN, butyrophilin; CI, confidence interval; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assays; HR, hazard ratio; ICI, immune checkpoint inhibitors; IMDC, International Metastatic RCC Database Consortium; mRCC, metastatic renal cell carcinoma; OS, overall survival; PD-1, programmed death protein 1; PDL-1, programmed death ligand 1; PFS, progression-free survival; TKI, tyrosine kinase inhibitor.

TABLE 1 | Baseline characteristics (n = 38).

	Entire cohort	sBTN2A1 low (n = 17)	sBTN2A1 high (n = 21)	p
Median age (range) – years	60,5 (38 - 81)	54,4 (38,8 - 71,5)	65,3 (51,2 - 81,4)	*0,002*
Sex, n (%)				*0,132*
Male	32 (84,2)	16 (94,1)	16 (76,2)	
Female	6 (15,8)	1 (5,9)	5 (23,8)	
Histological classification				*0,679*
Clear cell	35 (92,1)	16 (94,1)	19 (90,5)	
Other	3 (7,9)	1 (5,9)	2 (9,5)	
Number of metastasis site, n (%)				*0,658*
≤2	12 (31,6)	6 (35,3)	6 (28,6)	
>2	26 (38,4)	11 (64,7)	15 (71,4)	
IMDC risk subroup				*0,699*
Favorable	8 (22,9)	5 (31,3)	3 (15,8)	
Intermediate	18 (51,4)	7 (43,7)	11 (57,9)	
Poor	9 (25,7)	4 (25,0)	5 (26,3)	
Undefined	3	1	2	
Karnofsky performans status, n (%)				*0,635*
≥80%	23 (60,5)	11 (64,7)	12 (57,1)	
<80%	15 (39,5)	6 (35,3)	9 (42,9)	
Hemoglobin rate, n (%)				*0,13*
≥lower limit of normal	9 (23,7)	6 (35,3)	3 (14,3)	
<lower limit of normal	29 (76,3)	11 (64,7)	18 (85,7)	
Calcium > upper limit of normal				*0,16*
≥upper limit of normal	28 (80)	15 (93,8)	13 (68,4)	
>upper limit of normal	7 (20)	1 (6,2)	6 (31,6)	
Unknown	3	1	2	
Platelets > upper limit of normal				*0,038*
≥upper limit of normal	32 (84,2)	12 (70,6)	20 (95,2)	
>upper limit of normal	6 (15,8)	5 (29,4)	1 (4,8)	
Neutrophil > upper limit of normal				*0,189*
≥upper limit of normal	35 (94,6)	15 (88,2)	20 (100)	
>upper limit of normal	2 (5,4)	2 (11,8)	0 (0,0)	
Unknown	1	0	1	
Median time from the diagnosis of metastatic disease, months (range)	17,6 (1,5 - 87,2)	17,3 (3,0 - 64,6)	31,2 (1,5 - 87,2)	*0,061*

significantly associated with survival in their study but patients with PFS > 18 months seemed to have lower level of sBTN2A1 than patients with PFS < 18 months. The small number of patients in their learning cohort (n=21) could also explain the difference between the two works; and reinforce the necessity to validate these results in a larger prospective cohort.

The BTN sub-family plays an important role in $V_{\gamma}9V_{\delta}2$ T-cells activation and regulation by direct or indirect presentation of self and nonself phosphoantigens. The cell surface molecule BTN2A1 binds to the γδ TCR, in conjunction with BTN3A1, and signals the presence of phosphoantigens to γδ T cells (12). Gamma delta T (γδT) lymphocytes are members of the immune system which display both innate and adaptive functions (13). They recognize low molecular mass nonpeptide ligands named "phosphoantigens" that comprise isoprenoid pathway metabolites, as (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl PPi (HMB-PP) derived from bacteria and protozoa (14) and isopentenyl PPi (IPP) derived from host cells (15). There are evidence of their cytotoxic activity against tumor cells in certain cancers (16), and they are able to recognize tumor cells without the need for major histocompatibility complex (MHC) antigen presentation. However, there also evidence that suggested that γδT lymphocytes may also have a pro-tumorigenic role (17), by impairing the function of other antitumor immune cells or enhancing immunosuppressive cell function such as MDSCs.

We can hypothesize that high level of circulating BTN2A1 could lead to Vγ9Vδ2 T-cells exhaustion that facilitate tumor immune escape mechanisms (18), and/or activate Vγ9Vδ2 T cells with pro-tumorigenic characteristics, and explain the poorer outcomes of patients with high level of circulating BTN2A1. These Vγ9Vδ2 T-cells alterations could also impaired anti-PD-1 activities on these cells and then, impaired clinical efficacy of anti-PD-1 agents in patients with mRCC.

Soluble BTN2A1 could be a new approach to predict resistance and avoiding toxicities for mRCC treated by nivolumab. Targeting BTN sub-family molecule could represent a new therapy approach for mRCC patients. Despite the small number of patients in this cohort, our results suggest that the baseline level of plasmatic BTN2A1 could be an independent prognosis factor of PFS after nivolumab for pre-treated patient with mRCC. However, these results need to be validated in a larger prospective cohort and the biological role of BTN subfamily and γδ T cell immunity in mRCC must be elucidated.

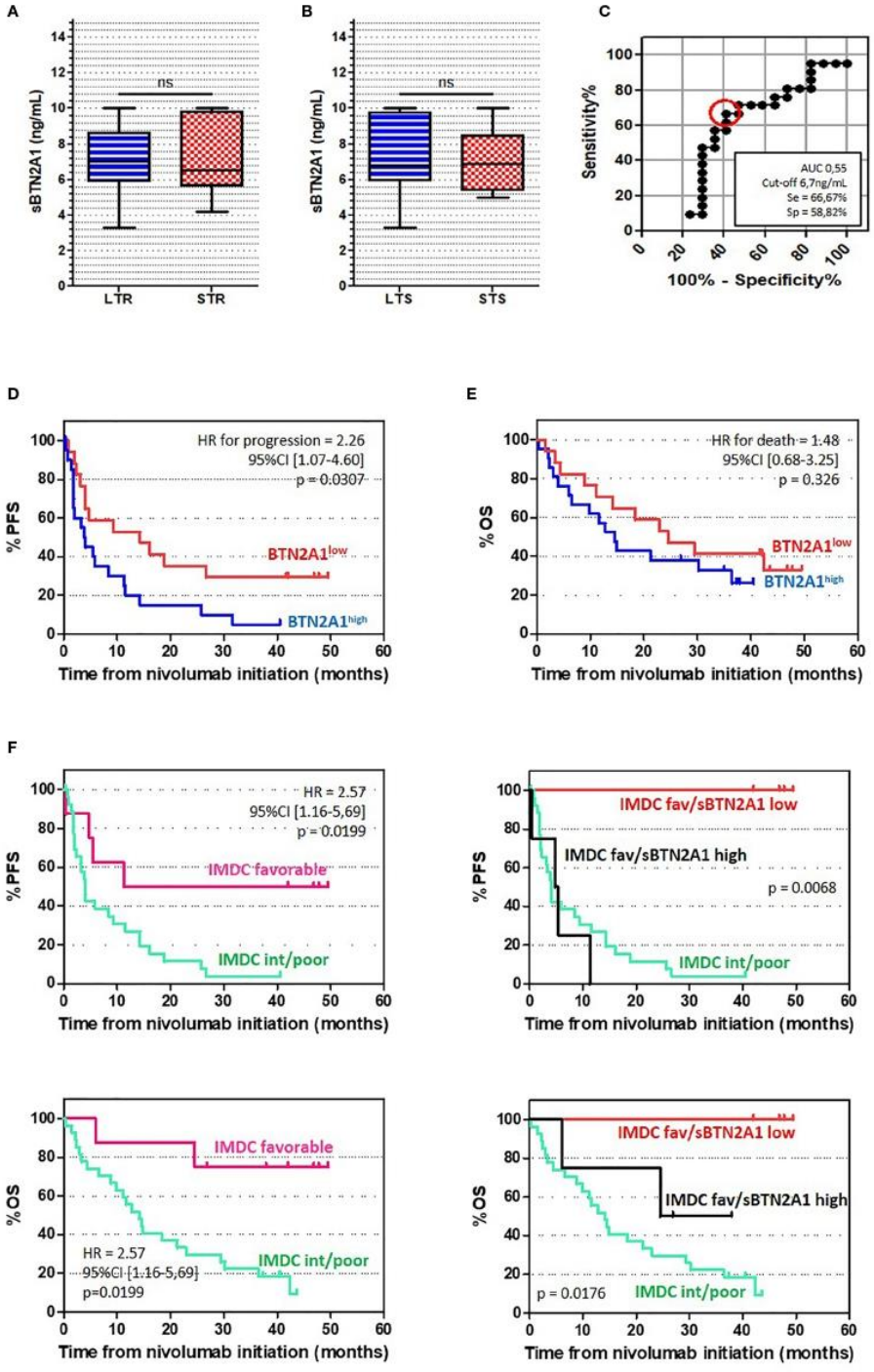


FIGURE 1 | sBTN2A1 seemed to be an independent prognostic factor for PFS in patients with mRCC **(A, B)** sBTN2A1 expression according to the time of response **(A)** and the time of overall survival **(B)**, assessed par enzyme linked immunosorbent assay. Paired-t test was used to compare differences between the groups. LTR, Long term responders; patients with PFS > median; STR, short term responders; patients with PFS < median; LTS, Long term survival; patients with OS > median; STS, Short term survival; patients with OS < median. **(C)** Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis of plasma level for sBTN2A1. ROC curve was plotted for sensitivity and specificity of time of response. **(D, E)** Kaplan Meier analysis of PFS **(D)** and OS **(E)** in patients with high and low plasma levels of BTN2A1. **(F)** Kaplan Meier analysis of PFS (top) and OS (bottom) according to the IMDC prognosis subgroup and sBTN2A1 level.

TABLE 2 | Univariate hazard ratio for PFS and OS.

Variables	Progression free survival			Overall survival		
	Hazard ratio	95%IC	*P*	Hazard ratio	95%IC	*P*
Age > median	0,93	0,46 - 1,89	*0,840*	0,83	0,38 - 1,81	*0,634*
Sex (male)	1,33	0,51 - 3,48	*0,564*	1,18	0,41 - 3,43	*0,762*
KPS < 80%	1,87	0,87 - 4,02	*0,098*	2,64	1,13 - 6,18	*0,025*
Hemoglobin < lower limit of normal	2,27	1,06 - 4,86	*0,034*	2,62	1,14 - 6,04	*0,024*
Calcium > upper limit of normal	0,99	0,38 - 2,63	*0,990*	1,85	0,63 - 5,43	*0,265*
Platelets > upper limit of normal	1,03	0,39 - 2,74	*0,947*	1,39	0,47 - 4,09	*0,546*
Neutrophil > upper limit of normal	1,41	0,27 - 7,39	*0,683*	11,63	0,86 - 155,8	*0,064*
IMDC risk subgroup						
Favorable	1,00			1,00		
Intermediate	3,54	1,16 - 10,79	*0,026*	5,74	1,30 - 25,33	*0,021*
Poor	2,98	0,89 - 10,01	*0,077*	6,92	1,44 - 33,27	*0,016*
sBTN2A1 high	2,26	0,68 – 4,60	*0,031*	1,48	0,68 - 3,25	*0,326*

KPS, Kamofsky performans status; IMDC, International Metastatic RCC Database Consortium.

TABLE 3 | Multivariate hazard ratio for PFS and OS.

Variables	Progression free survival			Overall survival		
	Hazard ratio	95%IC	*P*	Hazard ratio	95%IC	*P*
Age > median	0,42	0,00 - 0,99	*0,047*	0,46	0,20 - 1,05	*0,065*
Sex (male)	2,09	0,71 - 6,13	*0,180*	2,02	0,65 - 6,27	*0,224*
IMDC risk subgroup						
Favorable	1,00			1,00		
Intermediate	4,87	1,46 - 16,23	*0,010*	8,03	1,73 - 37,27	*0,008*
Poor	4,46	1,12 - 17,75	*0,034*	12,06	2,26 - 64,18	*0,004*
sBTN2A1 high	2,80	1,22 - 6,41	*0,015*	1,33	0,58 - 3,08	*0,500*

IMDC, International Metastatic RCC Database Consortium.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institut Paoli Calmettes. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: DO, GG. Acquisition of data: EB and BC. Analysis and interpretation of data: EB, BC, and DO. Drafting of the manuscript: EB, PR, and DO. Critical revision of the manuscript for important intellectual content: EB, BC, PR, LA, CV, GP, JW, A-SC, GG, and DO. Statistical analysis: EB. Administrative, technical, or material support: DO. Supervision: DO and GG. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

DO is supported by research grant of FRM (Equipe FRM 2018 DEQ20180339209) and RHU Pioneer. EB is supported by ITMO Cancer of Aviesan on funds administered by Inserm.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.670827/full#supplementary-material

REFERENCES

1. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab Plus Axitinib Versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* (2019) 380:1116–27. doi: 10.1056/NEJMoa1816714
2. Rini BI, Battle D, Figlin RA, George DJ, Hammers H, Hutson T, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of advanced renal cell carcinoma (RCC). *J Immunother Cancer* (2019) 7(1):354. doi: 10.1186/s40425-019-0813-8
3. Ko JJ, Xie W, Kroeger N, Lee J, Rini BI, Knox JJ, et al. The International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium Model as a

Prognostic Tool in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma Previously Treated With First-Line Targeted Therapy: A Population-Based Study. *Lancet Oncol* (2015) 16:293–300. doi: 10.1016/S1470-2045(14)71222-7
4. Wang L, Wang H, Chen H, Wang W, Chen X-Q, Geng Q-R, et al. Serum Levels of Soluble Programmed Death Ligand 1 Predict Treatment Response and Progression Free Survival in Multiple Myeloma. *Oncotarget* (2015) 6:41228–36. doi: 10.18632/oncotarget.5682
5. Benyamine A, Loncle C, Foucher E, Blazquez J-L, Castanier C, Chrétien A-S, et al. BTN3A is a Prognosis Marker and a Promising Target for Vγ9vδ2 T Cells Based-Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (Pdac). *Oncoimmunology* (2017) 7:e1372080. doi: 10.1080/2162402X.2017.1372080
6. Takahashi N, Iwasa S, Sasaki Y, Shoji H, Honma Y, Takashima A, et al. Serum Levels of Soluble Programmed Cell Death Ligand 1 as a Prognostic Factor on the First-Line Treatment of Metastatic or Recurrent Gastric Cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* (2016) 142:1727–38. doi: 10.1007/s00432-016-2184-6
7. Okuma Y, Hosomi Y, Nakahara Y, Watanabe K, Sagawa Y, Homma S. High Plasma Levels of Soluble Programmed Cell Death Ligand 1 are Prognostic for Reduced Survival in Advanced Lung Cancer. *Lung Cancer Amst Neth* (2017) 104:1–6. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.11.023
8. Dong MP, Enomoto M, Thuy LTT, Hai H, Hieu VN, Hoang DV, et al. Clinical Significance of Circulating Soluble Immune Checkpoint Proteins in Sorafenib-Treated Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep* (2020) 10:3392. doi: 10.1038/s41598-020-60440-5
9. Wang Q, Zhang J, Tu H, Liang D, Chang DW, Ye Y, et al. Soluble Immune Checkpoint-Related Proteins as Predictors of Tumor Recurrence, Survival, and T Cell Phenotypes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients. *J Immunother Cancer* (2019) 7:334. doi: 10.1186/s40425-019-0810-y
10. Vano Y-A, Rioux-Leclercq N, Dalban C, Sautes-Fridman C, Bougoüin A, Chaput N, et al. Nivoren GETUG-AFU 26 Translational Study: Association of PD-1, AXL, and PBRM-1 With Outcomes in Patients (Pts) With Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma (Mccrcc) Treated With Nivolumab (N). *J Clin Oncol* (2020) 38:618–8. doi: 10.1200/JCO.2020.38.6_suppl.618
11. Incorvaia L, Fanale D, Badalamenti G, Porta C, Olive D, De Luca I, et al. Baseline Plasma Levels of Soluble Pd-1, PD-L1, and BTN3A1 Predict Response to Nivolumab Treatment in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Step Toward a Biomarker for Therapeutic Decisions. *OncoImmunology* (2020) 9:1832348. doi: 10.1080/2162402X.2020.1832348
12. Payne KK, Mine JA, Biswas S, Chaurio RA, Perales-Puchalt A, Anadon CM, et al. BTN3A1 governs antitumor responses by coordinating αβ and γδ T cells. *Science* (2020) 369(3506):942. doi: 10.1126/science.aay2767
13. Davey MS, Willcox CR, Joyce SP, Ladell K, Kasatskaya SA, McLaren JE, et al. Clonal Selection in the Human Vδ1 T Cell Repertoire Indicates γδ TCR-dependent Adaptive Immune Surveillance. *Nat Commun* (2017) 8:14760. doi: 10.1038/ncomms14760
14. Eberl M, Hintz M, Reichenberg A, Kollas A-K, Wiesner J, Jomaa H. Microbial Isoprenoid Biosynthesis and Human Gammadelta T Cell Activation. *FEBS Lett* (2003) 544:4–10. doi: 10.1016/s0014-5793(03)00483-6
15. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and Synthetic non-Peptide Antigens Recognized by Human Gamma Delta T Cells. *Nature* (1995) 375:155–8. doi: 10.1038/375155a0
16. Rei M, Pennington DJ, Silva-Santos B. The Emerging Protumor Role of γδ T Lymphocytes: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancer Res* (2015) 75:798–802. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3228
17. Zhao Y, Niu C, Cui J. Gamma-delta (γδ) T cells: friend or foe in cancer development? *J Transl Med* (2018) 16(1):3. doi: 10.1186/s12967-017-1378-2
18. Messal N, Mamessier E, Sylvain A, Celis-Gutierrez J, Thibult M-L, Chetaille B, et al. Differential Role for CD277 as a Co-Regulator of the Immune Signal in T and NK Cells. *Eur J Immunol* (2011) 41:3443–54. doi: 10.1002/eji.201141404

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Billon, Chanez, Rochigneux, Albiges, Vicier, Pignot, Walz, Chretien, Gravis and Olive. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Conclusions générales et perspectives

Ces travaux permettent d'identifier la forme soluble de BTN2A1 comme un potentiel biomarqueur pronostic dans 2 cancers urologiques métastatiques, le cancer de la prostate et le cancer du rein. L'analyse approfondie de cette forme soluble dans le cancer de la prostate a permis de comprendre le rôle des vésicules extracellulaires BTN2A1^{+} et de positionner les lymphocytes B et les lymphocytes T Vγ9Vδ2 comme des acteurs impliqués dans l'immunorégulation de cette pathologie.

Nous pouvons nous interroger si ces mécanismes sont spécifiques au cancer de la prostate métastatique ou s'ils existent également dans d'autres pathologies tumorales. Le pipeline d'analyses développé dans le cadre de ce travail peut aisément se transposer à d'autres cohortes cliniques à partir de simples échantillons de plasma, permettant de screening rapidement un grand nombre de candidats potentiels.

Ces travaux nous ont également permis de mieux comprendre certains mécanismes de régulation de BTN2A1 à la surface des cellules. Les échanges intercellulaires de BTN2A1 par trogocytose avec les cellules myéloïdes vont pouvoir moduler la sensibilité des cellules à la lyse par les lymphocytes T Vγ9Vδ2 en condition physiologique et tumorale. La compréhension de la régulation des checkpoints immuns est à la base du développement de nouvelles stratégies d'immunothérapies ; la prise en considération du phénomène de trogocytose implique la nécessité de caractériser les cibles à l'échelle protéique et ouvre de nouvelles perspectives dans leur modulation à visée thérapeutique.

Ensemble ces résultats, souligne le rôle potentiel de BTN2A1 et des lymphocytes T Vγ9Vδ2 dans l'immunorégulation du cancer, et confirme leur position comme cible d'intérêt en immunothérapie.

La suite de ces travaux se focalisera sur le versant tissulaire de la thématique, afin de déterminer l'origine de la production de sBTN2A1 et de déterminer son impact sur la composition du microenvironnement tumoral, notamment évaluer l'infiltration T Vγ9Vδ2.

Bibliographie

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49.

2. Le cancer de la prostate - Les cancers les plus fréquents [Internet]. [cité 20 mars 2024]. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-de-la-prostate

3. Roberts RO, Bergstralh EJ, Bass SE, Lieber MM, Jacobsen SJ. Prostatitis as a risk factor for prostate cancer. Epidemiol Camb Mass. janv 2004;15(1):93-9.

4. Engeland A, Tretli S, Bjørge T. Height, body mass index, and prostate cancer: a follow-up of 950 000 Norwegian men. Br J Cancer. 30 sept 2003;89(7):1237.

5. Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Leitzmann M, Wu K, Stampfer MJ, et al. Body mass index and risk of prostate cancer in U.S. health professionals. J Natl Cancer Inst. 20 août 2003;95(16):1240-4.

6. Prostate Anatomy | Saint Luke's Health System [Internet]. [cité 21 mars 2024]. Disponible sur: https://www.saintlukeskc.org/health-library/prostate-anatomy

7. Toivanen R, Shen MM. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. Development. 15 avr 2017;144(8):1382-98.

8. Karhadkar SS, Steven Bova G, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. Nature. oct 2004;431(7009):707-12.

9. Humphrey PA. Histopathology of Prostate Cancer. Cold Spring Harb Perspect Med. 10 janv 2017;7(10):a030411.

10. Lee SH, Shen MM. Cell types of origin for prostate cancer. Curr Opin Cell Biol. 1 déc 2015;37:35-41.

11. Alizadeh M, Alizadeh S. Survey of Clinical and Pathological Characteristics and Outcomes of Patients With Prostate Cancer. Glob J Health Sci. 18 sept 2014;6(7):p49.

12. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. Eur Urol. 1 juill 2016;70(1):106-19.

13. Murray TBJ. The Pathogenesis of Prostate Cancer. In: Bott SR, Ng KL, éditeurs. Prostate Cancer [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2021 [cité 27 mars 2024]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK571321/

14. Culig Z, Klocker H, Bartsch G, Hobisch A. Androgen receptors in prostate cancer. Endocr Relat Cancer. 1 sept 2002;9(3):155-70.

15. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. Nat Rev Cancer. oct 2001;1(1):34-45.

16. Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. Nat Med. janv 2004;10(1):33-9.

17. Taplin Mary-Ellen, Bubley Glenn J., Shuster Todd D., Frantz Martha E., Spooner Amy E., Ogata George K., et al. Mutation of the Androgen-Receptor Gene in Metastatic Androgen-Independent Prostate Cancer. N Engl J Med. 1995;332(21):1393-8.

18. Buchanan G, Greenberg NM, Scher HI, Harris JM, Marshall VR, Tilley WD. Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. mai 2001;7(5):1273-81.

19. Velcheti V, Karnik S, Bardot SF, Prakash O. Pathogenesis of Prostate Cancer: Lessons from Basic Research. Ochsner J. Winter 2008;8(4):213.

20. Zhu ML, Kyprianou N. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. Endocr Relat Cancer. 1 déc 2008;15(4):841-9.

21. Wen Y, Hu MC, Makino K, Spohn B, Bartholomeusz G, Yan DH, et al. HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway. Cancer Res. 15 déc 2000;60(24):6841-5.

22. Yeh S, Lin HK, Kang HY, Thin TH, Lin MF, Chang C. From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 11 mai 1999;96(10):5458-63.

23. Tan ME, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong E leong. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. Acta Pharmacol Sin. janv 2015;36(1):3-23.

24. Ammirante M, Luo JL, Grivennikov S, Nedospasov S, Karin M. B cell–derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. Nature. 11 mars 2010;464(7286):302-5.

25. Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M, et al. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers. Am J Pathol. août 1993;143(2):390-400.

26. Turnham DJ, Bullock N, Dass MS, Staffurth JN, Pearson HB. The PTEN Conundrum: How to Target PTEN-Deficient Prostate Cancer. Cells. 22 oct 2020;9(11):2342.

27. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TLJ, Zappa M, Nelen V, et al. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. Lancet Lond Engl. 6 déc 2014;384(9959):2027-35.

28. Vickers AJ, Ulmert D, Sjoberg DD, Bennette CJ, Björk T, Gerdtsson A, et al. Strategy for detection of prostate cancer based on relation between prostate specific antigen at age 40-55 and long term risk of metastasis: case-control study. BMJ. 15 avr 2013;346:f2023.

29. Ploussard G, Fiard G, Barret E, Brureau L, Créhange G, Dariane C, et al. French AFU Cancer Committee Guidelines - Update 2022-2024: prostate cancer - Diagnosis and management of localised disease. Progres En Urol J Assoc Francaise Urol Soc Francaise Urol. nov 2022;32(15):1275-372.

30. Leongamornlert D, Saunders E, Dadaev T, Tymrakiewicz M, Goh C, Jugurnauth-Little S, et al. Frequent germline deleterious mutations in DNA repair genes in familial prostate cancer cases are associated with advanced disease. Br J Cancer. 18 mars 2014;110(6):1663-72.

31. Xu J, Lange EM, Lu L, Zheng SL, Wang Z, Thibodeau SN, et al. HOXB13 is a susceptibility gene for prostate cancer: results from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics (ICPCG). Hum Genet. janv 2013;132(1):5-14.

32. Nyberg T, Govindasami K, Leslie G, Dadaev T, Bancroft E, Ni Raghallaigh H, et al. Homeobox B13 G84E Mutation and Prostate Cancer Risk. Eur Urol. mai 2019;75(5):834-45.

33. Patel VL, Busch EL, Friebel TM, Cronin A, Leslie G, McGuffog L, et al. Association of Genomic Domains in BRCA1 and BRCA2 with Prostate Cancer Risk and Aggressiveness. Cancer Res. 1 févr 2020;80(3):624-38.

34. Schumacher FR, Al Olama AA, Berndt SI, Benlloch S, Ahmed M, Saunders EJ, et al. Association analyses of more than 140,000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci. Nat Genet. juill 2018;50(7):928-36.

35. Kasivisvanathan V, Rannikko AS, Borghi M, Panebianco V, Mynderse LA, Vaarala MH, et al. MRI-Targeted or Standard Biopsy for Prostate-Cancer Diagnosis. N Engl J Med. 10 mai 2018;378(19):1767-77.

36. Nam RK, Toi A, Klotz LH, Trachtenberg J, Jewett MAS, Appu S, et al. Assessing individual risk for prostate cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 20 août 2007;25(24):3582-8.

37. Parker C, Castro E, Fizazi K, Heidenreich A, Ost P, Procopio G, et al. Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. Ann Oncol. 1 sept 2020;31(9):1119-34.

38. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. Am J Surg Pathol. févr 2016;40(2):244.

39. Kamadjou C, Wadeu AK, Kuitche J, Mbassi A, Kamga J, Angwafo F. Prostate Cancer: Risk Factors and Outcome Indicators. Surg Sci. 8 août 2022;13(8):381-400.

40. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. JAMA. 16 sept 1998;280(11):969-74.

41. Meta-analysis of 11C-choline and 18F-choline PET/CT for mana... : Nuclear Medicine Communications [Internet]. [cité 9 févr 2024]. Disponible sur: https://journals.lww.com/nuclearmedicinecomm/fulltext/2014/03000/meta_analysis_of_11c_choline_and_18f_choline.1.aspx

42. Hofman MS, Lawrentschuk N, Francis RJ, Tang C, Vela I, Thomas P, et al. Prostate-specific membrane antigen PET-CT in patients with high-risk prostate cancer before curative-intent surgery or radiotherapy (proPSMA): a prospective, randomised, multicentre study. The Lancet. 11 avr 2020;395(10231):1208-16.

43. Donovan JL, Hamdy FC, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Walsh E, et al. Patient-Reported Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Prostate Cancer. N Engl J Med. 13 oct 2016;375(15):1425-37.

44. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Metcalfe C, Davis M, Turner EL, et al. Fifteen-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Prostate Cancer. N Engl J Med. 27 avr 2023;388(17):1547-58.

45. A BA, L H, H G, Jr R, K T, C B, et al. Radical prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer. N Engl J Med [Internet]. 3 juin 2014 [cité 21 mars 2024];370(10). Disponible sur: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24597866/

46. Droz JP, Balducci L, Bolla M, Emberton M, Fitzpatrick JM, Joniau S, et al. Background for the proposal of SIOG guidelines for the management of prostate cancer in senior adults. Crit Rev Oncol Hematol. janv 2010;73(1):68-91.

47. Bill-Axelson A, Garmo H, Holmberg L, Johansson JE, Adami HO, Steineck G, et al. Long-term distress after radical prostatectomy versus watchful waiting in prostate cancer: a longitudinal study from the Scandinavian Prostate Cancer Group-4 randomized clinical trial. Eur Urol. déc 2013;64(6):920-8.

48. Resnick MJ, Koyama T, Fan KH, Albertsen PC, Goodman M, Hamilton AS, et al. Long-term functional outcomes after treatment for localized prostate cancer. N Engl J Med. 31 janv 2013;368(5):436-45.

49. Al Hussein Al Awamlh B, Wallis CJD, Penson DF, Huang LC, Zhao Z, Conwill R, et al. Functional Outcomes After Localized Prostate Cancer Treatment. JAMA. 23 janv 2024;331(4):302-17.

50. Zapatero A, Guerrero A, Maldonado X, Alvarez A, Segundo CGS, Rodríguez MAC, et al. High-dose radiotherapy with short-term or long-term androgen deprivation in localised prostate cancer (DART01/05 GICOR): a randomised, controlled, phase 3 trial. Lancet Oncol. 1 mars 2015;16(3):320-7.

51. Long-term results of dose escalation (80 vs 70 Gy) combined with long-term androgen deprivation in high-risk prostate cancers: GETUG-AFU 18 randomized trial. | Journal of Clinical Oncology [Internet]. [cité 21 mars 2024]. Disponible sur: https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2024.42.4_suppl.LBA259

52. Fransson P, Nilsson P, Gunnlaugsson A, Beckman L, Tavelin B, Norman D, et al. Ultra-hypofractionated versus conventionally fractionated radiotherapy for prostate cancer (HYPO-RT-PC): patient-reported quality-of-life outcomes of a randomised, controlled, non-inferiority, phase 3 trial. Lancet Oncol. févr 2021;22(2):235-45.

53. Goy BW, Burchette R, Soper MS, Chang T, Cosmatos HA. Ten-Year Treatment Outcomes of Radical Prostatectomy Vs External Beam Radiation Therapy Vs Brachytherapy for 1503 Patients With Intermediate-risk Prostate Cancer. Urology. 1 févr 2020;136:180-9.

54. Ramsay CR, Adewuyi TE, Gray J, Hislop J, Shirley MDF, Jayakody S, et al. Ablative therapy for people with localised prostate cancer: a systematic review and economic evaluation. Health Technol Assess Winch Engl. juill 2015;19(49):1-490.

55. Mohammed A, Miller S, Douglas-Moore J, Miller M. Cryotherapy and its applications in the management of urologic malignancies: a review of its use in prostate and renal cancers. Urol Oncol. janv 2014;32(1):39.e19-27.

56. Blana A, Brown SCW, Chaussy C, Conti GN, Eastham JA, Ganzer R, et al. High-intensity focused ultrasound for prostate cancer: comparative definitions of biochemical failure. BJU Int. oct 2009;104(8):1058-62.

57. Francini E, Gray KP, Xie W, Shaw GK, Valença L, Bernard B, et al. Time of metastatic disease presentation and volume of disease are prognostic for metastatic hormone sensitive prostate cancer (mHSPC). The Prostate. sept 2018;78(12):889-95.

58. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, et al. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. N Engl J Med. 31 juill 2014;371(5):424-33.

59. Ryan CJ, Smith MR, Fizazi K, Saad F, Mulders PFA, Sternberg CN, et al. Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naive men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. Lancet Oncol. 1 févr 2015;16(2):152-60.

60. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone acetate plus prednisone in patients with newly diagnosed high-risk metastatic castration-sensitive prostate cancer (LATITUDE): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, phase 3 trial. Lancet Oncol. mai 2019;20(5):686-700.

61. Sweeney CJ, Chen YH, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. N Engl J Med. 20 août 2015;373(8):737-46.

62. Gravis G, Boher JM, Fizazi K, Joly F, Priou F, Marino P, et al. Prognostic Factors for Survival in Noncastrate Metastatic Prostate Cancer: Validation of the Glass Model and Development of a Novel Simplified Prognostic Model. Eur Urol. août 2015;68(2):196-204.

63. Harshman LC, Chen YH, Liu G, Carducci MA, Jarrard D, Dreicer R, et al. Seven-Month Prostate-Specific Antigen Is Prognostic in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer Treated With Androgen Deprivation With or Without Docetaxel. J Clin Oncol. 1 févr 2018;36(4):376-82.

64. Urofrance | French AFU Cancer Committee Guidelines - Update 2022-2024: prostate cancer - Management of metastatic disease and castration resistance - Urofrance [Internet]. [cité 3 avr 2024]. Disponible sur: https://www.urofrance.org/recommandation/french-afu-cancer-committee-guidelines-update-2022-2024-prostate-cancer-management-of-metastatic-disease-and-castration-resistance/

65. Oefelein MG, Feng A, Scolieri MJ, Ricchiutti D, Resnick MI. Reassessment of the definition of castrate levels of testosterone: implications for clinical decision making. Urology. 1 déc 2000;56(6):1021-4.

66. Clarke NW, Ali A, Ingleby FC, Hoyle A, Amos CL, Attard G, et al. Addition of docetaxel to hormonal therapy in low- and high-burden metastatic hormone sensitive prostate cancer: long-term survival results from the STAMPEDE trial. Ann Oncol. déc 2019;30(12):1992-2003.

67. Kyriakopoulos CE, Chen YH, Carducci MA, Liu G, Jarrard DF, Hahn NM, et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer: Long-Term Survival Analysis of the Randomized Phase III E3805 CHAARTED Trial. J Clin Oncol. 10 avr 2018;36(11):1080-7.

68. Gravis G, Fizazi K, Joly F, Oudard S, Priou F, Esterni B, et al. Androgen-deprivation therapy alone or with docetaxel in non-castrate metastatic prostate cancer (GETUG-AFU 15): a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol. févr 2013;14(2):149-58.

69. Vale CL, Burdett S, Rydzewska LHM, Albiges L, Clarke NW, Fisher D, et al. Addition of docetaxel or bisphosphonates to standard of care in men with localised or metastatic, hormone-sensitive prostate cancer: a systematic review and meta-analyses of aggregate data. Lancet Oncol. févr 2016;17(2):243-56.

70. Maluf FC, Schutz FA, Cronemberger EH, Luz M de A, Martins SPS, Muniz DQB, et al. A phase 2 randomized clinical trial of abiraterone plus ADT, apalutamide, or abiraterone and apalutamide in patients with advanced prostate cancer with non-castrate testosterone levels (LACOG 0415). Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 13 oct 2021;158:63-71.

71. Audenet F, Murez T, Ripert T, Villers A, Neuzillet Y. [CYP17A1 inhibitors in prostate cancer: mechanisms of action independent of the androgenic pathway]. Progres En Urol J Assoc Francaise Urol Soc Francaise Urol. oct 2013;23 Suppl 1:S9-15.

72. James ND, Clarke NW, Cook A, Ali A, Hoyle AP, Attard G, et al. Abiraterone acetate plus prednisolone for metastatic patients starting hormone therapy: 5-year follow-up results from the STAMPEDE randomised trial (NCT00268476). Int J Cancer. 1 août 2022;151(3):422-34.

73. Armstrong AJ, Azad AA, Iguchi T, Szmulewitz RZ, Petrylak DP, Holzbeierlein J, et al. Improved Survival With Enzalutamide in Patients With Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. J Clin Oncol. 20 mai 2022;40(15):1616-22.

74. Davis ID, Martin AJ, Stockler MR, Begbie S, Chi KN, Chowdhury S, et al. Enzalutamide with Standard First-Line Therapy in Metastatic Prostate Cancer. N Engl J Med. 11 juill 2019;381(2):121-31.

75. Chi KN, Chowdhury S, Bjartell A, Chung BH, Pereira de Santana Gomes AJ, Given R, et al. Apalutamide in Patients With Metastatic Castration-Sensitive Prostate Cancer: Final Survival Analysis of the Randomized, Double-Blind, Phase III TITAN Study. J Clin Oncol. 10 juill 2021;39(20):2294-303.

76. Fizazi K, Foulon S, Carles J, Roubaud G, McDermott R, Fléchon A, et al. Abiraterone plus prednisone added to androgen deprivation therapy and docetaxel in de novo metastatic castration-sensitive prostate cancer (PEACE-1): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study with a 2 × 2 factorial design. The Lancet. 30 avr 2022;399(10336):1695-707.

77. Smith Matthew R., Hussain Maha, Saad Fred, Fizazi Karim, Sternberg Cora N., Crawford E. David, et al. Darolutamide and Survival in Metastatic, Hormone-Sensitive Prostate Cancer. N Engl J Med. 23 mars 2022;386(12):1132-42.

78. Boevé LMS, Hulshof MCCM, Vis AN, Zwinderman AH, Twisk JWR, Witjes WPJ, et al. Effect on Survival of Androgen Deprivation Therapy Alone Compared to Androgen Deprivation Therapy Combined with Concurrent Radiation Therapy to the Prostate in Patients with Primary Bone Metastatic Prostate Cancer in a Prospective Randomised Clinical Trial: Data from the HORRAD Trial. Eur Urol. 1 mars 2019;75(3):410-8.

79. Parker CC, James ND, Brawley CD, Clarke NW, Hoyle AP, Ali A, et al. Radiotherapy to the primary tumour for newly diagnosed, metastatic prostate cancer (STAMPEDE): a randomised controlled phase 3 trial. The Lancet [Internet]. oct 2018 [cité 4 nov 2018]; Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618324863

80. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, et al. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. J Natl Cancer Inst. 2 oct 2002;94(19):1458-68.

81. Smith MR, Coleman RE, Klotz L, Pittman K, Milecki P, Ng S, et al. Denosumab for the prevention of skeletal complications in metastatic castration-resistant prostate cancer: comparison of skeletal-related events and symptomatic skeletal events. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. févr 2015;26(2):368-74.

82. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. N Engl J Med. 7 oct 2004;351(15):1502-12.

83. de Wit R, de Bono J, Sternberg CN, Fizazi K, Tombal B, Wülfing C, et al. Cabazitaxel versus Abiraterone or Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer. N Engl J Med. 26 déc 2019;381(26):2506-18.

84. Aparicio AM, Harzstark AL, Corn PG, Wen S, Araujo JC, Tu SM, et al. Platinum-based chemotherapy for variant castrate-resistant prostate cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 juill 2013;19(13):3621-30.

85. Miyake H, Hara T, Tamura K, Sugiyama T, Furuse H, Ozono S, et al. Comparative Assessment of Efficacies Between 2 Alternative Therapeutic Sequences With Novel Androgen Receptor-Axis-Targeted Agents in Patients With Chemotherapy-Naïve Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. Clin Genitourin Cancer. août 2017;15(4):e591-7.

86. Sartor O, Coleman R, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O'Sullivan JM, et al. Effect of radium-223 dichloride on symptomatic skeletal events in patients with castration-resistant prostate cancer and bone metastases: results from a phase 3, double-blind, randomised trial. Lancet Oncol. 1 juin 2014;15(7):738-46.

87. Hofman MS, Emmett L, Sandhu S, Iravani A, Joshua AM, Goh JC, et al. [177Lu]Lu-PSMA-617 versus cabazitaxel in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (TheraP): a randomised, open-label, phase 2 trial. Lancet Lond Engl. 27 févr 2021;397(10276):797-804.

88. Hussain M, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, et al. Survival with Olaparib in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. N Engl J Med. 10 déc 2020;383(24):2345-57.

89. Burnet M. Cancer—A Biological Approach. Br Med J. 13 avr 1957;1(5023):841-7.

90. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFNγ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature. avr 2001;410(6832):1107-11.

91. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity. août 2004;21(2):137-48.

92. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. Science. 29 sept 2006;313(5795):1960-4.

93. Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. Nat Rev Drug Discov. mars 2019;18(3):197-218.

94. Combes AJ, Samad B, Tsui J, Chew NW, Yan P, Reeder GC, et al. Discovering Dominant Tumor Immune Archetypes in A Pan-Cancer Census. Cell. 6 janv 2022;185(1):184-203.e19.

95. Wykes MN, Lewin SR. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. Nat Rev Immunol. févr 2018;18(2):91-104.

96. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. Science. 22 mars 1996;271(5256):1734-6.

97. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med. 2 oct 2000;192(7):1027-34.

98. Maio M, Ascierto PA, Manzyuk L, Motola-Kuba D, Penel N, Cassier PA, et al. Pembrolizumab in microsatellite instability high or mismatch repair deficient cancers: updated analysis from the phase II KEYNOTE-158 study. Ann Oncol. 1 sept 2022;33(9):929-38.

99. Løvf M, Zhao S, Axcrona U, Johannessen B, Bakken AC, Carm KT, et al. Multifocal Primary Prostate Cancer Exhibits High Degree of Genomic Heterogeneity. Eur Urol. 1 mars 2019;75(3):498-505.

100. Ge R, Wang Z, Cheng L. Tumor microenvironment heterogeneity an important mediator of prostate cancer progression and therapeutic resistance. Npj Precis Oncol. 4 mai 2022;6(1):1-8.

101. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. Nature. sept 2013;501(7467):346-54.

102. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. Nature. juill 2013;499(7457):214-8.

103. Bander NH, Yao D, Liu H, Chen YT, Steiner M, Zuccaro W, et al. MHC class I and II expression in prostate carcinoma and modulation by interferon-alpha and -gamma. The Prostate. 1997;33(4):233-9.

104. Barrack ER. TGF beta in prostate cancer: a growth inhibitor that can enhance tumorigenicity. The Prostate. 1 avr 1997;31(1):61-70.

105. Wu Z, Chen H, Luo W, Zhang H, Li G, Zeng F, et al. The Landscape of Immune Cells Infiltrating in Prostate Cancer. Front Oncol [Internet]. 29 oct 2020 [cité 9 mai 2024];10. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2020.517637/full

106. Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, DeMarzo AM, et al. Phenotypic Analysis of Prostate-Infiltrating Lymphocytes Reveals TH17 and Treg Skewing. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 juin 2008;14(11):3254-61.

107. Bogunovic D, O'Neill DW, Belitskaya-Levy I, Vacic V, Yu YL, Adams S, et al. Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. Proc Natl Acad Sci. déc 2009;106(48):20429-34.

108. Vesalainen S, Lipponen P, Talja M, Syrjänen K. Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. Eur J Cancer. 1 janv 1994;30(12):1797-803.

109. Kärjä V, Aaltomaa S, Lipponen P, Isotalo T, Talja M, Mokka R. Tumour-infiltrating Lymphocytes: A Prognostic Factor of PSA-free Survival in Patients with Local Prostate Carcinoma Treated by Radical Prostatectomy. Anticancer Res. 1 nov 2005;25(6C):4435-8.

110. Yanai Y, Kosaka T, Mikami S, Hongo H, Yasumizu Y, Takeda T, et al. CD8-positive T cells and CD204-positive M2-like macrophages predict postoperative prognosis of very high-risk prostate cancer. Sci Rep. 18 nov 2021;11(1):22495.

111. Yang Y, Attwood K, Bshara W, Mohler JL, Guru K, Xu B, et al. High intratumoral CD8+ T-cell infiltration is associated with improved survival in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. The Prostate. janv 2021;81(1):20-8.

112. Andersen LB, Nørgaard M, Rasmussen M, Fredsøe J, Borre M, Ulhøi BP, et al. Immune cell analyses of the tumor microenvironment in prostate cancer highlight infiltrating regulatory T cells and macrophages as adverse prognostic factors. J Pathol. 2021;255(2):155-65.

113. Ntala C, Salji M, Salmond J, Officer L, Teodosio AV, Blomme A, et al. Analysis of Prostate Cancer Tumor Microenvironment Identifies Reduced Stromal CD4 Effector T-cell Infiltration in Tumors with Pelvic Nodal Metastasis. Eur Urol Open Sci. juill 2021;29:19-29.

114. Woo JR, Liss MA, Muldong MT, Palazzi K, Strasner A, Ammirante M, et al. Tumor infiltrating B-cells are increased in prostate cancer tissue. J Transl Med. 30 janv 2014;12:30.

115. Roya N, Fatemeh T, Faramarz MA, Milad SG, Mohammad-Javad S, Najmeh SV, et al. Frequency of IL-10+CD19+ B cells in patients with prostate cancer compared to patients with benign prostatic hyperplasia. Afr Health Sci. sept 2020;20(3):1264-72.

116. Shalapour S, Font-Burgada J, Di Caro G, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Dhar D, et al. Immunosuppressive plasma cells impede T cell-dependent immunogenic chemotherapy. Nature. 7 mai 2015;521(7550):94-8.

117. Weiner AB, Vidotto T, Liu Y, Mendes AA, Salles DC, Faisal FA, et al. Plasma cells are enriched in localized prostate cancer in Black men and are associated with improved outcomes. Nat Commun. 10 févr 2021;12:935.

118. Costanzo-Garvey DL, Keeley T, Case AJ, Watson GF, Alsamraae M, Yu Y, et al. Neutrophils are mediators of metastatic prostate cancer progression in bone. Cancer Immunol Immunother CII. 29 févr 2020;69(6):1113-30.

119. Pasero C, Gravis G, Granjeaud S, Guerin M, Thomassin-Piana J, Rocchi P, et al. Highly effective NK cells are associated with good prognosis in patients with metastatic prostate cancer. Oncotarget. 29 avr 2015;6(16):14360-73.

120. Pasero C, Gravis G, Guerin M, Granjeaud S, Thomassin-Piana J, Rocchi P, et al. Inherent and Tumor-Driven Immune Tolerance in the Prostate Microenvironment Impairs Natural Killer Cell Antitumor Activity. Cancer Res. 15 2016;76(8):2153-65.

121. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, et al. Arginase I Production in the Tumor Microenvironment by Mature Myeloid Cells Inhibits T-Cell Receptor Expression and Antigen-Specific T-Cell Responses. Cancer Res. 16 août 2004;64(16):5839-49.

122. Lundholm M, Hägglöf C, Wikberg ML, Stattin P, Egevad L, Bergh A, et al. Secreted Factors from Colorectal and Prostate Cancer Cells Skew the Immune Response in Opposite Directions. Sci Rep. 27 oct 2015;5(1):15651.

123. Lanciotti M, Masieri L, Raspollini MR, Minervini A, Mari A, Comito G, et al. The role of M1 and M2 macrophages in prostate cancer in relation to extracapsular tumor extension and biochemical recurrence after radical prostatectomy. BioMed Res Int. 2014;2014:486798.

124. Biffi G, Tuveson DA. Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. Physiol Rev. 1 janv 2021;101(1):147-76.

125. Huang H, Wang Z, Zhang Y, Pradhan RN, Ganguly D, Chandra R, et al. Mesothelial cell-derived antigen-presenting cancer-associated fibroblasts induce expansion of regulatory T cells in pancreatic cancer. Cancer Cell. 13 juin 2022;40(6):656-673.e7.

126. Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, Graham CH. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. Cancer Res. 1 févr 2014;74(3):665-74.

127. Kwon JTW, Bryant RJ, Parkes EE. The tumor microenvironment and immune responses in prostate cancer patients. Endocr Relat Cancer. 8 août 2021;28(8):T95.

128. Gamat M, McNeel DG. Androgen deprivation and immunotherapy for the treatment of prostate cancer. Endocr Relat Cancer. déc 2017;24(12):T297-310.

129. Long X, Hou H, Wang X, Liu S, Diao T, Lai S, et al. Immune signature driven by ADT-induced immune microenvironment remodeling in prostate cancer is correlated with recurrence-free survival and immune infiltration. Cell Death Dis. 19 sept 2020;11(9):779.

130. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. Nat Med. août 2015;21(8):938-45.

131. Tosolini M, Pont F, Poupot M, Vergez F, Nicolau-Travers ML, Vermijlen D, et al. Assessment of tumor-infiltrating TCRVγ9Vδ2 γδ lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. Oncoimmunology [Internet]. 6 févr 2017 [cité 25 sept 2020];6(3). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5384348/

132. Frieling JS, Tordesillas L, Bustos XE, Ramello MC, Bishop RT, Cianne JE, et al. γδ-Enriched CAR-T cell therapy for bone metastatic castrate-resistant prostate cancer. Sci Adv. 9(18):eadf0108.

133. Liu Z, Guo BL, Gehrs BC, Nan L, Lopez RD. Ex vivo expanded human Vgamma9Vdelta2+ gammadelta-T cells mediate innate antitumor activity against human prostate cancer cells in vitro. J Urol. mai 2005;173(5):1552-6.

134. Liu Z, Eltoum IEA, Guo B, Beck BH, Cloud GA, Lopez RD. Protective Immunosurveillance and Therapeutic Antitumor Activity of γδ T Cells Demonstrated in a Mouse Model of Prostate Cancer1. J Immunol. 1 mai 2008;180(9):6044-53.

135. Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC. Determining γδ versus αβ T cell development. Nat Rev Immunol. sept 2010;10(9):657-63.

136. McVay LD, Carding SR. Extrathymic origin of human gamma delta T cells during fetal development. J Immunol Baltim Md 1950. 1 oct 1996;157(7):2873-82.

137. Parker CM, Groh V, Band H, Porcelli SA, Morita C, Fabbi M, et al. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. J Exp Med. 1 mai 1990;171(5):1597-612.

138. Hayday AC. γδ T Cells and the Lymphoid Stress-Surveillance Response. Immunity. 21 août 2009;31(2):184-96.

139. Cheng L, Cui Y, Shao H, Han G, Zhu L, Huang Y, et al. Mouse γδ T cells are capable of expressing MHC class II molecules, and of functioning as antigen-presenting cells. J Neuroimmunol. 15 oct 2008;203(1):3-11.

140. Park JH, Lee HK. Function of γδ T cells in tumor immunology and their application to cancer therapy. Exp Mol Med. mars 2021;53(3):318-27.

141. Fournié JJ, Bonneville M. Stimulation of γδ T cells by phosphoantigens. Res Immunol. 1 janv 1996;147(5):338-47.

142. Pfeffer K, Schoel B, Plesnila N, Lipford GB, Kromer S, Deusch K, et al. A lectin-binding, protease-resistant mycobacterial ligand specifically activates V gamma 9+ human gamma delta T cells. J Immunol Baltim Md 1950. 15 janv 1992;148(2):575-83.

143. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, et al. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. Science. 8 avr 1994;264(5156):267-70.

144. Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vγ2Vδ2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. Immunol Rev. 2007;215(1):59-76.

145. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. Nature. 11 mai 1995;375(6527):155-8.

146. Sebestyen Z, Prinz I, Déchanet-Merville J, Silva-Santos B, Kuball J. Translating gammadelta (γδ) T cells and their receptors into cancer cell therapies. Nat Rev Drug Discov. mars 2020;19(3):169-84.

147. Buhaescu I, Izzedine H. Mevalonate pathway: A review of clinical and therapeutical implications. Clin Biochem. 1 juin 2007;40(9):575-84.

148. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. J Exp Med. 20 janv 2003;197(2):163-8.

149. Bouet-Toussaint F, Cabillic F, Toutirais O, Le Gallo M, Thomas de la Pintière C, Daniel P, et al. Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. Cancer Immunol Immunother CII. avr 2008;57(4):531-9.

150. Nada MH, Wang H, Hussein AJ, Tanaka Y, Morita CT. PD-1 checkpoint blockade enhances adoptive immunotherapy by human Vγ2Vδ2 T cells against human prostate cancer. Oncoimmunology. 2021;10(1):1989789.

151. De Gassart A, Le KS, Brune P, Agaugué S, Sims J, Goubard A, et al. Development of ICT01, a first-in-class, anti-BTN3A antibody for activating Vγ9Vδ2 T cell–mediated antitumor immune response. Sci Transl Med. 20 oct 2021;13(616):eabj0835.

152. Thompson K, Rogers MJ. Statins prevent bisphosphonate-induced gamma,delta-T-cell proliferation and activation in vitro. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. févr 2004;19(2):278-88.

153. Blazquez JL, Benyamine A, Pasero C, Olive D. New Insights Into the Regulation of γδ T Cells by BTN3A and Other BTN/BTNL in Tumor Immunity. Front Immunol. 2018;9:1601.

154. Rhodes DA, Stammers M, Malcherek G, Beck S, Trowsdale J. The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex. Genomics. 1 févr 2001;71(3):351-62.

155. Brunker P a. R, Flegel WA. Scianna: the lucky 13th blood group system. Immunohematology. 1 juin 2011;27(2):25-8.

156. Rigau M, Ostrouska S, Fulford TS, Johnson DN, Woods K, Ruan Z, et al. Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by γδ T cells. Science. 7 févr 2020;367(6478):eaay5516.

157. Yang Y, Li L, Yuan L, Zhou X, Duan J, Xiao H, et al. A Structural Change in Butyrophilin upon Phosphoantigen Binding Underlies Phosphoantigen-Mediated Vγ9Vδ2 T Cell Activation. Immunity. 16 avr 2019;50(4):1043-1053.e5.

158. Cano CE, Pasero C, De Gassart A, Kerneur C, Gabriac M, Fullana M, et al. BTN2A1, an immune checkpoint targeting Vγ9Vδ2 T cell cytotoxicity against malignant cells. Cell Rep. 13 juill 2021;36(2):109359.

159. Fulford TS, Soliman C, Castle RG, Rigau M, Ruan Z, Dolezal O, et al. Vγ9Vδ2 T cells recognize butyrophilin 2A1 and 3A1 heteromers. Nat Immunol. 16 juill 2024;1-12.

160. Benyamine A, Loncle C, Foucher E, Blazquez JL, Castanier C, Chrétien AS, et al. BTN3A is a prognosis marker and a promising target for Vγ9Vδ2 T cells based-immunotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Oncoimmunology. 2017;7(1):e1372080.

161. Mamedov MR, Vedova S, Freimer JW, Sahu AD, Ramesh A, Arce MM, et al. CRISPR screens decode cancer cell pathways that trigger γδ T cell detection. Nature. sept 2023;621(7977):188-95.

162. Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, Bennouna J, Mosnier JF, Scotet E, et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. J Immunol Baltim Md 1950. 15 oct 2005;175(8):5481-8.

163. Kong Y, Cao W, Xi X, Ma C, Cui L, He W. The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRγ9/δ2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRγδ and NKG2D. Blood. 9 juill 2009;114(2):310-7.

164. Gundermann S, Klinker E, Kimmel B, Flierl U, Wilhelm M, Einsele H, et al. A comprehensive analysis of primary acute myeloid leukemia identifies biomarkers predicting susceptibility to human allogeneic Vγ9Vδ2 T cells. J Immunother Hagerstown Md 1997. 2014;37(6):321-30.

165. Poccia F, Cipriani B, Vendetti S, Colizzi V, Poquet Y, Battistini L, et al. CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both anti-viral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive V gamma 9V delta 2 T lymphocytes. J Immunol Baltim Md 1950. 15 déc 1997;159(12):6009-17.

166. Baccala R, Witherden D, Gonzalez-Quintial R, Dummer W, Surh CD, Havran WL, et al. γδ T Cell Homeostasis Is Controlled by IL-7 and IL-15 Together with Subset-Specific Factors1. J Immunol. 15 avr 2005;174(8):4606-12.

167. Barjon C, Michaud HA, Fages A, Dejou C, Zampieri A, They L, et al. IL-21 promotes the development of a CD73-positive Vγ9Vδ2 T cell regulatory population. Oncoimmunology. 4 oct 2017;7(1):e1379642.

168. Lafont V, Liautard J, Liautard JP, Favero J. Production of TNF-α by Human Vγ9Vδ2 T Cells Via Engagement of FcγRIIIA, the Low Affinity Type 3 Receptor for the Fc Portion of IgG, Expressed upon TCR Activation by Nonpeptidic Antigen1. J Immunol. 15 juin 2001;166(12):7190-9.

169. Angelini DF, Borsellino G, Poupot M, Diamantini A, Poupot R, Bernardi G, et al. FcγRIII discriminates between 2 subsets of Vγ9Vδ2 effector cells with different responses and activation pathways. Blood. 15 sept 2004;104(6):1801-7.

170. Wesch D, Peters C, Oberg HH, Pietschmann K, Kabelitz D. Modulation of γδ T cell responses by TLR ligands. Cell Mol Life Sci CMLS. 11 mai 2011;68(14):2357-70.

171. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T, et al. γδ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. Blood. 1 juill 2003;102(1):200-6.

172. Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, et al. Targeting Human γδ T Cells with Zoledronate and Interleukin-2 for Immunotherapy of Hormone-Refractory Prostate Cancer. Cancer Res. 1 août 2007;67(15):7450-7.

173. Naoe M, Ogawa Y, Takeshita K, Morita J, Shichijo T, Fuji K, et al. Zoledronate stimulates gamma delta T cells in prostate cancer patients. Oncol Res. 2010;18(10):493-501.

174. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigné CM, Mönkkönen H, Mönkkönen J, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human γδ T-cell subset. Blood. 13 sept 2012;120(11):2269-79.

175. Starick L, Riano F, Karunakaran MM, Kunzmann V, Li J, Kreiss M, et al. Butyrophilin 3A (BTN3A, CD277)-specific antibody 20.1 differentially activates Vγ9Vδ2 TCR clonotypes and interferes with phosphoantigen activation. Eur J Immunol. 2017;47(6):982-92.

176. Wermke M, Marabelle A, Jungels C, Bono JD, Vey N, Vicier C, et al. 503 Clinical activity of ICT01, an anti-BTN3A-targeted, γ9δ2-activating mAb, alone and in combination with pembrolizumab in patients with advanced/refractory solid tumors: EVICTION trial. J Immunother Cancer

[Internet]. 1 nov 2021 [cité 9 avr 2024];9(Suppl 2). Disponible sur: https://jitc.bmj.com/content/9/Suppl_2/A535

177. Champiat S, Wermke M, Bono JD, Marabelle A, Jungels C, Vicier C, et al. ICT01, an anti-Butyrophilin 3A Targeted mAb Activating γ9δ2 T cells, Induces Immune Remodeling of the Tumor Microenvironment and Clinical Responses in Combination with Pembrolizumab in Patients with Advanced Solid Tumors who Failed Prior Checkpoint Inhibitor Therapy: EVICTION Trial.

178. Bono JD, Champiat S, Danlos FX, Wermke M, Kunzmann V, Gassart AD, et al. 715 ICT01 plus low dose SC IL-2 produces a robust anti-tumor immune activation in advanced cancer patients (EVICTION-2 Study). J Immunother Cancer [Internet]. 1 nov 2023 [cité 5 août 2024];11(Suppl 1). Disponible sur: https://jitc.bmj.com/content/11/Suppl_1/A810

179. Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Osaka Y, Nakazawa H, Uchiyama T, et al. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. Cancer Immunol Immunother CII. 19 juill 2006;56(4):469-76.

180. Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, Rolland F, Philip I, Galéa C, et al. Phase-I study of Innacell γδ^{TM}, an autologous cell-therapy product highly enriched in γ9δ2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. Cancer Immunol Immunother CII. 27 févr 2008;57(11):1599-609.

181. Abe Y, Muto M, Nieda M, Nakagawa Y, Nicol A, Kaneko T, et al. Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated Vγ9γδ T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. Exp Hematol. 1 août 2009;37(8):956-68.

182. Cui J, Wang N, Zhao H, Jin H, Wang G, Niu C, et al. Combination of radiofrequency ablation and sequential cellular immunotherapy improves progression-free survival for patients with hepatocellular carcinoma. Int J Cancer. 2014;134(2):342-51.

183. Hira-Miyazawa M, Nakamura H, Hirai M, Kobayashi Y, Kitahara H, Bou-Gharios G, et al. Regulation of programmed-death ligand in the human head and neck squamous cell carcinoma microenvironment is mediated through matrix metalloproteinase-mediated proteolytic cleavage. Int J Oncol. févr 2018;52(2):379-88.

184. Aguirre JE, Beswick EJ, Grim C, Uribe G, Tafoya M, Chacon Palma G, et al. Matrix metalloproteinases cleave membrane-bound PD-L1 on CD90+ (myo-)fibroblasts in Crohn's disease and regulate Th1/Th17 cell responses. Int Immunol. 21 oct 2019;32(1):57-68.

185. Bailly C, Thuru X, Quesnel B. Soluble Programmed Death Ligand-1 (sPD-L1): A Pool of Circulating Proteins Implicated in Health and Diseases. Cancers. 17 juin 2021;13(12):3034.

186. Ng KW, Attig J, Young GR, Ottina E, Papamichos SI, Kotsianidis I, et al. Soluble PD-L1 generated by endogenous retroelement exaptation is a receptor antagonist. eLife. 8:e50256.

187. Gong B, Kiyotani K, Sakata S, Nagano S, Kumehara S, Baba S, et al. Secreted PD-L1 variants mediate resistance to PD-L1 blockade therapy in non–small cell lung cancer. J Exp Med. 1 avr 2019;216(4):982-1000.

188. Mahoney KM, Shukla SA, Patsoukis N, Chaudhri A, Browne EP, Arazi A, et al. A secreted PD-L1 splice variant that covalently dimerizes and mediates immunosuppression. Cancer Immunol Immunother. 2019;68(3):421-32.

189. Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, et al. Exosomal PD-L1 Contributes to Immunosuppression and is Associated with anti-PD-1 Response. Nature. août 2018;560(7718):382-6.

190. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. J Extracell Vesicles. 27 mai 2013;2:10.3402/jev.v2i0.20360.

191. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat Rev Mol Cell Biol. avr 2018;19(4):213-28.

192. van Niel G, Carter DRF, Clayton A, Lambert DW, Raposo G, Vader P. Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. Nat Rev Mol Cell Biol. mai 2022;23(5):369-82.

193. Kalluri R. The biology and function of extracellular vesicles in immune response and immunity. Immunity. 13 août 2024;57(8):1752-68.

194. Xing C, Li H, Li RJ, Yin L, Zhang HF, Huang ZN, et al. The roles of exosomal immune checkpoint proteins in tumors. Mil Med Res. 8 nov 2021;8:56.

195. Daassi D, Mahoney KM, Freeman GJ. The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. Nat Rev Immunol. avr 2020;20(4):209-15.

196. Poggio M, Hu T, Pai CC, Chu B, Belair CD, Chang A, et al. Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. Cell. 4 avr 2019;177(2):414-427.e13.

197. Fan Y, Che X, Qu J, Hou K, Wen T, Li Z, et al. Exosomal PD-L1 Retains Immunosuppressive Activity and is Associated with Gastric Cancer Prognosis. Ann Surg Oncol. oct 2019;26(11):3745-55.

198. Wen SW, Sceneay J, Lima LG, Wong CSF, Becker M, Krumeich S, et al. The Biodistribution and Immune Suppressive Effects of Breast Cancer–Derived Exosomes. Cancer Res. 1 déc 2016;76(23):6816-27.

199. Zhang F, Li R, Yang Y, Shi C, Shen Y, Lu C, et al. Specific Decrease in B-Cell-Derived Extracellular Vesicles Enhances Post-Chemotherapeutic CD8+ T Cell Responses. Immunity. 19 mars 2019;50(3):738-750.e7.

200. Pitts SC, Schlom J, Donahue RN. Soluble immune checkpoints: implications for cancer prognosis and response to immune checkpoint therapy and conventional therapies. J Exp Clin Cancer Res CR. 31 mai 2024;43:155.

201. Katongole P, Sande OJ, Reynolds SJ, Joloba M, Kajumbula H, Kalungi S, et al. Soluble Programmed Death-Ligand 1 (sPD-L1) is Elevated in Aggressive Prostate Cancer Disease Among African Men. Oncol Ther. 7 févr 2022;10(1):185-93.

202. Wang Q, Ye Y, Yu H, Lin SH, Tu H, Liang D, et al. Immune checkpoint-related serum proteins and genetic variants predict outcomes of localized prostate cancer, a cohort study. Cancer Immunol Immunother CII. 9 sept 2020;70(3):701-12.

203. Okuma Y, Wakui H, Utsumi H, Sagawa Y, Hosomi Y, Kuwano K, et al. Soluble Programmed Cell Death Ligand 1 as a Novel Biomarker for Nivolumab Therapy for Non–Small-cell Lung Cancer. Clin Lung Cancer. 1 sept 2018;19(5):410-417.e1.

204. Himuro H, Nakahara Y, Igarashi Y, Kouro T, Higashijima N, Matsuo N, et al. Clinical roles of soluble PD-1 and PD-L1 in plasma of NSCLC patients treated with immune checkpoint inhibitors. Cancer Immunol Immunother CII. août 2023;72(8):2829-40.

205. Castello A, Rossi S, Toschi L, Mansi L, Lopci E. Soluble PD-L1 in NSCLC Patients Treated with Checkpoint Inhibitors and Its Correlation with Metabolic Parameters. Cancers. juin 2020;12(6):1373.

206. Ando K, Hamada K, Watanabe M, Ohkuma R, Shida M, Onoue R, et al. Plasma Levels of Soluble PD-L1 Correlate With Tumor Regression in Patients With Lung and Gastric Cancer Treated With Immune Checkpoint Inhibitors. Anticancer Res. sept 2019;39(9):5195-201.

207. Incorvaia L, Fanale D, Badalamenti G, Porta C, Olive D, De Luca I, et al. Baseline plasma levels of soluble PD-1, PD-L1, and BTN3A1 predict response to nivolumab treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: a step toward a biomarker for therapeutic decisions. OncoImmunology. 1 janv 2020;9(1):1832348.

208. Hayashi H, Chamoto K, Hatae R, Kurosaki T, Togashi Y, Fukuoka K, et al. Soluble immune checkpoint factors reflect exhaustion of antitumor immunity and response to PD-1 blockade. J Clin Invest [Internet]. 1 avr 2024 [cité 31 août 2024];134(7). Disponible sur: https://www.jci.org/articles/view/168318

209. Costantini A, Julie C, Dumenil C, Hélias-Rodzewicz Z, Tisserand J, Dumoulin J, et al. Predictive role of plasmatic biomarkers in advanced non-small cell lung cancer treated by nivolumab. Oncoimmunology. 2018;7(8):e1452581.

210. Zizzari IG, Di Filippo A, Scirocchi F, Di Pietro FR, Rahimi H, Ugolini A, et al. Soluble Immune Checkpoints, Gut Metabolites and Performance Status as Parameters of Response to Nivolumab Treatment in NSCLC Patients. J Pers Med. déc 2020;10(4):208.

211. Tiako Meyo M, Jouinot A, Giroux-Leprieur E, Fabre E, Wislez M, Alifano M, et al. Predictive Value of Soluble PD-1, PD-L1, VEGFA, CD40 Ligand and CD44 for Nivolumab Therapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Case-Control Study. Cancers. févr 2020;12(2):473.

212. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J Extracell Vesicles. 2018;7(1):1535750.

213. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. J Extracell Vesicles. 2024;13(2):e12404.

214. McInnes L, Healy J, Melville J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction [Internet]. arXiv; 2020 [cité 27 févr 2024]. Disponible sur: http://arxiv.org/abs/1802.03426

215. Levine JH, Simonds EF, Bendall SC, Davis KL, Amir E ad D, Tadmor MD, et al. Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis. Cell. 2 juill 2015;162(1):184-97.

216. Le Gallou S, Caron G, Delaloy C, Rossille D, Tarte K, Fest T. IL-2 Requirement for Human Plasma Cell Generation: Coupling Differentiation and Proliferation by Enhancing MAPK–ERK Signaling. J Immunol. 1 juill 2012;189(1):161-73.

217. Rochigneux P, Chretien AS, Rossille D, Chanez B, Billon E, Fattori S, et al. Soluble BTN2A1 as a potential predictive biomarker of immune checkpoint inhibitor efficacy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). J Clin Oncol. 20 mai 2020;38(15_suppl):9561-9561.

218. Billon E, Chanez B, Rochigneux P, Albiges L, Vicier C, Pignot G, et al. Soluble BTN2A1 Is a Potential Prognosis Biomarker in Pre-Treated Advanced Renal Cell Carcinoma. Front Immunol [Internet]. 2021 [cité 26 juill 2021];0. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.670827/full#B9

219. Welsh JA, Arkesteijn GJA, Bremer M, Cimorelli M, Dignat-George F, Giebel B, et al. A compendium of single extracellular vesicle flow cytometry. J Extracell Vesicles. 2023;12(2):e12299.

220. Hatano K, Fujita K. Extracellular vesicles in prostate cancer: a narrative review. Transl Androl Urol. avr 2021;10(4):1890907-1907.

221. Ramirez-Garrastacho M, Bajo-Santos C, Line A, Martens-Uzunova ES, de la Fuente JM, Moros M, et al. Extracellular vesicles as a source of prostate cancer biomarkers in liquid biopsies: a decade of research. Br J Cancer. févr 2022;126(3):331-50.

222. Motamedinia P, Scott AN, Bate KL, Sadeghi N, Salazar G, Shapiro E, et al. Urine Exosomes for Non-Invasive Assessment of Gene Expression and Mutations of Prostate Cancer. PLOS ONE. 4 mai 2016;11(5):e0154507.

223. Logozzi M, Angelini DF, Giuliani A, Mizzoni D, Di Raimo R, Maggi M, et al. Increased Plasmatic Levels of PSA-Expressing Exosomes Distinguish Prostate Cancer Patients from Benign Prostatic Hyperplasia: A Prospective Study. Cancers. 27 sept 2019;11(10):1449.

224. Gabriel K, Ingram A, Austin R, Kapoor A, Tang D, Majeed F, et al. Regulation of the Tumor Suppressor PTEN through Exosomes: A Diagnostic Potential for Prostate Cancer. PLOS ONE. 25 juill 2013;8(7):e70047.

225. Duijvesz D, Versluis CYL, van der Fels CAM, Vredenbregt-van den Berg MS, Leivo J, Peltola MT, et al. Immuno-based detection of extracellular vesicles in urine as diagnostic marker for prostate cancer. Int J Cancer. 15 déc 2015;137(12):2869-78.

226. Tutrone R, Donovan MJ, Torkler P, Tadigotla V, McLain T, Noerholm M, et al. Clinical utility of the exosome based ExoDx Prostate(IntelliScore) EPI test in men presenting for initial Biopsy with a PSA 2–10 ng/mL. Prostate Cancer Prostatic Dis. déc 2020;23(4):607-14.

227. Huang X, Yuan T, Liang M, Du M, Xia S, Dittmar R, et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. Eur Urol. janv 2015;67(1):33-41.

228. Del Re M, Biasco E, Crucitta S, Derosa L, Rofi E, Orlandini C, et al. The Detection of Androgen Receptor Splice Variant 7 in Plasma-derived Exosomal RNA Strongly Predicts Resistance to Hormonal Therapy in Metastatic Prostate Cancer Patients. Eur Urol. avr 2017;71(4):680-7.

229. Cyster JG, Allen CDC. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. Cell. 18 avr 2019;177(3):524-40.

230. Saudi A, Banday V, Zirakzadeh AA, Selinger M, Forsberg J, Holmbom M, et al. Immune-Activated B Cells Are Dominant in Prostate Cancer. Cancers. 1 févr 2023;15(3):920.

231. Zheremyan EA, Ustiugova AS, Uvarova AN, Karamushka NM, Stasevich EM, Gogoleva VS, et al. Differentially activated B cells develop regulatory phenotype and show varying immunosuppressive features: a comparative study. Front Immunol [Internet]. 5 sept 2023 [cité 13 août 2024];14. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1178445/full

232. Catalán D, Mansilla MA, Ferrier A, Soto L, Oleinika K, Aguillón JC, et al. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. Front Immunol [Internet]. 29 avr 2021 [cité 13 août 2024];12. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.611795/full

233. Klinker MW, Lizzio V, Reed TJ, Fox DA, Lundy SK. Human B Cell-Derived Lymphoblastoid Cell Lines Constitutively Produce Fas Ligand and Secrete MHCII+FasL+ Killer Exosomes. Front Immunol [Internet]. 2 avr 2014 [cité 13 août 2024];5. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2014.00144/full

234. Xu W, Monaco G, Wong EH, Tan WLW, Kared H, Simoni Y, et al. Mapping of γ/δ T cells reveals Vδ2+ T cells resistance to senescence. EBioMedicine. 1 janv 2019;39:44-58.

235. Bruni E, Cazzetta V, Donadon M, Cimino M, Torzilli G, Spata G, et al. Chemotherapy accelerates immune-senescence and functional impairments of Vδ2pos T cells in elderly patients affected by liver metastatic colorectal cancer. J Immunother Cancer. 11 déc 2019;7(1):347.

236. Braakman E, van de Winkel JGJ, van Krimpen BA, Jansze M, Bolhuis RLH. CD16 on human γδ T lymphocytes: Expression, function, and specificity for mouse IgG isotypes. Cell Immunol. 1 août 1992;143(1):97-107.

237. Tokuyama H, Hagi T, Mattarollo SR, Morley J, Wang Q, Fai-So H, et al. Vγ9Vδ2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs—Rituximab and trastuzumab. Int J Cancer. 2008;122(11):2526-34.

238. Lee D, Dunn ZS, Guo W, Rosenthal CJ, Penn NE, Yu Y, et al. Unlocking the potential of allogeneic Vδ2 T cells for ovarian cancer therapy through CD16 biomarker selection and CAR/IL-15 engineering. Nat Commun. 8 nov 2023;14(1):6942.

239. Catalano M, O'Driscoll L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. J Extracell Vesicles. 9(1):1703244.

Annexe 1: Hétérogénéité et impact en cancérologie des checkpoints immuns solubles

Authors : Emilien Billon[1], Laurent Gorvel[1], Daniel Olive[1]

1. *Tumor immunology laboratory, IBISA immunomonitoring platform, Cancer Research Center of Marseille, Marseille, France.*

Résumé

La généralisation des immunothérapies dans le traitement des cancers ces dernières années a permis de relancer l'engouement des cliniciens et chercheurs sur le rôle du système immunitaire dans la défense anti tumorale, notamment dans la recherche de biomarqueurs immuns pronostics ou prédictifs de réponse. L'analyse de checkpoints immuns solubles permet d'une part une meilleure stratification des patients, avec à terme l'idée d'améliorer la prise en charge des patients, et d'autre part améliore les connaissances sur la place des différents acteurs immuns dans la lutte anti-tumorale. Cependant, l'analyse des checkpoints immuns solubles montre une grande hétérogénéité des mécanismes de production ainsi que des formes solubles, libres ou associées à des vésicules extracellulaires. Ces variations pouvant avoir des conséquences différentes sur les différents acteurs impliqués, il est nécessaire d'approfondir la caractérisation des checkpoints solubles dès qu'ils semblent présenter un intérêt particulier dans une pathologie donnée.

Mots-clés : Checkpoints immuns; Forme soluble; PD-L1 ; Vésicules extracellulaires

Abstract

The widespread use of immunotherapies in cancer treatment in recent years rekindled interest among clinicians and researchers for the role of the immune system in tumor defense, particularly in the search for prognostic or predictive immune biomarkers. Soluble immune checkpoint analyses enables; on the one hand, better stratification of patients, with the ultimate aim of improving patient management, and on the other, improves our knowledge on the role of the various immune players in antitumor defense. However, analysis of soluble immune checkpoints reveals considerable heterogeneity in production mechanisms, as well as in their form (free or associated with extracellular vesicles). These variations may have different consequences for the players involved, and it is therefore necessary to characterize soluble checkpoints deeper as soon as they appear to be of particular interest in a given pathology.

Key words: Immune checkpoints; soluble form; PD-L1; Extracellular vesicles

Introduction

La dernière décennie a été marquée par un tournant majeur dans la prise en charge en oncologie des tumeurs solides : la généralisation de l'utilisation des immunothérapies dans le traitement du cancer. En effet, longtemps sous exploité, il apparait maintenant évident que le système immunitaire a une place prépondérante dans le développement tumoral, autant sur le versant pro-tumoral que sur le versant anti tumoral. La modulation du microenvironnement tumoral comme thérapie anti-cancéreuse fait partie intégrante de la prise en charge des patients, notamment avec l'utilisation croissante des inhibiteurs de points de contrôle immuns (immune checkpoints, ICI), ciblant l'axe PD-1/PD-L1 ou CTLA-4 pour ceux utilisés en routine, et de multiples autres cibles potentielles en cours de développement.

Les ICI sont associés à une amélioration nette de la survie des patients dans un nombre croissant de pathologie, seuls, ou en association à d'autres thérapeutiques, et sont un outil incontournable dans l'arsenal thérapeutique de tout oncologue. Cependant, la réponse à ces traitements est variable d'un sujet à l'autre et d'une pathologie à l'autre, avec des taux de réponse variant de 10 à 70%.

L'identification et la caractérisation de nouveaux biomarqueurs, à la fois pronostic et/ou prédictif de réponse aux traitements, revêt donc une priorité dans cette situation où les alternatives thérapeutiques se multiplient afin d'adapter au mieux le traitement à chaque patient pour améliorer leur survie et en limitant au mieux les toxicités.

D'autre part, la généralisation de l'utilisation de stratégies moins invasives dans le diagnostic des cancers (biopsie à l'aiguille…) ainsi que l'augmentation des indications de traitements néoadjuvants limitent la quantité de matériel tumoral disponible en début de prise en charge des patients. Les études approfondies (i.e. immunophénotypage du microenvironnement tumoral, nécessitant plusieurs millions de cellules) sont ainsi plus limitées dans un grand nombre de pathologie ; augmentant ainsi l'intérêt des études réalisées en biopsies liquides, notamment sur le sang périphérique.

Pour toutes ces raisons, un intérêt particulier s'est porté ces dernières années sur l'impact clinique et biologique des formes solubles de différents checkpoints immuns dans de nombreuses pathologies en oncologie. Leur caractère pronostic et/ou prédictif de réponse aux traitements est maintenant documenté dans de multiples pathologies et la compréhension des mécanismes de leur régulation a permis de mettre en lumière de nouvelles voies de résistance aux traitements et stratégies pour améliorer leur efficacité.

L'hétérogénéité des checkpoints solubles en cancérologie : l'exemple de sPD-L1

Les checkpoints immuns sont des modulateurs clés de la réponse immunitaire antitumorale. Ils sont présents sur l'ensemble des cellules immunes effectrices, sur les cellules présentatrices d'antigènes mais également sur les cellules tumorales et du microenvironnement. L'interaction de ces récepteurs avec leur ligand active des voies de signalisation immunitaire inhibitrices ou activatrices. Les plus célèbres d'entre eux sont l'axe PD-1/PD-L1 et CTLA-4, dont l'engagement induit une inhibition des réponses T antitumorale.

La forme soluble de ces checkpoints peut être produite par différents mécanismes variant selon la molécule intéressée, ainsi que son origine cellulaire. Par exemple, pour PD-L1, 3 mécanismes de production sont décrits (**Figure 1**). Le premier, correspond au clivage de la forme membranaire de PD-L1 (mPD-L1), notamment par différentes métalloprotéases (MMP), aboutissant à la formation d'une forme soluble, libre de PD-L1 (sPD-L1). Il a été montré, à partir de lignées de carcinome épidermoïde buccal OSC-19 et OSC-20 que mPD-L1 peut être clivé en sPD-L1 par les MMP-7 et MMP-13 (1). Des résultats similaires ont été rapportés à partir de myofibroblastes PD-L1^{+} intestinaux dans la maladie de Crohn où mPD-L1 est clivé par MMP-10, limitant ainsi l'immunorégulation de ces myofibroblastes sur les lymphocytes T (2). D'autre part, sPD-L1 peut également être produit par une voie non-proteolytique, par épissage alternatif. Plusieurs variants d'épissages de PD-L1 conduisent à la formation de sPD-L1, avec des conséquences biologiques distinctes. Les principales formes correspondent à la perte du domaine transmembranaire du récepteur, décrit par exemple dans le cancer du poumon non à petites cellules, le mélanome ou la leucémie aigüe (3). Des variants d'épissage produits par acquisition d'un élément intronique, LINE-2A, dans le gène *CD274* codant pour PD-L1 (processus dit d'exaptation) ont été décrits. Ils conduisent à la production de PD-L1 dépourvu de domaine transmembranaire et de la séquence régulatrice associée. Le transcrit qui en résulte code pour une forme de sPD-L1 dépourvue d'activité inhibitrice sur les cellules T (4). Il existe des variants d'épissage conduisant à une forme soluble de PD-L1 agissant comme un « leurre » à l'encontre des anticorps anti-PD-L1, et agissant de ce fait comme potentiel mécanisme de résistance à ces thérapies (5). Inversement, un variant d'épissage dépourvu du domaine transmembranaire produit une forme sécrétée de PD-L1 ayant un ajout d'une séquence de 18 acides aminés, capable d'homodimérisation. Ce variant est doté de capacités immunosuppressives sur les cellules T du microenvironnement tumoral supérieures à celle de sPD-L1 produit par perte simple du domaine transmembranaire (6). La troisième voie par laquelle PD-L1 peut se présenter sous une forme libre est la libération de mPD-L1 par l'intermédiaire de vésicules extracellulaires, notamment par les exosomes. Ces vésicules, dotées d'une couche lipidique comparable à la membrane cellulaire, peuvent récapituler l'effet de PD-L1 à la

surface des cellules et moduler de manière significative la réponse au traitement par anticorps anti-PD-1/PD-L1 (7).

Ces trois formes de sPD-L1 peuvent être détectées dans le plasma des patients, mais l'identification du mécanisme de formation peut s'avérer plus délicate. En effet, les méthodes usuelles utilisées (ELISA par exemple) pour doser les checkpoints solubles dans les fluides biologiques détectent indistinctement les différentes formes des checkpoints, y compris les formes associées aux vésicules extracellulaires. Ces formes pouvant avoir des actions biologiques différentes et leur proportion diffère en fonction des pathologies. Cela peut expliquer les résultats contradictoires sur le rôle des checkpoints solubles décrits dans la littérature ; montrant l'enjeu technique sous tendu par l'étude de ces checkpoints.

Sur le plan clinique, la forme soluble de PD-L1 est généralement associé à un pronostic défavorable chez les patients traités par inhibiteurs de checkpoints immuns (8). Cependant la valeur pronostique diffère selon le type tumoral. sPDL1 a été associé à un pronostic défavorable dans le cancer du poumon non à petites cellules, du foie, du pancréas ou encore de l'estomac. Cependant son association avec le pronostic dans le mélanome n'est pas démontrée (9), où l'augmentation des taux circulants de sPDL1 semble même plutôt associée à la réponse aux ICI. On observe également des résultats contradictoires pour une même pathologie. Par exemple, dans le cancer du rein traité par immunothérapie, sPD-L1 est associé à un pronostic défavorable dans l'essai CheckMate 009 (9), alors que des taux élevés de sPDL1 sont associés à une PFS allongés dans l'étude de Incorvaia et al. (10). Les populations étudiées sont proches, à savoir des patients atteints de cancers du rein métastatiques majoritairement prétraités par anti-angiogéniques. Les analyses ont été effectuées sur le plasma avant traitement, par ELISA. Les différences constatées sont donc potentiellement liées aux détails des techniques utilisées (clones d'anticorps utilisés dans chaque test ELISA par exemple), qui ne détectent pas forcément les mêmes formes de sPD-L1 dans les mêmes proportions. Ces discordances montrent dont l'importance de la caractérisation des formes solubles identifiées comme biomarqueurs chez les patients, afin d'évaluer leur rôle dans la physiopathologie tumorale.

Checkpoints solubles et vésicules extracellulaires

Il est aujourd'hui établi que les phases d'initiation et de progression du cancer sont facilitées par la communication entre les cellules pré-néoplasiques/malignes émergentes et les autres cellules du micro-environnement tumoral. La communication intercellulaire peut faciliter les changements dans le microenvironnement pour influencer la croissance de la tumeur et la dissémination des cellules cancéreuses. Cette communication peut se faire par la sécrétion de facteurs solubles ou par l'échange de vésicules extracellulaires. Les vésicules extracellulaires sont sécrétées par de nombreux types de

cellules eucaryotes in vitro et ont été détectées dans des fluides corporels tels que le sang, l'urine, la bile, le lait maternel et les fluides synoviaux, lacrymaux, séminaux, d'ascite et de lavage broncho-alvéolaire, ainsi que dans les selles (11). Elles peuvent être libérées en réponse à l'activation, aux changements de pH, à l'hypoxie, à l'irradiation, aux blessures, à l'exposition aux protéines du complément et au stress cellulaire. Elles contiennent des protéines, des lipides, des métabolites, de l'ARN et de l'ADN, qui peuvent potentiellement être transférées aux cellules réceptrices pour influencer leur fonction. Les vésicules extracellulaires se composent de 2 grandes catégories : les exosomes dérivés du corps multivésiculaires mesurant de 40 à 150nm, et les ectosomes ou microvésicules, provenant de la membrane plasmique, mesurant de 100 à 1000nm.

Il est bien établi que les cellules tumorales, tout comme les cellules du micro-environnement tumoral, peuvent produire des vésicules extracellulaires exprimant des checkpoints immuns, modulant ainsi l'activité du système immunitaire face au cancer (12). Ces vésicules extracellulaires présentent l'intérêt de pouvoir co-exprimer plusieurs checkpoints pouvant avoir ainsi un effet synergique sur les cellules cibles. De plus, l'expression de checkpoints peut servir de « signal d'adressage » permettant aux vésicules de délivrer plus spécifiquement leur contenu à certains sous types cellulaires.

Si on poursuit l'exemple de PD-L1 (13), il a été montré que des exosomes PD-L1$^+$ peuvent être présents dans le plasma de patients atteints de mélanome avancé, et que des taux élevés sont associés à une moins bonne réponse aux anti-PD1, ainsi qu'à une moins bonne survie (7). Dans cette même étude, les auteurs montrent que les exosomes PD-L1$^+$ produits par les lignées de mélanome altèrent les fonctions de lymphocytes T CD8$^+$ *in vitro* et dans un modèle murin ; et favorisent la croissance tumorale. Des résultats comparables ont été obtenus avec les exosomes PD-L1+ dérivés de cellules tumorales prostatiques dans lequel le blocage de leur production permet une réduction de la croissance tumorale et la restauration des fonctions immunes notamment mémoires (14). Dans une cohorte de 69 patients opérés pour un cancer de l'estomac, la présence d'exosomes PD-L1$^+$ dans le plasma des patients avant chirurgie est corrélée à une moins bonne survie globale, alors que la concentration plasmatique en sPD-L1 n'est pas corrélée à la survie (15).

Dans un modèle murin de cancer du sein, Wen et al. montrent que les exosomes dérivés de la tumeur s'accumulent particulièrement dans le foie et les poumons des souris, où ils altèrent l'activité des cellules T CD4, T CD8 et NK, favorisent l'accumulation des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSCs) et le développement de métastases (16).

D'autre part, les cellules immunes sont elles aussi capables de produire des vésicules extracellulaires capables de moduler la réponse immune anti-tumorale. Il a ainsi été montré que les vésicules extracellulaires CD19$^+$ peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T CD8 par hydrolyse de l'ATP

via l'expression des molécules CD39 et CD73. Cette inhibition va être responsable d'une baisse de l'activité cytotoxique associée à la chimiothérapie dans un modèle murin de cancer du côlon, et la présence de ces vésicules extracellulaires $CD19^+$ dans le plasma est inversement corrélée à la survie dans une cohorte de patients atteints de cancer du côlon traités par chimiothérapie (17).

Conclusion

L'analyse des formes solubles des checkpoints immuns représente une nouvelle source d'informations pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la cancérogénèse et la dissémination métastatique. Elle reflète toute la complexité de la communication intercellulaire dans le développement du cancer, entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. L'étude de ces formes solubles permet également de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans l'échappement tumoral aux diverses thérapies du cancer, qu'il s'agisse des immunothérapies ou des chimiothérapies conventionnelles. Il s'agit de prime abord, d'une approche simple, accessible puisque l'analyse peut se faire à partir de fluides biologiques facilement disponibles aux cliniciens et aux chercheurs. Cette considération est d'autant plus importante que l'obtention de matériel tumoral est de plus en plus limitée avec la généralisation des traitements néo adjuvants qui diminue la quantité de matériel disponible au moment du diagnostic. Les méthodes d'analyses sont souvent simples (tests ELISA), compatibles avec la recherche de biomarqueurs sur de larges cohortes de patients, ainsi qu'à la transposition ultérieure à la pratique clinique. Cependant, la complexité du système des checkpoints solubles doit être prise en compte lors de l'identification et la description d'un éventuel biomarqueur, afin de comprendre au mieux les mécanismes sous tendus par celui-ci, et envisager sa modulation à des fins thérapeutiques.

Abréviations

ELISA ; enzyme-linked immunosorbent assay

ICI ; immune checkpoints inhibitors

MDSC ; myeloid-derived suppressor cells

PD-1 ; Programmed cell death protein 1

PD-L1 ; Programmed death-ligand 1

Références

1. Hira-Miyazawa M, Nakamura H, Hirai M, Kobayashi Y, Kitahara H, Bou-Gharios G, et al. Regulation of programmed-death ligand in the human head and neck squamous cell carcinoma microenvironment is mediated through matrix metalloproteinase-mediated proteolytic cleavage. Int J Oncol. févr 2018;52(2):379-88.

2. Aguirre JE, Beswick EJ, Grim C, Uribe G, Tafoya M, Chacon Palma G, et al. Matrix metalloproteinases cleave membrane-bound PD-L1 on CD90+ (myo-)fibroblasts in Crohn's disease and regulate Th1/Th17 cell responses. Int Immunol. 21 oct 2019;32(1):57-68.

3. Bailly C, Thuru X, Quesnel B. Soluble Programmed Death Ligand-1 (sPD-L1): A Pool of Circulating Proteins Implicated in Health and Diseases. Cancers. 17 juin 2021;13(12):3034.

4. Ng KW, Attig J, Young GR, Ottina E, Papamichos SI, Kotsianidis I, et al. Soluble PD-L1 generated by endogenous retroelement exaptation is a receptor antagonist. eLife. 8:e50256.

5. Gong B, Kiyotani K, Sakata S, Nagano S, Kumehara S, Baba S, et al. Secreted PD-L1 variants mediate resistance to PD-L1 blockade therapy in non–small cell lung cancer. J Exp Med. 1 avr 2019;216(4):982-1000.

6. Mahoney KM, Shukla SA, Patsoukis N, Chaudhri A, Browne EP, Arazi A, et al. A secreted PD-L1 splice variant that covalently dimerizes and mediates immunosuppression. Cancer Immunol Immunother. 2019;68(3):421-32.

7. Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, et al. Exosomal PD-L1 Contributes to Immunosuppression and is Associated with anti-PD-1 Response. Nature. août 2018;560(7718):382-6.

8. Oh SY, Kim S, Keam B, Kim TM, Kim DW, Heo DS. Soluble PD-L1 is a predictive and prognostic biomarker in advanced cancer patients who receive immune checkpoint blockade treatment. Sci Rep. 5 oct 2021;11(1):19712.

9. Mahoney KM, Ross-Macdonald P, Yuan L, Song L, Veras E, Wind-Rotolo M, et al. Soluble PD-L1 as an early marker of progressive disease on nivolumab. J Immunother Cancer. févr 2022;10(2):e003527.

10. Incorvaia L, Fanale D, Badalamenti G, Porta C, Olive D, De Luca I, et al. Baseline plasma levels of soluble PD-1, PD-L1, and BTN3A1 predict response to nivolumab treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: a step toward a biomarker for therapeutic decisions. OncoImmunology. 1 janv 2020;9(1):1832348.

11. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. J Extracell Vesicles. 27 mai 2013;2:10.3402/jev.v2i0.20360.

12. Xing C, Li H, Li RJ, Yin L, Zhang HF, Huang ZN, et al. The roles of exosomal immune checkpoint proteins in tumors. Mil Med Res. 8 nov 2021;8:56.

13. Daassi D, Mahoney KM, Freeman GJ. The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. Nat Rev Immunol. avr 2020;20(4):209-15.

14. Poggio M, Hu T, Pai CC, Chu B, Belair CD, Chang A, et al. Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. Cell. 4 avr 2019;177(2):414-427.e13.

15. Fan Y, Che X, Qu J, Hou K, Wen T, Li Z, et al. Exosomal PD-L1 Retains Immunosuppressive Activity and is Associated with Gastric Cancer Prognosis. Ann Surg Oncol. oct 2019;26(11):3745-55.

16. Wen SW, Sceneay J, Lima LG, Wong CSF, Becker M, Krumeich S, et al. The Biodistribution and Immune Suppressive Effects of Breast Cancer–Derived Exosomes. Cancer Res. 1 déc 2016;76(23):6816-27.

17. Zhang F, Li R, Yang Y, Shi C, Shen Y, Lu C, et al. Specific Decrease in B-Cell-Derived Extracellular Vesicles Enhances Post-Chemotherapeutic CD8+ T Cell Responses. Immunity. 19 mars 2019;50(3):738-750.e7.

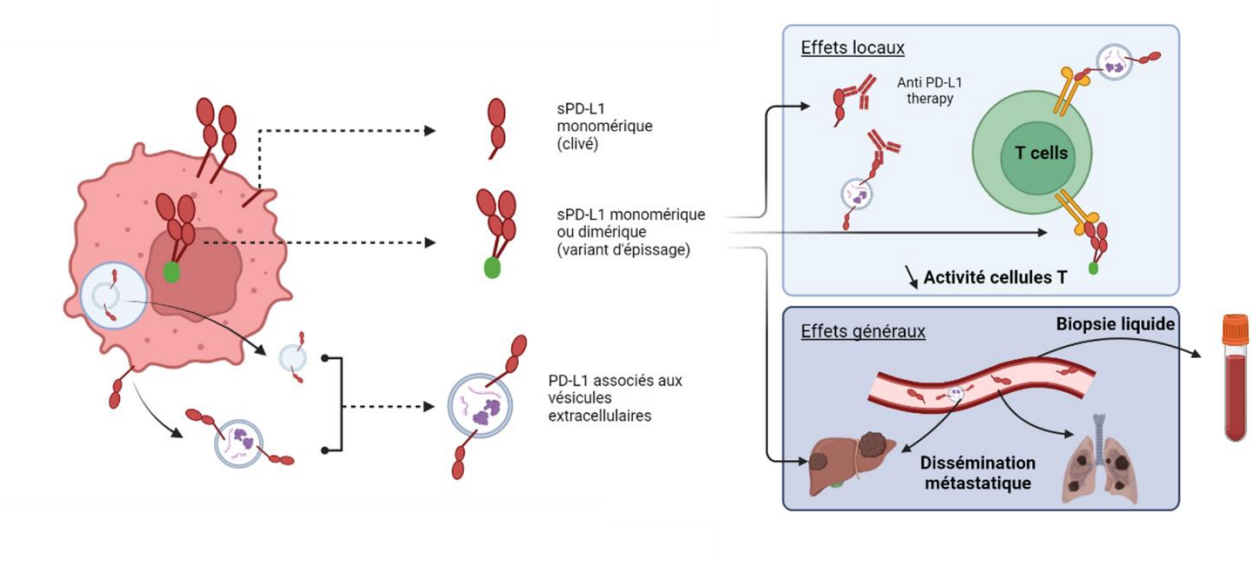


Figure 1. Les différentes formes de PD-L1 solubles et leur impact sur le développement tumoral (adaptée de Daassi, D., Mahoney, K.M. & Freeman, G.J. The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. Nat Rev Immunol 20, 209–215 (2020)).

Annexe 2. Poster présenté à l'ASCO GenituUrinary Congress, San Francisco, USA, 25-27 Janvier 2024

ASCO Genitourinary Cancers Symposium

Poster Session A: Prostate Cancer
Abstract ID #194

Association of BTN2A1+ extracellular vesicles with overall survival and the role of γδ T cells as a potential therapeutic target in patients with hormone-sensitive metastatic prostate cancer

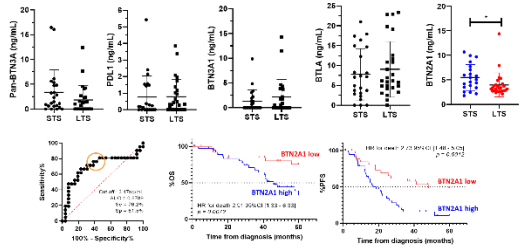
Authors: Emilien Billon[1, 2], Caroline Imbert[1], Laurent Gorvel[1], Manon Richaud[3], Rania Ghossoub[4], Virginie Girault[5], Thierry Fest[5], Gwenaelle Gravis[1, 2], Daniel Olive[1]

1. Tumor Immunology Laboratory, INSERM U1068, Immunomonitoring platform, Cancer Research of Marseille (CRCM), Paoli-Calmettes Institute, INSERM UMR1068, CNRS UMR725, Aix-Marseille University, 13009 Marseille, France. 2. Department of Medical Oncology, Paoli-Calmettes Institute, 13009 Marseille, France. 3.Cytometry platform, Cancer Research of Marseille (CRCM), 13009 Marseille, France. 4.Extracellular vesicles : from signaling mechanistic to therapeutic engineering, Equipe Labellisée Ligue 2018, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Institut Paoli-Calmettes, Aix-Marseille Université, Inserm, CNRS, 13009 Marseille, France. 5. Université de Rennes 1, INSERM, Établissement Français du Sang de Bretagne, UMR_S1236, Rennes, France; Laboratoire d'Hématologie, Pôle de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, Rennes, France.

Background

Despite the recent progress in cancer management, metastatic prostate cancer remains incurable. In the context of immunotherapy failure, we need to identify new immune biomarkers, to improve patient therapy, and explore their potential as therapeutic target. To this end, we screened the prognostic value of soluble immune checkpoints in the plasma of metastatic prostate cancer patients at diagnosis, and depicted their role in anti-tumor activities.

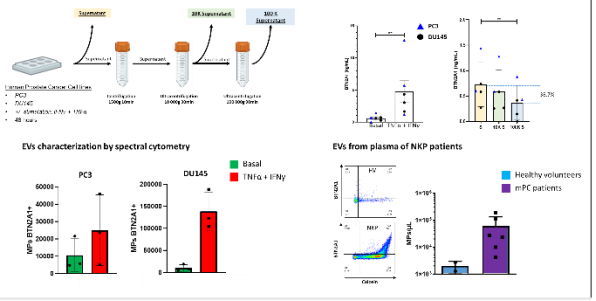
1. Soluble BTN2A1 is a prognostic biomarker in patients with mPC



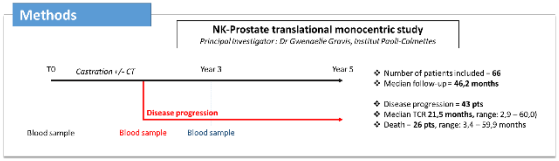
Plasmatic checkpoint concentration assessed by ELISA at diagnostic (n=66)

STS, short term responders (OS < 50 months); LTS, long term responders (OS > 50 months)

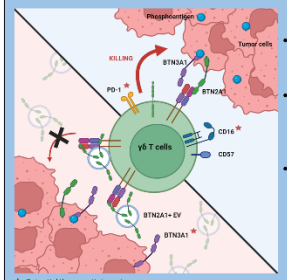
2. BTN2A1+ EVs can be identified in metastatic prostate cancer



Methods

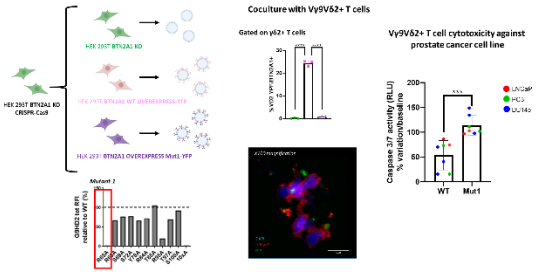


Take Home Message

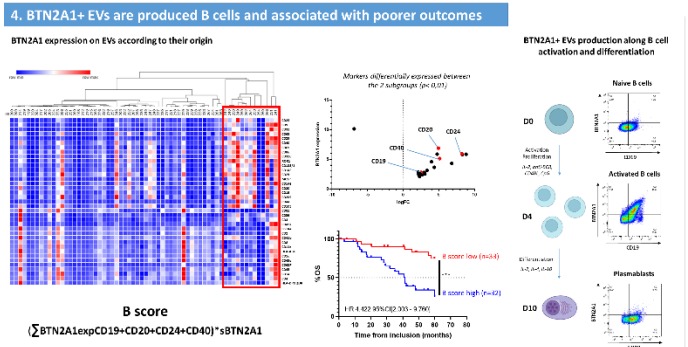


- Plasmatic BTN2A1 represents a new immune prognostic biomarker in mPC
- BTN2A1+ EVs impair γδ2 T cells cytotoxicity in vitro and γδ2 T cells maturation in patients
- Identification of γδ2 T cells as potential therapeutic target with different mechanisms according to BTN2A1+ EVs profile

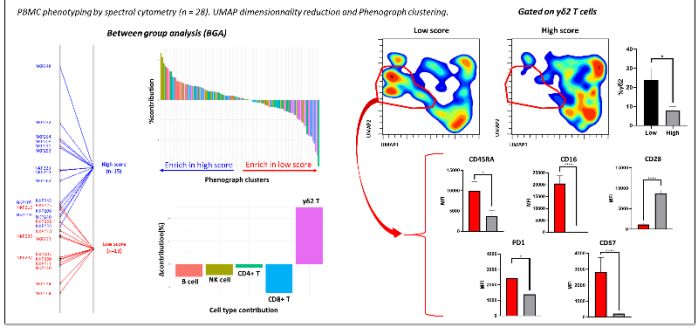
3. BTN2A1+ EVs altered γδ2 T cells cytotoxicity



4. BTN2A1+ EVs are produced B cells and associated with poorer outcomes



5. BTN2A1+ EVs impaired circulating γδ2 T cells maturation in mPC



Declarations

Acknowledgment
This work has been supported by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer

Contact
Emilien Billon
Department of medical Oncology, Paoli-Calmettes, Marseille, France
Plateforme of immunomonitoring, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille, France
emilien.billon@inserm.fr