

Université de Montréal

Valeur pronostique de CD73 et des lymphocytes T CD8+ et optimisation de la vaccination de type GVAX dans le cancer de la prostate

par

Bruno G. Leclerc

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

27 avril 2015

© Bruno G. Leclerc, 2015

Résumé

CD73 est un ecto-enzyme qui a été associé à la suppression de l'immunité anti-tumorale. Ses valeurs pronostiques et thérapeutiques ont été mises de l'avant dans plusieurs types de cancer. La première hypothèse du projet est que l'expression de CD73 dans la tumeur prédit le pronostic des patients atteints du cancer de la prostate. L'expression de CD73 a été étudiée par immunofluorescence dans des échantillons de tumeur. Puis, des analyses univariées et multivariées ont été conduites pour déterminer si l'expression de CD73 permet de prédire la récurrence biochimique des patients. Nous avons déterminé que CD73 prédit indépendamment le pronostic des patients atteints du cancer de la prostate. De plus, nous avons déterminé que son expression dans le tissu normal adjacent ou dans la tumeur prédit différemment la survenue de la récurrence biochimique. La deuxième hypothèse est que l'inhibition de CD73 permet d'améliorer l'efficacité d'un vaccin thérapeutique contre le cancer de la prostate. L'effet d'un vaccin de type GVAX a été étudié dans des souris CD73KO ou en combinaison avec un anticorps ciblant CD73. Nous avons observé que l'efficacité du vaccin était augmentée dans les souris où CD73 était absent. Cependant, la combinaison avec l'anti-CD73 n'a pas permis d'améliorer l'efficacité.

Mots-clés : adénosine, cancer de la prostate, CD73, GVAX, immuno-oncologie, immunothérapie, lymphocyte T, souris, vaccin

Abstract

The ectoenzyme CD73 has been associated with suppression of anti-tumor immunity. Its prognostic and therapeutic values have been highlighted in many types of cancer. The first hypothesis of this project is that tumor CD73 expression predicts the prognosis of prostate cancer patients. CD73 expression was determined by immunofluorescence in tumor tissues. Univariate and multivariate analysis were conducted to determine if CD73 expression could predict patients' biochemical recurrence. We determined that CD73 predicts independently the prognosis of prostate cancer patients. Moreover, we determined that CD73 expression in normal adjacent tissue or in the tumor predicts differently the occurrence of biochemical recurrence. The second hypothesis is that CD73 blockade enhances the efficacy of a therapeutic vaccine against prostate cancer. The GVAX-like vaccine was studied in CD73KO mice or in combination with an antibody against CD73. We observed that the vaccine was more efficient in mice where CD73 was absent. However, the combination with the anti-CD73 did not enhance the efficacy of the vaccine.

Keywords : adenosine, CD73, GVAX, immuno-oncology, immunotherapy, mice, prostate cancer, T lymphocyte, vaccine

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
Chapitre 1	1
1) Introduction	1
1.1) Cancer de la prostate	1
1.1.1) Statistiques	1
1.1.2) La prostate.....	1
1.1.2) Facteurs de risques	1
1.1.3) Hyperplasie bénigne de la prostate.....	4
1.1.4) Pathologies associées au cancer de la prostate.....	4
1.1.5) Caractéristiques	5
1.1.6) Dépistage.....	5
1.1.7) Diagnostic	6
1.1.8) Stades cliniques	7
1.1.9) Pronostic	7
1.1.10) Traitements.....	8
1.1.11) Surveillance active.....	8
1.1.12) Prostatectomie	9
1.1.13) Radiothérapie	10
1.1.14) Brachythérapie.....	11
1.1.15) Cryochirurgie	11
1.1.16) Hormonothérapie.....	12
1.1.17) Traitement du cancer de la prostate résistant à la castration.....	13

1.1.18) Traitement des métastases aux os.....	14
1.1.19) Suivi et récurrence.....	15
1.1.20) Biomarqueurs émergents.....	15
1.1.21) Traitements émergents.....	16
1.2) Système immunitaire et cancer de la prostate.....	17
1.2.1) Inflammation.....	17
1.2.2) Infiltration immunitaire.....	19
1.2.3) Mécanisme d'évasion tumorale.....	21
1.2.4) Immunothérapie.....	24
1.2.5) GVAX.....	26
1.3) CD73 et l'adénosine dans le cancer.....	27
1.3.1) L'adénosine et l'immunosuppression.....	27
1.3.2) Autres rôles des récepteurs à l'adénosine.....	28
1.3.3) Les rôles de CD73.....	29
1.3.4) CD73 et l'immunosuppression comme cible thérapeutique.....	30
1.3.5) CD73 et le pronostic chez l'homme.....	31
1.4) Hypothèses et objectifs de recherche.....	32
1.4.1) La valeur pronostique de CD73 et des lymphocytes T CD8+.....	32
1.4.2) Optimisation de la vaccination de type GVAX.....	33
Chapitre 2.....	35
2.1) Translational Relevance.....	36
2.2) Résumé.....	37
2.3) Abstract.....	38
2.4) Introduction.....	39
2.5) Materials and Methods.....	40
2.5.1) Patients and TMA.....	40
2.5.2) Immunohistochemistry.....	41
2.5.3) Immunofluorescence.....	42
2.5.4) Staining quantification.....	42
2.5.5) NF- κ B activity assay.....	43
2.5.6) Statistical analysis.....	43

2.6) Results	44
2.6.1) CD73 expression is associated with biochemical recurrence and bone metastasis.....	44
2.6.2) Prostate-infiltrating CD8+ cells are associated with worse prognosis	46
2.6.3) Prognostic value of a combined score of CD73 and CD8 expression.....	49
2.6.4) CD73 expression confers a negative prognostic value to CD8+ cells.....	49
2.6.5) CD73 expression negatively correlates with NF- κ B activity	49
2.7) Discussion.....	51
2.8) Grant Support.....	55
2.9) Supplementary figures.....	55
2.10) References.....	61
Chapitre 3	66
Optimisation de la vaccination de type GVAX dans un modèle murin du cancer de la prostate	66
3.1) Résumé	66
3.2) Introduction.....	66
3.3) Méthodes	68
3.3.1) Cellules tumorales et vaccinales	68
3.3.2) Traitement des tumeurs <i>in vivo</i>	69
3.3.3) Analyse des TIL en cytométrie de flux.....	70
3.4) Résultats.....	70
3.4.1) Expression de CD73, de l'OVA et du GM-CSF.....	70
3.4.2) Vaccination des souris CD73KO	71
3.4.3) Proportion des TIL CD8+ spécifiques à l'OVA	73
3.4.4) Combinaison du vaccin et d'un antagoniste du récepteur A2A	74
3.4.5) Combinaison du vaccin et d'un anti-CD73	75
3.5) Discussion.....	76
Chapitre 4	80
4) Discussion générale.....	80
Chapitre 5	86
5) Bibliographie	86

Liste des tableaux

Table 1. Patient characteristics and clinicopathological parameters.....	41
Table 2. Multivariate Cox Regression Analysis of CD73 (top) or CD8 and CD73 (bottom) for BCR-free survival.	46

Liste des figures

Figure 1. Prognostic impact of CD73 in prostate cancer.	45
Figure 2. Prognostic impact of CD8+ cell density in prostate cancer.....	47
Figure 3. Prognostic impact of total CD8+ cell density and a combined CD73/CD8 score.	48
Figure 4. Adenosinergic signaling via A2B adenosine receptor inhibits NF-kB activity in human prostate cancer cells.	51
Suppl. Figure S1. CD73 and CD8 protein expression analysis.	55
Suppl. Figure S2. Distribution of CD73 expression and CD8+ cell density in prostate cancer on TMA.	56
Suppl. Figure S3. Prognostic impact of CD73 in prostate cancer on TMA (n=285).....	56
Suppl. Figure S4. Prognostic impact of CD8 in 285 cases of prostate cancer on TMA.	57
Suppl. Figure S5. (A) Correlation between a combined CD73/CD8 score (using ROC based cut-offs) and BCR-free survival. (B) Correlation between a combined CD73/CD8 score (using the median as cut-offs) and bone metastasis-free survival.	58
Suppl. Figure S6. Correlation between CD73 and TGF- β associated genes in human prostate cancer.....	59
Suppl. Figure S7. Graphical summary.	60
Figure 5: Protocole d'injection et de traitements des souris.	69
Figure 6: Les TRAMP-C1 OVA expriment CD73, le GFP et l'OVA.....	71
Figure 7: Le vaccin de cellules tumorales est plus efficace dans les souris CD73KO.	72
Figure 8: Les TIL CD8+ spécifiques à l'OVA dans les souris CD73KO.....	73
Figure 9: La combinaison du vaccin et d'un antagoniste d'A2A n'augmente pas l'efficacité du traitement des tumeurs.....	74
Figure 10: La combinaison du vaccin et d'un anti-CD73 n'augmente pas l'efficacité du traitement des tumeurs.....	75

Liste des sigles et abréviations

AIP: atrophie inflammatoire proliférative (proliferative inflammatory atrophy)

APC: cellule présentatrice d'antigène (antigen presenting cell)

APS : Antigène prostatique spécifique (prostatic specific antigen)

ARG: arginase

ASAP: petite prolifération acinaire atypique (atypical small acinar proliferation)

CAR: récepteur d'antigène chimérique (chimeric antigen receptor)

COX-2: cyclooxygénase-2 (cyclooxygenase-2)

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité (major histocompatibility complex)

CPRC: Cancer de la prostate résistant à la castration (castration resistant prostate cancer)

CTLA4: antigène associé aux lymphocytes T cytotoxiques 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)

FasL: Fas ligand

FDA: Agence américaine des produits alimentaires et médicaux (Food and drug administration)

GFP: protéine fluorescente verte (green fluorescent protein)

GM-CSF: facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (granulocyte and macrophage colony stimulating factor)

HBP: Hyperplasie bénigne de la prostate (benign prostate hyperplasia)

IDO: indoleamine 2,3-dioxygénase (indoleamine 2,3-dioxygenase)

IL: interleukine (interleukin)

LH-RH: hormone de libération de la lutéinostimuline (Luteinizing Hormone Releasing Hormone)

MRP-1: protéine de résistance multidrogue (multidrug resistance protein-1)

NIP: néoplasie intraépithéliale de la prostate (prostate intraepithelial neoplasia)

NIPHG: néoplasie intraépithéliale de la prostate de haut grade (high grade prostate intraepithelial neoplasia)

NK: cellule tueuse naturelle (natural killer cell)

NOS: synthase d'oxyde nitrique (nitric oxide synthase)

OVA: ovalbumine (ovalbumin)

PAP : Phosphatase acide prostatique (Prostatic acid phosphatase)

PD1: mort cellulaire programmée 1 (programmed cell death 1)

PGE2: prostaglandine E2 (prostaglandin E2)

SNP: polymorphismes nucléotidiques (single nucleotide polymorphism)

TCR: récepteur des cellules T (T cell receptor)

TIL: lymphocyte infiltrant la tumeur (tumor infiltrating lymphocyte)

TLR: récepteur Toll-like (Toll-like receptors)

TMA: micro-étalage tissulaire (tissue microarray)

TNM: Tumeur, ganglion et métastase (Tumor, node and metastasis)

TRAMP: adénocarcinome de la prostate transgénique de souris (transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate)

Tregs: cellules T régulatrices (regulatory T cells)

Remerciements

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé à la réalisation du projet de recherche ou qui était simplement présent au quotidien. Je remercie mon directeur de recherche, John Allard, Vincent Delisle et Marjorie Bergeron; mes collègues employés, Guillaume Chouinard, Isabelle Cousineau, Loïse Gilbert, Sandra Pommey, Pavel Chrobak et Kathleen Spring; des collaborateurs de d'autres laboratoires, Véronique Barrès, Liliane Meunier, Yanik Huon, Benjamin Péant, Guillaume Cardin, Fred Saad, Anne-Marie Mes-Masson, Francis Rodier, Stagg; mes collègues étudiants, Bertrand Allard, Martin Turcotte, Roxanne Charlebois, David Réjean Lapointe, Jean-François Cailhier et Marc Servant. Je remercie les organismes subventionnaires: Instituts de recherche en santé du Canada, Cancer de la prostate Canada, Institut du cancer de Montréal, Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, le Centre de recherche du CHUM, l'institut de recherche Terry Fox et le Fond de recherche du Québec - Santé.

Chapitre 1

1) Introduction

1.1) Cancer de la prostate

1.1.1) Statistiques

En 2014, on estime qu'au Canada, 191 300 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués et que 76 600 personnes en sont décédées.¹ Les cancers sont la cause de 30% des décès au Canada, ce qui en fait la première cause de mortalité. Le cancer de la prostate est le cancer le plus répandu chez l'homme au Canada. En 2014, on s'attendait à 23 600 nouveaux cas, ce qui représente 24% de tous les cancers chez les hommes. Le cancer de la prostate serait la troisième cause de décès parmi tous les cancers chez les hommes. En 2014, on estime que 4000 hommes sont décédés du cancer de la prostate. Cela représente une proportion de 10% des décès causés par tous les cancers. On estime que la survie relative à 5 ans des patients atteints du cancer de la prostate est assez élevé, soit de 96%.

1.1.2) La prostate

La prostate est une glande exocrine qui est responsable de la sécrétion du fluide prostatique qui compose le sperme. Ce fluide représente environ le quart du sperme, le reste étant le liquide séminal et les spermatozoïdes. Le fluide prostatique contient des sucres et des électrolytes, principalement le citrate et le zinc.² Son rôle est de soutenir les spermatozoïdes en apportant des nutriments, en maintenant le pH et en protégeant leur matériel génétique.³ La prostate est située sous la vessie. Elle entoure l'urètre et le canal éjaculateur. Elle est composée de trois zones principales: la zone transitionnelle, la zone centrale et la zone périphérique.

1.1.2) Facteurs de risques

Il y a de nombreux facteurs impliqués dans l'apparition du cancer de la prostate. Les facteurs connus sont environnementaux et héréditaires. Ceux ayant le plus d'impact sur le

développement du cancer de la prostate sont l'âge, l'histoire familiale et l'ethnie. Les Américains d'origine africaine sont plus à risque.⁴

Comme pour la plupart des cancers, l'âge est un facteur de risque important pour le cancer de la prostate. Environ 80% des diagnostics de cancer de la prostate ont lieu chez des hommes de plus de 60 ans.¹ Cela peut s'expliquer par l'accumulation, avec l'âge, de facteurs favorisant la carcinogenèse comme les mutations, l'inflammation, des changements hormonaux et la diminution de l'immunosurveillance. De plus, les hommes plus âgés ont plus de chance d'être diagnostiqués avec un cancer à haut risque et ont une moins bonne survie.⁵

L'origine ethnique est certainement un facteur important faisant varier l'incidence du cancer de la prostate. Les américains d'origine africaine ont un risque 60% plus élevé que les caucasiens de développer un cancer de la prostate.⁴ De plus, le taux de mortalité est 2,4 fois plus élevé chez ce même groupe.⁶ Au contraire, les américains d'origine asiatique auraient un taux d'incidence plus bas que ces deux autres groupes. Ceci peut s'expliquer par des différences génétiques parmi ces groupes ethniques. Par exemple, plusieurs marqueurs génétiques, dont la région 8q24, sont associés au risque plus élevé de cancer de la prostate chez les américains d'origine africaine.⁷

Le cancer de la prostate a une composante héréditaire importante. Un parent au premier degré d'un homme atteint du cancer de la prostate a environ deux fois plus de chance de développer un cancer de la prostate que la population générale.⁸ De plus, on estime que la composante génétique contribue à environ 40% du risque de développer un cancer de la prostate.⁹ Les études d'associations pangénomiques ont révélé plusieurs allèles de susceptibilités au cancer de la prostate.¹⁰ Ce type d'études révèlent des allèles communs qui confèrent un risque plutôt modéré. Le caractère héréditaire du cancer de la prostate semble complexe puisqu'il impliquerait la combinaison de plusieurs de ces allèles. De plus, d'autres types d'études ont révélé des allèles plus rares, mais qui confèrent un risque plus élevé. Parmi celles-ci, on retrouve les gènes BRCA 1 et 2 qui sont associés à un risque accru de cancers du sein et de l'ovaire, mais aussi de la prostate.

Les taux d'incidence du cancer de la prostate varient grandement entre les régions du monde. Les régions développées (Amérique du Nord, Europe de l'Ouest, Australie...) ont les

plus hauts taux d'incidence du cancer de la prostate.¹¹ En 2008, environ 70% des nouveaux cas de cancer de la prostate ont été diagnostiqués dans ces pays. Pourtant, ils représentent seulement environ 20% de la population mondiale. Les plus bas taux d'incidence sont en Asie et en Afrique du Nord. Ceci peut s'expliquer par des différences de dépistage et de diagnostic entre les pays, mais aussi par des facteurs héréditaires et environnementaux. Les américains d'origine chinoise et japonaise ont des taux d'incidence beaucoup plus élevés que leurs homologues de leur pays d'origine.¹² Ceci supporte l'implication importante de facteurs environnementaux dans les différences observées.

Certaines habitudes de vies constituent des facteurs environnementaux qui influencent le développement du cancer de la prostate. Des études indiquent que la diète peut influencer l'incidence du cancer de la prostate. En effet, la consommation de lycopène, de vitamine E, de légume crucifère, de vitamine D, de poisson et de vin rouge diminuerait le risque de développer un cancer de la prostate.¹³ Inversement, la consommation de grandes quantités de gras saturé, de viande rouge, de produit laitier, de calcium et de zinc augmenterait les risques de cancer de la prostate. Plusieurs autres facteurs pourraient avoir un impact sur le cancer de la prostate: l'activité physique, l'obésité, l'activité sexuelle, la vasectomie, la consommation de tabac et d'alcool. Cependant, les résultats des différentes études demeurent contradictoires.

Il est connu que les androgènes jouent un rôle dans le développement du cancer de la prostate. Or, des études ont cherché à vérifier si le niveau d'androgène pouvait être un facteur de risque pour le cancer de la prostate. Une étude a observé que de hauts niveaux de testostérone sanguine sont associés à un risque augmenté de cancer de la prostate.¹⁴ Toutefois, d'autres études ont observé qu'il n'y avait pas d'association avec plusieurs hormones sexuelles, dont la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT).¹⁵ Pourtant, il a été démontré que des inhibiteurs de la 5 α -réductase, l'enzyme de conversion de la testostérone en DHT, permettent de réduire le risque du cancer de la prostate.¹⁶ La DHT a plus d'affinité pour le récepteur des androgènes que la testostérone.

1.1.3) Hyperplasie bénigne de la prostate

L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) est caractérisée par la prolifération des cellules épithéliales et stromales, ce qui résulte en un élargissement de la prostate.¹⁷ Cette condition entraîne la compression de l'urètre et mène souvent à des problèmes urinaires. Elle touche environ 90% des hommes de plus de 80 ans. Les traitements de la HBP sont les alpha-bloqueurs, les inhibiteurs de la 5-alpha réductase ou la chirurgie, principalement la résection transurétrale de la prostate. Malgré des similarités entre les deux pathologies et leur coexistence dans quelques patients, l'HBP ne semble pas prédisposer au développement du cancer de la prostate.¹⁸

1.1.4) Pathologies associées au cancer de la prostate

Il existe plusieurs pathologies de la prostate qui sont associées au cancer de la prostate. Ces pathologies sont bénignes et partagent des caractéristiques avec le carcinome. On pense que celles-ci pourraient être un état précancéreux, c'est-à-dire un précurseur du cancer. La néoplasie intraépithéliale de la prostate (NIP) et la petite prolifération acinaire atypique (ASAP) ont été associées au cancer de la prostate puisqu'on les trouve souvent dans les prostates où il y a des cellules cancéreuses.¹⁹ Lorsqu'on découvre l'une d'elles, le pathologiste examine attentivement le spécimen de tissu à la recherche de cancer. S'il n'en découvre pas, il est recommandé d'initier un protocole de suivi avec ces patients et de reprendre une biopsie.

La néoplasie intraépithéliale de la prostate (NIP) est caractérisée par la prolifération anormale des cellules épithéliales dans les canaux et acinus prostatiques préexistants.²⁰ Les changements morphologiques sont similaires au cancer de la prostate. Cependant, il n'y a pas d'invasion de la membrane basale. Il existe deux classifications de la NIP: de haut grade (NIPHG) et de bas grade. La NIP de haut grade est fortement associée au développement du cancer de la prostate. Il est estimé que 30% des hommes avec plusieurs foyers de NIPHG développeront un cancer de la prostate dans les 2 ans à venir.¹⁹ De plus, en moyenne 31% des patients auront une biopsie subséquente positive pour le cancer de la prostate lorsqu'une NIPHG est présente.²¹

La petite prolifération acinaire atypique (ASAP) désigne un groupe de lésions qui ont des caractéristiques similaires au cancer de la prostate, mais insuffisantes pour un diagnostic.²² Les acini sont souvent petits et atypiques, mais leur nombre et le degré d'atypie n'est pas assez élevé pour être un carcinome. On retrouve l'ASAP dans environ 5% des biopsies de prostate. Lorsque c'est le cas, il y a en moyenne 40% de chance de retrouver un cancer sur une biopsie subséquente.²¹

L'atrophie est la diminution du volume d'une glande préexistante de la prostate.²³ L'atrophie inflammatoire proliférative (AIP) est une atrophie focale. L'AIP se caractérise par la présence d'inflammation près d'un foyer d'épithélium glandulaire atrophié qui prolifère. Par des observations histologiques, il a été mis de l'avant que l'AIP pouvait être un précurseur de la NIPHG et du carcinome de la prostate.²⁴ Cependant, cette hypothèse demeure controversée, car plusieurs études n'ont pas démontré d'association positive entre ces conditions.

1.1.5) Caractéristiques

Les cancers de la prostate sont majoritairement des adénocarcinomes provenant de cellules épithéliales glandulaires.²⁵ Les autres types de cancer de la prostate sont considérés rares. Le principal lieu d'occurrence de l'adénocarcinome est la zone périphérique de la prostate. De façon générale, le cancer de la prostate est un cancer qui évolue lentement. En effet, il demeure dans un état latent pendant plusieurs années. Il a été estimé que la période asymptomatique, pendant laquelle le cancer demeure indétectable cliniquement, durerait environ 12 ans.²⁶ De plus, on estime qu'il y a une proportion élevée de cancers de la prostate qui sont à ce stade. Cependant, certains de ces cancers vont progresser et être létaux à long terme. En effet, une étude a démontré que la survie pour des cancers de la prostate localisés diminue au-delà de 15 à 20 ans.²⁷ Les cancers de la prostate plus avancés peuvent présenter certains symptômes. Les plus importants incluent des symptômes urinaires, des douleurs aux os, des fractures, des pertes de poids et des désordres sanguins.²⁸

1.1.6) Dépistage

La plupart du temps, le cancer de la prostate est asymptomatique. C'est pourquoi on utilise le dépistage pour détecter les nouveaux cas. Les deux techniques de dépistage du cancer

de la prostate utilisées sont le toucher rectal et le dosage de l'antigène prostatique spécifique (APS). Cependant, ces techniques ne permettent pas de diagnostiquer le cancer. Le toucher rectal est l'outil de dépistage le plus courant. Il permet d'identifier des changements de taille, de forme et de consistance par rapport à une prostate normale, ce qui peut indiquer la présence de cancer.²⁹ Le dépistage par l'APS consiste à mesurer sur une base régulière son taux sanguin. Une augmentation du taux par rapport au niveau de base peut être indicateur du cancer de la prostate. Cependant, ce test peut conduire à des faux positifs et des faux négatifs.³⁰ En effet, d'autres affections de la prostate comme l'HBP peuvent augmenter le taux d'APS sanguin. Inversement, il a été démontré que certains patients atteints du cancer de la prostate ont un taux d'APS bas.³¹ Les faux positifs peuvent engendrer des biopsies et traitements inutiles qui nuisent au patient. De plus, les effets bénéfiques du test semblent moins bien démontrés que les effets néfastes.³² C'est pourquoi ce test n'est recommandé qu'aux patients entre 55 et 70 ans ayant une espérance de vie de plus de dix ans. Ceux-ci en tireraient le plus grand bénéfice.

1.1.7) Diagnostic

Un résultat positif à un test de dépistage ou la présence de symptômes conduit à un prélèvement de biopsies de la prostate. On prélève habituellement de 10 à 14 biopsies à travers le rectum.³³ On utilise souvent une échographie transrectale pour guider le médecin lors des biopsies. L'échographie transrectale peut aussi servir à détecter la présence d'une tumeur, mesurer la taille de la prostate et guider les traitements de brachythérapie et de cryochirurgie.³⁴ Le diagnostic du cancer de la prostate se fait à partir d'observations histologiques et cytologiques des biopsies.³³ La plupart du temps, le pathologiste attribuera alors un grade à la tumeur qui est appelé le score de Gleason. Il s'agit d'un score de 2 à 10 qui représente le niveau de différenciation de la tumeur.³⁵ Il résulte de l'addition de deux scores de 1 à 5 attribués aux deux motifs prédominants dans les biopsies. Le score de Gleason indique le niveau de risque de la tumeur. Les tumeurs avec un score de 3 à 5 présentent un niveau de risque faible, celles qui ont un score de 6 présentent un risque intermédiaire et celles qui ont un score de 7 et plus présentent un risque élevé.

1.1.8) Stades cliniques

Lorsqu'un diagnostic est confirmé, on doit déterminer jusqu'où la maladie a progressé. Pour ce faire, on attribue un stade qui indique le niveau de propagation de la tumeur. La méthode la plus utilisée est la classification TNM. La lettre T renseigne sur la taille de la tumeur et si elle s'est propagée à l'extérieure de la prostate.³⁶ Les stades T1 et T2 caractérisent des cancers confinés dans la prostate, tandis que T3 et T4 des cancer s'étant propagés à l'extérieur. La lettre N indique s'il y a eu propagation aux ganglions lymphatiques. La lettre M indique la présence de métastases. Au diagnostic, le médecin peut seulement donner le stade clinique. Ce stade est une estimation de la propagation du cancer selon les résultats du toucher rectal, des biopsies et de techniques d'imagerie comme l'échographie transrectale.³⁷ On peut attribuer un stade plus précis qu'on nomme stade pathologique. Dans la majorité des cas, il est déterminé après une prostatectomie radicale incluant les ganglions lymphatiques adjacents. Suite au diagnostic, le médecin utilise les résultats d'examens, le taux d'APS et le score Gleason pour estimer le risque de métastases. En effet, il est peu probable de trouver des métastases chez les patients asymptomatiques qui ont un taux d'APS de moins de 20ng/ml et dont la tumeur est bien ou modérément différenciée.³⁸ Chez les patients à risque, le médecin peut prescrire des tests d'imageries qui permettront de vérifier la présence de métastases. Des techniques comme la scintigraphie osseuse, la tomодensitométrie et la résonance magnétique sont utilisées, car le cancer de la prostate engendre souvent des métastases aux os.³⁴ De plus, il est possible de réaliser des biopsies des ganglions lymphatiques et des os pour confirmer la présence de cellules cancéreuses. Après avoir récolté toutes ces données, on effectue le regroupement des stades. Ceci consiste en la combinaison du stade TNM, du taux d'APS et du score de Gleason pour donner un stade global de I à IV.

1.1.9) Pronostic

La progression de la maladie influence beaucoup plus le pronostic du cancer de la prostate que le choix du traitement.³³ C'est pourquoi l'utilisation de nomogrammes tenant compte du stade, du taux d'APS et du score de Gleason permet de prédire adéquatement le pronostic.³⁹ Les nomogrammes se fient aux statistiques de survie des patients selon les caractéristiques de leur cancer. Le stade a une forte influence sur le pronostic puisqu'il indique

le niveau de progression de la maladie. De façon globale, on distingue le cancer de la prostate localisé, localement avancé et métastatique. La survie à 5 ans des cancers localisés et localement avancés sont de près de 100%.⁴⁰ Par contre, pour le cancer métastatique, la survie diminue drastiquement à près de 30%. Il est intéressant de noter que le cancer localisé, localement avancé et métastatique représente respectivement environ 80%, 12% et 4% des cancers de la prostate. Malgré une efficacité modérée pour le dépistage, le niveau d'APS est très utile pour évaluer le pronostic et suivre la progression de la maladie. De plus, la vélocité de l'APS est une mesure de la variation du taux d'APS dans le temps. Il s'avère que la vélocité de l'APS est un bon prédicateur de la récurrence du cancer et du décès du patient.⁴¹ Le score de Gleason est aussi un bon outil pronostique, car le degré de différenciation est indicateur de l'agressivité des cellules tumorales. En effet, les hommes avec un score de Gleason de 8 à 10 ont une forte probabilité de mourir de leur cancer dans les 10 ans.⁴²

1.1.10) Traitements

Il existe de nombreux traitements pour le cancer de la prostate. Le choix du traitement sera guidé par les caractéristiques de la tumeur et le pronostic. Ainsi, on donne le traitement qui est le plus approprié selon le type de cancer. De plus, on devra tenir compte de l'âge, de l'espérance de vie et de l'état de santé du patient.³⁵ En effet, ces facteurs influencent la probabilité que le cancer progresse ou qu'il cause le décès. On tient compte aussi des effets secondaires du traitement en relation avec l'état de santé.

1.1.11) Surveillance active

La plupart des cas de cancers de la prostate sont des cancers localisés qui croissent lentement et qui ont de faibles chances de causer la mort. Donc, en tenant compte de l'espérance de vie, certains patients pourraient ne pas bénéficier d'un traitement actif. C'est pourquoi plusieurs patients avec ce type de cancer ne reçoivent pas de traitement et sont plutôt mis sous surveillance active. Dans plusieurs cas, cela permet de retarder l'initiation d'un traitement ou même de l'éviter complètement.⁴³ On évite ainsi les effets indésirables liés aux traitements. L'objectif de la surveillance active est de détecter une possible progression de la maladie. Pour ce faire, des mesures du taux d'APS, des touchers rectaux et des biopsies

répétées sont réalisés à des intervalles réguliers. Les deux premiers peuvent être réalisés à tous les 3 à 12 mois, tandis que les biopsies sont effectuées moins régulièrement. Une augmentation du score de Gleason sur une biopsie, de la vélocité de l'APS ou de l'étendue de la tumeur sont des raisons qui poussent à l'initiation d'un traitement actif. Il semble que cette option soit bénéfique pour les patients à faible risque. En effet, on estime que le 2/3 des patients sous surveillance active ne devront pas recevoir de traitement actif et que le taux de mortalité est seulement de 1%.⁴⁴

1.1.12) Prostatectomie

Les patients avec un cancer localisé ayant une tumeur moins bien différenciée et une plus grande espérance de vie se verront plutôt proposer un traitement actif.³³ La prostatectomie radicale est un choix commun lorsqu'on estime que la tumeur ne s'est pas étendue à l'extérieur de la prostate.³⁴ Cette chirurgie consiste à enlever la prostate entière, les vésicules séminales et d'autres tissus adjacents. Il existe deux types de prostatectomie: rétropubienne et laparoscopique. Dans la première, on enlève la prostate via une incision de l'abdomen près du pubis. Cette incision permet d'enlever les ganglions lymphatiques pour vérifier s'ils sont touchés par le cancer. Dans ce cas, la chirurgie est habituellement annulée, car il y a moins de chance que le cancer soit complètement enlevé. La prostatectomie laparoscopique est moins invasive que la prostatectomie rétropubienne.⁴⁵ C'est pourquoi elle devient de plus en plus populaire. Dans cette procédure, plusieurs petites incisions sont faites afin d'introduire plusieurs longs instruments chirurgicaux, incluant une caméra, qui permettront d'enlever la prostate.³⁴ Cette chirurgie peut se faire à l'aide de bras robotiques qui sont contrôlés via un panneau de contrôle. Il a été démontré que la prostatectomie laparoscopique permet de diminuer les saignements et le séjour à l'hôpital.⁴⁵ De plus, si elle est assistée par robot, on note une diminution des risques de ne pas enlever tout le tissu cancéreux et de plusieurs complications de la chirurgie. Ceci serait imputable à de meilleurs outils de visualisation et une plus grande précision du contrôle des instruments.⁴⁶ Les effets indésirables communs de la prostatectomie radicale sont l'incontinence urinaire et l'impuissance.⁴⁷ La prostatectomie serait plus appropriée pour traiter le cancer localisé à plus haut risque. En effet, il a été démontré qu'il n'y avait pas de différence de mortalité entre la prostatectomie et la surveillance active pour les

cancers localisés en général.⁴⁸ Cependant, la prostatectomie permettait une réduction de la mortalité chez les patients avec une tumeur à haut risque et un taux d'APS élevé.

1.1.13) Radiothérapie

Un autre traitement couramment utilisé pour le cancer de la prostate est la radiothérapie. Elle est utilisée pour les cancers de la prostate localisés et localement avancés. Cependant, pour les cancers à haut risque l'utilisation concomitante avec l'hormonothérapie est recommandée.⁴⁹ De plus, on l'utilise comme adjuvant après une chirurgie dont on soupçonne ne pas avoir enlevé tout le tissu cancéreux. La radiothérapie externe consiste à concentrer des rayons ionisants provenant de l'extérieur du corps sur la prostate.³⁴ Les techniques d'imagerie peuvent aider à localiser la prostate avant le traitement. Plusieurs méthodes d'irradiation ont été développées afin de mieux focaliser les rayons sur la prostate. Ceci permet de diminuer l'atteinte des tissus sains et d'augmenter la dose à la tumeur.⁵⁰ Par exemple, la radiothérapie conformationnelle en trois dimensions permet de concentrer des rayons provenant de différentes directions grâce à un ordinateur qui détermine la position de la prostate.⁵¹ Une forme plus avancée de celle-ci se nomme radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité. Sa particularité est que l'ordinateur change l'intensité du rayonnement selon l'angle pour épargner les tissus normaux sensibles.⁵² Elle a largement remplacé la radiothérapie conventionnelle pour devenir la technique d'irradiation la plus commune utilisée pour traiter le cancer de la prostate.⁵³ La radiothérapie par proton est en émergence dans le cancer de la prostate. La radiothérapie guidée par l'image et la radiothérapie stéréotaxique sont d'autres techniques qui offrent une précision élevée.⁵⁰ Les effets secondaires des traitements de radiothérapie de la prostate incluent: des problèmes gastro-intestinaux, urinaires, sexuels et osseux.⁵³ Il a été démontré que la radiothérapie externe causait plus de problèmes intestinaux, mais moins de problèmes urinaires que la prostatectomie.⁵⁴ De plus, une large étude a déterminé que la radiothérapie externe menait à une survie légèrement diminuée par rapport à la prostatectomie pour des cancers localisés.⁵⁵

1.1.14) Brachythérapie

La brachythérapie est une radiothérapie interne utilisée pour traiter le cancer de la prostate. Elle est recommandée principalement pour les patients avec un cancer de la prostate localisé à faible risque.⁵⁶ Elle consiste en l'insertion dans la prostate de plusieurs petites pastilles radioactives qui permettent une irradiation locale.³⁴ Pour ce faire, on utilise des aiguilles insérées entre le scrotum et l'anus. On distingue la brachythérapie temporaire de la brachythérapie permanente. Pour la première méthode, les aiguilles contenant les pastilles sont laissées en place seulement quelques minutes pour chaque traitement. Ceci permet l'utilisation d'une haute dose de radiation. À l'opposé, pour la brachythérapie permanente, les pastilles demeurent dans la prostate après l'administration avec les aiguilles. Ainsi, on place plusieurs dizaines de pastilles ayant un faible niveau de radiation. L'émission de radiation persiste quelques semaines jusqu'à son épuisement. Le positionnement des aiguilles est guidé par un plan élaboré avec une échographie transrectale.⁵⁶ La brachythérapie est une procédure dont le patient se remet rapidement. Elle permet un traitement ciblé de la prostate en touchant minimalement les tissus sains. Les effets secondaires de cette méthode sont similaires à ceux de la radiothérapie externe. Cependant, une étude a démontré que la brachythérapie cause plus d'irritations urinaires et affecte moins la fonction sexuelle que la radiothérapie externe.⁵⁴ Aussi, chez des patients avec un cancer localisé, la survie était légèrement diminuée avec la brachythérapie comparativement à la prostatectomie et la radiothérapie externe.⁵⁵

1.1.15) Cryochirurgie

La cryochirurgie peut être utilisée comme méthode minimalement invasive pour traiter les cancers de la prostate localisés.⁵⁷ On l'utilise comme traitement primaire et pour traiter une tumeur récurrente suite à un autre traitement. La cryochirurgie a pour objectif de congeler les cellules de la prostate afin d'engendrer la mort cellulaire. On utilise des sondes insérées entre le scrotum et l'anus dans lesquelles circulent des gaz pressurisés. Le passage des gaz permet d'obtenir une température très basse qui entraîne la congélation du tissu environnant. Une échographie transrectale permet de guider l'installation des sondes et de suivre la congélation des tissus. De plus, on utilise un cathéter pour réchauffer l'urètre et des sondes pour mesurer la température. Ces outils permettent d'éviter d'endommager les tissus sains. Les complications

de cette procédure sont peu fréquentes.⁵⁸ Celles-ci incluent des obstructions urinaires et l'impuissance. D'autre part, la cryochirurgie semble efficace pour les patients ayant subi un échec de leur premier traitement.

1.1.16) Hormonothérapie

Le récepteur des androgènes est exprimé dans tous les stades du cancer de la prostate et son activation stimule la prolifération des cellules de la prostate.⁵⁹ L'hormonothérapie est un traitement du cancer de la prostate qui empêche l'effet des androgènes sur les cellules tumorales. Elle entraîne la diminution de la taille de la tumeur et des métastases. L'hormonothérapie est le traitement standard pour les cancers de la prostate métastatiques.⁶⁰ De plus, elle est utilisée pour le traitement des cancers localement avancés et récurrents. Comme mentionnée plus tôt, elle peut être utilisée en concomitance avec la radiothérapie. L'hormonothérapie n'est pas une option curative du cancer de la prostate, mais plutôt palliative.⁶¹ En effet, elle permet de contrôler les symptômes liés aux métastases et de prolonger la vie. Par contre, presque tous les cancers traités vont progresser et devenir résistant à castration.⁶² Plusieurs types d'hormonothérapies existent. L'orchidectomie ou l'ablation chirurgicale des testicules en est un exemple. Les testicules sont l'organe principal de production des androgènes, donc la chirurgie cause une diminution rapide et soutenue du niveau d'androgènes.⁶³ Par contre, les patients ont de la difficulté à accepter la perte des testicules. Ceci a fait en sorte que l'orchidectomie a été largement remplacée par les analogues de l'hormone de libération de la lutéinostimuline (LH-RH). Cette dernière constitue la principale hormonothérapie utilisée de nos jours. Son mécanisme est de désensibiliser l'hypophyse pour diminuer la sécrétion de la lutéinostimuline et de la testostérone.⁶⁴ En raison du temps nécessaire à la désensibilisation, les androgènes sont transitoirement augmentés avant de diminuer.⁶³ Pendant ce temps, la croissance de la tumeur et des métastases est augmentée ce qui exacerbe les symptômes. Il existe des antagonistes de la LH-RH qui ont sensiblement les mêmes effets sans cette augmentation initiale des androgènes. De plus, l'administration d'antagonistes du récepteur des androgènes avant l'agoniste LH-RH permet d'éviter ce phénomène. Les antiandrogènes peuvent être utilisés en combinaison avec une méthode de castration. Par contre, le bénéfice de cette combinaison n'est pas clairement démontré. Habituellement, ils ne sont pas utilisés en monothérapie. D'autre part, il est possible

de donner une hormonothérapie intermittente, c'est-à-dire d'arrêter le traitement quelque temps pour ensuite le recommencer. Cette méthode pourrait prévenir les complications associées au traitement à long terme et retarder l'apparition du cancer résistant à la castration. L'hormonothérapie cause plusieurs effets indésirables. Parmi ceux-ci on compte une diminution de la libido, l'impuissance et une diminution de la taille des organes génitaux.³⁴ De plus, il y aurait augmentation des risques de maladie cardiovasculaire, de diabète et d'ostéoporose.⁶³

1.1.17) Traitement du cancer de la prostate résistant à la castration

Le cancer de la prostate résistant à la castration (CPRC) est défini comme une tumeur qui continue à croître malgré le bas niveau d'androgènes résultant de la castration.³⁴ Il est associé à un mauvais pronostic, car les patients survivent seulement de 9 à 30 mois et que 84% d'entre eux ont des métastases.⁶⁵ On estime que 10 à 20% des patients atteints du cancer de la prostate développeront un CPRC. Ce dernier est considéré incurable, mais il existe des traitements qui permettent d'augmenter la survie des patients. On croit que le CRPC demeure dépendant à l'androgène.⁶⁶ Ceci peut s'expliquer, par exemple, par un faible niveau d'androgène résiduel. C'est pourquoi certains traitements hormonaux pourraient toujours aider les patients avec ce type de tumeur. Par contre, il existe des cancers qui sont indépendants à l'androgène, nommés hormono-résistants, pour lesquels aucune forme d'hormonothérapie n'a d'effet.⁶⁰ Les hormonothérapies utilisées pour le CPRC sont l'enzalutamide et l'acétate d'abiratérone. L'enzalutamide est un antiandrogène qui a beaucoup plus d'affinité pour le récepteur des androgènes. L'acétate d'abiratérone bloque la synthèse résiduelle des androgènes par l'inhibition du cytochrome P450c17 dans les testicules, les glandes surrénales et la prostate.⁶³ On l'utilise en combinaison avec la prednisone pour améliorer l'efficacité et diminuer les effets secondaires dus à l'augmentation des minéralocorticoïdes.⁶⁷ La chimiothérapie standard pour traiter le CPRC est le docetaxel, aussi utilisé avec la prednisone. Il s'agit d'un taxane inhibant l'assemblage des microtubules.⁶⁸ D'autre part, une immunothérapie sous forme de vaccin, nommé Sipuleucel-T, est utilisée pour traiter le CPRC, mais n'est pas approuvée au Canada. (Voir la section 1.2.4 p.34) L'«American urological association» a émis un guide pour le choix du traitement selon les caractéristiques suivantes: présence de métastases, degré des symptômes, degré d'activité du patient et traitement

préalable avec docetaxel.⁶⁸ Puisqu'il demeure difficile de traiter le CPRC, de nombreuses nouvelles thérapies sont présentement en étude clinique afin de trouver une meilleure option thérapeutique pour les patients.

1.1.18) Traitement des métastases aux os

Les os sont le principal site de métastase du cancer de la prostate. En effet, environ 80% des cancers de la prostate de stades avancés présentent des métastases aux os.⁶⁹ Elles sont la cause de plus de mortalité et de plusieurs symptômes sérieux. Les plus importants sont les douleurs osseuses, des fractures, des compressions de la moelle épinière et des parésies. De plus, l'âge avancé des patients et le traitement par hormonothérapie augmentent les complications liées aux os.⁶⁸ Ceci justifie l'utilisation de thérapies permettant de prévenir et de traiter les métastases aux os. Lorsqu'il y a présence de métastases osseuses, on note une augmentation de la dégradation de l'os résultant de l'activité des ostéoclastes.⁶⁹ Ceci contribue aux complications des métastases. Les traitements du cancer de la prostate métastatique incluent donc des thérapies limitant la dégradation de l'os. Les biphosphonates inhibent l'activité des ostéoclastes. L'acide zolédronique est le seul biphosphonate à avoir démontré un effet bénéfique pour le CRPC métastatique.⁶⁸ Le denosumab permet aussi d'inhiber les ostéoclastes. Il s'agit d'un anticorps monoclonal dirigé contre RANKL, un important médiateur de la fonction des ostéoclastes. Les radiopharmaceutiques permettent de traiter les métastases osseuses. Le Radium-223 émet du rayonnement alpha à courte distance permettant d'endommager les cellules cancéreuses en évitant la moelle osseuse. Sa ressemblance au calcium permet son accumulation dans les métastases osseuses. D'autre part, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et l'immunothérapie, utilisée pour le CPRC, peuvent aider à traiter les métastases.³⁴ Des traitements de radiothérapie externe ciblés sur les zones douloureuses permettent de soulager celles-ci. Des médicaments contre la douleur, comme des anti-inflammatoires ou des opioïdes, peuvent être prescrits. Finalement, des traitements préventifs des fractures, comme le calcium et la vitamine D sont recommandés.⁶⁸

1.1.19) Suivi et récurrence

L'utilisation du taux d'APS pour déterminer l'efficacité de la thérapie et indiquer la récurrence du cancer est largement acceptée par les cliniciens.⁷⁰ Cela offre l'avantage de constater l'échec du traitement plusieurs années avant l'apparition de symptômes cliniques. Habituellement, le taux d'APS diminue drastiquement après un traitement.³⁴ L'augmentation de ce taux au-delà d'un certain seuil après un traitement se définit comme la récurrence biochimique.⁷⁰ Elle est acceptée comme une évidence de la réapparition du cancer. Cependant, le taux d'APS après le traitement varie en fonction de celui-ci. Pour la prostatectomie, l'APS devient indétectable dans un intervalle de six semaines. S'il redevient détectable, cela implique que le cancer est récurrent. Pour la prostatectomie, il est recommandé de définir la récurrence biochimique comme une augmentation de l'APS au-delà de 0,2 ng/ml. Au contraire, la radiothérapie ne permet pas de diminuer l'APS à un niveau indétectable. Celui-ci, prend plutôt d'un à deux ans à atteindre son niveau le plus bas. Pour la radiothérapie, il est recommandé de définir la récurrence biochimique comme ayant lieu après trois augmentations consécutives de l'APS après son point le plus bas.⁷¹ Pour les cancers de la prostate avancés, on utilise plutôt la vélocité de l'APS pour déterminer si un autre traitement est requis.³⁴ Le nouveau traitement dépend du lieu de la récurrence et du traitement primaire.

1.1.20) Biomarqueurs émergents

Malgré l'utilisation répandue du test de l'APS comme outil clinique, il présente plusieurs limitations. Sa variabilité et son manque de spécificité pour le cancer nuisent à son utilisation comme outil de dépistage.⁷² De plus, sa valeur pronostic est limitée par un manque de relation linéaire avec le stade et la présence de métastases. Ceci justifie la recherche de nouveaux biomarqueurs qui seraient utiles pour détecter le cancer de la prostate et prédire son pronostic. De nombreux biomarqueurs potentiels du cancer de la prostate sont à l'étude. Le biomarqueur émergent le plus important est «prostate cancer antigen 3» (PCA3).⁷³ Il s'agit d'un ARN non codant pouvant être détecté dans l'urine. Le test est très sensible et spécifique. PCA3 est détecté dans plus de 90% des cancers de la prostate et pas dans les tissus normaux et hyperplasiques. Le test PCA3 a été approuvé pour le diagnostic du cancer de la prostate après une biopsie négative. Un autre biomarqueur intéressant est la fusion des gènes TMPRSS2-

ERG. Elle se trouve parmi les événements génétiques les plus communs avec une occurrence dans 50% des cancers de la prostate. Sa mesure dans l'urine en combinaison avec PCA3 s'est révélée un outil diagnostique prometteur. De plus, elle pourrait être utilisée comme outil pronostique, étant possiblement associée avec l'agressivité de la tumeur. Malgré tout, il reste difficile de trouver un biomarqueur fiable et précis.

1.1.21) Traitements émergents

Au contraire des cancers de la prostate localisés, les cancers avancés comme le CPRC sont incurables. C'est pourquoi de nombreux efforts ont été faits pour trouver de nouvelles thérapies pour le CPRC. Cela a permis l'approbation de plusieurs thérapies émergentes qui augmentent la survie pour ce type de tumeur. Ces thérapies comprennent l'enzalutamide, l'acétate d'abiratéron, le cabazitaxel, le sipuleucel-T, le denosumab et le radium-223. (voir section 1.1.17 p.22) D'autres thérapies potentielles sont présentement en étude clinique. Le bénéfice des antiangiogéniques a été étudié pour le cancer de la prostate.⁷⁴ Le tasquinimod est en étude clinique de phase III en monothérapie. (NCT01234311) Malheureusement, l'aflibercept, le bevacizumab et le lénalidomide n'ont pas démontré d'avantage sur la survie en combinaison avec docetaxel et prednisone en étude clinique de phase III.⁷⁵ De la même façon, les antagonistes du récepteur de l'endotheline, l'atrasentan et le zibotentan, n'ont pas améliorés la survie. Des inhibiteurs des tyrosines kinases ont été en investigation pour le CPRC. Le dasatinib n'a pas, lui non plus, permis d'améliorer la survie. Par contre, le cabozantinib, un inhibiteur des récepteurs Met et du VEGF, est sous étude. (NCT01703065) De plus, le OGX-011 ou custirsén, un inhibiteur de la synthèse de clustérine est à l'étude en combinaison avec docetaxel et prednisone. (NCT01188187) D'autres immunothérapies sont aussi à l'étude dans le CPRC: GVAX, ipilimumab et PROSTVAC-VF. (Voir la section 1.2.4 p.34) Malgré les progrès récents, plusieurs traitements échouent à augmenter la survie des patients et les traitements approuvés en permettent une augmentation limitée.

1.2) Système immunitaire et cancer de la prostate

1.2.1) Inflammation

L'inflammation de la prostate se nomme prostatite. Elle a une forte prévalence chez les hommes adultes. Un consensus a été établi pour différencier 4 types de prostatites: bactérienne aiguë (I), bactérienne chronique (II), chronique (III) et asymptomatique (IV).⁷⁶ Les trois premières sont symptomatiques. Les deux premières sont causées par des bactéries comme *E. coli*. Elles sont bien connues, mais moins communes. La prostatite chronique est la plus commune des prostatites symptomatiques, représentant 90% des cas. Les causes de celle-ci sont peu connues. La prostatite asymptomatique ne présente pas de symptômes. Elle est souvent découverte lors d'une biopsie pour une autre pathologie de la prostate.

L'inflammation chronique de la prostate pourrait contribuer au risque de développer un cancer de la prostate. En effet, plusieurs études ont démontré l'augmentation de ce risque chez les hommes atteints de prostatite.⁷⁷ Par contre, ces études présentent un biais de détection, car il y a plus de chance de détecter le cancer chez les hommes qui sont suivis pour une prostatite. Comme discuté précédemment, l'atrophie inflammatoire proliférative pourrait être un précurseur du cancer de la prostate. (voir section 1.1.4; p.14) Le fait que cette lésion soit liée à l'inflammation chronique, à la prolifération et au NIPHG suggère un lien entre l'inflammation et le développement du cancer de la prostate.⁷⁷ Les infections de la prostate sont une cause de l'inflammation chronique. Même si on ne détecte pas de microorganismes lors de prostatite chronique (III), plusieurs indices supportent qu'une infection en soit la cause. Dans le même ordre d'idée, des modèles animaux ont démontré que l'inflammation chronique pouvait persister dans la prostate indépendamment de la persistance des agents infectieux l'ayant causées.⁷⁸ Ceci supporte l'idée que plusieurs années seraient nécessaires pour qu'une infection entraîne l'inflammation chronique et subséquemment le cancer. Plusieurs études ont démontré que l'infection par différents microorganismes peut contribuer à la carcinogenèse de la prostate. Celles-ci ont permis d'identifier des agents infectieux responsables d'infections transmissibles sexuellement, des bactéries qui infectent habituellement la prostate et des virus connus pour contribuer à d'autres cancers. D'autres causes d'inflammation prostatique incluent les reflux urinaires, la diète et les œstrogènes.⁷⁹ Le bris de la tolérance immune envers les

antigènes prostatiques est une hypothèse causale de l'inflammation chronique. Les facteurs nommés précédemment causeraient des dommages aux cellules épithéliales, ce qui libérerait des antigènes qui sont exprimés seulement après la puberté. Puisque le système immunitaire n'a pas développé de tolérance pour ceux-ci, une réponse immune serait construite. D'autre part, l'inflammation pourrait aussi contribuer à la progression tumorale. En effet, une étude a démontré que l'inflammation chronique était associée à des cancers de haut grade.⁸⁰

Comme mentionné plus tôt, le cancer de la prostate a une composante génétique. En effet, de nombreux gènes de susceptibilités sont associés à des voies inflammatoires.⁷⁹ Parmi celles-ci, on trouve deux mutations inactivatrices de deux gènes de l'immunité innée importants pour la protection contre les pathogènes. La ribonucléase L est une enzyme nécessaire à la réponse antivirale et antiproliférative des interférons. Le «macrophage scavenger receptor 1» est un récepteur des macrophages qui permet de lier des lipoprotéines des bactéries. Des polymorphismes nucléotidiques (single nucleotide polymorphism; SNP) des «toll-like receptors» (TLR) ont été associés avec le risque de cancer de la prostate. Un SNP du TLR4 a été associé avec un risque augmenté dans une population suédoise, tandis que huit autres avec un risque diminué dans une population américaine. De plus, plusieurs SNP du gène des TLR1, 6 et 10 ont été associés à une augmentation du risque de cancer de la prostate. De plus, un SNP du gène MIC1 régulant l'activité des macrophages a été associé à moins de cancer. Un polymorphisme du gène IL1RN qui inhibe les cytokines pro-inflammatoires interleukine-1 α et interleukine-1 β (IL-1 α et IL-1 β) augmente les chances de cancer avancé. Plusieurs polymorphismes dans des gènes de cytokines ont été étudiés. En effet, des SNP pour l'IL-10, l'IL-1 β et l'IL-8 augmenteraient les risques de cancer plus agressif.⁸¹ Des SNP du gène de cyclooxygénase-2 (COX-2) influence aussi le risque de cancer de la prostate.⁸²

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer le rôle de l'inflammation sur l'initiation et la progression du cancer de la prostate. L'inflammation consiste en l'infiltration de leucocytes. Or, les phagocytes sécrètent des dérivés réactifs de l'oxygène qui augmentent le risque de mutations dans les cellules épithéliales de la prostate.⁷⁹ De plus, les leucocytes sécrètent des cytokines qui augmentent l'angiogenèse et la prolifération des cellules épithéliales. Ces cellules pourraient aussi contribuer à la progression tumorale via la stimulation de l'invasion. En effet, la sécrétion d'enzymes protéolytiques et leur propre migration peuvent faciliter la

migration des cellules cancéreuses. Le recrutement de cellules immunes régulatrices serait un mécanisme de protection contre la destruction par d'autres cellules immunes (discuté plus en détail dans la prochaine section) De plus, l'expression de facteurs de transcription de la voie inflammatoire à un rôle important à jouer. NF-kB est reconnu comme l'effecteur pro-inflammatoire majeur dans le cancer de la prostate.⁸³ Son expression par les leucocytes et les cellules épithéliales est importante. NF-kB augmente la survie, la prolifération, l'invasion des cellules tumorales. De plus, son rôle a été démontré dans les processus de métastases et de résistance à la castration.

1.2.2) Infiltration immunitaire

Le système immunitaire a un rôle à jouer dans la progression tumorale. Outre les possibles effets protumoraux discutés ci-haut, toute une littérature supporte le fait que le système immunitaire peut s'attaquer aux cellules cancéreuses. L'immunosurveillance est le concept selon lequel les leucocytes peuvent reconnaître et détruire les cellules cancéreuses naissantes. Ce concept a surtout été démontré par des études où des souris immunodéficientes avaient une susceptibilité augmentée à développer des tumeurs spontanées et induites chimiquement.⁸⁴ Chez l'homme, il est clair que le système immunitaire a un rôle protecteur pour les cancers d'origine virale, car les patients immunodéficients ont une plus grande susceptibilité à ces cancers. Cependant, il aurait aussi un rôle à jouer pour les cancers d'origine non virale. En effet, une augmentation de l'incidence de certaines tumeurs d'origine non virale a été observée chez des patients sous immunosuppresseurs en vue d'une transplantation. De plus, le fait que la présence de TIL est souvent associée avec un meilleur pronostic supporte l'idée de l'immunosurveillance.⁸⁵ Pour plusieurs types de cancer, il a été rapporté que la présence d'un nombre élevé de lymphocytes dans la tumeur est indicateur d'un bon pronostic.⁸⁶ Récemment, un score immunitaire a été défini selon des populations de lymphocytes précises (CD3+, CD8+, CD45RO+).⁸⁷ Ce score prédit très efficacement le pronostic des patients atteints du cancer du côlon. En conséquence, il a été suggéré qu'il soit utilisé pour la classification des tumeurs du côlon en collaboration avec le stade TMN.

Les lymphocytes infiltrant les tumeurs de la prostate ont aussi été étudiés. Cependant, contrairement à la plupart des autres types de tumeurs, il n'est pas clair si leur rôle est

bénéfique ou nuisible. En effet, des études ont rapporté que la présence accrue de TIL est associée à un bon pronostic et d'autres à un mauvais pronostic. Une étude a associé le faible niveau de TIL à la progression tumorale et au décès du cancer.⁸⁸ Un autre groupe qui a étudié l'effet de l'hormonothérapie sur l'infiltrat immunitaire et le pronostic, a observé que les patients avec plus de lymphocytes T CD8+ voyaient leur survie sans récurrence biochimique augmentée.⁸⁹ De façon opposée, une étude a rapporté que ce qu'ils définissent comme l'inflammation de haut grade associée aux glandes malignes prédit plus de récurrences biochimiques.⁹⁰ Un autre groupe a observé que des niveaux élevés de lymphocytes T CD4+ sont associés à une diminution de la survie des patients peu importe le stade de leur tumeur.⁹¹ Un article montre qu'un haut niveau de TIL corrèle avec la présence d'invasion des cellules cancéreuses et une survie sans récurrence réduite.⁹² Récemment, il a été postulé qu'une densité élevée de lymphocytes T CD8+ dans la tumeur est un facteur prédictif de plus de récurrences biochimiques.⁹³ De façon intéressante, une étude avec un grand nombre de patients a rapporté des résultats allant dans les deux sens.⁹⁴ Elle postule que de faibles taux de lymphocyte T (CD3+) et des taux élevés étaient tous deux associés à une survie sans récurrence plus courte comparativement aux taux intermédiaires. Il semble que cette variabilité dans les résultats soit due aux différences méthodologiques entre les études. Par exemple, il peut s'agir des types de tumeurs ou des marqueurs utilisés. Comme mentionnée plus tôt, l'inflammation peut favoriser la progression du cancer de la prostate. Donc, l'association des TIL avec un mauvais pronostic peut s'expliquer par l'hypothèse qu'ils sont associés à de l'inflammation protumorale. D'ailleurs, un groupe propose que les leucocytes soient responsables de la dégradation de la membrane basale menant à l'invasion tumorale.⁹⁵

Une autre explication pour l'association avec un pronostic défavorable serait que les TIL du cancer de la prostate contiennent une forte proportion des cellules T régulatrices (Tregs). Ces cellules inhibent la fonction des cellules immunes effectrices et seraient présentes dans plusieurs types de cancer.⁹⁶ Les Tregs sont un sous-type de lymphocyte T CD4 qu'on reconnaît par l'expression de FoxP3 et l'expression élevée de CD25.⁹⁷ Une étude chez des patients atteints du cancer de la prostate démontre que leur nombre serait augmenté dans les tumeurs et le sang périphérique comparativement à des patients sains.⁹⁶ De plus, une autre étude a démontré que les Tregs provenant du sang de patients atteints du cancer de la

prostate voyaient leur fonction immunosuppressive augmentée comparativement aux Tregs provenant de patients sains.⁹⁷ La présence de ces cellules semblent être associée à un mauvais pronostic. En effet, un groupe a postulé que les patients avec plus de Tregs dans leur tumeur avaient plus de chance de décéder de leur cancer.⁹⁸ Le groupe cité plus haut qui avait étudié l'effet de l'hormonothérapie sur l'infiltrat immunitaire et le pronostic, a étudié les Tregs en plus de cellules CD8+.⁸⁹ Il a rapporté qu'un ratio CD8/Treg élevé indiquait une survie sans récurrence biochimique augmentée. D'autre part, il existe des lymphocytes T CD8 régulateurs exprimant les deux mêmes marqueurs que les Tregs. Il a été démontré que ces cellules sont présentes dans le cancer de la prostate et ont des fonctions immunosuppressives.⁹⁹ De plus, il a été rapporté qu'une forte proportion de lymphocytes T CD8+ isolés d'un petit nombre de tumeurs de la prostate étaient du sous-type $\gamma\delta 1$ qui ont des propriétés immunosuppressives.¹⁰⁰ La présence de lymphocytes T CD8 régulateurs peut aussi expliquer l'association des lymphocytes T CD8 avec un mauvais pronostic.

1.2.3) Mécanisme d'évasion tumorale

Malgré la présence de l'immunosurveillance, les cancers arrivent à se développer. Ceci peut s'expliquer par le concept d'immunoédition. Ce concept propose qu'en s'attaquant aux cellules cancéreuses le système immunitaire sélectionne des cellules qui sont mieux adaptées pour lui résister.⁸⁴ L'immunoédition aurait lieu en trois étapes: élimination, équilibre et évasion. L'élimination correspond à la destruction des cellules cancéreuses lors de l'immunosurveillance. L'équilibre est la période où le système immunitaire contient la croissance de la tumeur, mais n'arrive pas à détruire les cellules qui ont acquis des mutations leur permettant d'être résistantes. L'évasion a lieu lorsque la tumeur croît sans être reconnue ni détruite par le système immunitaire. Il existe différents mécanismes d'évasion employés par les cellules cancéreuses. Plusieurs de ces mécanismes ont été identifiés dans le cancer de la prostate.¹⁰¹ Un mécanisme d'évasion important constitue en une diminution de l'apprêtement des antigènes et de la présentation antigénique. On observe souvent que les cellules tumorales diminuent l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. En effet, ceci permet d'éviter aux cellules tumorales d'être détruites par les lymphocytes T cytotoxiques, car le CMH de classe I est nécessaire pour la reconnaissance des antigènes tumoraux par ces cellules. Des études ont démontré que le CMH de classe I était sous-exprimé dans des lignées

humaines du cancer de la prostate et dans des tissus primaires humains provenant de tumeur de la prostate et de métastases aux ganglions lymphatiques.

La production de facteurs immunosuppresseurs dans le microenvironnement tumoral constitue un autre mécanisme d'évasion important. Parmi ceux-ci, on trouve les cytokines immunosuppressives IL-4, IL-6, IL-10 et TGF- β .¹⁰¹ Des niveaux plus élevés de ces cytokines ont été détectés dans le sérum de patients atteints du cancer de la prostate. L'IL-6 a été associé à un mauvais pronostic. Elle stimule la prolifération des cellules tumorales et diminue la réponse des lymphocytes T périphériques. Une étude a démontré que les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) ont une expression plus élevée d'IL-10 comparativement aux lymphocytes sanguins.¹⁰² Le TGF- β régule plusieurs aspects de la réponse immunitaire.¹⁰¹ Des études ont observé que son expression est augmentée dans les tumeurs de la prostate et qu'elle corrèle négativement avec la survie. Les métabolites des acides aminés sont d'autres molécules immunosuppressives impliquées dans le cancer de la prostate. L'arginine peut être métabolisée par les enzymes oxyde nitrique synthase (NOS) et arginase (ARG). Or, il a été mis de l'avant que ces enzymes étaient augmentées dans les tumeurs de la prostate. Le métabolisme de l'arginine a été associé à la progression tumorale et à l'immunosuppression. Des inhibiteurs des NOS et ARG ont permis d'augmenter la réponse de lymphocytes T CD8⁺ (cytotoxiques) dans des tumeurs de la prostate.¹⁰³ Le tryptophane est un autre acide aminé dont la dégradation par la indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) est un mécanisme d'immunosuppression dans les tumeurs. En effet, l'activité de l'IDO inhibe l'activation des lymphocytes T. Une étude a démontré une haute expression d'IDO dans des tumeurs de prostate.¹⁰⁴ Dans un modèle murin du cancer de la prostate, un délai dans la croissance des tumeurs a été observé lorsque l'expression d'IDO était compromise.¹⁰⁵ Le métabolisme de l'acide arachidonique par la COX-2 produit, entre autres, la prostaglandine E2 (PGE2) qui possède des propriétés immunosuppressives.¹⁰¹ En effet, elle peut inhiber l'activité des lymphocytes T, macrophages et cellules «natural killer» (NK). Or, une étude a démontré que l'expression de la COX-2 permet de prédire le développement de métastases et la récurrence biochimique des patients avec un cancer de la prostate.¹⁰⁶ De plus, l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, qui sont des inhibiteurs des COX, diminue le risque de développement du cancer de la prostate.¹⁰⁷ L'immunosuppression est probablement un des mécanismes importants par lesquels la COX-2

peut contribuer au cancer de la prostate. La glycoprotéine MUC1 pourrait aussi être impliquée dans l'immunosuppression du cancer de la prostate.¹⁰¹ Elle possède des propriétés immunosuppressives et sa présence est corrélée avec des cancer de la prostate plus avancés. L'APS possède aussi des propriétés immunosuppressives et est fortement exprimé dans ce cancer. Finalement, l'adénosine est une autre voie d'immunosuppression importante. Elle est produite par les enzymes CD39 et CD73. (Discutée en détail dans la section 1.3 p.36)

Outre les molécules immunosuppressives, les tumeurs utilisent d'autres moyens pour agir sur les lymphocytes T. L'induction de la mort cellulaire par l'interaction Fas et Fas ligand (FasL) en est un exemple.¹⁰¹ En effet, l'expression de FasL par la tumeur peut engendrer l'apoptose dans les lymphocytes exprimant Fas. On a observé des niveaux de FasL soluble élevés sécrétés par des lignées LNCaP, DU145, et PC3, et dans le sérum de patients ayant le cancer de la prostate. Or, il a été démontré que les cellules T cocultivées avec les exosomes provenant des LNCaP entraînent en apoptose de façon dépendante à FasL.¹⁰⁸ La présentation des antigènes et la costimulation par les cellules dendritiques est nécessaire à la réponse des lymphocytes T. Or, l'inhibition de la fonction des cellules dendritiques serait un moyen d'inhiber l'activité antitumorale des cellules T.¹⁰¹ Dans le cancer de la prostate, les cellules dendritiques ont été trouvées moins nombreuses que dans les prostates normales et sont plutôt immatures et non fonctionnelles. Le recrutement de Tregs est un autre moyen d'échapper à la réponse immune. Comme mentionnés plus haut, les Tregs infiltrent les tumeurs de la prostate et sont associés à un mauvais pronostic. Les Tregs inhibent les fonctions immunitaires via la co-inhibition ou la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β . Les tumeurs pourraient attirer ces cellules par la sécrétion de chimiokines. Par exemple, CCL22 a été identifié dans des tumeurs de la prostate et induisait la migration des Tregs.⁹⁶ L'expression du récepteur des cellules T (TCR) et des molécules de costimulation et co-inhibition jouent un rôle sur l'activation de lymphocytes. Une diminution du TCR et des molécules de costimulation CD3 a été observée dans les TIL du cancer de la prostate. De plus, une étude a rapporté que les corégulateurs B7-H3 et B7x sont exprimés dans le cancer de la prostate et qu'ils sont associés avec la progression tumorale.^{109, 110} Les molécules CTLA-4 et PD-1 sont deux molécules de co-inhibition régulant négativement l'activité des cellules T. Étant donné une certaine efficacité d'un traitement anti-CTLA4 dans le cancer de la prostate (voir prochaine section), on peut

supposer que cette molécule est impliquée dans la régulation négative des TIL. Par contre, il semble que PD-L1 (B7-H1) soit peu exprimé dans le cancer de la prostate.¹¹⁰ Cela pourrait expliquer l'absence de réponse d'un anti-PD-1 dans un petit nombre de patients en clinique.¹¹¹

1.2.4) Immunothérapie

Dans les dernières années, plusieurs nouvelles thérapies visant à restaurer l'immunité antitumorale ont été étudiées. Certaines de ces immunothérapies visent à contrer directement les mécanismes d'évasion. Par exemple, les anti-CTLA4 et anti-PD1 sont deux succès majeurs pour le mélanome. Ils permettent de lever le frein sur les lymphocytes T pour qu'ils puissent détruire la tumeur. L'anti-CTLA4 (ipilimumab) fut le premier traitement à augmenter la survie pour le mélanome métastatique et a été approuvé par la food and drug administration (FDA) pour cette maladie.¹¹² Il a été démontré que l'anti-PD1 (nivolumab) augmentait aussi la survie pour la mélanome.¹¹³ Une étude de phase III sur la combinaison des deux immunothérapies est en cours. (NCT01844505) Les deux anticorps ont aussi montré des résultats encourageants dans d'autres types de tumeur. D'autre part, l'immunothérapie par transfert adoptif est étudiée abondamment dans le traitement du cancer. Elle consiste en la collecte et réadministration des cellules T intratumorales du patient.¹¹² Les «chimeric antigen receptor» (CAR) sont une innovation de ce domaine. Il s'agit de cellules T dont le récepteur est modifié pour reconnaître un antigène tumoral. Le traitement avec ces cellules a montré des résultats encourageants, mais demeure expérimental. Plusieurs autres immunothérapies ont été étudiées dans le contexte du cancer de la prostate.

L'ipilimumab a été étudié en clinique pour le CPRC métastatique. Malgré des résultats encourageants dans les études précédentes, l'ipilimumab n'a pas démontré d'avantage significatif sur la survie globale dans une étude de phase III.¹¹⁴ Les patients incluent dans cette étude étaient préalablement traités avec de la radiothérapie et avaient échoués un traitement avec le docetaxel. Les auteurs suggèrent que l'anti-CTLA4 pourrait être plus efficace chez des patients ayant un pronostic plus favorable. Une étude clinique de phase III incluant des patients avec peu de symptômes et sans traitement de chimiothérapie préalable est justement en cours. (NCT01057810) L'ipilimumab engendre plusieurs effets indésirables liés à l'activation du système immunitaire, dont l'auto-immunité.

Sipuleucel-T (Provenge) est le premier vaccin thérapeutique anticancer approuvé par la FDA. Il n'est pas approuvé au Canada. Il est indiqué pour les patients atteints du CPRC ne présentant pas ou peu de symptôme.¹¹⁵ Il a été démontré que le traitement avec ce vaccin permet de prolonger la vie. Cependant, aucun effet sur la progression de la maladie ou sur les symptômes n'a été démontré. Sipuleucel-T est un vaccin de cellules autologues. Le processus de traitement consiste à collecter les cellules présentatrices d'antigènes (APC) du patient à traiter. Ces cellules sont stimulées avec une protéine recombinante de la phosphatase acide prostatique (PAP) et du «granulocyte macrophage colony stimulating factor» (GM-CSF). La PAP est un antigène prostatique exprimé dans la majorité des cancers de la prostate. Le GM-CSF est une cytokine qui stimule les APC. (plus de détail dans la prochaine section) Les cellules, alors matures, sont réinjectées au patient. Le mécanisme d'action proposé est que les APC actifs (principalement les cellules dendritiques) présentent les peptides de la PAP aux lymphocytes T qui peuvent ensuite aller détruire les cellules cancéreuses. La procédure est réalisée à l'extérieur du patient afin d'éviter un environnement immunosuppresseur. Le traitement est réalisé en trois cycles de prélèvements et infusions. Sipuleucel-T est généralement bien toléré. Les effets indésirables principaux sont reliés à la relâche accrue de cytokines.

PROSTVAC ou PSA-TRICOM est un vaccin, à base de virus, dirigé contre l'APS. Il utilise deux vecteurs à base de poxvirus: PROSTVAC-V et F qui sont respectivement un recombinant du virus vaccinia et du virus fowlpox.¹¹⁶ Le premier est administré comme dose initiatrice et le second pour les doses subséquentes de renforcement. Ces deux vecteurs contiennent des transgènes de l'APS et de trois molécules costimulatrices des lymphocytes T (B7.1, ICAM-1, and LFA-3). Ces dernières permettent d'augmenter la réponse immune. Ce vaccin est donné en combinaison avec de faibles doses de GM-CSF. PROSTVAC est présentement en étude clinique de phase III pour le CPRC. (NCT01322490) En étude clinique de phase II, il a été démontré que le traitement permet d'augmenter la survie globale des patients. En comparaison avec l'étude de phase III sur sipuleucel-T, la survie est plus grande avec PROSTVAC. Le vaccin est généralement bien toléré. Le mécanisme d'action du vaccin serait qu'il augmente la réponse des lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques à l'APS contre la

tumeur. De plus, une réponse contre d'autres antigènes tumoraux se développerait subséquemment.

1.2.5) GVAX

GVAX est un vaccin anticancer constitué de cellules cancéreuses modifiées génétiquement pour sécréter le GM-CSF.¹¹⁷ Son utilisation provient d'une étude où 10 rétrovirus encodant pour des cytokines ont été utilisés pour infecter des cellules tumorales du mélanome afin d'identifier les cytokines qui augmentaient leur immunogénéicité.¹¹⁸ Or, la vaccination avec les cellules irradiées et transfectées avec le GM-CSF stimulait la réponse immune et empêchait le développement de tumeurs chez les animaux. Ensuite, cette stratégie de vaccination a été étudiée dans différents modèles précliniques de cancer.¹¹⁷ Pour le cancer de la prostate, une étude utilisant un modèle de tumeur résistante à la castration a observé que le traitement avec les cellules tumorales sécrétant le GM-CSF augmentait la survie sans-maladie des animaux.¹¹⁹ Le vaccin GVAX utilisé en clinique pour le cancer de la prostate est composé des lignées humaines LNCaP et PC3.¹¹⁷ La stratégie de ce vaccin est d'utiliser des cellules tumorales comme source d'une grande variété d'antigènes. En effet, le choix de ces cellules repose sur leur complémentarité dans l'expression des antigènes. L'avantage de cette thérapie serait donc d'immuniser pour divers antigènes potentiellement exprimés dans les tumeurs des patients. En effet, il a été démontré que GVAX pouvait stimuler la réponse en anticorps contre 33 protéines différentes.¹²⁰ Le GM-CSF est une cytokine qui permet d'attirer et d'engendrer la maturation des cellules dendritiques.¹²¹ Son rôle est donc de stimuler la présentation des différents antigènes provenant des cellules tumorales apoptotiques. Les cellules dendritiques présentent les antigènes aux lymphocytes T CD4+ et CD8+ qui peuvent ensuite reconnaître et détruire les cellules tumorales. Des études cliniques de phase I/II chez des patients avec un CPRC ont démontré que GVAX était bien toléré, qu'il pouvait générer une réponse immune et influencer le taux d'APS.¹²² Ensuite, deux études cliniques de phase III visant une augmentation de la survie globale en comparaison avec docetaxel et prednisone chez des patients atteints du CPRC ont été initiées.¹²³ La première étudiait GVAX seul et la deuxième une combinaison de GVAX et docetaxel. Cependant, les deux études ont dû être interrompues prématurément. D'abord, la deuxième en raison d'un nombre de décès plus important dans le groupe de combinaison. Puis, la première en raison de la faible efficacité de

GVAX laissant présager que l'étude n'atteindrait pas ses objectifs. Une étude de phase I étudiant GVAX en combinaison avec ipilimumab a montré des résultats intéressants.¹²⁴ Cependant, il ne semble pas que l'étude de cette combinaison soit poursuivie. Une étude de phase I/II étudiant la combinaison de GVAX avec la cyclophosphamide demeure active. (NCT01696877) La combinaison avec la cyclophosphamide est intéressante, car elle permet de diminuer le nombre de Tregs dans la tumeur et pourrait augmenter l'efficacité de GVAX.¹²⁵

1.3) CD73 et l'adénosine dans le cancer

1.3.1) L'adénosine et l'immunosuppression

Les succès modérés de l'immunothérapie dans le cancer de la prostate peuvent s'expliquer par la présence des divers mécanismes d'évasion du système immunitaire. Or, la génération d'adénosine extracellulaire, principalement par les ectonucléotidases, est un mécanisme d'immunosuppression identifié dans plusieurs cancers.¹²⁶ L'adénosine est impliquée dans plusieurs fonctions physiologiques incluant la circulation sanguine, la contractilité cardiaque, la transmission de l'influx nerveux, la lipolyse, l'agrégation plaquettaire et le contrôle de la respiration.¹²⁷ Elle engendre ses effets par quatre récepteurs couplés aux protéines G: A1, A2A, A2B et A3.¹²⁶ L'adénosine a un rôle dans la régulation de l'inflammation de par ses propriétés immunosuppressives qui sont principalement causées par le récepteur A2A.¹²⁸ Ce récepteur est exprimé par plusieurs types de cellules immunes.¹²⁶ En effet, l'adénosine peut moduler la fonction des macrophages, neutrophiles, lymphocytes NK, et NKT, cellules dendritiques, lymphocytes B, et T. De façon intéressante, l'adénosine favoriserait une population de cellules dendritiques productrices de cytokines protumorales. De plus, chez les lymphocytes T, elle inhiberait l'activation, la cytotoxicité, la production de cytokines, la prolifération et favoriserait la différenciation en Treg. Ces fonctions immunosuppressives suggèrent fortement que l'adénosine peut inhiber l'immunité antitumorale. Plusieurs études ont montré des résultats en ce sens.¹²⁹ Une étude avec des modèles animaux a démontré qu'il y avait des hauts niveaux d'adénosine dans le microenvironnement de différentes tumeurs murines et humaines.¹³⁰ De plus, dans une autre

étude, des souris transgéniques déficientes en récepteur A2A rejetaient des tumeurs immunogéniques du mélanome et du lymphome contrairement aux souris contrôles.¹³¹ Aussi, l'utilisation d'inhibiteur ou de siRNA pour le récepteur A2A permettait d'augmenter la réponse de lymphocytes T CD8+ contre les tumeurs et les métastases pulmonaires. Ensuite, il a été démontré que l'adénosine inhibe l'activité cytotoxique et la sécrétion de cytokines par des lymphocytes T CD8+ et CD4+ humains spécifiques au mélanome suite à l'exposition à des cellules tumorales.¹³² Finalement, une étude a observé que des souris déficientes en récepteur A2A et traitées avec un vaccin de cellules tumorales irradiées sécrétant le GM-CSF voyaient la croissance de leur tumeur retardée.¹³³ Ceci s'accompagnait d'une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8+ spécifiques à un antigène tumoral et suggère que l'inhibition d'A2A augmente l'efficacité d'une telle thérapie.

1.3.2) Autres rôles des récepteurs à l'adénosine

En plus de son rôle immunosuppresseur, l'adénosine module le développement des tumeurs par plusieurs autres mécanismes. En effet, les quatre récepteurs de l'adénosine sont exprimés et jouent un rôle dans divers cancers.¹³⁴ Cependant, ce rôle n'est pas clair, car des effets protumoraux et antitumoraux leurs ont été associés dépendamment du type de tumeur étudié. Le récepteur A1 jouerait un rôle dans la prolifération et l'apoptose de certaines tumeurs. Outre son rôle dans l'immunosuppression, le récepteur A2A peut influencer l'apoptose et stimuler l'angiogenèse. Le récepteur A2B stimule lui aussi l'angiogenèse, mais par plusieurs mécanismes. Le récepteur A3 a un effet sur la prolifération, la migration et l'angiogenèse dans plusieurs tumeurs. De plus, il a été démontré que le récepteur A3 a un rôle antitumoral dans le cancer de la prostate. D'abord, un groupe a observé qu'un agoniste sélectif du récepteur A3, IB-MECA, inhibait la prolifération de la lignée humaine PC-3 *in vitro* et des tumeurs de PC-3 chez des souris immunosupprimées.¹³⁵ Aussi, ils ont démontré que cet effet de A3 est causé par la diminution des voies de Wnt et NF-kB. Ensuite, un autre groupe a déterminé que l'IB-MECA inhibait la prolifération et la migration de plusieurs lignées *in vitro* et diminuait le nombre de métastases provenant d'une tumeur sous-cutanée dans un modèle animal.¹³⁶ Ils suggèrent que la diminution de la migration et des métastases est causée par la réduction de l'activité de l'oxydase NADPH. Enfin, il a été rapporté que le traitement de plusieurs lignées humaines avec l'adénosine, en présence d'inhibiteurs du transport des

nucléotides et de l'adénosine désaminase, diminuait la prolifération, causait l'arrêt du cycle cellulaire et induisait l'apoptose.¹³⁷ D'autre part, un article a montré un effet protumoral de l'adénosine et du récepteur A2B.¹³⁸ Un antagoniste sélectif de A2B diminuait la croissance des lignées du cancer de la prostate. Aussi, un article a rapporté que l'adénosine stimule l'invasion des cellules cancéreuses de prostates de façon indépendante à ses récepteurs.¹³⁹

1.3.3) Les rôles de CD73

L'adénosine est un anti-inflammatoire qui contrebalance les effets de l'ATP pro-inflammatoire.¹⁴⁰ Les enzymes ectonucléotidases sont principalement responsables de gérer cette balance entre les deux molécules. Elles sont situées à la surface des cellules. CD39 catalyse l'hydrolyse de l'ATP en AMP et CD73 (5'-ectonucléotidase) la transformation de l'AMP en adénosine. Puisque la conversion de l'AMP en adénosine est théoriquement irréversible, CD73 est considéré comme le régulateur clé de la formation de l'adénosine. Il est exprimé par plusieurs types cellulaires, dont les lymphocytes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. Il est impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques: transport des fluides et des ions, perméabilité des barrières intercellulaires, réponse à l'hypoxie, résistance à l'ischémie, régulation de l'inflammation, réponse aux infections, filtration rénale, perméabilité vasculaire et agrégation plaquettaire.¹⁴¹ De plus, il régule l'extravasation des leucocytes et ses fonctions non enzymatiques incluent l'adhésion cellulaire et la transduction du signal chez les lymphocytes.¹²⁶ L'expression de CD73 est stimulée par l'hypoxie et certaines cytokines. CD73 est surexprimé dans plusieurs cancers: vessie, leucémie, cerveau, ovaire, mélanome, colon, estomac et sein. Or, il a été démontré que CD73 est impliqué dans plusieurs mécanismes de progression tumorale, dont la prolifération, la métastase, l'angiogenèse, la résistance aux médicaments et l'immunosuppression.¹⁴² En effet, il a été montré comme stimulant la prolifération de lignées tumorales et de tumeurs sous-cutanées dans des études utilisant la surexpression, l'inhibiteur sélectif APCP ou l'ARN interférent. Aussi, des études ont observé que CD73 influence la migration, l'invasion et la transition épithélio-mésenchymateuse. De plus, notre groupe et d'autres ont démontré que le nombre de métastases était diminué dans des souris déficientes en CD73 ou traitées avec un anti-CD73.^{142 à 146} Aussi, chez l'humain, des études ont associé une forte expression de CD73 dans la tumeur à la présence de métastases.¹⁴² Ensuite, il a été démontré que CD73 stimule la production de VEGF et contribue à la

formation de tubes de type capillaire par des cellules endothéliales *in vitro*. De plus, notre groupe et d'autres ont démontré que sa délétion ou son inhibition réduit l'angiogenèse tumorale dans des modèles murins.^{142, 147} Puis, notre groupe et d'autres ont observé que l'expression de CD73 est associée au phénotype chimiorésistant de certaines cellules tumorales, à l'expression du transporteur multidrogue MRP-1 qui confère une résistance à plusieurs médicaments et à la réponse aux anthracyclines chez des patients.^{142, 148} Aussi, l'inhibition de CD73 permettait de renverser la résistance dans certaines études.

1.3.4) CD73 et l'immunosuppression comme cible thérapeutique

CD73 a un rôle important dans l'immunosuppression tumorale par son activité enzymatique générant l'adénosine. Notre groupe et d'autres ont démontré qu'un anticorps anti-CD73 et un ARN interférent réduisent la croissance des tumeurs dans des modèles murins.^{144, 149} Or, cet effet était absent dans des souris immunodéficientes, suggérant que l'effet est dépendant de la réponse immune adaptative. Ceci démontre que l'inhibition de la réponse immune adaptative est un effet majeur de CD73 dans les tumeurs.¹⁵⁰ Ce rôle a aussi été démontré par notre groupe et d'autres où des souris déficientes en CD73 étaient résistantes à la croissance de tumeurs de façon dépendante aux lymphocytes T CD8+.^{145, 151, 152} De plus, ces études ont démontré que l'expression de CD73 dans les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques est importante pour son rôle immunosuppresseur. Nous avons précédemment identifié que l'expression de CD73 dans les Tregs contribue à leur effet pro-tumoral.¹⁴⁵ Un autre groupe a observé une diminution des macrophages de type 2, associés à un phénotype immunosuppresseur et protumoral, dans les souris déficientes en CD73.¹⁵² D'autre part, nous avons précédemment démontré que la déficience en CD73 permet de réduire la carcinogénèse.¹⁴⁶ Cet effet était dépendant du système immunitaire suggérant que CD73 peut réduire l'immunosurveillance tumorale. Entre autres, les souris du modèle transgénique de tumeurs spontanées de la prostate «transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate» (TRAMP) qui étaient aussi déficientes en CD73 avaient des tumeurs réduites. Aussi, l'utilisation de l'anti-CD73 permettait de réduire la croissance des tumeurs et des métastases des TRAMP-C1, une lignée issue de la souris TRAMP. Plusieurs des études précédentes démontrent l'utilité d'un traitement ciblant CD73 dans divers cancers, dont la prostate.^{144 à 149,}

¹⁵¹ De plus, un article observe que l'APCP réduit la croissance de tumeurs du mélanome et que

les lymphocytes B participe à cet effet.¹⁵³ Dans une étude *in vitro*, la cytotoxicité des cellules NK et T envers des cellules du cancer de l'ovaire était augmentée en présence d'un anti-CD73 et d'un anti-CD39.¹⁵¹ De plus, il a été démontré qu'un traitement anti-CD73 peut augmenter l'efficacité d'autres traitements. En effet, un anti-CD73 a permis d'augmenter l'activité de la doxorubicine, une chimiothérapie, dans un modèle murin.¹⁵⁴ De plus, il a été démontré que l'APCP peut augmenter l'efficacité d'un anti-CTLA4.¹⁵⁵ Dans le même ordre d'idée, nous avons précédemment observé que l'anti-CD73 permet d'augmenter l'efficacité des anti-PD-1 et anti-CTLA4 dans divers modèles de tumeur.¹⁵⁶

1.3.5) CD73 et le pronostic chez l'homme

L'expression de CD73 a été identifiée dans plusieurs cancers humains. Entre autres, une étude a démontré une surexpression de CD73 et CD39 dans des lignées cellulaires et des spécimens de tumeurs de l'ovaire.¹⁵⁷ De façon intéressante, un article a observé que des lignées provenant de différentes tumeurs humaines, dont la prostate, sécrètent des exosomes qui expriment CD73 et CD39 et sont capable d'inhiber la fonction de lymphocytes T.¹⁵⁸ De plus, une autre étude a démontré une synergie entre CD39 exprimé sur les lymphocytes et CD73 exprimé sur les cellules du gliome pour supprimer la réponse de lymphocytes T.¹⁵⁹ Ensuite, CD73 a été associé avec le pronostic des patients dans différents cancers. Cependant, comme pour les TIL, l'expression de CD73 a été associé avec des pronostics défavorables ou favorables selon le type de tumeur. Une étude dans le cancer du colon a associé une expression élevée de CD73 avec la faible différenciation de la tumeur, les métastases aux ganglions lymphatiques, le stade et une survie globale diminuée.¹⁶⁰ Dans le cancer de l'estomac, la surexpression de CD73 est associée avec la faible différenciation, les métastases aux ganglions lymphatiques, l'invasion, les métastases distantes et une survie globale diminuée.¹⁶¹ De même, l'expression de CD73 dans les tumeurs de la vésicule biliaire est associée à la faible différenciation, à des tumeurs volumineuses, aux métastases aux ganglions lymphatiques, à l'invasion et à une diminution de la survie globale.¹⁶² D'autre part, un groupe a associé une faible expression de CD73 à des cellules bien différenciées dans plusieurs types de leucémies.¹⁶³ Aussi, dans la leucémie lymphoïde chronique, les cellules exprimant le plus CD73 exprimaient plus de marqueurs reliés à la prolifération et à l'agressivité clinique.¹⁶⁴ Par contre, une étude dans des leucémies lymphoïdes aiguës n'a pas observé d'association avec le

pronostic des patients.¹⁶⁵ Une étude dans le mélanome a rapporté que la méthylation du gène de CD73 permet de prédire le site des métastases.¹⁶⁶ Au contraire des études précédentes, l'expression de CD73 dans différents types de cancers épithéliaux de l'ovaire a été associée à un stade bas, un tissu bien différencié, une plus faible infiltration de Treg, de plus grandes survie globale et survie sans-récidive.¹⁶⁷ De même, une étude dans des cancers du sein de stade 1 à 3 a observé que l'expression de CD73 corrèle positivement avec la survie globale et la survie sans-récidive.¹⁶⁸ Cependant, nous avons précédemment démontré que l'expression de CD73 est associée à une diminution de la survie pour les cancers du sein triple-négatifs.¹⁴⁸ De plus, une étude a associé l'expression de CD73 à l'occurrence de rechutes et de métastases dans des cancers du sein dont la majeure partie sont double ou triple négatif.¹⁶⁹ Ceci suggère que CD73 a un rôle distinct selon le type tumeur. Aussi, les associations contradictoires avec le pronostic dans les différents cancers pourraient s'expliquer par les rôles variables des récepteurs à l'adénosine envers les tumeurs. Enfin, CD73 a aussi été étudié dans le cancer de la prostate. Une étude a rapporté que l'activité enzymatique de CD73 était diminuée dans des tissus de cancers de la prostate comparativement des tissus d'HBP.¹⁷⁰ Ils ont aussi observé que l'activité de CD73 corrélait négativement avec le score de Gleason et positivement avec la survie. Une autre étude a démontré que l'expression de CD73 était associée à la présence de métastases aux ganglions lymphatiques.¹⁷¹ Donc, l'association positive ou négative de CD73 avec le pronostic du cancer de la prostate n'est pas clair.

1.4) Hypothèses et objectifs de recherche

1.4.1) La valeur pronostique de CD73 et des lymphocytes T CD8+

La plupart du temps, le cancer de la prostate est peu agressif et se développe lentement. Malgré tout, certains patients ont un cancer plus agressif, qui évolue plus rapidement et qui mène souvent au développement de métastases. Le score de Gleason, le stade TMN et le taux d'APS sont des outils pronostiques qui aident à identifier ce type de cancer. Cependant, ils manquent de précision et de fiabilité. En effet, le score de Gleason évalué lors d'une biopsie est souvent surévalué ou sous-évalué.¹⁷² De même, le stade clinique évalué par des tests au

diagnostic peut être différent du stade pathologique réel.¹⁷³ Comme mentionné plus haut, le taux d'APS manque de linéarité avec la progression de la maladie.⁷² Pour pallier à ces manques, il est important de trouver des biomarqueurs qui permettront d'identifier plus précisément les cancers plus agressifs. L'adénosine générée par CD73 joue a plusieurs rôles dans les cancers. De plus, l'expression de CD73 dans les tumeurs a été associée avec le pronostic des patients. Aussi, CD73 est impliqué dans l'immunosuppression tumorale particulièrement au niveau des lymphocytes T. D'ailleurs, la présence de TIL, particulièrement les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+), s'est révélée être un outil pronostique intéressant pour le cancer. Le rôle des TIL dans le cancer de la prostate reste cependant peu défini. La première hypothèse de ce projet est que l'expression de CD73 et l'infiltration de lymphocytes T CD8+ dans la tumeur ont une valeur pronostique pour les patients atteints du cancer de la prostate. L'objectif relié à cette hypothèse est d'identifier la valeur pronostique de CD73 et des lymphocytes T CD8+ à partir d'échantillons de tumeurs de prostates humaines. Pour ce faire nous avons quantifié l'expression de CD73 et la densité de lymphocytes T CD8+ dans un micro-étalage tissulaire constitué d'échantillons de tumeurs provenant de 300 patients. Nous avons ensuite déterminé si ces données prédisaient la récurrence biochimique des patients.

1.4.2) Optimisation de la vaccination de type GVAX

Le cancer de la prostate est généralement bien géré par la surveillance active ou les différentes options thérapeutiques présentement disponibles. Cependant, les cancers plus agressifs, comme le CPRC, demeurent incurables. Il existe peu d'options pour ces patients qui ont progressé après l'hormonothérapie. Les traitements actuellement disponibles permettent seulement de contrôler les symptômes et de prolonger la vie des patients de façon limitée. C'est pourquoi il est important d'améliorer les options thérapeutiques de ces patients afin d'avoir un traitement efficace contre les cancers les plus agressifs. L'immunothérapie est un domaine actif de recherche. En effet, différents traitements stimulant l'immunité antitumorale ont donné des résultats prometteurs en étude clinique. Pour le cancer de la prostate, un vaccin a été approuvé et d'autres traitements sont toujours en études cliniques. Par contre, plusieurs traitements ont échoué en phase clinique, dont le vaccin de cellules tumorales GVAX. Une hypothèse expliquant le faible succès des vaccins anticancer réside dans l'existence de l'immunosuppression dans le microenvironnement tumorale. L'adénosine générée par CD73

est une molécule immunosuppressive identifiée dans les cancers. Il a été démontré que l'inhibition de CD73 permet de réduire les tumeurs et les métastases dans différents modèles de cancer, dont le cancer de la prostate. De plus, elle permet d'augmenter l'efficacité d'autres traitements en combinaison. La seconde hypothèse du projet est que l'inhibition de CD73 permettrait d'augmenter l'efficacité d'un vaccin antitumoral dans le cancer de la prostate. L'objectif associé à celle-ci est de déterminer si l'efficacité d'un vaccin de cellules tumorales de type GVAX est augmentée en absence de CD73 ou en combinaison avec un anticorps ciblant CD73 dans un modèle murin du cancer de la prostate. Pour ce faire nous avons généré un vaccin de cellules tumorales sécrétant le GM-CSF à partir d'un modèle murin de tumeurs de la prostate. Nous avons ensuite déterminé si l'efficacité de ce vaccin à réduire la taille des tumeurs du même modèle était augmentée chez des souris déficientes en CD73 ou en combinaison avec un anti-CD73.

Chapitre 2

Article publié dans Clinical Cancer Research

CD73 expression is an independent prognostic factor in prostate cancer

Bruno G Leclerc ^{1,2}, Roxanne Charlebois ^{1,2}, Guillaume Chouinard ¹, Bertrand Allard ^{1,2}, Sandra Pommey ¹, Fred Saad ¹ and John Stagg ^{1,2,*}

¹ Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Institut du Cancer de Montréal, 900 Rue Saint-Denis, H2X0A9, Montréal, QC, Canada.

² Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Pavillon Jean-Coutu, 2940 chemin de Polytechnique, Montréal, QC, Canada

* **Corresponding author** : John Stagg, Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900 Rue Saint Denis, 10^{ième} étage, Montréal H2X0A9, QC, Canada.

Running Title: CD73 in prostate cancer

Conflict of interest: J.S is a paid consultant and SAB member for Surface Oncology Inc.

Clinical Cancer Research. 2015 August 7. pii: clincanres.1181.2015.

2.1) Translational Relevance

One of the most recently described immunosuppressive pathways involved in tumor progression is the CD73-adenosine pathway. We here report the prognostic impact of CD73 expression in prostate cancer. Our study revealed that high levels of CD73 in normal adjacent prostate epithelium are associated with early biochemical recurrence and increased risk of prostate cancer bone metastasis. Our study also demonstrated that extracellular adenosine, the metabolite produced by CD73, suppresses NF- κ B activity in human prostate cancer cells via activation of the A2B adenosine receptor. Finally, we provide evidence that CD73 expression confers a negative prognostic value to intraepithelial CD8⁺ cells.

2.2) Résumé

Objectif: CD73 est une ecto-enzyme générant l'adénosine qui supprime l'immunité anti-tumorale dans des modèles murin du cancer, incluant le cancer de la prostate. Sachant que de hauts niveaux de CD73 sont associés avec un pronostic défavorable dans différents types de cancer, l'impact clinique de CD73 dans le cancer de la prostate demeure incertain.

Conception expérimentale: Nous avons évalué la valeur pronostique de l'expression protéique de CD73 et de la densité de cellule CD8+ dans 285 cas de cancer de la prostate sur des micro-étalages tissulaire (TMA). Le tissu normal adjacent et le tissu tumoral ont été évalués en duplicata.

Résultats: Des analyses univariées et multivariées ont révélé que de hauts niveaux de CD73 dans l'épithélium prostatique normal adjacent étaient significativement associés avec des survies sans récurrence biochimique plus courtes. Particulièrement, l'expression de CD73 dans l'épithélium normal adjacent confère une valeur pronostique négative aux cellules CD8+ infiltrant la prostate. Étonnamment, de hauts niveaux de CD73 dans le stroma de la tumeur étaient associés avec des survies sans récurrence biochimique plus longues dans les analyses univariées. Des études *in vitro* ont révélé que la signalisation de l'adénosine par le récepteur A2B inhibait l'activité de NF- κ B dans des cellules humaines du cancer de la prostate. En accord avec ces résultats, l'expression de CD73 dans le stroma tumoral prostatique corrélait négativement avec l'expression de p65 dans le noyau des cellules tumorales prostatiques.

Conclusions: Notre étude a révélé que CD73 est un facteur pronostique indépendant dans le cancer de la prostate. Nos résultats supportent un modèle où l'expression de CD73 dans l'épithélium prostatique supprime l'immunosurveillance par les lymphocytes T CD8+ tandis que l'expression de CD73 dans le stroma tumoral réduit la signalisation par NF- κ B dans les cellules tumorales par la signalisation du récepteur de l'adénosine A2B. L'expression de CD73, incluant celle de l'épithélium prostatique normal adjacent, peut ainsi distinguer efficacement les formes agressives et indolentes du cancer de la prostate.

2.3) Abstract

Purpose: CD73 is an adenosine-generating ecto-enzyme that suppresses anti-tumor immunity in mouse models of cancer, including prostate cancer. While high levels of CD73 are associated with poor prognosis in various types of cancer, the clinical impact of CD73 in prostate cancer remains unclear.

Experimental desing: We evaluated the prognostic value of CD73 protein expression and CD8+ cell density in 285 cases of prostate cancer on tissue microarray (TMA). Normal adjacent and tumor tissues were evaluated in duplicates.

Results: Univariate and multivariate analyses revealed that high levels of CD73 in normal adjacent prostate epithelium were significantly associated with shorter biochemical recurrence (BCR)-free survival. Notably, CD73 expression in normal epithelium conferred a negative prognostic value to prostate-infiltrating CD8+ cells. Surprisingly, high levels of CD73 in the tumor stroma were associated with longer BCR-free survival in univariate analysis. *In vitro* studies revealed that adenosine signaling inhibited NF- κ B activity in human prostate cancer cells via A2B adenosine receptors. Consistent with these results, CD73 expression in the prostate tumor stroma negatively correlated with p65 expression in the nuclei of prostate tumor cells.

Conclusions: Our study revealed that CD73 is an independent prognostic factor in prostate cancer. Our data support a model where CD73 expression in the prostate epithelium suppresses immunosurveillance by CD8+ T cells, while CD73 expression in the tumor stroma reduces NF- κ B signaling in tumor cells via A2B adenosine receptor signaling. CD73 expression, including in normal adjacent prostate epithelium, can thus effectively discriminate between aggressive and indolent forms of prostate cancer.

2.4) Introduction

Prostate cancer is the most common non-skin cancer among men in western countries. Despite good detection methods, it is still difficult to predict the natural progression of the disease (1-3). Deciding who needs to be screened and who needs to receive treatment remains an important challenge. In addition, although localized forms of prostate cancer can be successfully treated, a significant proportion of patients having undergone interventions are at risk of relapse. Thus, considerable efforts have been made to discover new biomarkers that can accurately predict disease relapse and lead to better targeted treatments.

Recent studies suggest that biomarkers associated with anti-tumor immunity could complement the clinico-pathological parameters traditionally used in the prediction of cancer progression (4-7). The presence of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells, for instance, has been associated with a favorable prognosis in various types of cancer (6). In prostate cancer, Vesalainen *et al.* (8) and Sorrentino *et al.* (9) reported that high levels of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells were associated with improved disease-free survival. In contrast, Kärjä *et al.* (10) showed that high lymphocytic densities were associated with shorter recurrence-free survival. Consistent with this, Ness *et al.* (11) recently reported that high levels of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells were significantly associated with shorter BCR-free survival in a cohort of 535 prostate cancer patients.

One of the factors that can influence the prognostic value of immune infiltrates is the immunosuppressive status of the tumor microenvironment (TME). T cell function in prostate tumors can be severely attenuated, as evidenced by their inability to mediate cytotoxic function and secrete cytokines, and by the expression of exhaustion markers (12-13). One of the most recently described immunosuppressive pathways involved in tumor progression is the CD73-adenosinergic pathway (14-28). The CD73-adenosinergic pathway is driven by tissue hypoxia and soluble factors frequently found in the TME, including type I IFNs, TNF- α , IL-1 β , TGF- β and Wnt activators. Tumor-infiltrating immune cells are inhibited in hypoxic and extracellular adenosine-rich tissues as a result of adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-mediated signaling triggered by high affinity A2A and low affinity A2B adenosine receptors. Notably, recent studies published by Sitkovsky and colleagues demonstrated the potential of

respiratory hyperoxia in reversing immunosuppressive caused by the hypoxia-adenosinergic pathway (14).

Several studies, including from our group, have highlighted the importance of the CD73-adenosine axis in tumor immune escape (15-28). Using a transgenic mouse model of prostate cancer (i.e. TRAMP mice), we recently demonstrated that CD73 deficiency is associated with a significant reduction in prostate tumor growth and increased infiltration of CD8+ T cells (29). Our data thus suggested that CD73 may be associated with prostate cancer progression and decreased anti-tumor immunity.

The objective of this study was thus to assess the prognostic value of CD73 expression in human prostate cancer. Using a TMA composed of 285 cases of prostate cancer, we analyzed CD73 protein expression and CD8 cell density in stromal and epithelial areas of tumor tissue and matched normal adjacent tissues. Our results revealed that CD73 analysis in the stromal and epithelial compartments could significantly stratify patient outcome, that CD73 expression confers a negative prognostic value to intraepithelial CD8+ cells and that co-analysis of CD73 and CD8 expression, including in normal prostate tissue, is highly prognostic.

2.5) Materials and Methods

2.5.1) Patients and TMA

For construction of the tissue microarray (TMA), prostate cancer specimens were obtained from radical prostatectomy of 285 patients treated at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) between 1993 and 2006. An informed consent form was signed by every patient. Cores (0.6 mm) of benign prostate tissues adjacent to the tumor and malignant tissues were spotted in duplicates. Distance between normal adjacent tissue and the tumor is undetermined and may vary. A pathologist reviewed each core and misclassified cores were reclassified. Also, 15 patients were excluded from the analysis because they had previous treatment. A total of 285 patients were evaluable. Patients' clinico-pathological characteristics are detailed in Table 1.

Table 1. Patient characteristics and clinicopathological parameters.

Age at diagnostic		62 ± 5 years
Overall follow up		108 ± 46 months
PSA pre-op		8,6 ± 4,2 ng/ml
Time to biochemical recurrence		35 ± 34 months
Bone metastasis	No	260
	Yes	25
Death	All	35
	From prostate cancer	13
Biochemical recurrence	No	172
	Yes	113
	Yes within 5 years	88
Gleason score (surgery)	≤3+3	139
	3+4	94
	4+3	19
	≥4+4	29
Castration resistant	No	262
	Yes	23
Lymph node invasion	No	195
	Yes	10
	Not available	80
Extraprostatic extensions	No	206
	Yes	79
Seminal vesicle involvement	No	254
	Yes	31

2.5.2) Immunohistochemistry

An automated immunohistochemistry protocol (IHC) was used for the staining of CD8+ T cells. Briefly, TMA slides were deparaffinised and rehydrated with xylene and alcohols. Then, endogenous peroxidases were blocked using diluted hydrogen peroxide and an antigen retrieval step was performed in boiling Target retrieval solution pH 9 (Dako). Staining with anti-CD8 (Novus Biological, 4B11, 1/40) primary antibody was performed with a BenchMark XT automated stainer (Ventana Medical System Inc.). Antibody binding was visualized using the UltraView universal DAB detection kit (Ventana Medical System Inc.) and slides were stained with haematoxylin, dehydrated and mounted. TMA slides were imaged using the automated slides scanner VS-110 (Olympus).

2.5.3) Immunofluorescence

Multicolor immunofluorescence (IF) was performed to simultaneously stain CD73 and cytokeratins. The same steps as described in the immunohistochemistry protocol were used from deparaffinization to antigen retrieval. Following this, tissue sections were blocked with a solution containing 10% horse serum and 1% of BSA for 30 min at room temperature. Anti-CD73 (Abcam, clone 1D7, 1/400) primary antibody was incubated over night at 4°C. Anti-p65 (Santa Cruz, clone sc-8008, 1/125) primary antibody was incubated at 37°C for 60 min on another slide. For CD73, staining with an anti-mouse secondary antibody coupled to Alexa Fluor 594 was performed (1/250; Life Technologies). For p65, staining with an anti-mouse secondary antibody coupled to Cy5 was performed (#A10524, 1/250; Life Technologies). To block mouse antibody binding sites, slides were blocked for 60 min with Mouse-On-Mouse blocking reagent (1 drop in 250 μ L PBS, MKB-2213, Vector Laboratories, CA, USA). For epithelial staining, anti-PSA (Santa Cruz Biotechnology, clone A67-B/E3, 1/100), anti-CK18 (Santa Cruz Biotechnology, clone DC-10, 1/100) and anti-CK19 (NeoMarkers MS-190-P0, clone A53-B/A2.26, 1/100) antibodies were mixed and applied to the slides followed by secondary anti-mouse antibody coupled to Alexa Fluor 546 (Invitrogen). Slides were incubated with 0.15% sudan black in 70% ethanol. Slides were mounted with #1.5 coverslips using Prolong Gold which stained nuclei using DAPI. The stained TMA slides were then imaged with the scanner VS-110 (Olympus) for each color channel.

2.5.4) Staining quantification

For IHC, slides were visualized with the OlyVIA software (Olympus) and the numbers of CD8 positive cells were manually counted in both stromal and epithelial areas in each core. Cells included within or touching epithelial acini was considered as part of the epithelial compartment. The percentage of the core occupied by the stroma and the epithelium compartment was visually estimated for each core. CD8+ T cell density was then determined for each compartment (epithelium and stroma) by dividing cell count by the percentage of the core occupied by the compartment. Mean CD8+ cell density of duplicates was calculated and used for analysis.

For IF, the expression levels were calculated as mean fluorescence intensity (MFI) in stromal and epithelial areas in each core for CD73, and in the nuclear (DAPI+) compartment in the stroma and epithelial areas for p65. Scanned images were imported into VisioMorph software (Visiopharm) and each TMA core was separated and automatically labeled with their respective patient number and corresponding tissue (Benign/tumor). The cytokeratin staining was used to create an epithelial / stromal mask allowing for the distinction between stromal and epithelial areas in each core. The total fluorescence intensity of the CD73 staining under each mask was measured. The MFI of CD73 staining in epithelial versus stromal compartments was obtained by dividing the total CD73 fluorescence intensity measurement by the area of its respective compartment. The mean MFI values of duplicate cores for each case were calculated. The intra class correlation (ICC) between the duplicate cores was 0.80 for CD73 and 0.68 for p65 ($P < 0.001$ Spearman).

2.5.5) NF- κ B activity assay

PC-3 human prostate tumor cells were transfected with the 3 κ B-conA-Firefly plasmid as previously described (30) and Luciferase activity measured at indicated time-points using the manufacturer's instructions (Promega) with a multiplate luminometer (BMG Labtechnologies, Inc., Durham, NC). Where indicated, cells were treated with NECA (Tocris), PSB1115 (Tocris) or BAY-608385 (Tocris).

2.5.6) Statistical analysis

GraphPad Prism software was used for mean comparison. To compare CD73 expression in tumor and benign adjacent compartments, a Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test was used. To compare CD8 density, a one-way ANOVA followed by a Bonferroni's multiple comparison test was used. SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for correlation and Kaplan-Meier analyses. CD73 MFI and CD8+ cells densities were correlated to patients' clinico-pathological characteristics using a two-tailed Spearman correlation test. Biochemical recurrence-free survival was determined using the Kaplan-Meier estimator and statistical significance was calculated by a log-rank test. The median values of CD73 expression or CD8+ cell density were used as cut-offs to generate the

different group of patients compared for survival. Patients with values lower than the median were considered as having low CD73 expression or a low density of CD8+ cells and vice versa.

2.6) Results

2.6.1) CD73 expression is associated with biochemical recurrence and bone metastasis

We analyzed CD73 protein expression by quantitative IF on 285 independent cases of prostate cancer. Expression levels in tumor tissues and normal adjacent tissues were evaluated in duplicates. Co-analysis of CD73 and cytokeratins-18/19/PSA allowed for specific assessment in epithelial and stromal compartments (Suppl. Fig. S1). Paired analysis of tumor and normal tissues revealed that CD73 was modestly, albeit significantly, higher in the tumor stroma compared to normal stroma (suppl. Fig. S2). When the prognostic value of CD73 was evaluated, we found that high levels of CD73 (above median) in normal adjacent epithelium were significantly associated with shorter BCR-free survival (Fig. 1A) and shorter bone metastasis-free survival (Fig. 1B). In multivariate analysis (Table 2), CD73 expression in normal prostate epithelium was also an independent negative prognostic factor of BCR-free survival (HR = 2.75; P = 0.001). In contrast, high levels of CD73 in the TME (Figure 1C-D), in particular in the tumor stroma, were associated with longer BCR-free survival in univariate analysis (not significant in multivariate analysis). Similar results were obtained using a receiver-operating characteristics (ROC)-based cut-off (suppl. Fig. S3).

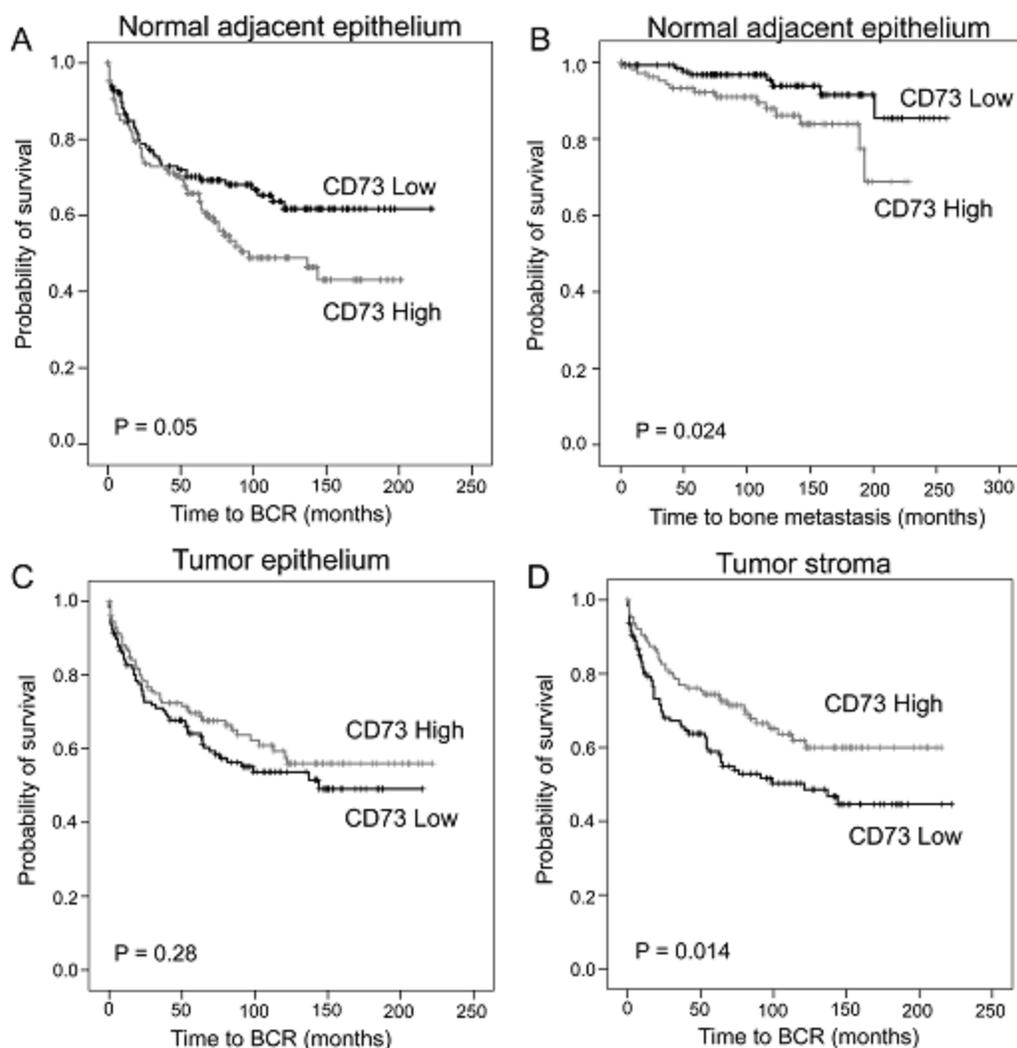


Figure 1. Prognostic impact of CD73 in prostate cancer.

CD73 protein expression in normal adjacent prostate tissue (A, B) and tumor tissue (C, D) were evaluated by immunofluorescence in 285 cases of prostate cancer on TMA. Correlation between CD73 expression levels (above or below median) and biochemical relapse (BCR)-free survival (A, C, D) or bone metastasis-free survival (B) was evaluated by Log rank test (P values are shown).

Table 2. Multivariate Cox Regression Analysis of CD73 (top) or CD8 and CD73 (bottom) for BCR-free survival.

Factor	HR	95% CI	<i>P</i>
pT-stage	0.897	0.294 - 2.737	0.849
Gleason score	1.253	0.995 - 1.578	0.056
PSA pre-op (>10 ng/ml)	1.615	0.956 - 2.728	0.073
Lymph node involvement	1.869	0.778 - 4.489	0.162
Extraprostatic extension	3.364	1.006 - 11.243	0.049
Positive surgical margin	1.869	1.054 - 3.311	0.032
CD73 normal adjacent epith	2.753	1.483 - 5.109	0.001
CD73 normal adjacent stroma	0.584	0.316 - 1.077	0.085
CD73 tumor epith	1.018	0.534 - 1.941	0.957
CD73 tumor stroma	1.002	0.526 - 1.910	0.995

Factor	HR	95% CI	<i>P</i>
pT-stage	1.052	0.346 - 3.199	0.929
Gleason score	1.210	0.970 - 1.509	0.091
PSA pre-op (>10 ng/ml)	1.588	0.943 - 2.674	0.082
Lymph node involvement	1.661	0.680 - 4.055	0.266
Extraprostatic extension	2.708	0.824 - 8.899	0.101
Positive surgical margin	1.734	1.003 - 2.999	0.049
CD73 normal adjacent epith	1.654	1.000 - 2.735	0.050
CD8 normal adjacent epith	1.356	0.830 - 2.218	0.224

2.6.2) Prostate-infiltrating CD8+ cells are associated with worse prognosis

We next investigated the prognostic value of CD8+ cell density. Paired analysis of tumor and normal tissues revealed that CD8+ cell densities were reduced in tumor epithelium compared to normal adjacent epithelium. In contrast, CD8+ cell densities were increased in tumor stroma compared to normal stroma (suppl. Figure S2). When the prognostic value of CD8+ cell density was evaluated, we found that high levels of CD8+ cells (above median) were significantly associated with worse prognosis (Figure 2 and suppl. Fig. S4). Total CD8+ cell density (in normal adjacent and tumor tissues) was also significantly associated with shorter BCR-free survival (Figure 3A).

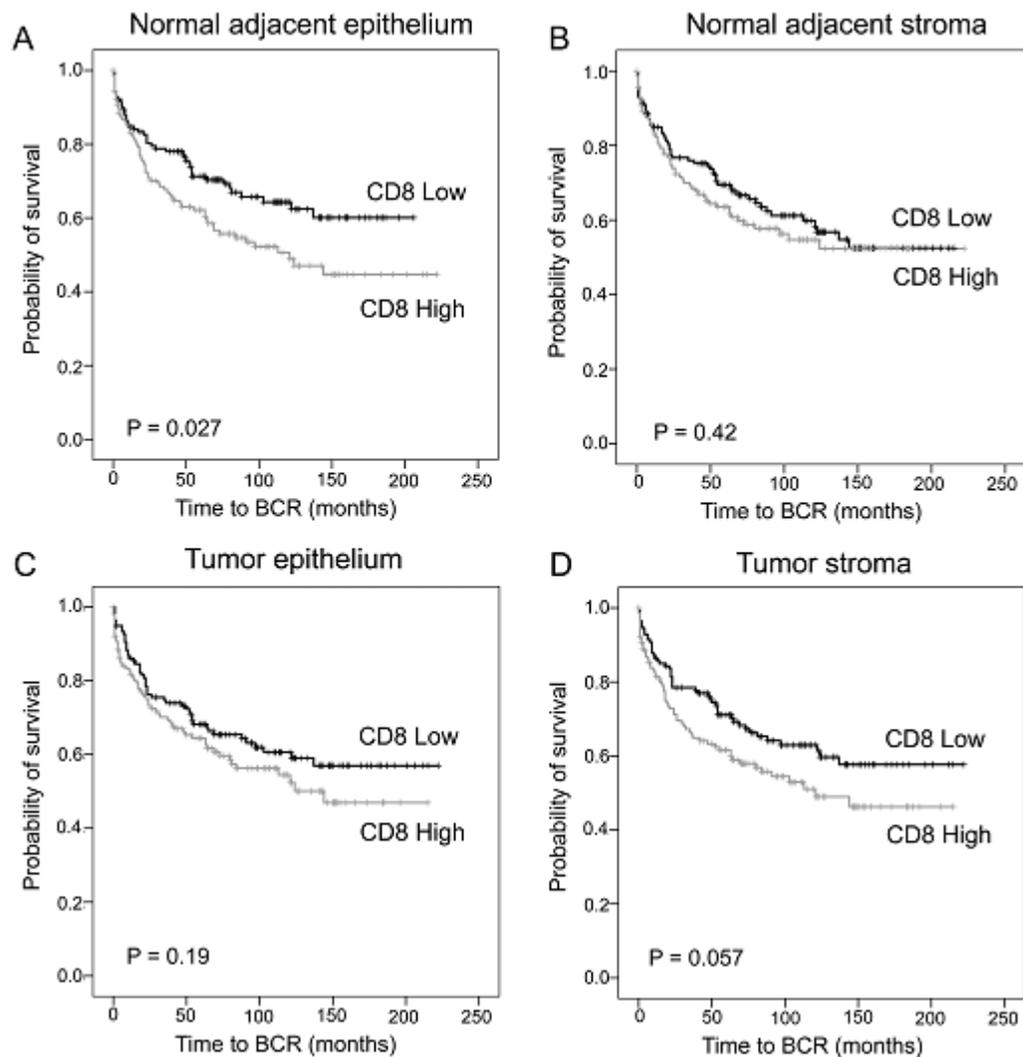


Figure 2. Prognostic impact of CD8+ cell density in prostate cancer.

CD8+ cell density in normal prostate adjacent tissue (A, B) and tumor tissue (C, D) were evaluated by immunohistochemistry in 285 cases of prostate cancer on TMA. Haematoxylin counter-staining allowed for specific assessment in epithelial (A, C) and stromal (B, D) compartments. Correlation between CD8+ cell density (above or below median) and biochemical relapse (BCR)-free survival was evaluated by Log rank test (P values are shown).

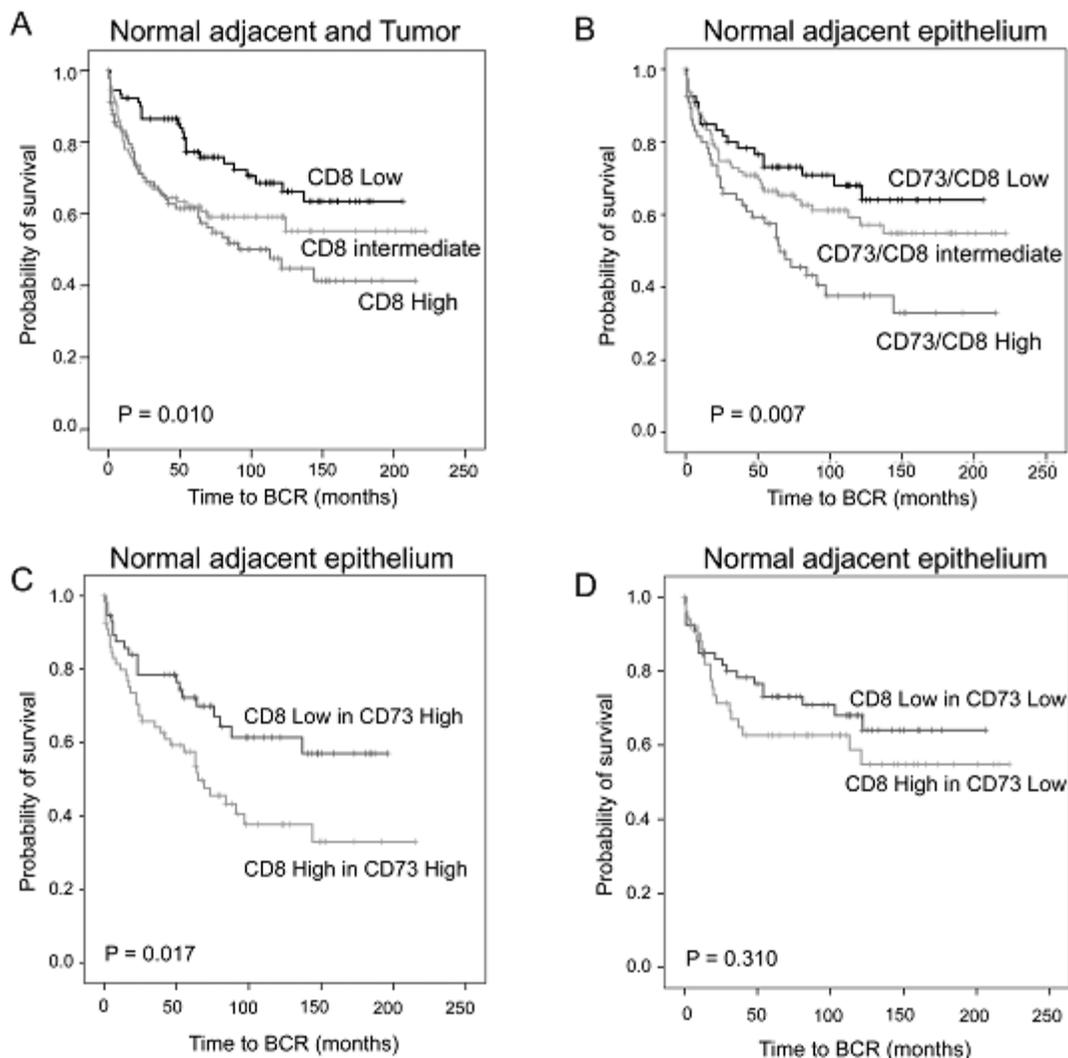


Figure 3. Prognostic impact of total CD8+ cell density and a combined CD73/CD8 score.

(A) Correlation between total CD8+ cell density (in tertiles) and biochemical relapse (BCR)-free survival was evaluated by Log rank test (P value shown). (B) Correlation between a combined CD73/CD8 score (based on median expression) and BCR-free survival was evaluated by Log rank test (P value shown). (C-D) Correlation between CD8+ cell density (above or below median) and biochemical relapse (BCR)-free survival was evaluated in CD73-high (above median) and CD73-low (below median) cases by Log rank test (P values are shown)

2.6.3) Prognostic value of a combined score of CD73 and CD8 expression

In normal adjacent prostate epithelium, CD73 expression and CD8⁺ cell density were positively correlated (Spearman rho: 0.181; P=0.005). When we evaluated the prognostic value of a combined score (Figure 3B and Suppl. Fig. S5), we observed that patients with high levels of both CD73 and CD8 (CD73/CD8 high) had the shortest BCR-free survival (mean: 100 ± 11.9 months), while patients with low levels of both CD73 and CD8 (CD73/CD8 low) had the longest BCR-free survival (147 ± 11 months). Patients with high levels of both CD73 and CD8 also had shorter bone metastasis-free survival (Suppl. Fig. S5).

2.6.4) CD73 expression confers a negative prognostic value to CD8⁺ cells.

Considering the immunosuppressive effects of CD73-derived adenosine, we evaluated whether CD73 expression influenced the prognostic value of intraepithelial CD8⁺ cells. We observed that high densities of CD8⁺ cells were associated with poor prognosis only in cases where CD73 was expressed at high levels in normal adjacent prostate epithelium (Figure 3C-D). Consistent with these results, CD73 expression in normal adjacent epithelium, but not CD8⁺ cell density, was an independent prognostic factor in multivariate analysis (Table 2). Our data thus suggest that CD73 expression in the prostate epithelium regulates the prognostic impact of infiltrating CD8⁺ cells.

2.6.5) CD73 expression negatively correlates with NF-κB activity

Consistent with previous studies (31), we observed a strong positive correlation between CD73 gene expression and several TGF-β genes in human prostate tumors (Suppl. Fig. S6). We next investigated the potential mechanism by which CD73 in the TME negative regulates prostate cancer progression (Figure 1C-D). We hypothesized that CD73-derived adenosine could be associated with decreased NF-κB activity in prostate tumor cells. NF-κB has been shown to promote prostate tumor cell survival, proliferation and invasiveness, and to be associated with poor prognosis in prostate cancer patients (32). Interestingly, extracellular adenosine can alter NF-κB signaling via activation of adenosine receptors (33-35). To test our hypothesis, we first assessed whether CD73 expression levels negatively correlated with NF-κB activity using nuclear p65 expression. As shown in Figure 4A, CD73 expression levels in

the prostate tumor stroma negatively correlated with nuclear p65 expression in prostate tumor cells. We next measured NF- κ B activity in PC-3 human prostate tumor cells treated with the pan-adenosine receptor agonist NECA. As shown in Figure 4B, NECA significantly inhibited endogenous NF- κ B activity in human prostate tumor cells. Real-time PCR analysis revealed high levels of A2B adenosine receptor expression in PC-3 tumor cells (Figure 4C). To assess the role of A2B adenosine receptor in NF- κ B regulation, PC-3 cells were treated with a selective A2B receptor agonist (BAY-608385) or an A2B receptor antagonist (PSB-1115). As shown in Figure 4B, treatment with the selective A2B receptor agonist significantly suppressed NF- κ B activity, while treatment with the selective A2B receptor antagonist rescued the suppressive effect of NECA on NF- κ B activity. Take together, our data demonstrated that extracellular adenosine inhibits NF- κ B activity in human prostate cancer cells via A2B adenosine receptor.

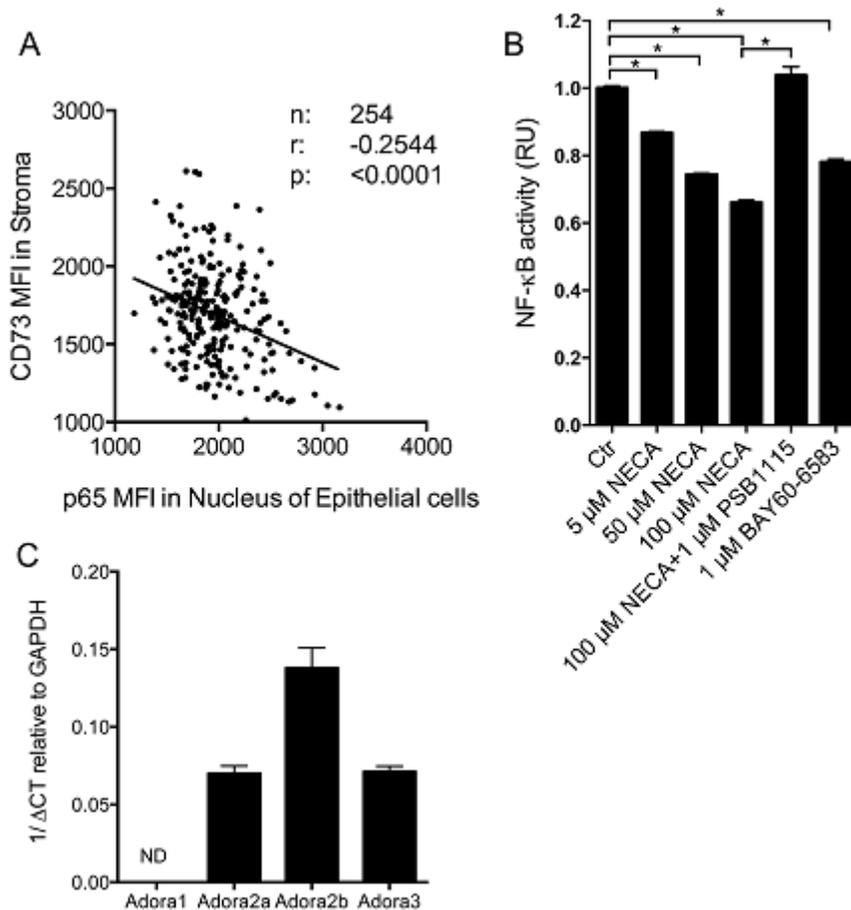


Figure 4. Adenosinergic signaling via A2B adenosine receptor inhibits NF- κ B activity in human prostate cancer cells.

(A) Correlation between CD73 expression levels in prostate tumor stroma and nuclear p65 expression in prostate tumor cells on TMA (n=254) was evaluated (Spearman rho and P value are shown). (B) PC-3 prostate tumor cells were transfected to express the 3 κ B-conA-Firefly NF- κ B reporter plasmid. Cells were then treated with NECA, BAY-608385 or PSB-1115 and luciferase activity measured 32 h later (mean relative units \pm standard errors of triplicates are shown; *: p<0.001 by Student T test). (C) Real-time PCR analysis of *ADORA1*, *ADORA2A*, *ADORA2B* and *ADORA3* mRNA expression in PC-3 human prostate tumor cells (relative to *GAPDH*).

2.7) Discussion

Given the heterogeneity of prostate cancer and concerns regarding overtreatment, significant effort is currently being deployed to identify biomarkers capable of distinguishing aggressive and indolent forms of the disease. The objective is to develop improved classification methods that will help its clinical management.

Biomarkers associated with immune infiltrates (e.g. CD8 and CD3) and immunosuppressive molecules (e.g. PD-L1) have recently emerged as highly promising in various types of cancer (4-7). Immune biomarkers also have the potential to identify cancer patients most likely to respond to immunotherapy (7). In several types of cancer, the presence of CD8+ T cells is associated with better clinical outcomes. In prostate cancer, however, the prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes has long been unclear. Earlier studies reported that prostate tumor-infiltrating lymphocytes were either not associated with prognosis or associated with better outcomes (8-10). Recent studies in large cohorts have however challenged this notion. In their analysis of 535 cases on TMA, Ness *et al.* (11) demonstrated that high densities of CD8+ T cells (in tumor epithelium only or in total tumor tissues) were independent negative prognostic factors of biochemical recurrence (HR= 1.45 and 1.57 respectively).

Our results support the findings of Ness *et al.* Indeed, we also demonstrated that high levels tumor-infiltrating CD8⁺ T cells were associated with shorter BCR-free survival. In addition, we demonstrated that high levels of CD8⁺ T cells in normal adjacent prostatic epithelium were also associated with poor prognosis. As suggested by Ness *et al.*, one of the potential explanations is that CD8⁺ T cells might display immunosuppressive functions in the prostate. Several studies have indeed described the presence of immunosuppressive CD8⁺ T cells in tumors, including in prostate tumors (36-38). The mechanisms of immunosuppression by prostate tumor-infiltrating CD8⁺ T cells include the production of extracellular adenosine by ecto-nucleotidases (39), CTLA-4 expression and production of IL-35 (38). Interestingly, the prostate microenvironment has been implicated in the conversion of effector CD8⁺ T cells into immunosuppressive CD8⁺ T cells (40). While the underlying mechanism of such conversion remains undefined, we believe CD73 expression and extracellular adenosine may be involved. This is supported by our observation that high levels of CD73 in the prostatic epithelium confers a negative prognosis to CD8⁺ cells, and by the fact that extracellular adenosine can convert CD4⁺ T cells into immunosuppressive cells (41-42). Clearly, further work is needed to decipher the potential role of the CD73-adenosinergic pathway in the generation and function of CD8⁺ T suppressor cells.

Our multivariate analysis highlighted the negative prognostic impact of CD73 expression in normal adjacent prostate epithelium, exceeding the prognostic value of pathological staging, Gleason score or pre-operative PSA levels. Consistent with our previous studies in TRAMP transgenic mice (29), CD73 expression in normal prostatic epithelium negatively influenced the clinical impact of prostate-infiltrating CD8⁺ T cells.

Because CD73 can be induced by TGF- β (31), we investigated the potential association between CD73 and TGF- β genes in human prostate tumors. Our gene expression analysis revealed a strong positive correlation between CD73 and several TGF- β genes, suggesting co-regulation. TGF- β is classically defined as a tumor suppressor in the early stages of carcinogenesis and a tumor promoter in established cancers. In prostate cancer, TGF- β forms a growth barrier in response to PTEN deletion (43). Paradoxically, it also promotes the expression of pro-metastatic genes and the development of bone metastases (44). TGF- β is also important in the normal prostate, where cellular interactions between luminal epithelial

cells and stromal cells determine the amount of active TGF- β , in order to maintain tissue homeostasis (45). It is our assertion that CD73 expression in normal prostatic epithelium may also be regulated by TGF- β . Because androgen ablation is associated with an increased production of TGF- β in the prostate, CD73 may also be induced by androgen deprivation therapy (ADT). This possibility merits further investigation, especially considering that ADT is known to increase prostatic T cell infiltration without impacting clinical outcomes (46-47).

In contrast to the poor prognosis associated with CD73 expression in normal adjacent prostatic epithelium, our data revealed that high levels of CD73 in prostate tumors resulting for expression by stromal cells were associated with better prognosis. Our correlative clinical data and *in vitro* studies support the notion high levels of CD73 in the prostate TME contribute to reducing NF- κ B activation in prostate cancer cells. The NF- κ B complex is a key transcription factor involved in the regulation of pro-inflammatory genes, aberrantly activated in prostate cancer (30). Gannon *et al.* demonstrated that nuclear p65 expression, a surrogate of NF- κ B activity, could predict early BCR in prostate cancer patients (32). Our current study demonstrated that extracellular adenosine produced by CD73 suppresses NF- κ B activity in human prostate cancer cells via activation of the A2B adenosine receptor.

Another mechanism by which CD73 and extracellular adenosine may contribute to improve clinical outcomes in prostate cancer is through tumor cell apoptosis. As described above, CD73 expression is strongly correlated with TGF- β in prostate tumors. An important function of TGF- β is to maintain genomic stability via activation of DNA damage responses (DDR) (48). Interestingly, a recent study revealed that p53 activation can induce the expression of A2B adenosine receptor and stimulation of A2B receptor can amplify p53-induced apoptosis (49). Thus, in addition to its inhibitory effect on NF- κ B signaling, extracellular adenosine may eliminate prostate tumor cells via p53 activation.

Because of its short-range paracrine effects, we hypothesize that extracellular adenosine generated by CD73 in the normal prostatic epithelium suppresses the effector function of infiltrating CD8⁺ T cells without affecting distant tumor cells. In contrast, adenosine produced by CD73 in the tumor stroma may suppress both immune cells and tumor cells, thus favouring better clinical outcome (Suppl. Fig. S7). Whether the prognostic impact

of CD73 expression would be different in metastatic castration-resistant prostate tumors or in the context of immunotherapy remains unknown.

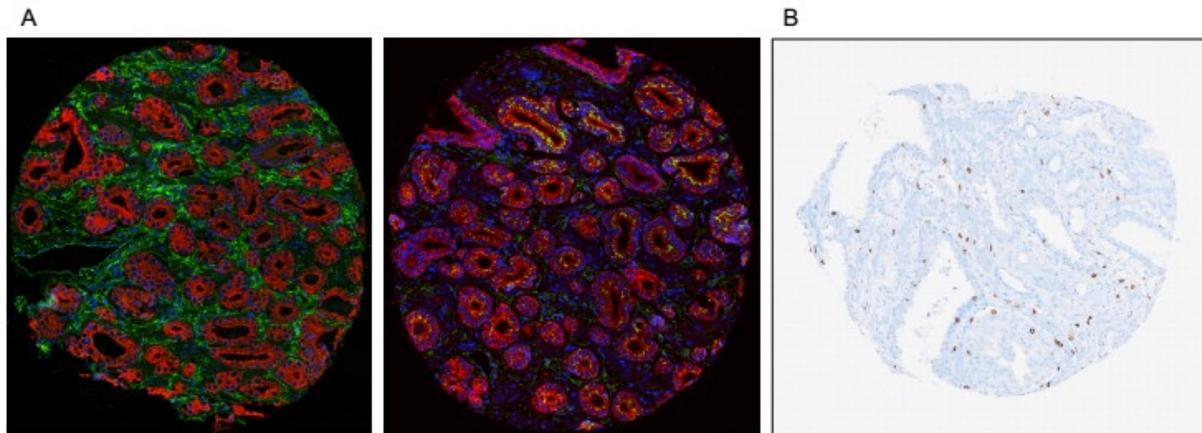
High levels of CD73 in tumors have generally been associated with poor clinical outcomes (16), including in melanoma, colorectal cancer, triple negative breast cancer (TNBC) and high-grade serous (HGS) ovarian cancer (Turcotte *et al.*, in revision). Our current study in prostate cancer sheds new light and highlights the complexity of the adenosinergic pathway in cancer. The prognostic impact of CD73 and extracellular adenosine levels probably depends on several factors, such as tumor immunogenicity, activation of specific oncogenic pathways and loss-of-function of tumor suppressor mechanisms. Given the role of extracellular adenosine in regulating p53 activity, we hypothesize that targeted inhibition of the CD73-adenosinergic pathway will be most effective in cancers with p53 loss-of-function. In support of this, tumoral CD73 expression has been associated with poor prognosis essentially in cancers harbouring frequent p53 loss-of-function, such as TNBC (22) and HGS ovarian cancer (Turcotte *et al.*, in revision).

In conclusion, our study demonstrated that CD73 protein expression in normal adjacent prostate epithelium is an independent negative prognostic factor of BCR-free survival in prostate cancer. Our study also provides evidence that prostate-infiltrating CD8⁺ T cells are associated with worse prognosis in prostate cancer, in support of recent studies (11). We propose that CD73 expression in the prostate epithelium suppresses immunosurveillance by CD8⁺ T cells and converts them into tumor-promoting cells. Future studies are required to better define the impact of CD73 expression in various cell types and adenosine signaling on prostate cancer outcomes.

2.8) Grant Support

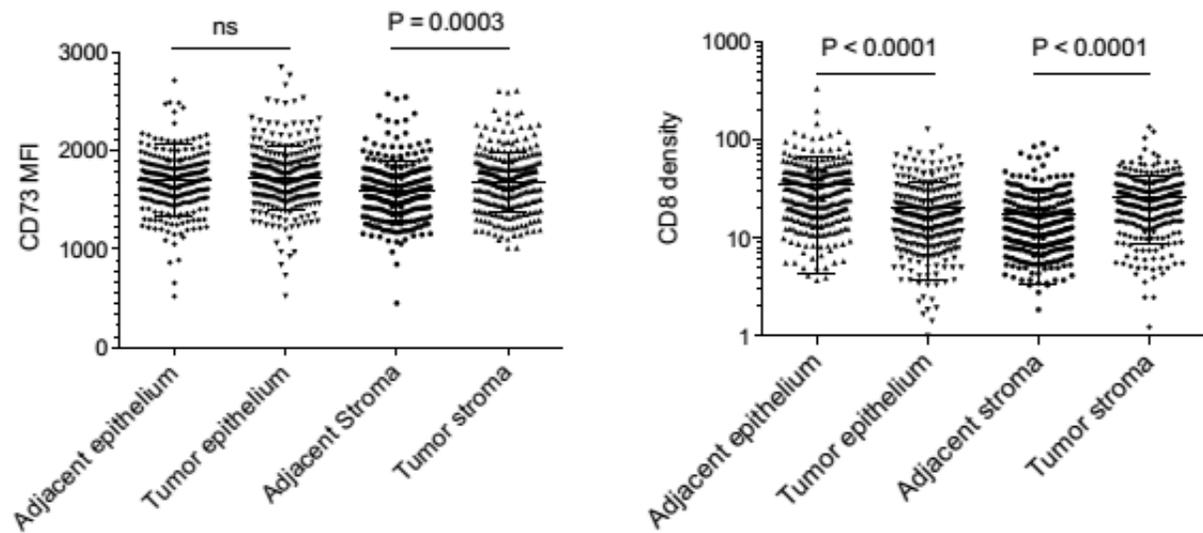
This work was supported by operating grants to J.S. from Prostate Cancer Canada and The Terry Fox Research Institute. B.G.L. was supported by the Canadian Institutes of Health Research Doctoral Award program. J.S. acknowledges support from the Institut du Cancer de Montréal ‘Rapatriement de Cerveaux’ program and support from the Fonds de Recherche Québec – Santé.

2.9) Supplementary figures

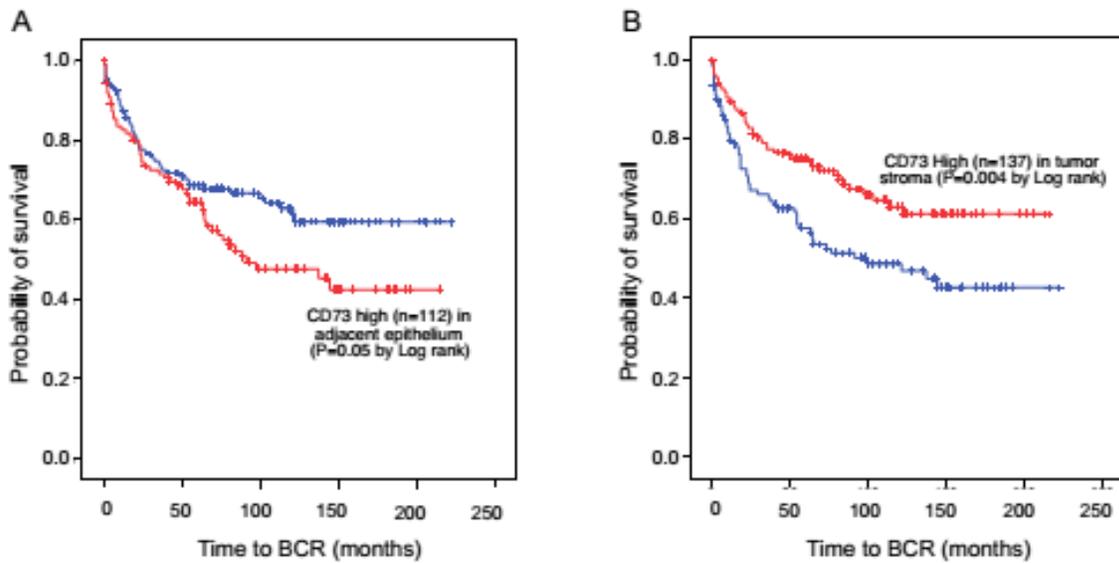


Supp. Figure S1. CD73 and CD8 protein expression analysis.

(A) Representative staining of CD73 expression by immunofluorescence in the stroma (left) and the epithelium (right) of two prostate cancer cases (green = CD73; red = cytokeratins; blue = nuclei). (B) Representative staining of CD8 expression by immunohistochemistry.

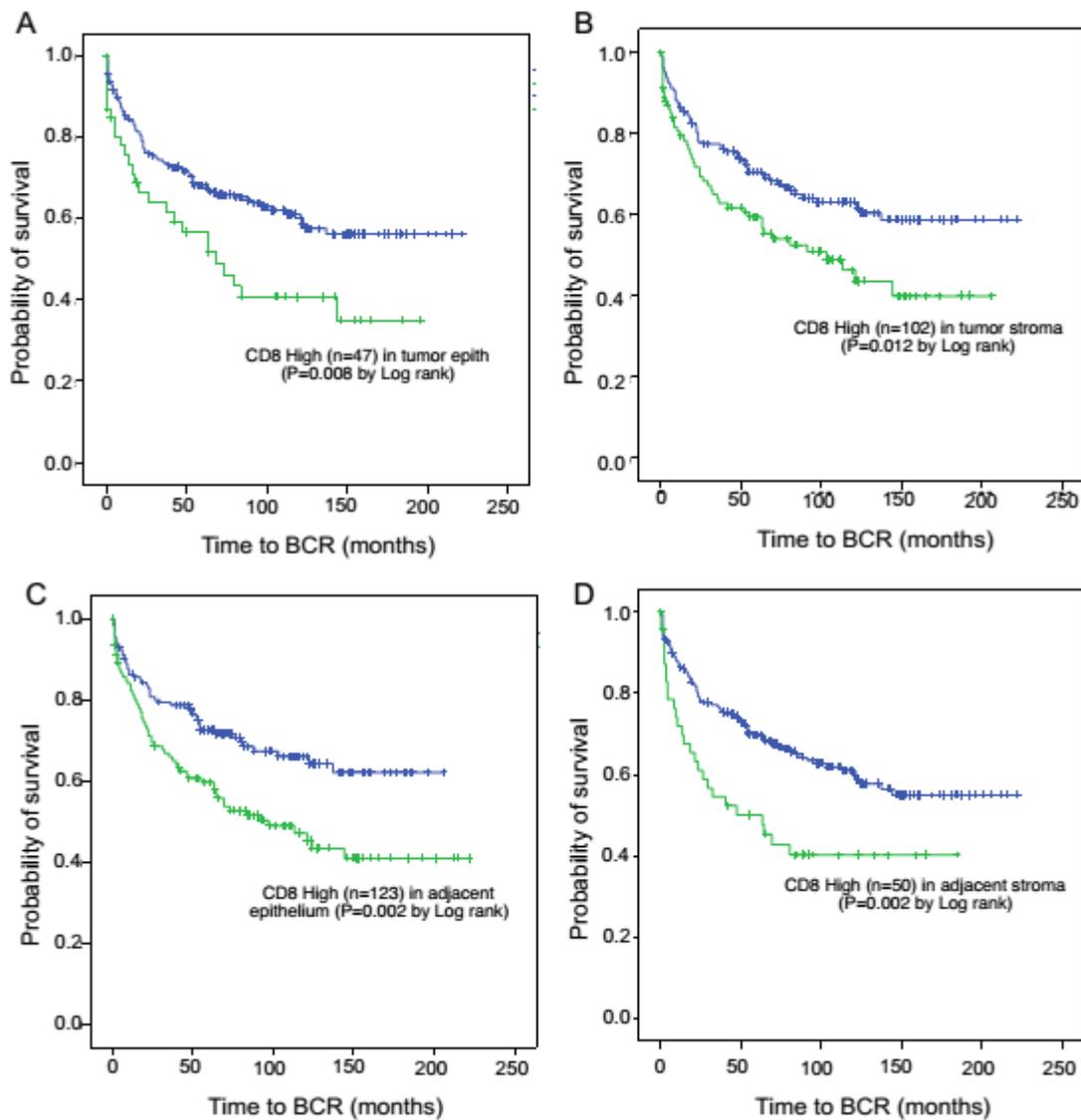


Supp. Figure S2. Distribution of CD73 expression and CD8+ cell density in prostate cancer on TMA.



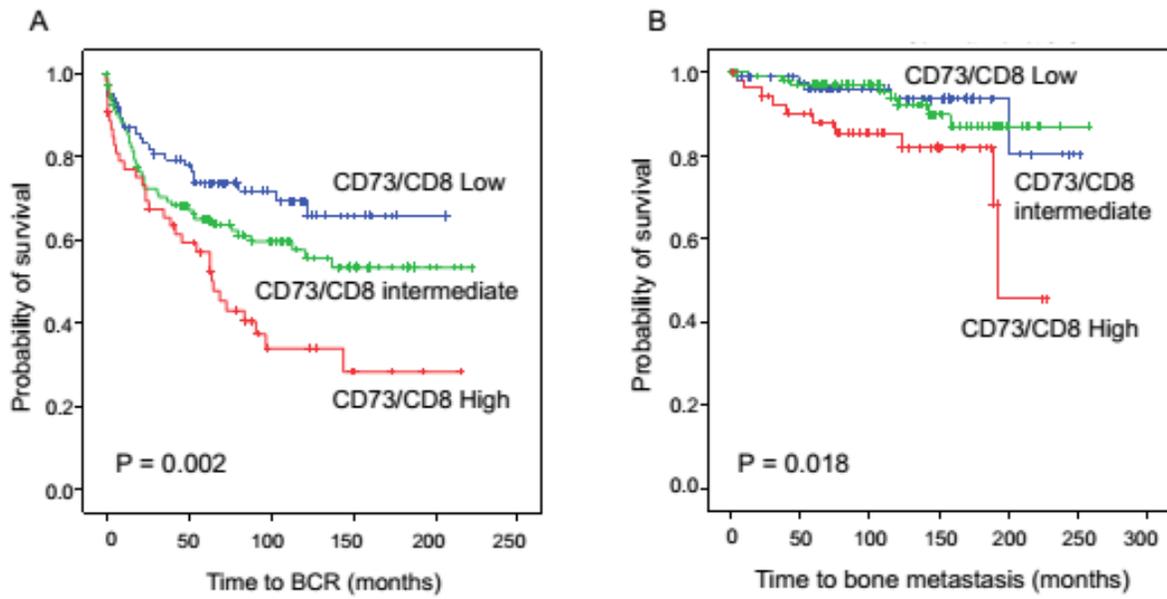
Suppl. Figure S3. Prognostic impact of CD73 in prostate cancer on TMA (n=285).

Correlation between BCR-free survival and CD73 expression in (A) normal adjacent epithelium or (B) tumor stroma (B) using ROC-based cut-offs (Log rank P values are shown).

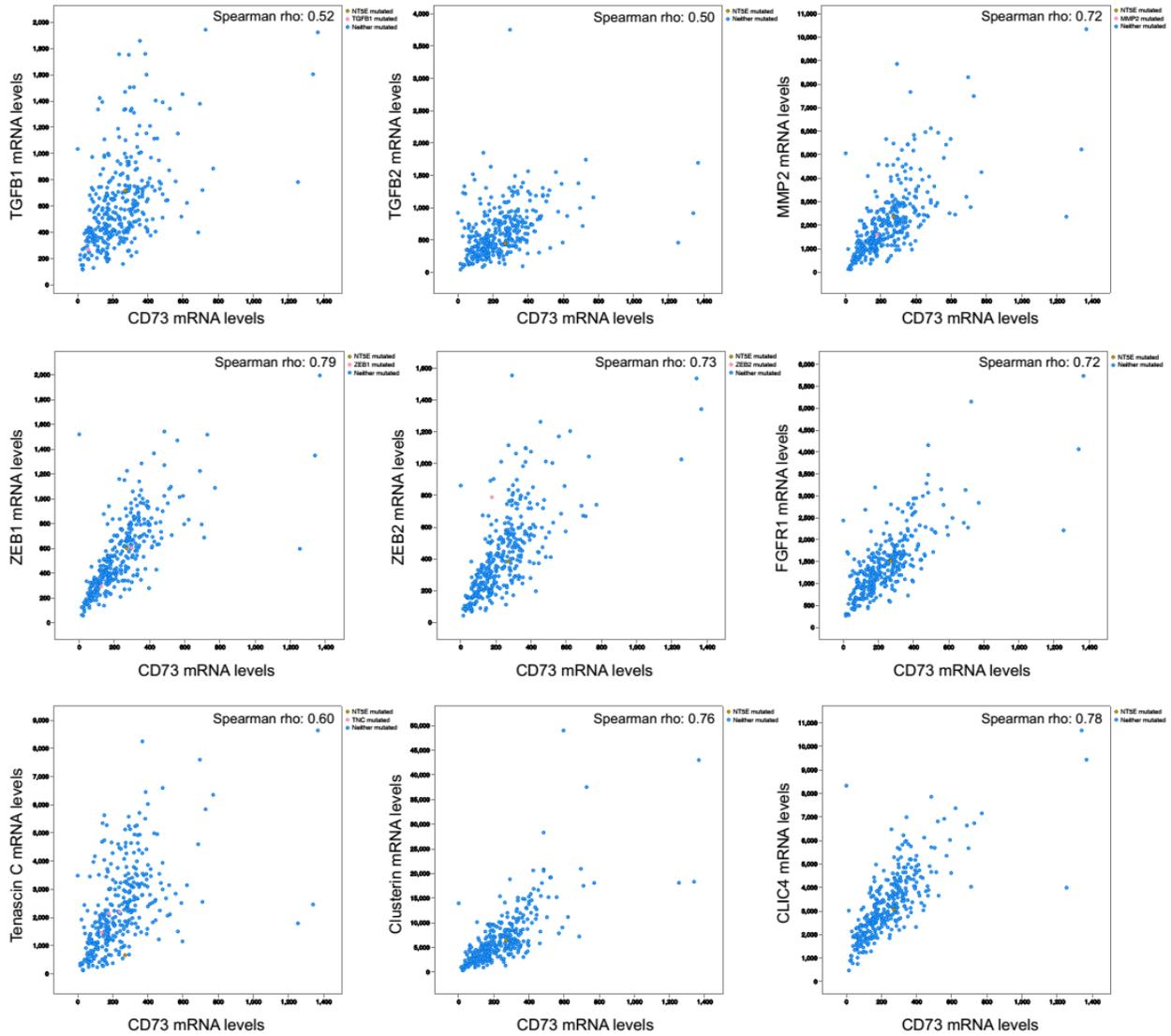


Suppl. Figure S4. Prognostic impact of CD8 in 285 cases of prostate cancer on TMA.

Correlation between BCR-free survival and CD8+ cell density in tumor epithelium (A), tumor stroma (B), normal adjacent epithelium (C) or normal stroma (D) using ROC-based cut-offs (Log rank P values are shown).

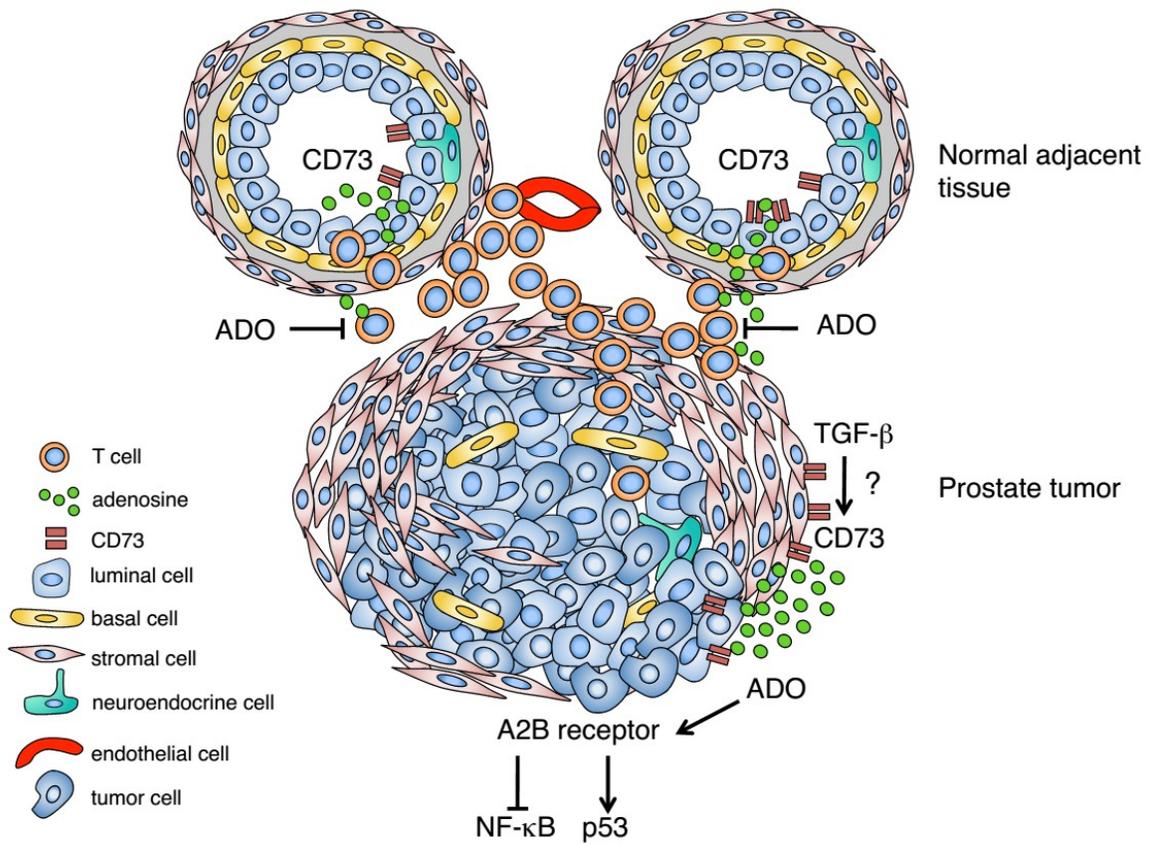


Suppl. Figure S5. (A) Correlation between a combined CD73/CD8 score (using ROC based cut-offs) and BCR-free survival. (B) Correlation between a combined CD73/CD8 score (using the median as cut-offs) and bone metastasis-free survival.



Suppl. Figure S6. Correlation between CD73 and TGF- β associated genes in human prostate cancer

(TCGA integrated profiling of 333 primary prostate adenocarcinoma samples; data analyzed using the cBioPortal for Cancer Genomics [www.cbioportal.org])



Suppl. Figure S7. Graphical summary.

We propose that extracellular adenosine generated by CD73 expression in normal prostatic epithelium suppresses effector T cell function and promotes tumor immune escape. In the prostate tumor microenvironment, however, adenosine may suppress both T cells and tumor cells, with a net result of delaying biochemical relapse.

2.10) References

1. Saad F and Miller K. Current and Emerging Immunotherapies for Castration-resistant Prostate Cancer. *Urology* 2015;85:976-86.
2. Basch E, Loblaw DA, Oliver TK, Carducci M, Chen RC, Frame JN, et al. Systemic therapy in men with metastatic castration-resistant prostate cancer: American Society of Clinical Oncology and Cancer Care Ontario clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 2014; 32:3436-48.
3. Gartrell BA and Saad F. Managing bone metastases and reducing skeletal related events in prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:335-45.
4. Jiang L, Zhao Z, Jiang S, Lin Y, Yang H, Xie Z, et al. Immunological markers predict the prognosis of patients with squamous non-small cell lung cancer. *Immunol Res* 2015;62:316-24.
5. Giraldo N, Becht E, Pages F, Skliris GP, Verkarre V, Vano Y, et al. Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:3031-40.
6. Galon J, Angell HK, Bedognetti D and Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* 2013;39:11-26.
7. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16:375-84.
8. Vesalainen S, Lipponen P, Talja M and Syrjänen K. Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 1994;30A:1797-803.
9. Sorrentino C, Musiani P, Pompa P, Cipollone G and Di Carlo E. Androgen deprivation boosts prostatic infiltration of cytotoxic and regulatory T lymphocytes and has no effect on disease-free survival in prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011;17:1571-81.

10. Kärjä V, Aaltomaa S, Lipponen P, Isotalo T, Talja M and Mokka R. Tumour-infiltrating lymphocytes: A prognostic factor of PSA-free survival in patients with local prostate carcinoma treated by radical prostatectomy. *Anticancer Res* 2005;25:4435-8.
11. Ness N, Andersen S, Valkov A, Nordby Y, Donnem T, Al-Saad S, Busund LT, Bremnes RM and Richardsen E. Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer. *Prostate* 2014;74:1452-61.
12. Bishop JL, Sio A, Angeles A, Roberts ME, Azad AA, Chi KN and Zoubeidi A. PD-L1 is highly expressed in Enzalutamide resistant prostate cancer. *Oncotarget* 2015;6:234-42.
13. Schweizer MT and Drake CG. Immunotherapy for prostate cancer: recent developments and future challenges. *Cancer Metastasis Rev* 2014;33:641-55.
14. Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Schreiber TH, Belikoff B, Abbott R, et al. Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci Transl Med* 2015;7:277.
15. Young A, Mittal D, Stagg J and Smyth MJ. Targeting Cancer-Derived Adenosine: New Therapeutic Approaches. *Cancer Discov* 2014;4: 879-888.
16. Allard B, Turcotte M and Stagg J. Targeting CD73 and downstream adenosine receptor signaling in triple-negative breast cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2014;18: 863-8.
17. Young A, Mittal D, Stagg J and Smyth MJ. Antimetastatic effects of blocking PD-1 and the adenosine A2A receptor. *Cancer Research* 2014;74: 3652-8.
18. Allard B, Turcotte M, Spring K, Pommey S, Royal I and Stagg J. Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *International Journal of Cancer* 2014;134: 1466-73.
19. Beavis PA, Milenkovski N, Stagg J, Smyth MJ and Darcy PK. A2A blockade enhances anti- metastatic immune responses. *Oncoimmunology* 2013;2: 26705.
20. Allard B, Pommey S, Smyth MJ and Stagg J. Targeting CD73 enhances the anti-tumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clinical Cancer Research* 2013;19: 5626-35.

21. Beavis PA, Divisekera U, Paget C, Chow MT, John LB, Devaud C, et al. Blockade of A2A receptors potently suppresses the metastasis of CD73+ tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110: 14711-6.
22. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ and Stagg J. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110: 11091-6.
23. Stagg J and Allard B. Immunotherapeutic approaches in triple-negative breast cancer: latest research and clinical prospects. *Therapeutic advances in medical oncology* 2013;5: 169-81.
24. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK and Smyth MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in immunology* 2012;33:231-7.
25. Stagg J. The double-edge sword effect of anti-CD73 cancer therapy. *Oncoimmunology* 2012;1: 217-218.
26. Stagg J, Thompson LF and Dwyer KM. Ectonucleotidases in cancer and inflammation. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012; 2012: 951423.
27. Allard B, Turcotte M and Stagg J. CD73-generated adenosine: orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012; 2012: 485156.
28. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MW, Darcy PK and Smyth MJ. CD73- deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer research* 2011;71: 2892-900.
29. Stagg J, Beavis PA, Divisekera U, Liu MC, Möller A, Darcy PK and Smyth MJ. CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. *Cancer Res* 2012;72:2190-6.
30. Péant B, Diallo JS, Dufour F, Le Page C, Delvoye N, Saad F and Mes-Masson AM. Over-expression of IkappaB-kinase-epsilon (IKKepsilon/IKKi) induces secretion of inflammatory cytokines in prostate cancer cell lines. *Prostate* 2009;69:706-18.
31. Regateiro FS, Howie D, Nolan KF, Agorogiannis EI, Greaves DR, Cobbold SP, Waldmann H. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- β . *Eur J Immunol* 2011;41:2955-65.

32. Gannon PO, Lessard L, Stevens LM, Forest V, Bégin LR, Minner S, et al. Large-scale independent validation of the nuclear factor-kappa B p65 prognostic biomarker in prostate cancer. *Eur J Cancer* 2013;49:2441-8.
33. Majumdar S and Aggarwal BB. Adenosine suppresses activation of nuclear factor-kappaB selectively induced by tumor necrosis factor in different cell types. *Oncogene* 2003;22:1206-18.
34. Jijon HB, Walker J, Hoentjen F, Diaz H, Ewaschuk J, Jobin C and Madsen KL. Adenosine is a negative regulator of NF-kappaB and MAPK signaling in human intestinal epithelial cells. *Cell Immunol* 2005;237:86-95.
35. Csóka B, Németh ZH, Rosenberger P, Eltzschig HK, Spolarics Z, Pacher P, et al. A2B adenosine receptors protect against sepsis-induced mortality by dampening excessive inflammation. *J Immunol* 2010;185:542-50.
36. Kiniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, Peng W, Peng G, Wheeler TM, et al. CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(23):6947-58.
37. Olson BM, Jankowska-Gan E, Becker JT, Vignali DA, Burlingham WJ, McNeel DG. Human prostate tumor antigen-specific CD8+ regulatory T cells are inhibited by CTLA-4 or IL-35 blockade. *J Immunol* 2012;189:5590-601.
38. Churlaud G, Pitoiset F, Jebbawi F, Lorenzon R, Bellier B, Rosenzweig M, Klatzmann D. Human and Mouse CD8(+)/CD25(+)/FOXP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Front Immunol* 2015;6:171.
39. Parodi A1, Battaglia F, Kalli F, Ferrera F, Conteduca G, Tardito S, et al. CD39 is highly involved in mediating the suppression activity of tumor-infiltrating CD8+ T regulatory lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:851-62.
40. Shafer-Weaver KA, Anderson MJ, Stagliano K, Malyguine A, Greenberg NM, Hurwitz AA. Cutting Edge: Tumor-specific CD8+ T cells infiltrating prostatic tumors are induced to become suppressor cells. *J Immunol* 2009;183:4848-52.
41. Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, Drake CG, Powell JD. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 2008;111:251-9.

42. Ohta A, Kini R, Ohta A, Subramanian M, Madasu M, Sitkovsky M. The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front Immunol* 2012;3:190.
43. Ding Z1, Wu CJ, Chu GC, Xiao Y, Ho D, Zhang J et al. SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature* 2011;470:269-73.
44. Fournier PG, Juárez P, Jiang G, Clines GA, Niewolna M, Kim HS et al. The TGF- β Signaling Regulator PMEPA1 Suppresses Prostate Cancer Metastases to Bone. *Cancer Cell* 2015;27:809-21.
45. Salm SN, Koikawa Y, Ogilvie V, Tsujimura A, Coetzee S, Moscatelli D et al. Generation of active TGF-beta by prostatic cell cocultures using novel basal and luminal prostatic epithelial cell lines. *J Cell Physiol* 2000;184:70-9.
46. Sorrentino C, Musiani P, Pompa P, Cipollone G, Di Carlo E. Androgen deprivation boosts prostatic infiltration of cytotoxic and regulatory T lymphocytes and has no effect on disease-free survival in prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011;17:1571-81.
47. Gannon PO, Poisson AO, Delvoye N, Lapointe R, Mes-Masson AM, Saad F. Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. *J Immunol Methods* 2009;348:9-17.
48. Barcellos-Hoff MH, Cucinotta FA. New tricks for an old fox: impact of TGF β on the DNA damage response and genomic stability. *Sci Signal* 2014;7:re5.
49. Long JS, Crighton D, O'Prey J, Mackay G, Zheng L, Palmer TM et al. Extracellular adenosine sensing-a metabolic cell death priming mechanism downstream of p53. *Mol Cell* 2013;50:394-406.

Chapitre 3

Optimisation de la vaccination de type GVAX dans un modèle murin du cancer de la prostate

3.1) Résumé

Malgré des résultats prometteurs dans les études précédentes, la vaccination de type GVAX a été inefficace en étude clinique de phase III pour le cancer de la prostate. La présence de facteurs favorisant la suppression de l'immunité anti-tumorale est une hypothèse du faible succès de telles thérapies. CD73 s'est révélé être une cible permettant de restaurer l'immunité anti-tumorale dans différents modèles murins, dont le cancer de la prostate. Une combinaison du vaccin GVAX avec l'inhibition de CD73 pourrait permettre d'en augmenter l'efficacité dans le cancer de la prostate. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé un vaccin de type GVAX dans un modèle murin du cancer de la prostate. D'abord, nous avons déterminé si son efficacité était augmenté dans des souris CD73 «knock-out». Ensuite, nous avons déterminé l'efficacité de combinaisons avec un anticorps contre CD73 et un inhibiteur du récepteur A2A de l'adénosine. Nous avons observé que la croissance des tumeurs sous-cutanées était significativement réduite dans les souris CD73KO traitées avec le vaccin. Cependant, nous n'avons pas observé de réduction de la croissance des tumeurs lors de la combinaison avec l'anti-CD73 ou l'inhibiteur d'A2A. Notre étude suggère que le vaccin de type GVAX est plus efficace en absence de CD73 de l'organisme hôte, mais que sa combinaison avec une inhibition de CD73 ne serait pas bénéfique.

3.2) Introduction

Plusieurs vaccins anticancéreux ont été étudiés dans le cancer de la prostate. Parmi ceux-ci, on compte Sipuleucel-T, un vaccin de cellules dendritiques qui a été approuvé aux États-Unis. Malgré le succès de celui-ci, la plupart des autres vaccins anti-cancer apportent des

succès cliniques limités. GVAX est un vaccin constitué de cellules cancéreuses irradiées et sécrétant du GM-CSF. Pour le cancer de la prostate, il s'est d'abord montré efficace dans les études précliniques et cliniques de phase II.^{119, 122} Cependant, il n'a pas été efficace contre le CPRC dans des études cliniques de phase III.¹²³ Une hypothèse veut que le faible succès des vaccins anti-cancer serait imputable aux mécanismes d'évasions de l'immunité antitumorale présents dans les tumeurs. Ainsi, malgré la stimulation des lymphocytes T contre des antigènes tumoraux par le vaccin, ils seraient incapable d'agir au site tumoral en raison de la présence de facteurs les inhibant. L'adénosine a été identifié comme un facteur important supprimant l'immunité anti-tumorale dans plusieurs cancers.¹²⁶ CD73 est l'enzyme principale responsable de la formation de l'adénosine. Son expression a été fortement associé avec l'immunosuppression dans les tumeurs.¹⁵⁰ Notre groupe et d'autres ont montré que l'inhibition de CD73 permet de réduire la croissance et la métastase des tumeurs dans différents modèles murins, dont le cancer de la prostate.^{144 à 149, 151} De plus, notre groupe et d'autres ont montré que la combinaison de cette inhibition avec d'autre traitements permet d'augmenter leur efficacité.^{154 à 156}

L'hypothèse de ce projet est donc que l'inhibition de CD73 permettrait d'optimiser la vaccination de type GVAX dans le cancer de la prostate. L'objectif associé est d'évaluer si l'efficacité du vaccin de cellules tumorales est augmentée lors de la délétion ou de l'inhibition de CD73. Pour ce faire, nous avons généré un vaccin avec une lignée tumorale murine de la prostate: les TRAMP-C1. Celles-ci ont été transfectées avec l'antigène ovalbumine et le GM-CSF. Ensuite, nous avons comparé la croissance de tumeurs sous-cutanées de TRAMP-C1 dans des souris «knock-out» pour CD73 (CD73KO) et des souris normales vaccinées avec les cellules irradiées. Les souris CD73KO traitées avec le vaccin voyaient la taille de leur tumeur significativement réduite comparativement aux autres groupes de traitements. Finalement, nous avons combiné le vaccin avec un inhibiteur du récepteur A2A de l'adénosine ou avec un anticorps monoclonal ciblant CD73 dans des souris normales porteuses de tumeurs. Ni l'ajout de l'inhibiteur, ni l'anticorps monoclonal n'ont permis de réduire significativement la taille des tumeurs. Ceci suggère que ces combinaisons de traitements ne seraient pas bénéfiques dans un contexte de vaccination.

3.3) Méthodes

3.3.1) Cellules tumorales et vaccinales

Le modèle de cellule tumorale de prostate utilisé dans cette étude est la lignée murine TRAMP-C1. Cette lignée provient de la souris transgénique TRAMP qui développe un cancer de la prostate de façon spontanée.¹⁷⁴ Les TRAMP-C1 étaient gardées en culture avec du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂. Les cellules utilisées pour former des tumeurs exprimaient l'ovalbumine (OVA). L'ovalbumine est une protéine issue des œufs de poule, elle est utilisée comme un antigène externe qui est ciblé par les lymphocytes. L'insertion du gène dans les TRAMP-C1 a été réalisée par un rétrovirus. D'abord, le plasmide pMIG (Addgene) contenant les gènes de l'OVA et du «green fluorescent protein» (GFP) a été transféré dans des cellules d'encapsidations, les Amphopacks, à l'aide de la lipofectamine 2000 (Life Technologies). Alors, les Amphopacks ont produit des rétrovirus contenant le plasmide. Ensuite, le milieu contenant les virus a été récolté et incubé avec des TRAMP-C1 non confluentes. Les plaques contenant les virus et les cellules ont été centrifugées avant d'être incubées. Ce cycle d'infection a été répété deux fois. Puis, les cellules infectées ont été triées par cytométrie de flux (BD, AriaII) pour une expression positive du GFP. Pour mesurer l'expression de CD73 par cytométrie de flux (BD, LSR Fortessa II), les cellules ont été incubées avec un anti-CD73 (eBioscience, Ty/11.8, PE-Cy7, 1/200). Pour le GFP, les cellules ont directement été passées dans le cytomètre. D'autre part, les cellules vaccinales utilisées dans nos expériences étaient les TRAMP-C1 OVA sécrétant du GM-CSF. Il s'agit d'une cytokine stimulant la présentation antigénique par les cellules dendritiques. La transfection du plasmide pMFG (Tokyo University of Pharmacy and Life Science) contenant le gène du GM-CSF dans les TRAMP-C1 OVA a été réalisée selon le même protocole que pour l'OVA. Pour sélectionner les cellules exprimant le GM-CSF, des dilutions limites ont été réalisées. Plusieurs clones ont été isolés de ces dilutions. Le surnageant de chaque culture de clones a été récolté et la quantité de GM-CSF sécrété a été mesurée avec un kit d'ELISA (eBioscience). Le clone sécrétant le plus de GM-CSF a été multiplié et conservé pour être utilisé comme vaccin.

3.3.2) Traitement des tumeurs *in vivo*

Les souris utilisées étaient de la souche C57BL/6 normale (Charles Rivers) ou CD73KO (CD73^{-/-}) (Dr. Linda H. Thompson, Oklahoma Medical Research Foundation). C57BL/6 est aussi la souche de base des souris TRAMP. Les expériences *in vivo* réalisées suivaient un protocole général. (Figure 5) Pour les injections de tumeurs, les TRAMP-C1 OVA étaient lavées au PBS, comptées et suspendues à 10 millions de cellules par millilitres. Deux millions de cellules étaient injectées sous la peau sur le flanc droit des souris. Les souris étaient vaccinées au jour 3 et, s'il y avait deux vaccinations, au jour 6. Avant la vaccination, les TRAMP-C1 OVA GM-CSF étaient irradiées à 120Gy pour tuer toutes les cellules. Un million de cellules étaient injectées sur le flanc gauche des souris et du PBS était injecté chez les souris contrôles. Ensuite, la longueur et la largeur des tumeurs étaient mesurées avec un vernier tous les deux jours. Une multiplication était effectuée afin de déterminer l'aire occupée par les tumeurs. Dans l'expérience utilisant un inhibiteur du récepteur A2A, le SCH58261 était injecté dans la cavité péritonéale des souris tous les jours. Dans l'expérience avec l'anti-CD73, un anticorps monoclonal contre CD73 (Bio-X-Cell, TY23) ou un anticorps contrôle (Bio-X-Cell, 2A3) était injecté dans la cavité péritonéale des souris deux fois par semaine. Lorsque les tumeurs atteignaient une taille supérieure à 150 mm², les animaux étaient sacrifiés. Dans certains cas, les tumeurs étaient extraites afin d'analyser les TIL. Les données ont été comparées avec une ANOVA à deux facteurs.

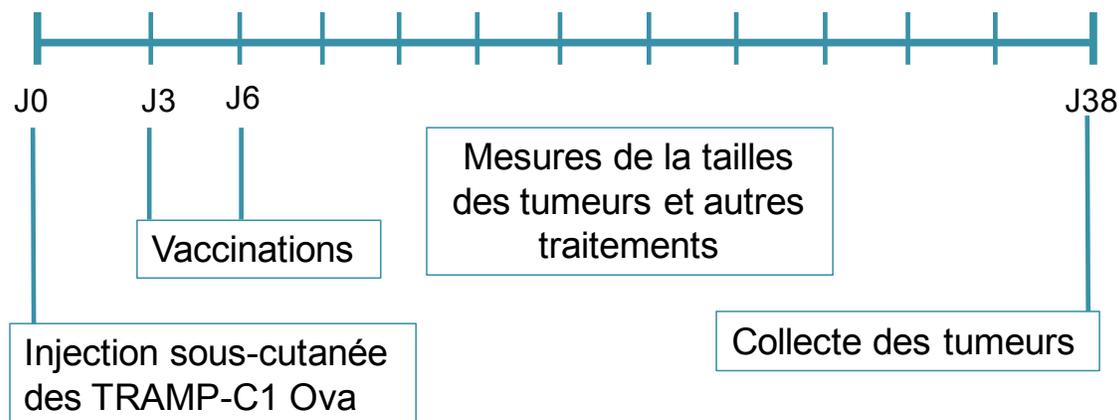


Figure 5: Protocole d'injection et de traitements des souris.

3.3.3) Analyse des TIL en cytométrie de flux

Les tumeurs des souris CD73KO ont été extraites après l'euthanasie. D'abord, un morceau de tumeur de masse équivalente pour chaque souris a été haché finement avec une lame de rasoir. Ensuite, ils ont été digérés avec une solution de collagénase et DNase pour libérer les cellules. Puis, les cellules ont été marquées avec des anticorps contre CD3 (eBioscience, 500A2, PerCP-eFluor710, 1/200) et CD8 (BD, 53-6.7, V450, 1/200) couplées à des fluorophores et un marqueur de viabilité (eBioscience, Fixable Viability Dye eFluor506, 1/500). Afin d'identifier les lymphocytes T CD8 dont le TCR est spécifique à l'OVA, nous avons utilisé un tétramère de CMH de classe 1 lié au peptide de l'OVA SIINFEKL (Université de Montréal, PE, 1/30). Les différents marquages ont ensuite été quantifiés en cytométrie de flux (BD, LSR Fortessa II). Les résultats ont été analysés avec le logiciel FlowJo. Les données ont été comparées avec un test-T.

3.4) Résultats

3.4.1) Expression de CD73, de l'OVA et du GM-CSF

Nous avons déterminé par cytométrie de flux que les TRAMP-C1 expriment CD73. Nous avons constaté que le spectre d'expression est étendu. (Figure 6a) De plus, nous avons validé le succès de la transfection du gène de l'OVA et du tri cellulaire. Pour ce faire, nous avons confirmé que les TRAMP-C1 OVA exprimaient le GFP indiquant l'acquisition du plasmide. (Figure 6b) D'autre part, nous avons mesuré la quantité de GM-CSF sécrété par les cellules vaccinales. Plusieurs expériences d'ELISA ont permis de déterminer que les TRAMP-C1 OVA GM-CSF sécrétaient entre 50 et 200 ng de GM-CSF par 24h et par millions de cellules dans le milieu de culture.

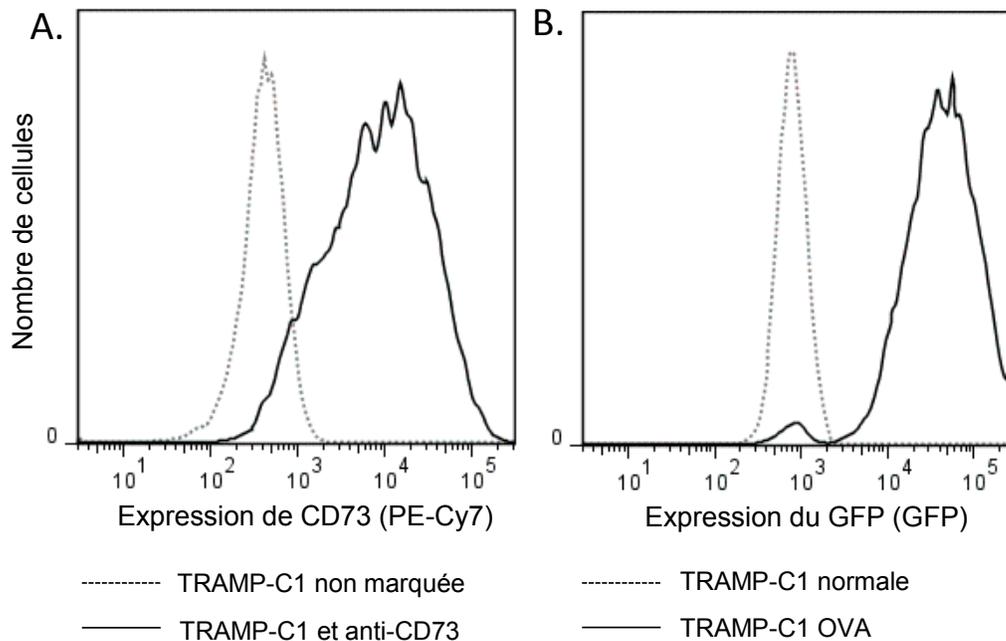


Figure 6: Les TRAMP-C1 OVA expriment CD73, le GFP et l'OVA.

A. Distribution de l'expression de CD73 par cytométrie de flux. B. Distribution de l'expression du GFP par cytométrie de flux.

3.4.2) Vaccination des souris CD73KO

L'objectif de cette étude est d'évaluer si l'efficacité du vaccin de type GVAX est augmentée lors de la délétion ou de l'inhibition de CD73. Nous avons donc commencé par comparer l'efficacité du vaccin chez des souris déficientes en CD73 et des souris normales. Nous avons formé quatre groupes de 10 souris: normales recevant du PBS, normales recevant le vaccin, CD73KO recevant du PBS et CD73KO recevant le vaccin. Une seule vaccination au jour 3 a été réalisée pour cette expérience. Le vaccin semble ne pas avoir d'effet chez les souris normales dans cette expérience. (Figure 7a) Les tumeurs des souris KO non traitées ont un délai de croissance par rapport aux souris normales. Les souris KO vaccinées voient la croissance de leurs tumeurs encore plus réduite. De plus, dans ce groupe, il y a cinq souris qui n'ont pas développé de tumeur. Nous avons répété cette expérience dans des conditions semblables. (Figure 7b) Cependant, l'expérience a eu lieu dans une autre animalerie et les

souris ont reçu deux vaccinations. Les résultats obtenus dans celle-ci sont très similaires à la première expérience. Cependant, il semble que la taille des tumeurs soit plus grande et plus variable dans la seconde expérience. Malgré deux vaccinations, cette augmentation de la croissance des tumeurs semble avoir diminué l'efficacité de la vaccination dans les souris CD73KO. Finalement, nous avons observé que le vaccin ne réduit pas la taille des tumeurs dans les souris normales, mais la réduit fortement dans les souris CD73KO. Ces résultats démontrent que la vaccination est plus efficace en absence de CD73.

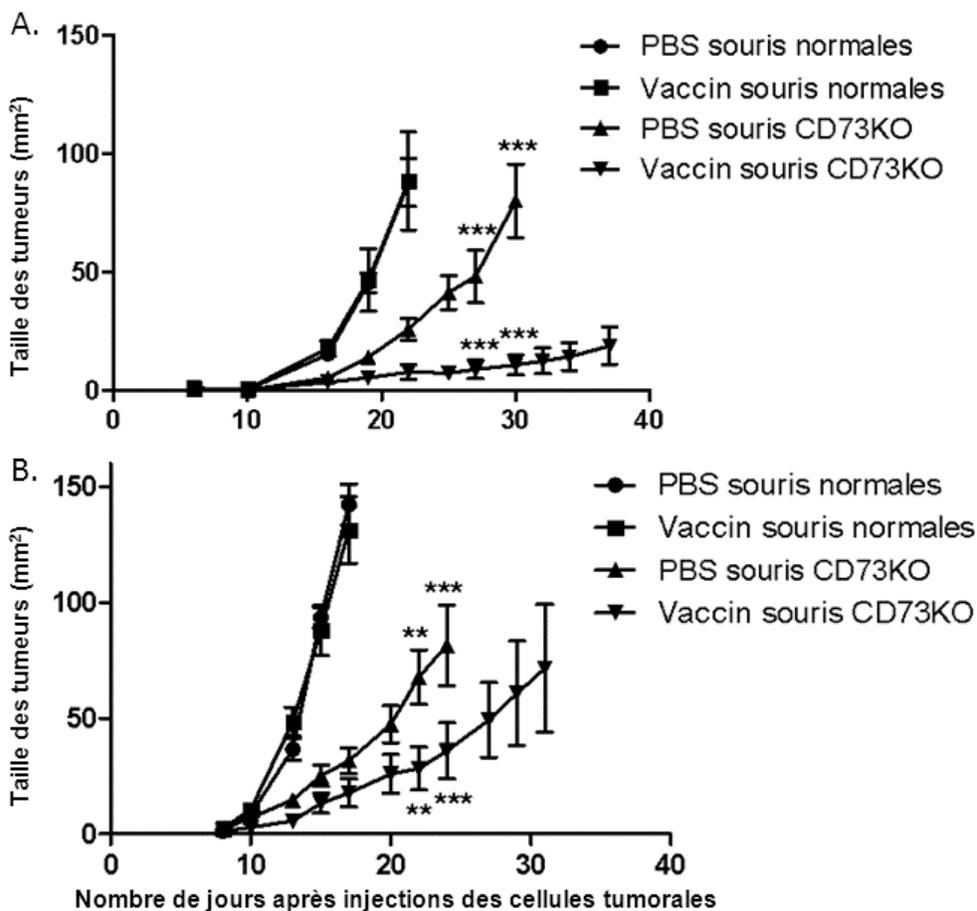


Figure 7: Le vaccin de cellules tumorales est plus efficace dans les souris CD73KO.

Des souris normales et CD73KO ont été traitées avec du PBS ou le vaccin. La taille des tumeurs a été mesurée aux deux jours. A. Première expérience. B. Deuxième expérience. (*)Différence statistiquement significative par ANOVA à deux facteurs.

3.4.3) Proportion des TIL CD8+ spécifiques à l'OVA

Pour la première expérience, nous avons extrait les tumeurs de souris CD73KO traitées avec du PBS et le vaccin. Nous avons déterminé la proportion de lymphocytes T CD8+ infiltrant la tumeur dont le TCR était spécifique à l'ovalbumine. Nous n'avons pas pu comparer avec les souris normales dans une même expérience, car ces souris ont été euthanasiées bien plus tôt en raison de la croissance rapide de leur tumeur. De plus, une comparaison de deux expériences différentes de cytométrie n'aurait pas été valable en raison de la variabilité entre les expériences. Évidemment, nous n'avons pas pu analyser les souris CD73KO n'ayant pas développé de tumeur. Nous avons identifié les cellules positives pour CD3 et CD8 et puis celles marquées avec le tétramère. Il y avait une augmentation non significative de la proportion de lymphocytes spécifiques parmi les lymphocytes CD8+ totaux. (Figure 8) La vaccination pourrait donc stimuler légèrement l'infiltration de lymphocytes spécifiques dans les souris KO.

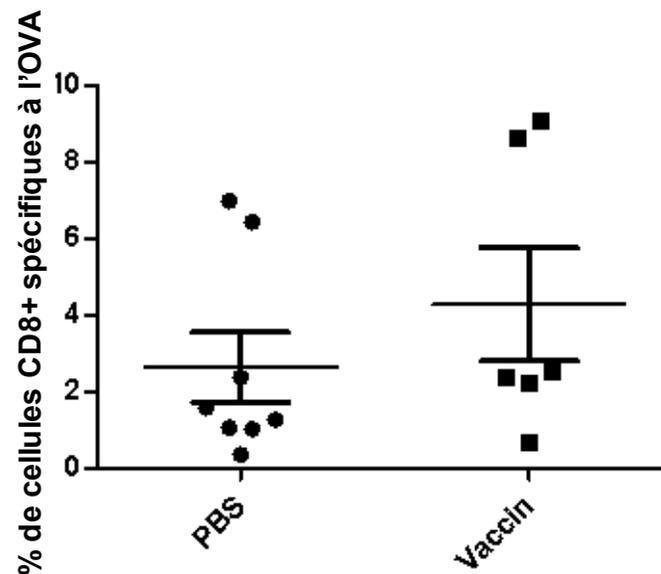


Figure 8: Les TIL CD8+ spécifiques à l'OVA dans les souris CD73KO.

Les tumeurs des souris CD73KO traitées avec du PBS ou le vaccin ont été extraites. Les TIL ont été analysés par cytométrie de flux. Le pourcentage de lymphocytes T CD8+ marqués avec le tétramère a été calculé.

3.4.4) Combinaison du vaccin et d'un antagoniste du récepteur A2A

Sachant que le récepteur A2A de l'adénosine est le principal responsable de son rôle immunosuppresseur, nous avons vérifié si son inhibition permettait d'augmenter l'efficacité du vaccin. Pour ce faire, nous avons administré, tous les jours, un inhibiteur sélectif du récepteur A2A: le SCH58261, par des injections intrapéritonéales. Les souris ont reçu deux vaccinations dans cette expérience. Nous avons ainsi formé quatre groupes de traitement de 10 souris: PBS et véhicules, PBS et SCH58261, vaccin et véhicules et vaccin et SCH58261. Le vaccin et l'inhibiteur seuls ont permis de réduire légèrement la taille des tumeurs par rapport aux souris non traitées. (Figure 9) La combinaison du vaccin et de l'inhibiteur ont permis de réduire légèrement la croissance des tumeurs. Cependant, les différences observées ne sont pas significatives. Donc, l'ajout d'un inhibiteur du récepteur A2A au vaccin ne permet pas de réduire significativement la taille des tumeurs.

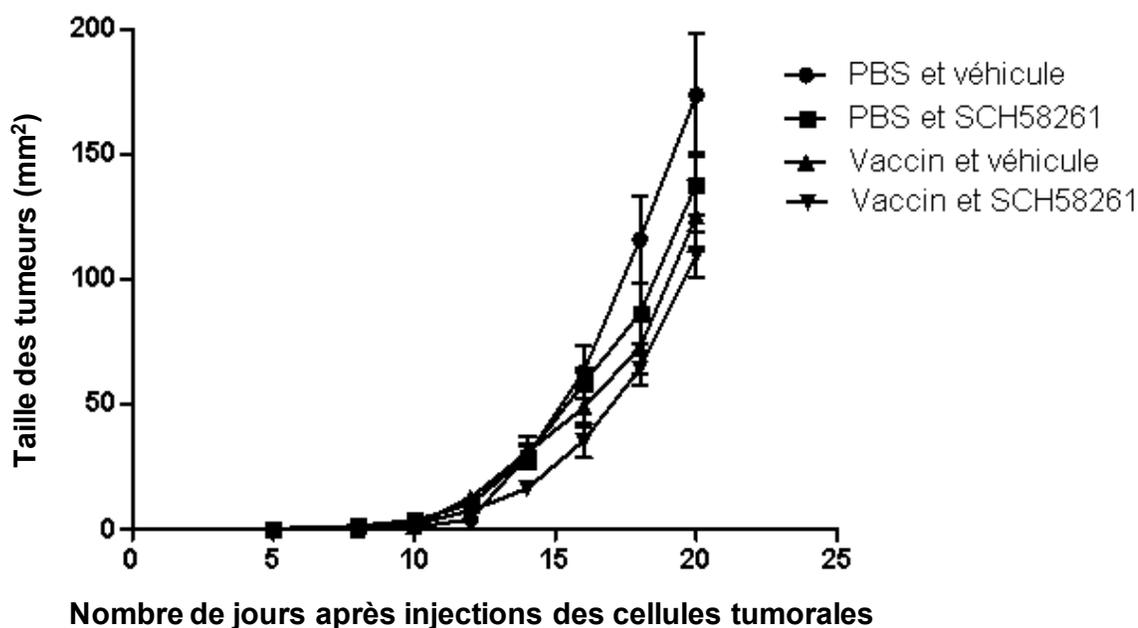


Figure 9: La combinaison du vaccin et d'un antagoniste d'A2A n'augmente pas l'efficacité du traitement des tumeurs.

Des souris ont été traitées avec une combinaison de PBS ou du vaccin avec le véhicule ou le SCH58261. La taille des tumeurs a été mesurée aux deux jours.

3.4.5) Combinaison du vaccin et d'un anti-CD73

À la suite des résultats positifs dans les souris CD73KO, nous avons déterminé l'efficacité d'une combinaison du vaccin avec un anticorps dirigé contre CD73. Les souris ont été vaccinées deux fois et traitées avec un anticorps contrôle (2A3) ou l'anti-CD73 (TY23) deux fois par semaine. Quatre groupes de traitements ont été formés: PBS/2A3, vaccin/2A3, PBS/TY23, et vaccin/TY23. Les groupes de souris ayant reçu le vaccin ont une réduction de la taille de leur tumeur. (Figure 10) Cependant, la combinaison avec l'anti-CD73 n'a pas permis de réduire d'avantage la taille des tumeurs. Aussi, l'anti-CD73 seul n'a pas eu d'effet sur la croissance des tumeurs. Ces résultats suggèrent que la combinaison avec l'anti-CD73 ne permet pas d'augmenter l'efficacité du vaccin.

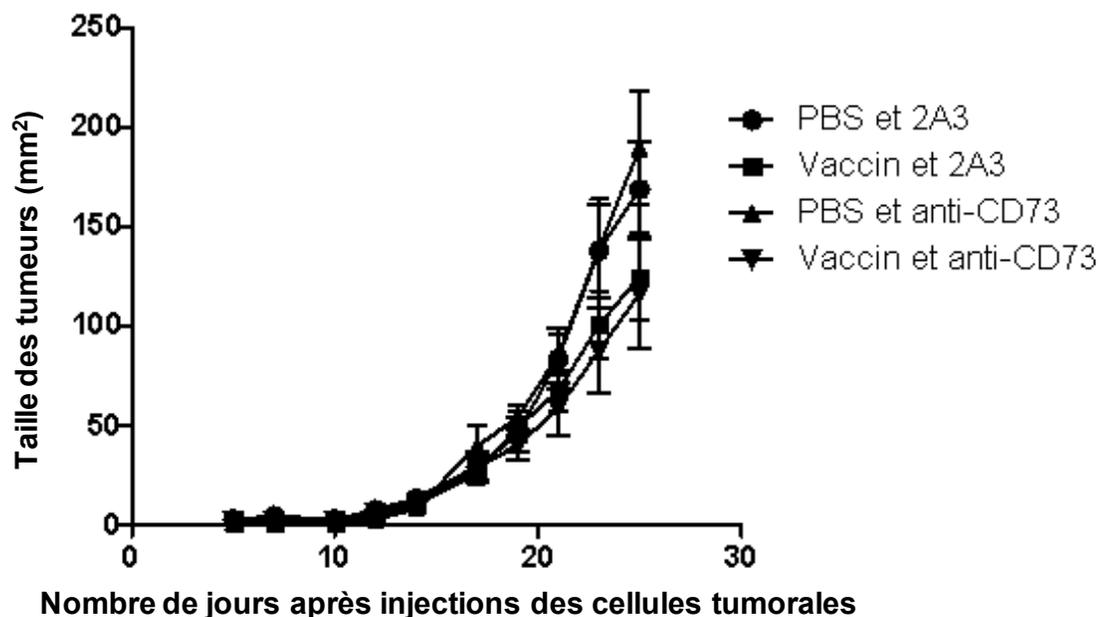


Figure 10: La combinaison du vaccin et d'un anti-CD73 n'augmente pas l'efficacité du traitement des tumeurs.

Des souris ont été traitées avec une combinaison de PBS ou du vaccin avec un anticorps contrôle ou l'anti-CD73. La taille des tumeurs a été mesurée aux deux jours.

3.5) Discussion

Les vaccins anticancéreux ont donné des succès cliniques limités dans le cancer de la prostate. Le vaccin de cellules tumorales GVAX en est un exemple. L'immunosuppression dans l'environnement tumoral pourrait être responsable de ce manque d'efficacité. Plusieurs études ont démontré que l'inhibition de CD73 permet de traiter diverses tumeurs murines. Parmi celles-ci, certaines ont démontré le bénéfice de sa combinaison avec d'autres traitements. C'est pourquoi l'hypothèse de ce projet est que l'inhibition de CD73 permettrait d'optimiser la vaccination de type GVAX dans le cancer de la prostate. L'objectif associé est d'évaluer si l'efficacité du vaccin de cellules tumorales est augmentée lors de la délétion ou de l'inhibition de CD73. Dans cette étude, nous avons donc comparé l'efficacité de la vaccination avec des cellules tumorales irradiées sécrétant le GM-CSF dans des souris normales et CD73KO. De plus, nous avons déterminé l'efficacité d'une combinaison du vaccin avec un inhibiteur du récepteur A2A et avec un anticorps monoclonal contre CD73.

Nous avons démontré que le vaccin de type GVAX est plus efficace dans des souris déficientes en CD73 comparativement à des souris normales. Ces résultats ont été répétés dans deux expériences. Les souris CD73KO non traitées avaient une réduction de la taille de leur tumeur par rapport aux souris normales. De plus, les souris KO traitées avaient une réduction encore plus marquée démontrant un effet du vaccin dans ces souris. Or, les souris normales vaccinées n'avaient pas de réduction de leur tumeur démontrant que l'absence de CD73 augmente considérablement l'efficacité du vaccin dans ces souris. De plus, toutes les souris n'ayant pas développé de tumeurs se trouvaient dans le groupe de souris KO traitées soutenant cette hypothèse. Dans la seconde expérience, la croissance des tumeurs semble avoir été plus rapide et plus variable. De plus, le vaccin semble avoir été moins efficace, malgré une vaccination supplémentaire. Ceci peut s'expliquer parce que les deux expériences n'ont pas été réalisées dans la même animalerie. En effet, le laboratoire a déménagé de l'hôpital Notre-Dame vers le nouveau bâtiment du Centre de recherche du CHUM. Contrairement à la première animalerie, la seconde animalerie est plus «propre» et les animaux sont gardés dans des cages fermées. Ceci peut avoir modifié l'exposition des souris aux pathogènes externes, ce qui peut influencer la réponse antitumorale du système immunitaire. Pour la première expérience, les tumeurs ont été isolées afin d'étudier les TIL. Nous avons quantifié les

lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à l'OVA, un antigène exprimé par les cellules tumorales et vaccinales. Nous avons observé une augmentation non significative de ces cellules dans les souris CD73KO traitées comparativement aux non traités. L'absence de différence statistiquement significative peut s'expliquer par l'absence de l'analyse des 5 souris n'ayant pas développé de tumeur. On peut supposer que celles-ci auraient eu un nombre élevé de ces cellules, car ce sont elles qui ont répondu le mieux au traitement. Une autre hypothèse serait que l'effet de GVAX chez les souris CD73KO est causé par un autre mécanisme que l'augmentation des lymphocytes T CD8 spécifiques à l'OVA. Par exemple, il pourrait plutôt s'agir d'une meilleure activation de ces lymphocytes sans augmentation de leur nombre, d'autres antigènes ciblés ou d'un autre type de cellule effectrice. Il ne peut pas s'agir de l'antigène «large T» de SV40, car les TRAMP-C1 en ont perdu l'expression.

Nous n'avons pas observé d'augmentation de l'efficacité du vaccin, lorsque combiné avec un antagoniste d'A2A ou l'anti-CD73. Ces résultats ne confirment pas ceux obtenus dans les souris CD73KO. Pour l'inhibiteur d'A2A, il est possible qu'il n'empêche pas tous les effets protumoraux de l'adénosine générée par CD73, car il n'inhibe pas les autres récepteurs de l'adénosine. La différence entre les résultats avec les souris KO et avec l'anti-CD73 peuvent s'expliquer par les résultats décrits au chapitre 2. En effet, nous avons déterminé que l'expression de CD73 prédit différemment le pronostic des patients selon sa localisation. Une expression élevée dans la tumeur était associée à un pronostic favorable tandis qu'une expression élevée dans les tissus bénins était associée à un pronostic défavorable. L'association avec un pronostic favorable dans la tumeur suggère que CD73 y a un rôle antitumoral. Donc, si CD73 joue ce même rôle dans les tumeurs de TRAMP-C1, l'inhibition par l'anti-CD73 serait délétère. L'effet immunostimulateur de l'anti-CD73 viendrait contrebalancer l'effet dans la tumeur résultant en une absence d'effet sur la croissance tumorale. La différence de résultats observée chez les souris CD73KO peut s'expliquer parce que l'expression de CD73 dans les tumeurs est intacte. En effet, les TRAMP-C1 injectés aux souris KO exprimaient CD73. L'augmentation de l'efficacité du vaccin résultait donc de l'absence de CD73 sur les tissus bénins et les cellules hématopoïétiques. Notre groupe et d'autres ont démontré que l'expression de CD73 sur les cellules hématopoïétiques contribue largement à ses effets sur l'évasion de l'immunité anti-tumorale.^{145, 151} En résumé, la

combinaison avec l'anti-CD73 ne serait pas bénéfique, car il affecterait le rôle protecteur de CD73 sur les cellules tumorales, tandis que la délétion de CD73 serait bénéfique, car elle affecte seulement le CD73 de l'hôte. Une autre hypothèse pourrait expliquer cette différence. En effet, le traitement avec l'anti-CD73 représentait une inhibition sur une courte période de temps, tandis que les souris CD73KO n'ont pas de CD73 depuis leur naissance. Il ne serait donc pas étonnant que l'effet sur le système immunitaire soit beaucoup plus marqué dans les souris KO. Par exemple, nous avons démontré que les Tregs étaient moins fonctionnelles dans ces souris.¹⁴⁵ Ainsi, il est possible que l'anti-CD73 ne reproduise pas l'effet d'une délétion complète et soutenue de CD73.

Les TRAMP-C1 OVA GM-CSF non irradiés, utilisées comme vaccin, sécrétaient une quantité de GM-CSF variant de 50 à 200 ng/24h*10⁶ cellules. Cette quantité est comparable à une étude similaire utilisant les TRAMP-C1.¹⁷⁵ Dans cette étude, ils ont observé qu'une combinaison du vaccin avec un anti-CTLA4 était efficace. Comme nous, le vaccin seul avait peu d'effet. D'autre part, nous avons précédemment montré que la délétion de CD73 réduit la croissance des tumeurs spontanées des souris TRAMP et des tumeurs sous-cutanées TRAMP-C1.¹⁴⁶ Nos résultats vont dans le même sens, car nos souris KO développaient aussi des tumeurs moins rapidement. Par contre, dans cette étude ils observent que le clone TY23 de l'anti-CD73 réduit la croissance des TRAMP-C1. Or, nous n'avons pas observé d'effet du TY23 dans notre expérience. Ceci peut s'expliquer par des différences dans le protocole. Nous avons injecté 2 millions de cellules tandis qu'ils en ont injecté seulement 0,5 million. De plus, nous avons traité les souris tous les 3 ou 4 jours et ils les ont traitées tous les 2 jours. Ainsi, il est possible que dans notre étude les lymphocytes n'aient pas été assez stimulés pour être en mesure de détruire un plus grand nombre de cellules. Par contre, dans les souris CD73KO, ils étaient probablement plus actifs. De plus, si l'hypothèse du rôle antitumorale de CD73 dans les tumeurs de TRAMP-C1 est valable, il est possible que des traitements espacés, comme dans notre étude, affectent autant le CD73 de l'hôte et de la tumeur. Au contraire, des traitements rapprochés comme dans l'étude précédente pourraient favoriser la balance vers l'immunité antitumorale. Finalement, un autre article avait démontré qu'un vaccin à base de cellules tumorales sécrétant le GM-CSF voyait son efficacité augmentée dans des souris déficientes en récepteur A2A.¹³³ Nos résultats dans les souris CD73KO vont dans le même sens. Cependant,

l'inhibiteur d'A2A n'a pas apporté d'augmentation d'efficacité significative, probablement parce qu'il ne reproduit pas les effets d'un KO complet.

En conclusion, cette étude confirme que la vaccination de type GVAX voit son efficacité augmentée dans les souris CD73KO. Cependant, les combinaisons d'un inhibiteur du récepteur A2A de l'adénosine et d'un anticorps monoclonal contre CD73 avec la vaccination n'ont pas augmenté l'efficacité de celle-ci. Donc, cette étude ne permet pas de conclure sur l'utilité d'une combinaison d'un vaccin et d'un inhibiteur de la voie de l'adénosine dans le cancer de la prostate. D'autres études seraient nécessaires pour confirmer que l'inhibition de cette voie n'est pas bénéfique dans le cancer de la prostate.

Chapitre 4

4) Discussion générale

Les outils pronostiques qui sont présentement utilisés couramment pour le cancer de la prostate se limite au taux d'APS sanguin, au stade TMN et au score de gleason. Malgré qu'ils soient utile pour estimer le pronostic des patients, chacun possède ses limites. Il y a donc place à amélioration. De nouveaux outils pronostiques potentiels dont de nombreux biomarqueurs sont présentement en développement. Il est possible que certains d'entre-deux se révèlent très efficace et soient utilisés dans les examens de routine pour le cancer de la prostate. Notamment, deux biomarqueurs ont été récemment approuvés aux États-Unis.¹⁷⁶ L'un d'eux est le pro-APS, un précurseur de l'APS, qui est associé plus fortement au cancer de la prostate. L'autre est PCA3, un antigène spécifique à la prostate, qui est mesuré dans l'urine après les autres examens de routine. Quoique non approuvé, plusieurs autres types de biomarqueurs ont été développés pour le cancer de la prostate. Par exemple, des marqueurs épigénétiques ou des microARN ont été identifiés.¹⁷⁷ L'expression de protéines dans le tissu tumoral sont des biomarqueurs très étudiés. Cependant, seulement l'expression de quelques protéines peuvent prédire le pronostic de façon indépendante. Par exemple, une étude a identifié que seulement les protéines AKT1, AR stromal, EZH2 et PSMA était un facteur pronostique indépendant parmi une sélection beaucoup plus importante.¹⁷⁸ Il semblerait donc qu'il est important de faire une sélection rigoureuse des biomarqueurs les plus probants pour prédire adéquatement le pronostic. D'autre part, il existe des tests qui combinent l'expression de nombreuses protéines. Par exemple, les tests Oncotype Dx et Prolaris Score estime un niveau de risque à partir de la combinaison de l'expression de différents gènes dans les biopsies.¹⁷⁶ Peut-être que les tests qui seront les plus efficaces dans le futur seront ceux qui combineront une grande variété des biomarqueurs les plus efficace.

En général, le cancer de la prostate est un cancer qui est facile à contrôler. Il existe de nombreux types de traitements pour ce cancer. La surveillance active, la prostatectomie et la radiothérapie sont des options qui fonctionnent bien pour les cancers peu avancés. Malgré cela, de nos jours, ces traitements usuels sont constamment amélioré. Par exemple, des

techniques plus sophistiquées comme la prostatectomie laparoscopique assistée par robot et la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité sont de plus en plus utilisées. De plus, il est nécessaire de connaître pour quel type de cancer chaque type de traitement est le plus efficace. Cela est beaucoup étudié et on arrive de plus en plus à recommander le bon traitement au bon patient. Par contre, les cancers de la prostate métastatiques et résistants à la castration demeurent très difficiles à traiter. Les efforts de recherche sont donc concentrés principalement sur cette maladie. Actuellement, il existe plusieurs options de traitements, mais elles permettent seulement une prolongation limitée de la survie. Les traitements qui ont été développés récemment sont l'enzalutamide, l'acétate d'abiratéron, le cabazitaxel, le sipuleucel-T, le denosumab et le radium-223. Ils sont utilisés dans certaines circonstances et ont une efficacité modérée. Il y a donc encore beaucoup de travail à faire afin d'avoir des traitements à fort taux d'efficacité pour le CRPC. En effet, plusieurs autres traitements sont actuellement en étude clinique.

Dans les dernières années, la recherche sur les immunothérapies du cancer a beaucoup évolué. Partant du principe de base que le système immunitaire s'attaque aux cellules tumorales, l'objectif de l'immunothérapie est de stimuler ce processus pour détruire les tumeurs. Plusieurs méthodes sont utilisées pour y parvenir. Les principales sont la vaccination, l'inhibition des mécanismes intrinsèques d'immunosuppression, le ciblage d'antigènes par des anticorps et le transfert adoptif de cellules immunes. La seconde catégorie compte l'ipilimumab et le nivolumab qui ont connus de forts succès en clinique contre le mélanome métastatique. La troisième compte le trastuzumab utilisé pour le cancer du sein et le rituximab utilisé pour des lymphomes et leucémies. Pour le cancer de la prostate, un vaccin, sipuleucel-T, a été approuvé aux États-Unis. Beaucoup d'autres traitements sont à l'étude sans toutefois avoir été prouvés assez efficaces jusqu'à maintenant. Le vaccin PROSTVAC-VF a montré des résultats prometteurs et est actuellement en étude clinique de phase III. Par contre, l'ipilimumab et le vaccin GVAX ont échoué en étude clinique de phase III pour le CRPC. Des études de combinaisons de ceux-ci avec d'autres traitements sont en cours. Les succès limités peuvent s'expliquer par la grande variété de mécanismes d'évasion tumorale. Pour les thérapies futures, il pourrait donc être nécessaire de cibler les tumeurs de différentes façons à la fois. Il

est possible que les thérapies les plus efficaces soient des combinaisons de plusieurs types d'immunothérapies ou d'immunothérapies et de thérapies conventionnelles.

Les outils pronostiques dont nous disposons pour le cancer de la prostate manquent de précision et de fiabilité. Ils ne permettent pas de prédire avec certitude la progression future du cancer et les chances de survie du patient. L'estimation du pronostic du patient permet de choisir une option de traitement adaptée. C'est pourquoi il est important de rechercher de meilleures méthodes pour prédire le pronostic. De plus, le traitement que l'on choisit doit être efficace pour le type de tumeur à traiter. Donc, il faut que des traitements efficaces contre chaque types de tumeurs soient disponible. Cependant, les traitements actuellement disponibles ne sont pas tous efficace. Par exemple, pour les cancers de la prostate les plus agressifs, ils permettent seulement d'augmenter la survie de façon limitée. C'est pourquoi il est important de rechercher de nouvelles options thérapeutiques pour le cancer de la prostate.

Pour ce projet, nous avons identifié une protéine exprimée dans les cancers qui pourrait servir à la fois d'outil pronostique et de cible thérapeutique dans le cancer de la prostate. Il s'agit de l'ectoenzyme CD73. Elle est responsable de la sécrétion d'adénosine dans le milieu extracellulaire. CD73 et l'adénosine ont été associés avec la suppression de la réponse immune dans plusieurs types de tumeurs.^{126, 150} Sachant que les cellules immunitaires détruisent les cellules tumorales, l'expression de CD73 serait associée à la progression tumorale. De plus, CD73 a été associé a plusieurs autres rôles dans les tumeurs.¹⁴² Donc, l'étude de l'expression de CD73 dans les tumeurs pourraient permettre de prédire le pronostic des patients. En effet, notre groupe et d'autres ont associé l'expression de CD73 avec le pronostic dans plusieurs types de cancer dont le cancer de la prostate.^{148, 160 à 171} De plus, l'inhibition de CD73 pourrait permettre de restaurer l'immunité anti-tumorale. En effet, notre groupe et d'autres ont démontré que des thérapies ciblant CD73 sont efficace contre les tumeurs et les métastases de différents modèles murins du cancer, dont le cancer de la prostate.^{144 à 149, 151} De plus, notre groupe et d'autres ont aussi démontré l'utilité d'une combinaison avec d'autre traitements.^{154 à 156} Cependant, la valeur pronostique et thérapeutique de CD73 dans le cancer de la prostate demeure peu étudié et reste à être confirmée. Donc, ce projet vise à déterminer si la protéine CD73 peut être un outil pronostique et une cible thérapeutique dans le cancer de la prostate.

Le premier objectif était d'évaluer la valeur pronostique de l'expression de CD73 et de l'infiltration des lymphocytes T CD8+ dans le cancer de la prostate. Nous avons déterminé que l'expression de CD73 dans le tissu tumoral prédit un pronostic favorable, tandis que son expression dans le tissu normal adjacent prédit un pronostic défavorable. Ces résultats suggèrent que CD73 a un rôle antagoniste dans le tissu normal adjacent et dans la tumeur. À notre connaissance, nous sommes les premiers à identifier ces rôles distincts. Notre résultat sur la valeur pronostique négative de CD73 s'explique bien par son rôle connu d'immunosuppresseur. Par contre, notre résultat montrant un pronostic favorable de CD73 dans la tumeur semble surprenant. En effet, il est en désaccord avec des études de notre groupe et d'autres qui ont associées l'expression de CD73 a un pronostic défavorable dans plusieurs autres types de tumeurs,^{148, 160 à 164, 169} De plus, une étude dans le cancer de la prostate a montré que son expression dans la tumeur était associée aux métastases lymphatiques.¹⁷¹ Par contre, notre résultat est en accord avec deux autres études dans des tumeurs du sein et de l'ovaire.^{167, 168} De plus, il va dans le même sens d'une étude où l'activité de CD73 était associée à de meilleures survies dans le cancer de la prostate.¹⁷⁰ Ce résultat est donc plausible d'autant plus que nous avons pu l'expliquer par l'inhibition de NF-κB. D'autre part, nous avons montré que l'infiltration des lymphocytes T CD8+ dans le tissu normal adjacent et la tumeur était associée avec un pronostic défavorable. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études dans le cancer de la prostate.^{90 à 93} Par contre, d'autres études ne vont pas dans le même sens.^{88, 89} Nous avons déterminé que l'expression de CD73 dans l'épithélium normal adjacent confère une valeur pronostique négative aux cellules CD8+ infiltrant la prostate. Ceci peut permettre d'expliquer les résultats contradictoires dans le cancer de la prostate, mais aussi la différence avec les autres types de cancer où le pronostic associé est plutôt favorable.

Les résultats de cette étude sur la valeur pronostique de CD73 pourraient avoir un impact sur l'évaluation des cancer de la prostate en clinique. En effet, la mesure du niveau de CD73 pourrait être effectuée dans certains cas ou même de façon routinière pour aider à établir le pronostic des patients. Cependant, avant d'en arriver là, plusieurs autres études seront nécessaires. D'abord, puisque cette étude incluait seulement de petits échantillons de tissus, ces résultats devraient être confirmés avec des échantillons complets de tumeur. De plus, les études futures devraient inclure une identification plus précise des rôles de CD73 dans le

cancer de la prostate. Ensuite, d'autres études indépendantes devraient être effectuées pour s'assurer d'une constance des résultats. Finalement, une étude avec un grand nombre de patients devrait être effectuée pour valider les résultats à grande échelle. Après cela, les agences réglementaires pourront évaluer le bien-fondé de son utilisation à grande échelle en clinique. L'utilisation de CD73 seul ne pourra pas donner une prédiction précise du pronostic. C'est pourquoi, il devrait être inclus dans des tests avec plusieurs autres biomarqueurs pour établir une prédiction plus précise.

Le second objectif du projet était de déterminer si l'absence ou l'inhibition de CD73 permet d'augmenter l'efficacité d'un vaccin contre le cancer de la prostate. Nous avons déterminé qu'un vaccin à base de cellules tumorales irradiées de type GVAX a une efficacité augmentée dans des souris déficientes en CD73. Ces résultats sont en accord avec une étude dans des souris A2AKO.¹³³ Par contre, l'efficacité n'a pas été augmentée lors d'une combinaison avec un inhibiteur du récepteur A2A de l'adénosine ou d'un anticorps contre CD73. Donc, l'absence permanente de CD73 des cellules de l'hôte permettrait d'augmenter l'efficacité du vaccin de type GVAX, mais pas la combinaison avec des traitements pharmacologiques. Il semble que l'anti-CD73 n'ait pas été efficace avec le modèle TRAMP-C1 dans cette étude contrairement à une autre étude de notre groupe.¹⁴⁶ Il est donc possible que l'absence de résultats s'explique par un problème méthodologique dans la présente étude.

Malgré des résultats négatifs avec l'anti-CD73, les résultats dans les souris CD73KO démontrent le potentiel d'une combinaison avec GVAX. Si d'autres études futures avec cette combinaison étaient à réaliser, une posologie différente ou un autre modèle d'étude devraient être utilisés. Si on considère l'hypothèse que le CD73 de la tumeur a un rôle antitumoral dans le cancer de la prostate, il faudrait un traitement qui affecte seulement le CD73 de l'hôte et pas le CD73 de la tumeur. Une méthode qui arriverait en partie à ce résultat serait le transfert adoptif de lymphocytes dans lesquelles CD73 a été amoindri (knock-down). Il serait intéressant de stimuler ces lymphocytes avec les antigènes provenant des cellules tumorales irradiées et de déterminer leur potentiel à détruire les tumeurs. D'autre part, il existe plusieurs autres immunothérapies qui pourraient être utilisées pour le cancer de la prostate. Il reste donc plusieurs autres combinaisons possibles à étudier dans les modèles animaux. Les cancers agressifs comme le CRPC sont difficiles à traiter, car plusieurs mécanismes sont impliqués

dans leurs progression. C'est pourquoi les études futures devraient se concentrer sur des combinaisons de traitements de différents types. Par exemple, les combinaisons d'immunothérapies avec des traitements conventionnels pourraient être prometteuses.

En conclusion, ce projet a permis de déterminer que la mesure de l'expression de CD73 dans des échantillons de tumeurs de la prostate permet de prédire le pronostic des patients. Si les études futures le confirme, l'utilisation de ce marqueur en plus des outils déjà existants pourrait permettre d'établir un pronostic plus précis et fiable pour les patients atteints du cancer de la prostate. De plus, cette étude a permis de déterminer que l'absence de CD73 des tissus de l'hôte est bénéfique pour la vaccination contre le cancer de la prostate. Par contre, nous avons déterminé que la combinaison avec une thérapie contre CD73 n'est pas nécessairement bénéfique. Donc, CD73 pourrait être un outil pronostique intéressant en clinique pour le cancer de la prostate, mais son utilité en thérapeutique reste à être prouvée.

Chapitre 5

5) Bibliographie

1. Comité consultatif de la Société canadienne du cancer. (2014) Statistiques canadiennes sur le cancer 2014. Toronto (Ontario) : Société canadienne du cancer, 2014.
2. Costello LC, Franklin RB. (2009) Prostatic fluid electrolyte composition for the screening of prostate cancer: a potential solution to a major problem. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 12:17-24.
3. Thomson AA, Marker PC. (2006) Branching morphogenesis in the prostate gland and seminal vesicles. *Differentiation.* 74:382-92.
4. Gann PH. (2002) Risk factor for prostate cancer. *Rev Urol.* 4(Suppl 5): S3–S10.
5. Bechis SK, Carroll PR, Cooperberg MR. (2011) Impact of age at diagnosis on prostate cancer treatment and survival. *J Clin Oncol.* 29(2):235-41
6. American Cancer Society. (2011) *Cancer Facts & Figures for African Americans 2011-2012.* Atlanta: American Cancer Society.
7. Haiman CA, Chen GK, Blot WJ, Strom SS, Berndt SI, Kittles RA, Rybicki BA, Henderson BE. (2011) Characterizing genetic risk at known prostate cancer susceptibility loci in African Americans. *PLoS Genet.* (5): e1001387. doi: 10.1371/journal.pgen.1001387.
8. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA and Skolnick MH. (1994) Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J. Natl Cancer Inst.* 86, 1600–1608.
9. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M... Hemminki K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.* 343, 78–85.
10. Eeles R, Goh C, Castro E, Bancroft E, Guy M, Al Olama AA, Easton D, Kote-Jarai Z. (2014) The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol.* (1):18-31.

11. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, Bray F. (2012) International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol.* 61(6):1079-92.
12. Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. (2000) International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer.* 85(1):60-7.
13. Chan JM, Gann PH, Giovannucci EL. (2005) Role of diet in prostate cancer development and progression. *J Clin Oncol.* 23(32):8152-60.
14. Hyde Z, Flicker L, McCaul KA, Almeida OP, Hankey GJ, Chubb SA, Yeap BB. (2012) Associations between testosterone levels and incident prostate, lung, and colorectal cancer. A population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (8):1319-29
15. Endogenous Hormones and Prostate Cancer Collaborative Group, Roddam AW, Allen NE, Appleby P, Key TJ. (2008) Endogenous sex hormones and prostate cancer: a collaborative analysis of 18 prospective studies. *J Natl Cancer Inst.* 100(3):170-83.
16. Andriole GL, Bostwick D, Brawley OW, Gomella L, Marberger M, Montorsi F, Pettaway C... Rittmaster RS; REDUCE Study Group. (2011) The effect of dutasteride on the usefulness of prostate specific antigen for the diagnosis of high grade and clinically relevant prostate cancer in men with a previous negative biopsy: results from the REDUCE study. *J Urol.* 185(1):126-31.
17. Thiruchelvam N. (2014) Benign prostatic hyperplasia. *Surgery (Oxford).* 32(6)314-322
18. Schenk JM, Kristal AR, Arnold KB, Tangen CM, Neuhauser ML, Lin DW, White E and Thompson IM. (2011) Association of Symptomatic Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer: Results from the Prostate Cancer Prevention Trial *Am. J. Epidemiol.* 173(12):1419-28
19. Brosman, S.A. (Déc 2014) Precancerous Lesions of the Prostate. Repéré à: <http://emedicine.medscape.com/article/447780-overview#showall>
20. Bostwick DG, Pacelli A, Lopez-Beltran A. (1996) Molecular Biology of Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *The Prostate.* 29:117-134
21. Olar A et Wheeler TM. (2013) Atypical Small Acinar Proliferation. Dans Jones JS. *Prostate Cancer Diagnosis. Current Clinical Urology*, p 255-268. Humana Press

22. Cheong HF, Tan PH, Iczkowsk KA. (Déc 2013) Pathology of Atypical Small Acinar Proliferation. Repéré à <http://emedicine.medscape.com/article/1611859-overview#showall>
23. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. (1999) Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 155:1985-92.
24. Billis A. (2010) Prostatic Atrophy. Clinicopathological Significance. *International Braz J Urol.* 36 (4): 401-409.
25. Société canadienne du cancer. (2015) Tumeur malignes de la prostate. Repéré à: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/prostate/prostate-cancer/malignant-tumours/?region=qc>
26. Etzioni R, Cha R, Feuer EJ, Davidov O. (1998) Asymptomatic incidence and duration of prostate cancer. *Am J Epidemiol.* 148(8):775-85.
27. Popiolek M, Rider JR, Andrén O, Andersson SO, Holmberg L, Adami HO, Johansson JE. (2013) Natural history of early, localized prostate cancer: a final report from three decades of follow-up. *Eur Urol.* 63(3):428-35.
28. Kazer MW et Harmon AS. (2011) Prostate cancer. Dans Yarbro CH, Wujcki D et Holmes Gobel B. *Cancer Nursing: Principles and Practice.* (7th Édition, vol 64, pp 1609-1633). Sudbury, MA: Jones and Bartlett.
29. Société canadienne du cancer. (2015) Trouver le cancer de la prostate à ses débuts. Repéré à: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/prostate/finding-cancer-early/?region=qc>
30. National Cancer Institute. (2012) Prostate-Specific Antigen (PSA) Test. Repéré à: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/PSA#r1>
31. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM... Coltman CA Jr. (2004) Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *New England Journal of Medicine* 350(22):2239-2246.
32. Carter HB, Albertsen PC, Barry MJ, Etzioni R, Freedland SJ, Greene KL, Holmberg L... Zietman AL. (2013) Early detection of prostate cancer: AUA Guideline. *J Urol.* 190(2):419-26.

33. Damber JE et Aus G. (2008) Prostate cancer. *Lancet*. 371(9625):1710-21
34. American cancer society. (2015) Prostate cancer: Detailed guide. Atlanta, Ga: American Cancer Society.
35. Thompson I, Thrasher JB, Aus G, Burnett AL, Canby-Hagino ED, Cookson MS, D'Amico AV... Tangen CM. (2007) Prostate Cancer: Guideline for the Management of Clinically Localized Prostate Cancer: 2007 Update. American Urological Association Education and Research, Inc.
36. Cancer de la prostate Canada. (2015) Stadification. Repéré à: http://prostatecancer.ca/Prostate-Cancer/Testing-and-Diagnosis/Staging#.VNpi3PmG_3U
37. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. *AJCC (2002) Cancer Staging Manual*. (6th ed.) New York, NY: Springer.
38. Heidenreich A, Ausb G, Bollac M, Joniaud S, Matveeve VB, Schmidf HP, Zattonig F. (2008) EAU Guidelines on Prostate Cancer. *European Urology*. 53(1):p68–80
39. Eifler JB, Feng Z, Lin BM, Partin MT, Humphreys EB, Han M, Epstein JI... Partin AW. (2013) An updated prostate cancer staging nomogram (Partin tables) based on cases from 2006 to 2011. *BJU Int*. 111(1):22-9.
40. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. (2014) Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 64(1):9-29.
41. D'Amico AV, Renshaw AA, Sussman B, Chen MH. (2005) Pretreatment PSA velocity and risk of death from prostate cancer following external beam radiation therapy. *JAMA*. 294(4):440-7.
42. Albertsen PC, Hanley JA, Fine J. (2005) 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 293(17):2095-101.
43. Ganz PA, Barry JM, Burke W, Col NF, Corso PS, Dodson E, Hammond ME... Wessells H. (2012) National Institutes of Health State-of-the-Science Conference: role of active surveillance in the management of men with localized prostate cancer. *Ann Intern Med*. 156(8):591-5
44. Dall'era MA, Albertsen PC, Bangma C, Carroll PR, Carter HB, Cooperberg MR, Freedland SJ... Soloway MS. (2012) Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of the literature. *Eur Urol*. 62(6):976-83

45. Tewari A, Sooriakumaran P, Bloch DA, Seshadri-Kreaden U, Hebert AE, Wiklund P. (2012) Positive surgical margin and perioperative complication rates of primary surgical treatments for prostate cancer: a systematic review and meta-analysis comparing retropubic, laparoscopic, and robotic prostatectomy. *Eur Urol.* 62(1):1-15
46. Box GN, Ahlering TE. (2008) Robotic radical prostatectomy: long-term outcomes. *Curr Opin Urol.* 18(2):173-9
47. Penson DF, McLerran D, Feng Z, Li L, Albertsen PC, Gilliland FD, Hamilton A... Stanford JL. (2005) 5-year urinary and sexual outcomes after radical prostatectomy: results from the prostate cancer outcomes study. *J Urol.* 173(5):1701-5.
48. Wilt TJ, Brawer MK, Jones KM, Barry MJ, Aronson WJ, Fox S, Gingrich JR... Prostate Cancer Intervention versus Observation Trial (PIVOT) Study Group. (2012) Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *N Engl J Med.* 367(3):203-13.
49. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, Mason M... European Association of Urology. (2014) EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol.* 65(1):124-37
50. Verellen D, De Ridder M, Linthout N, Tournel K, Soete G, Storme G. (2007) Innovations in image-guided radiotherapy. *Nat Rev Cancer.* 7(12):949-60.
51. Verhey LJ. (1999) Comparison of three-dimensional conformal radiation therapy and intensity-modulated radiation therapy systems. *Seminars in Radiation Oncology.* 9(1):78-98
52. Teh BS, Woo SY, Butler EB. (1999) Intensity modulated radiation therapy (IMRT): a new promising technology in radiation oncology. *Oncologist.* 4(6):433-42.
53. Sheets NC, Goldin GH, Meyer AM, Wu Y, Chang Y, Stürmer T, Holmes JA... Chen RC. (2012) Intensity-modulated radiation therapy, proton therapy, or conformal radiation therapy and morbidity and disease control in localized prostate cancer. *JAMA.* 307(15):1611-20
54. Frank SJ, Pisters LL, Davis J, Lee AK, Bassett R, Kuban DA. (2007) An assessment of quality of life following radical prostatectomy, high dose external beam radiation

- therapy and brachytherapy iodine implantation as monotherapies for localized prostate cancer. *J Urol.* 177(6):2151-6.
55. Kibel AS, Ciezki JP, Klein EA, Reddy CA, Lubahn JD, Haslag-Minoff J, Deasy JO... Stephenson AJ. (2012) Survival among men with clinically localized prostate cancer treated with radical prostatectomy or radiation therapy in the prostate specific antigen era. *J Urol.* 187(4):1259-65.
56. Davis BJ, Horwitz EM, Lee WR, Crook JM, Stock RG, Merrick GS, Butler WM... American Brachytherapy Society. (2012) American Brachytherapy Society consensus guidelines for transrectal ultrasound-guided permanent prostate brachytherapy. *Brachytherapy.* 11(1):6-19
57. Levy D, Avallone A, Jones JS. (2010) Current state of urological cryosurgery: prostate and kidney. *BJU Int.* 105(5):590-600.
58. Wenske S, Quarrier S, Katz AE. (2013) Salvage cryosurgery of the prostate for failure after primary radiotherapy or cryosurgery: long-term clinical, functional, and oncologic outcomes in a large cohort at a tertiary referral centre. *Eur Urol.* 64(1):1-7
59. Culig Z, Hobisch A, Bartsch G, Klocker H. (2000) Androgen receptor – an update of mechanisms of action in prostate cancer. *Urological Research.* 28(4):211-219
60. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, Mason M... European Association of Urology. (2014) EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol.* 65(2):467-79
61. Rigaud J, Tiguert R, Le Normand L, Karam G, Glemain P, Buzelin JM, Bouchot O. (2002) Prognostic value of bone scan in patients with metastatic prostate cancer treated initially with androgen deprivation therapy. *J Urol.* 168(4 Pt 1):1423-6.
62. Montgomery RB, Mostaghel EA, Vessella R, Hess DL, Kalhorn TF, Higano CS, True LD, Nelson PS. (2008) Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res.* 68(11):4447-4454
63. Pagliarulo V, Bracarda S, Eisenberger MA, Mottet N, Schröder FH, Sternberg CN, Studer UE. (2012) Contemporary role of androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Eur Urol.* 61(1):11-25.

64. Conn PM, Crowley WF Jr. (1994) Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med.* 45:391-405.
65. Kirby M, Hirst C, Crawford ED. (2011) Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *Int J Clin Pract.* 65(11):1180-92.
66. Di Lorenzo G, Buonerba C, Autorino R, De Placido S, Sternberg CN. (2010) Castration-resistant prostate cancer: current and emerging treatment strategies. *Drugs.* 70(8):983-1000
67. Lebdaï S, Branchereau J, Robert G, De La Taille A, Bouchaert P. (2013) Corticothérapie dans le cancer de la prostate résistant à la castration. *Progrès en urologie. suppl. 1*, S23-S33
68. Cookson MS, Roth BJ, Dahm P, Engstrom C, Freedland SJ, Hussain M, Lin DW... Kibel AS. (2014) Castration-resistant prostate cancer: AUA Guideline. American Urological Association Education and Research Inc.
69. Sturge J, Caley MP, Waxman J. (2011) Bone metastasis in prostate cancer: emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol.* 8(6):357-68.
70. Cookson MS, Aus G, Burnett AL, Canby-Hagino ED, D'Amico AV, Dmochowski RR, Eton DT... Thompson I. (2007) Variation in the definition of biochemical recurrence in patients treated for localized prostate cancer: the American Urological Association Prostate Guidelines for Localized Prostate Cancer Update Panel report and recommendations for a standard in the reporting of surgical outcomes. *J Urol.* 177(2):540-5.
71. Roach M 3rd, Hanks G, Thames H Jr, Schellhammer P, Shipley WU, Sokol GH, Sandler H. (2006) Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 65(4):965-74.
72. Martin SK, Vaughan TB, Atkinson T, Zhu H, Kyprianou N. (2012) Emerging biomarkers of prostate cancer (Review). *Oncol Rep.* 28(2):409-17
73. Prensner JR, Rubin MA, Wei JT, Chinnaiyan AM. (2012) Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Sci Transl Med.* 4(127):127rv3.

74. Oudard S. (2013) Progress in emerging therapies for advanced prostate cancer. *Cancer Treat Rev.* 39(3):275-89.
75. Tannock IF, Fizazi K, Ivanov S, Karlsson CT, Fléchon A, Skoneczna I, Orlandi F... VENICE investigators. (2013) Aflibercept versus placebo in combination with docetaxel and prednisone for treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancer (VENICE): a phase 3, double-blind randomised trial. *Lancet Oncol.* 14(8):760-8
76. Krieger JN, Nyberg L Jr, Nickel JC. (1999) NIH consensus definition and classification of prostatitis. *JAMA.* 282(3):236-7.
77. Nakai Y, Nonomura N. (2013) Inflammation and prostate carcinogenesis. *Int J Urol.* 20(2):150-60.
78. Sfanos KS, Isaacs WB, De Marzo AM. (2013) Infections and inflammation in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol.* 1(1):3-11.
79. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 7(4):256-69.
80. Gurel B, Lucia MS, Thompson IM Jr, Goodman PJ, Tangen CM, Kristal AR, Parnes HL... Platz EA. (2014) Chronic inflammation in benign prostate tissue is associated with high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 23(5):847-56.
81. Zabaleta J, Su LJ, Lin HY, Sierra RA, Hall MC, Sartor AO, Clark PE, Hu JJ, Ochoa AC. (2009) Cytokine genetic polymorphisms and prostate cancer aggressiveness. *Carcinogenesis.* 30(8):1358-62
82. Shahedi K1, Lindström S, Zheng SL, Wiklund F, Adolfsson J, Sun J, Augustsson-Bälter K, Chang BL... Xu J. (2006) Genetic variation in the COX-2 gene and the association with prostate cancer risk. *Int J Cancer.* 119(3):668-72.
83. Nguyen DP, Li J, Yadav SS, Tewari AK. (2014) Recent insights into NF- κ B signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer. *BJU Int.* 114(2):168-76
84. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 3(11):991-8.

85. Fridman WH, Mlecnik B, Bindea G, Pagès F, Galon J. (2011) Immunosurveillance in human non-viral cancers. *Curr Opin Immunol.* 23(2):272-8.
86. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH. (2010) Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene.* 29(8):1093-102.
87. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A... Pagès F. (2014) Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 232(2):199-209
88. Vesalainen S, Lipponen P, Talja M, Syrjänen K. (1994) Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer.* 30A(12):1797-803.
89. Sorrentino C, Musiani P, Pompa P, Cipollone G, Di Carlo E. (2011) Androgen deprivation boosts prostatic infiltration of cytotoxic and regulatory T lymphocytes and has no effect on disease-free survival in prostate cancer patients. *Clinical Cancer Research.* 17(6):1571-1581.
90. Irani J, Goujon JM, Ragni E, Peyrat L, Hubert J, Saint F, Mottet N, Pathologist Multi Center Study Group. (1999) High-grade inflammation in prostate cancer as a prognostic factor for biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Urology.* 54(3):467-72.
91. McArdle PA, Canna K, McMillan DC, McNicol AM, Campbell R, Underwood MA. (2004) The relationship between T-lymphocyte subset infiltration and survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer.* 91(3):541-3.
92. Kärjä V, Aaltomaa S, Lipponen P, Isotalo T, Talja M, Mokka R. (2005) Tumour-infiltrating lymphocytes: A prognostic factor of PSA-free survival in patients with local prostate carcinoma treated by radical prostatectomy. *Anticancer Research.* 25(6C):4435-4438
93. Ness N, Andersen S, Valkov A, Nordby Y, Donnem T, Al-Saad S, Busund LT, Bremnes RM, Richardsen E. (2014) Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer. *Prostate.* 74(14):1452-61.

94. Flammiger A, Bayer F, Cirugeda-Kühnert A, Huland H, Tennstedt P, Simon R, Minner S... Trepel M. (2012) Intratumor T but not B lymphocytes are related to clinical outcome in prostate cancer. *APMIS*, 120(11), 901-908.
95. Yuan H, Hsiao YH, Zhang Y, Wang J, Yin C, Shen R, Su Y. (2013) Destructive impact of T-lymphocytes, NK and Mast cells on basal cell layers: implications for tumor invasion. *BMC Cancer*. 13:258.
96. Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, Banham AH, Hellström M, Egevad L, Pisa P. (2006) CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *J Immunol*. 177(10):7398-405.
97. Yokokawa J, Cereda V, Remondo C, Gulley JL, Arlen PM, Schlom J, Tsang KY. (2008) Enhanced functionality of CD4+CD25(high)FoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 14(4):1032-40.
98. Davidsson S, Ohlson AL, Andersson SO, Fall K, Meisner A, Fiorentino M, Andrén O, Rider JR. (2013) CD4 helper T cells, CD8 cytotoxic T cells, and FOXP3(+) regulatory T cells with respect to lethal prostate cancer. *Modern Pathology* 26(3):448-455
99. Kuniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, Peng W, Peng G, Wheeler TM, Thompson TC, Old LJ, Wang RF. (2007) CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 13(23):6947-58.
100. Peng G, Wang HY, Peng W, Kuniwa Y, Seo KH, Wang RF. (2007) Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity*. (2): 334-348
101. Miller AM, Pisa P. (2007) Tumor escape mechanisms in prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 56(1):81-7.
102. Elsasser-Beile U, Przytulski B, Gierschner D, Grussenmeyer T, Katzenwadel A, Leiber C, Deckart A, Wetterauer U (2000) Comparison of the activation status of tumor infiltrating and peripheral lymphocytes of patients with adenocarcinomas and benign hyperplasia of the prostate. *Prostate* 45:1-7
103. Bronte V, Kasic T, Gri G, Gallana K, Borsellino G, Marigo I, Battistini L... Viola A. (2005) Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J Exp Med* 201(8):1257-1268

104. Feder-Mengus C, Wyler S, Hudolin T, Ruszat R, Bubendorf L, Chiarugi A, Pittelli M, Weber WP... Provenzano M. (2008) High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase gene in prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2008 Oct;44(15):2266-75.
105. Källberg E, Wikström P, Bergh A, Ivars F, Leanderson T. (2010) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity influence tumor growth in the TRAMP prostate cancer model. *Prostate*. 70(13):1461-70.
106. Khor LY, Bae K, Pollack A, Hammond ME, Grignon DJ, Venkatesan VM, Rosenthal SA, Ritter MA... Dicker AP. (2007) COX-2 expression predicts prostate-cancer outcome: analysis of data from the RTOG 92-02 trial. *Lancet Oncol*. 8(10):912-20
107. Mahmud S, Franco E, Aprikian A. (2004) Prostate cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 90(1):93-9.
108. Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, Li M, Ichim TE, Chin JL, Min WP (2005) Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8(+) T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 35:169–173.
109. Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, Serio AM, Reuter VE, Eastham JA, Scardino PT, Sharma P, Allison JP. (2007) B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(49):19458-63
110. Roth TJ, Sheinin Y, Lohse CM, Kuntz SM, Frigola X, Inman BA, Krambeck AE... Kwon ED. (2007) B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy. *Cancer Res*. 67(16):7893-900.
111. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD... Sznol M. (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 366(26):2443-54
112. Couzin-Frankel J. (2013) Breakthrough of the year 2013. *Cancer immunotherapy*. *Science*. 342(6165):1432-3.
113. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC... Ascierto PA. (2015) Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*. 372(4):320-30.
114. Kwon ED, Drake CG, Scher HI, Fizazi K, Bossi A, van den Eertwegh AJ, Krainer M... CA184-043 Investigators. (2014) 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.* 15(7):700-12.
115. Graff JN, Chamberlain ED. (2014) Sipuleucel-T in the treatment of prostate cancer: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evid.* 10:1-10.
 116. Mandl SJ, Rountree RB, Dela Cruz TB, Foy SP, Cote JJ, Gordon EJ, Trent E, Delcayre A, Franzusoff A. (2014) Elucidating immunologic mechanisms of PROSTVAC cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2(1):34.
 117. Simons JW, Sacks N. (2006) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor–transduced allogeneic cancer cellular immunotherapy: The GVAX® vaccine for prostate cancer. *Urol Oncol.* 24(5):419-24.
 118. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V... Mulligan RC. (1993) Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(8):3539-43.
 119. Sanda MG, Ayyagari SR, Jaffee EM, Epstein JI, Clift SL, Cohen LK, Dranoff G... Simons JW. (1994) Demonstration of a rational strategy for human prostate cancer gene therapy. *J Urol.* 151(3):622-8.
 120. Nguyen MC, Tu GH, Koprivnikar KE, Gonzalez-Edick M, Jooss KU, Harding TC. (2010) Antibody responses to galectin-8, TARP and TRAP1 in prostate cancer patients treated with a GM-CSF-secreting cellular immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 59(9):1313-23.
 121. Geary SM, Lemke CD, Lubaroff DM, Salem AK. (2013) Proposed mechanisms of action for prostate cancer vaccines. *Nat Rev Urol.* 10(3):149-60.
 122. Higano CS, Corman JM, Smith DC, Centeno AS, Steidle CP, Gittleman M, Simons JW... Small EJ. (2008) Phase 1/2 dose-escalation study of a GM-CSF-secreting, allogeneic, cellular immunotherapy for metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer.* 113(5):975-84.
 123. Drake CG. (2009) Immunotherapy for prostate cancer: walk, don't run. *J Clin Oncol.* 27(25):4035-7.

124. van den Eertwegh AJ, Versluis J, van den Berg HP, Santegoets SJ, van Moorselaar RJ, van der Sluis TM, Gall HE... Gerritsen WR. (2012) Combined immunotherapy with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced allogeneic prostate cancer cells and ipilimumab in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* 13(5):509-17.
125. Wada S, Yoshimura K, Hipkiss EL, Harris TJ, Yen HR, Goldberg MV, Grosso JF, Getnet D... Drake CG. (2009) Cyclophosphamide augments antitumor immunity: studies in an autochthonous prostate cancer model. *Cancer Res.* 69(10):4309-18.
126. Stagg J. and Smyth MJ. (2010) Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*, 29, 5346–5358.
127. Berne RM. (1986) Adenosine: An Important Physiological Regulator. *Physiology.* 1(5):163-167
128. Ohta A, Sitkovsky M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414: 916–920.
129. Fishman P, Bar-Yehuda S, Synowitz M, Powell JD, Klotz KN, Gessi S, Borea PA. (2009) Adenosine Receptors and Cancer. Dans Wilson CN, Mustafa SJ. *Adenosine Receptors in Health and Disease: Handbook of Experimental Pharmacology* (1ère édition, vol 193, pp 399-441). Berlin, Allemagne: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
130. Blay J, White TD, Hoskin DW. (1997) The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res.* 57(13):2602-5.
131. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, Huang X... Sitkovsky M. (2006) A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(35):13132-7
132. Raskovalova T, Lokshin A, Huang X, Su Y, Mandic M, Zarour HM, Jackson EK, Gorelik E. (2007) Inhibition of cytokine production and cytotoxic activity of human antimelanoma specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by adenosine-protein kinase A type I signaling. *Cancer Res.* 67(12):5949-56.

133. Waickman AT, Alme A, Senaldi L, Zarek PE, Horton M, Powell JD. (2012) Enhancement of tumor immunotherapy by deletion of the A2A adenosine receptor. *Cancer Immunol Immunother.* 61(6):917-26.
134. Gessi S, Merighi S, Sacchetto V, Simioni C, Borea PA. (2011) Adenosine receptors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1808(5):1400-12.
135. Fishman P, Bar-Yehuda S, Ardon E, Rath-Wolfson L, Barrer F, Ochaion A, Madi L. (2003) Targeting the A3 adenosine receptor for cancer therapy: inhibition of prostate carcinoma cell growth by A3AR agonist. *Anticancer Res.* 23(3A):2077-83.
136. Jajoo S, Mukherjea D, Watabe K, Ramkumar V. (2009) Adenosine A(3) receptor suppresses prostate cancer metastasis by inhibiting NADPH oxidase activity. *Neoplasia.* 11(11):1132-45.
137. Aghaei M, Karami-Tehrani F, Panjehpour M, Salami S, Fallahian F. (2012) Adenosine induces cell-cycle arrest and apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines, LNCap-FGC-10, DU-145, and PC3. *Prostate.* 72(4):361-75.
138. Wei Q, Costanzi S, Balasubramanian R, Gao ZG, Jacobson KA. (2013) A2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells. *Purinergic Signal.* 9(2):271-80.
139. Virtanen SS, Kukkonen-Macchi A, Vainio M, Elima K, Härkönen PL, Jalkanen S, Yegutkin GG. (2014) Adenosine inhibits tumor cell invasion via receptor-independent mechanisms. *Mol Cancer Res.* 12(12):1863-74.
140. Allard B, Turcotte M, and Stagg J. (2012) CD73-Generated Adenosine: Orchestrating the Tumor-Stroma Interplay to Promote Cancer Growth. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012:485156. doi: 10.1155/2012/485156.
141. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal.* 2(2):351-60.
142. Gao ZW, Dong K, Zhang HZ. (2014) The roles of CD73 in cancer. *Biomed Res Int.* 2014:460654. doi: 10.1155/2014/460654.
143. Terp MG, Olesen KA, Arnspang EC, Lund RR, Lagerholm BC, Ditzel HJ, Leth-Larsen R. (2013) Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells. *J Immunol.* 191(8):4165-73

144. Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, Dwyer KM, Smyth MJ. (2010) Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(4):1547-52.
145. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MW, Darcy PK, Smyth MJ. (2011) CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res.* 71(8):2892-900.
146. Stagg J, Beavis PA, Divisekera U, Liu MC, Möller A, Darcy PK, Smyth MJ. (2012) CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. *Cancer Res.* 72(9):2190-6.
147. Allard B, Turcotte M, Spring K, Pommey S, Royal I, Stagg J. (2014) Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 134(6):1466-73.
148. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, Stagg J. (2013) CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(27):11091-6.
149. Jin D, Fan J, Wang L, Thompson LF, Liu A, Daniel BJ, Shin T, Curiel TJ, Zhang B. (2010) CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res.* 70(6):2245-55.
150. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. (2012) CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol.* 33(5):231-7.
151. Wang L, Fan J, Thompson LF, Zhang Y, Shin T, Curiel TJ, Zhang B. (2011) CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. *J Clin Invest.* 121(6):2371-82.
152. Yegutkin GG, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, Niemelä J, Laurila JP, Elima K, Jalkanen S, Salmi M. (2011) Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur J Immunol.* 41(5):1231-41.
153. Forte G, Sorrentino R, Montinaro A, Luciano A, Adcock IM, Maiolino P, Arra C... Morello S. (2012) Inhibition of CD73 improves B cell-mediated anti-tumor immunity in a mouse model of melanoma. *J Immunol.* 189(5):2226-33.
154. Häusler SF, Del Barrio IM, Diessner J, Stein RG, Strohschein J, Hönig A, Dietl J, Wischhusen J. (2014) Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion. *Am J Transl Res.* 6(2):129-39.

155. Iannone R, Miele L, Maiolino P, Pinto A, Morello S. (2014) Adenosine limits the therapeutic effectiveness of anti-CTLA4 mAb in a mouse melanoma model. *Am J Cancer Res.* 4(2):172-81.
156. Allard B, Pommey S, Smyth MJ, Stagg J. (2013) Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res.* 19(20):5626-35
157. Häusler SF, Montalbán del Barrio I, Strohschein J, Anoop Chandran P, Engel JB, Hönig A, Ossadnik M... Wischhusen J. (2011) Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother.* 60(10):1405-18.
158. Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD, Tabi Z. (2011) Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol.* 187(2):676-83.
159. Xu S, Shao QQ, Sun JT, Yang N, Xie Q, Wang DH, Huang QB... Qu X. (2013) Synergy between the ectoenzymes CD39 and CD73 contributes to adenosinergic immunosuppression in human malignant gliomas. *Neuro Oncol.* 15(9):1160-72.
160. Wu XR, He XS, Chen YF, Yuan RX, Zeng Y, Lian L, Zou YF, Lan N, Wu XJ, Lan P. (2012) High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology.* 106(2):130-137.
161. Lu XX, Chen YT, Feng B, Mao XB, Yu B, Chu XY. (2013) Expression and clinical significance of CD73 and hypoxia-inducible factor-1 α in gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology.* 19(12):1912-1918.
162. Xiong L, Wen Y, Miao X, Yang Z. (2014) NT5E and FcGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cancer. *Cell Tissue Res.* 355(2):365-74.
163. Zhao SX, Zhang HM, Dong SX, Liu JH, Zhou Z, Wang HJ, Zhu XF, Mi YC, Ru YX. (2011) «Characteristics and clinical significance of CD73 expression in subtypes of leukemia». *Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology.* 19(5):1141-4.

164. Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, D'Arena G... Deaglio S. (2011) CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood*. 118(23):6141-52.
165. Wieten E, van der Linden-Schrever BE, Sonneveld E, Veerman AJ, Pieters R. (2011) CD73 (5'-nucleotidase) expression has no prognostic value in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 25(8):1374-6.
166. Wang H, Lee S, Nigro CL, Lattanzio L, Merlano M, Monteverde M, Matin R... Crook T. (2012) NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma and associated with metastatic site specificity. *Br J Cancer*. 106(8):1446-52.
167. Oh HK, Sin JI, Choi J, Park SH, Lee TS, Choi YS. (2012) Overexpression of CD73 in epithelial ovarian carcinoma is associated with better prognosis, lower stage, better differentiation and lower regulatory T cell infiltration. *Journal of Gynecologic Oncology*. 23(4):274-281.
168. Supernat A, Markiewicz A, Welnicka-Jaskiewicz M, Seroczynska B, Skokowski J, Sejda A, Szade J... Zaczek A. (2012) CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*. 20(2):103-107.
169. Leth-Larsen R, Lund R, Hansen HV, Laenkholm AV, Tarin D, Jensen ON, Ditzel HJ. (2009) Metastasis-related plasma membrane proteins of human breast cancer cells identified by comparative quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 8(6):1436-49.
170. Rackley RR, Lewis TJ, Preston EM, Delmoro CM, Bradley EL Jr, Resnick MI, Pretlow TP, Pretlow TG. (1989) 5'-Nucleotidase Activity in Prostatic Carcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia. *Cancer Research*. 49(13):3702-3707.
171. Yang Q, Du J, Zu L. (2013) Overexpression of CD73 in prostate cancer is associated with lymph node metastasis. *Pathology and Oncology Research*. 19(4):811-814.
172. Epstein JI, Feng Z, Trock BJ, Pierorazio PM. (2012) Upgrading and downgrading of prostate cancer from biopsy to radical prostatectomy: incidence and predictive factors using the modified Gleason grading system and factoring in tertiary grades. *Eur Urol*. 61(5):1019-24.

173. Cooke EW, Shrieve DC, Tward JD. (2012) Clinical versus pathologic staging for prostate adenocarcinoma: how do they correlate? *Am J Clin Oncol.* 35(4):364-8.
174. Foster BA, Gingrich JR, Kwon ED, Madias C, Greenberg NM. (1997) Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. *Cancer Res.* 57(16):3325-30.
175. Hurwitz AA, Foster BA, Kwon ED, Truong T, Choi EM, Greenberg NM, Burg MB, Allison JP. (2000) Combination immunotherapy of primary prostate cancer in a transgenic mouse model using CTLA-4 blockade. *Cancer Res.* 60(9):2444-8.
176. Sartori DA, Chan DW. (2014) Biomarkers in prostate cancer: what's new? *Curr Opin Oncol.* 26(3):259-64.
177. Chiam K, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T. (2014) Epigenetic biomarkers in prostate cancer: Current and future uses. *Cancer Lett.* 342(2):248-56.
178. Huber F, Montani M, Sulser T, Jaggi R, Wild P, Moch H, Gevensleben H... Kristiansen G. (2015) Comprehensive validation of published immunohistochemical prognostic biomarkers of prostate cancer -what has gone wrong? A blueprint for the way forward in biomarker studies. *Br J Cancer.* 112(1):140-8.