



HAL
open science

Biomarqueurs des immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 : facteurs cliniques, histologiques et immunohistochimiques associés au statut PD-L1

Audrey Bellesoeur

► **To cite this version:**

Audrey Bellesoeur. Biomarqueurs des immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 : facteurs cliniques, histologiques et immunohistochimiques associés au statut PD-L1. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01508648

HAL Id: dumas-01508648

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01508648>

Submitted on 14 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2016

N° 82

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN MÉDECINE

Spécialité : Oncologie médicale

Biomarqueurs des immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 :
facteurs cliniques, histologiques et immunohistochimiques
associés au statut PD-L1

Présentée et soutenue publiquement
le 20 juin 2016

Par

Audrey BELLESOEUR

Née le 8 mars 1985 à Ploemeur (56)

Dirigée par M. Le Professeur Jean-Charles Soria, PU-PH

Jury :

M. Le Professeur François Goldwasser, PU-PH Président

M. Le Professeur Éric Tartour, PU-PH

M. Le Professeur Jean-Yves Scoazec, PU-PH

M. Le Docteur Christophe Massard, Oncologue



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Remerciements

À Monsieur le Professeur François Goldwasser,

Merci d'avoir accepté de présider cette thèse. Merci pour cette philosophie de l'oncologie que vous transmettez au sein de votre service : c'est ce qui a conforté mon choix en début d'internat, et encore aujourd'hui. Merci de la confiance que vous m'accordez en m'accueillant au sein de votre équipe pour mon clinicat.

À Monsieur le Professeur Jean-Charles Soria,

Merci d'avoir accepté la direction de cette thèse, et du temps que vous avez consacré à m'encadrer. Merci de votre exigence et de votre investissement pour nous pousser à être toujours de meilleurs oncologues.

À Monsieur le Professeur Eric Tartour,

Merci d'avoir accepté de juger mon travail en participant à mon jury de soutenance de thèse. Merci de votre investissement pour nous faire partager votre expertise dans le domaine de l'immunologie.

À Monsieur le Professeur Jean-Yves Scoazec,

Merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de participer à mon jury de soutenance de thèse pour y apporter votre expertise dans le domaine de l'anatomopathologie.

À Monsieur le Docteur Christophe Massard,

Merci pour ton aide et ton enthousiasme, en oncologie et dans la réalisation de ce travail. Merci pour ta disponibilité, ta réassurance et ta bonne humeur.

Aux médecins, rencontrés au cours du parcours, qui m'ont à la fois confortée dans mon choix et inspirée pour me construire comme médecin, mais aussi comme personne : les Professeurs Véronique Trillet-Lenoir, Fabrice André, et Pierre Kerbrat, et les Docteurs Olivier Mir, François Blot, François Lokiec, Ludivine Chalumeau, Stephan Lopez, Pascaline Boudou-Rouquette et Anatole Cessot.

Aux « pharmacologues » de Cochin, pour avoir pris le temps de m'initier à cette réflexion mais surtout pour votre accueil et votre bienveillance, et pour ce que nous avons pu partagé en terme de travail et bien au-delà ; votre façon de travailler continuera de m'inspirer longtemps: le Professeur Michel Vidal, et les Docteurs Audrey Thomas, Benoit Blanchet et Gaëlle Noé.

Aux « plus vieux » de l'AERIO, pour m'avoir challengée, m'avoir conseillée, m'avoir poussée parfois, mais surtout pour m'avoir appris que l'oncologie est encore meilleure avec enthousiasme, bonne humeur et convivialité: Manuel « par qui tout a commencé », François-Clément Bidard, Johanna « pour ta grande responsabilité dans cette aventure » mais surtout pour ton entrain phénoménal, Benjamin Christophe et Yohann pour votre enthousiasme

inépuisable, Benoit et Camille pour votre motivation et votre soutien, Constance pour ta réassurance et ton calme.

À l'AERIO, merci d'avoir fait de ces années « une super expérience », par votre écoute, votre présence chaleureuse, les fou-rires et les soirées parfois étonnantes qu'on a pu passer, sans oublier les galères qu'on a aussi partagées : Johanna, Benoit, Camille, Constance, Jennifer, Olivier, Hélène, Aurélien, Léo, Clément, Edouard, Pernelle, Cécile, Emeline, Edith, Marie, Roger, Aurore.

À mes co-internes, qui sont souvent devenus depuis des amis, pour votre patience et votre bonne humeur à toute épreuve: Anne-Marie Ronchetti et Diane Lara, Edith Carton (2 fois, quand on aime on ne compte pas), Safae Terrisse, Lucillia Bezu, Elie Kassouf, Antoine Dautruche et Kim Cao, Aurélien Gobert, Marine Slim et Marco Gizzi, Constance Thibault, Solenn Brosseau, Charles Canova, Lina Benajiba, Marie Viala, Louis Bazire.

A mes amis, médecins ou non, présents aux différentes étapes du parcours : l'Oncoteam bien sûr (Camille, Delphine, Benoit, Constance, Johanna, Aurélien et aussi Julien et Medhi, « presque oncologues »), Camille grâce à qui je sais désormais que « tout va bien se passer », Edith pour tout ce qu'on a partagé bien au-delà de l'internat, Hélène pour ta présence précieuse tout au long de l'internat, Léo pour ta détermination et toutes les fois où tu as su me remotiver, Cécile pour les « supers expériences », Aurélien parce qu'on en a traversé des choses mais qu'on s'est toujours bien marré, Anatole et Benoit parce qu'il n'y a pas que la médecine dans la vie, la dream-team-vacances (Pernelle, Constance et Laetitia), Chloé pour m'avoir supportée 5 ans quand même en colocation et parfois même pendant les vacances, Grégoire, Georges, Diane.

À mes amis de toujours, pour avoir supporté mes stress, mes absences, mes obsessions médicales, mais surtout pour votre présence, votre soutien et tout ce que nous avons partagé au fil de ces nombreuses années : Claire tout particulièrement, pour ta présence aussi loin que mes souvenirs remontent, Anne et Gaëlle, Alexis et Romuald, Tsipora, Soizic et Estelle.

À ma famille, Daniel et Christiane, Carole et Olivier, pour votre présence, votre réassurance, et les moments partagés grâce à vous, notamment à Quiberon,

A Erwann, mon petit-frère, pour sa « fantaisie », et sa présence précieuse,

A mes parents, pour votre soutien sans limite, ce que vous m'avez transmis en me guidant tout en me laissant libre, et tout ce que nous avons partagé au fil des joies et des étapes plus difficiles,

A Etienne, pour ta patience, ta joie de vivre, ta volonté de faire de la vie une fête...pour la révolution que tu crées chaque jour dans ma vie... Vivement la suite !

Sommaire

Liste des abréviations :	6
I. Introduction	8
A. Essor d'une nouvelle génération d'immunothérapie en oncologie	8
1. Le concept d'immunothérapie en oncologie.....	8
2. Mécanisme d'action des anti-PD-1.....	11
3. Activité des anti-PD-1 et des anti-PD-L1	14
a. Les anti-PD-1	15
b. Les anti-PD-L1	17
4. Enjeux des inhibiteurs de checkpoints immunitaires.....	19
B. A la recherche d'un prédicteur moléculaire d'efficacité : intérêt de PD-L1	23
1. Méthode de détermination du statut PD-L1.....	23
2. Valeur prédictive du statut PD-L1	25
3. Les enjeux du statut PD-L1	29
II. Problématique	30
III. Méthodologie	31
Population.....	31
Essais de phase I d'immunothérapie	31
Echantillons de tissus tumoraux	32
Méthodes de détermination du statut PD-L1.....	32
Recueil des données	33
Revue de la littérature	33
Analyse statistique.....	33
IV. Résultats	35
Caractéristiques des patients	35
Prévalence du statut PD-L1 +.....	39
Prévalence du statut PD-L1 + en fonction du cancer primitif.....	39
Comparaison de la prévalence du statut PD-L1+ dans la population GR par rapport aux résultats des essais internationaux.....	40
Concordance du statut PD-L1 en cas de déterminations multiples.....	41
Caractéristiques des populations PD-L1 + et PD-L1 –	42
Facteurs associés à la positivité du statut PD-L1	45

V. Discussion.....	47
A. Facteurs associés au statut PD-L1	47
B. Autres prédicteurs envisagés	57
C. Limites des biomarqueurs prédictifs.....	59
VI. Conclusion.....	62
VII. Bibliographie :.....	63

Liste des abréviations :

ADCC Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity
ADK Adénocarcinome
ASCO American Society of Clinical Oncology
BCG Bacille de Calmette et Guérin
CAR Chimeric Antigen Receptor : Récepteur Antigénique Chimérique
CBNPC Cancer bronchique non à petites cellules
CCI Carcinome canalaire infiltrant
CE Carcinome épidermoïde
CHC Carcinome hépatocellulaire
CI Cellules immunitaires
CMH Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CT Cellules tumorales
CTLA4 Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated antigen 4
CU Carcinome urothélial
DC Cellules Dendritiques
EMA European Medicines Agency : Agence européenne du médicament
FDA Food And Drug Administration : Agence américaine du médicament
GR Gustave Roussy
HR Hazard Ratio
IC Intervalle de confiance
IFN Interféron
Ig Immunoglobuline
IHC Immunohistochimie
IL2 Interleukine 2
IV Intra-veineuse
LR Locorégionale
LT Lymphocyte T
NA Non atteint
ND Non disponible
NK Natural Killer
NPC Non à petites cellules
OR Odds ratio

PC Petites cellules

PD-1 Programmed Death 1

PD-L1 Programmed Death Ligand 1

SG Survie globale

SSP Survie sans progression

TCR T Cell Receptor : récepteur des lymphocytes T

TIL Lymphocytes infiltrant la tumeur

TNE Tumeur neuro-endocrine

I. Introduction

A. Essor d'une nouvelle génération d'immunothérapie en oncologie

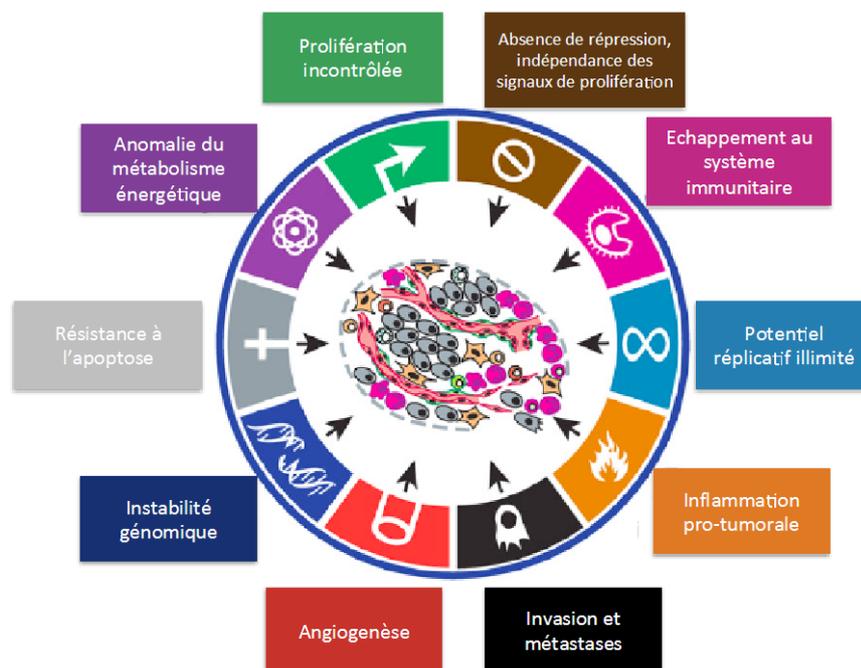
1. Le concept d'immunothérapie en oncologie

Le concept de l'immunothérapie, d'utiliser et renforcer l'activité anti-tumorale propre du système immunitaire, n'est pas nouveau. En effet, dès le début du XXe siècle, des rémissions spontanées de cancer en lien avec la survenue d'infections avaient été décrites. Ainsi, le chirurgien William Coley a décrit des rémissions de sarcomes lors d'érysipèles et a ensuite utilisé des dérivés bactériens de streptocoque (toxines de Coley) pour traiter certains patients atteints de sarcome (1). L'hypothèse était d'utiliser des composés capables d'induire une réponse inflammatoire (des agents infectieux par exemple) qui exercerait elle-même secondairement un effet anti-tumoral. La BCG-thérapie étudiée par Georges Mathé dans les années 70, selon différentes voies d'administration et pour diverses pathologies (hémopathies principalement mais aussi certaines tumeurs solides) (2), repose sur ce principe et reste encore utilisée aujourd'hui en adjuvant pour les tumeurs non-infiltrantes de vessie (3).

Progressivement, avec la meilleure compréhension des interactions cellulaires impliquées au niveau du système immunitaire et capables de moduler la réponse immunitaire, le concept d'immunosurveillance s'est imposé : il existe une immunité anti-tumorale grâce à laquelle le système immunitaire peut limiter le développement tumoral (4). L'échappement des cellules tumorales au système immunitaire est ensuite apparu comme un des mécanismes fondamentaux de la cancérogenèse (5) (Figure 1). Favoriser l'activité anti-tumorale du système immunitaire est ainsi devenu un nouvel axe de développement thérapeutique.

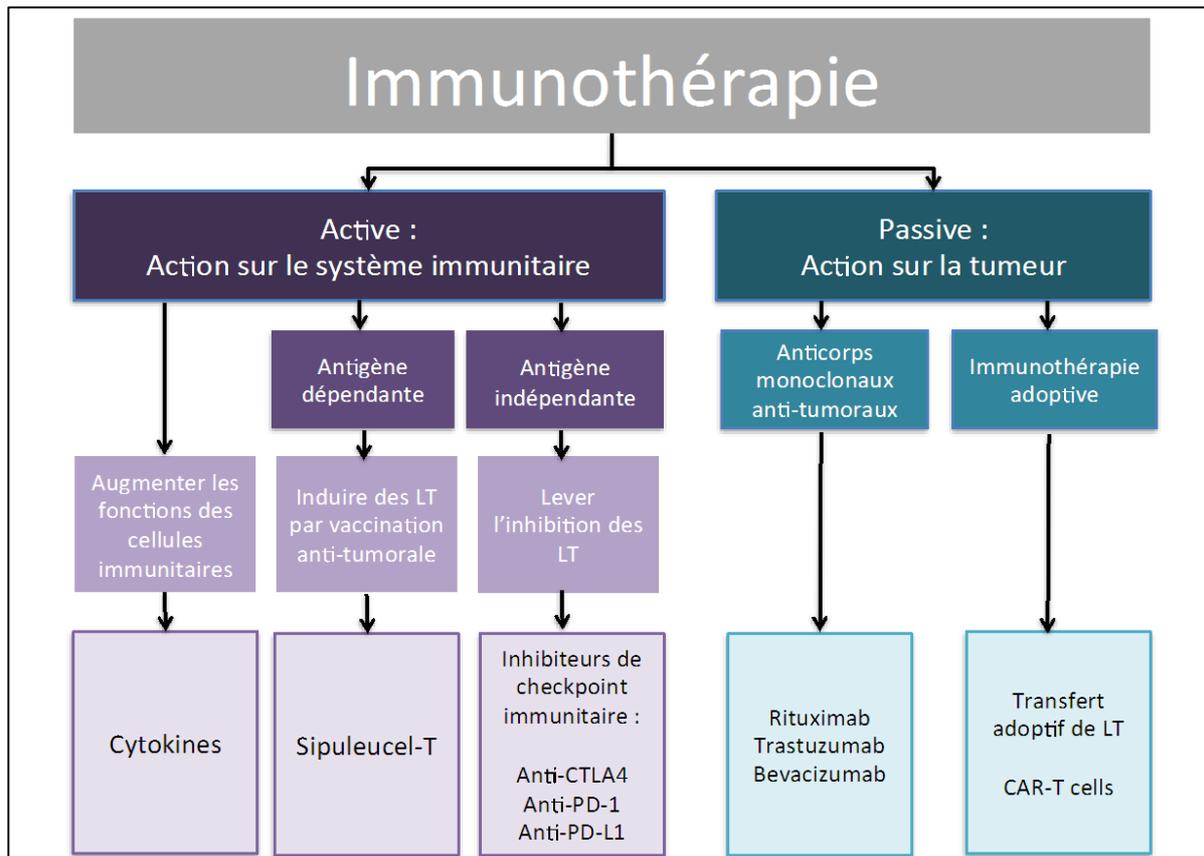
Les immunothérapies de première génération ont reposé sur l'utilisation de cytokines telles que l'interféron (IFN) et l'interleukine 2 (IL2). In vitro, ces cytokines permettaient d'activer les lymphocytes, les rendant alors capables de lyser les cellules tumorales. L'IFN α 2 a été la première immunothérapie approuvée par l'agence américaine du médicament (FDA) en 1995, pour la prise en charge du mélanome opéré (6). L'interleukine 2 a été approuvée ensuite pour le traitement du mélanome et du cancer du rein métastatiques (7).

Figure 1 : Mécanismes fondamentaux de la cancérogenèse : d'après Hanahan et al (5)



Les résultats de ces premiers traitements sont restés très modestes, mais l'immunothérapie est devenue progressivement une voie de recherche majeure en oncologie. Différentes stratégies anti-tumorales se sont développées successivement, avec d'une part des approches d'immunothérapie dite passive, consistant à apporter de nouveaux effecteurs immunologiques dirigés contre la tumeur ; et des techniques d'immunothérapie active, qui visent à stimuler directement le système immunitaire existant (Figure 2). Parmi les immunothérapies passives, l'utilisation d'anticorps monoclonaux thérapeutiques dirigés contre la cellule tumorale est aujourd'hui très répandue. D'autres méthodes passives, dites d'immunothérapie adoptive, consistent à apporter directement des cellules immunitaires, parfois modifiées *in vitro* : le transfert adoptif de lymphocytes par exemple, ou de CARs (Chimeric Antigen Receptor : lymphocytes T avec récepteur antigénique chimérique). Concernant l'immunothérapie active, au-delà des cytokines, on peut citer notamment la vaccination anti-tumorale, qui utilise des antigènes tumoraux chargés sur des cellules présentatrices d'antigènes ou des exosomes, pour induire une réponse lymphocytaire spécifique de la tumeur ; ou encore les molécules ciblant les points de contrôle du système immunitaire (ou immune checkpoints). Ces dernières ne consistent plus à induire une réponse immune spécifique anti-tumorale, mais à s'opposer à l'immunosuppression induite par la tumeur et son microenvironnement, en bloquant des récepteurs inhibiteurs de la réponse immunitaire.

Figure 2 : Méthodes d'immunothérapie passive et active :



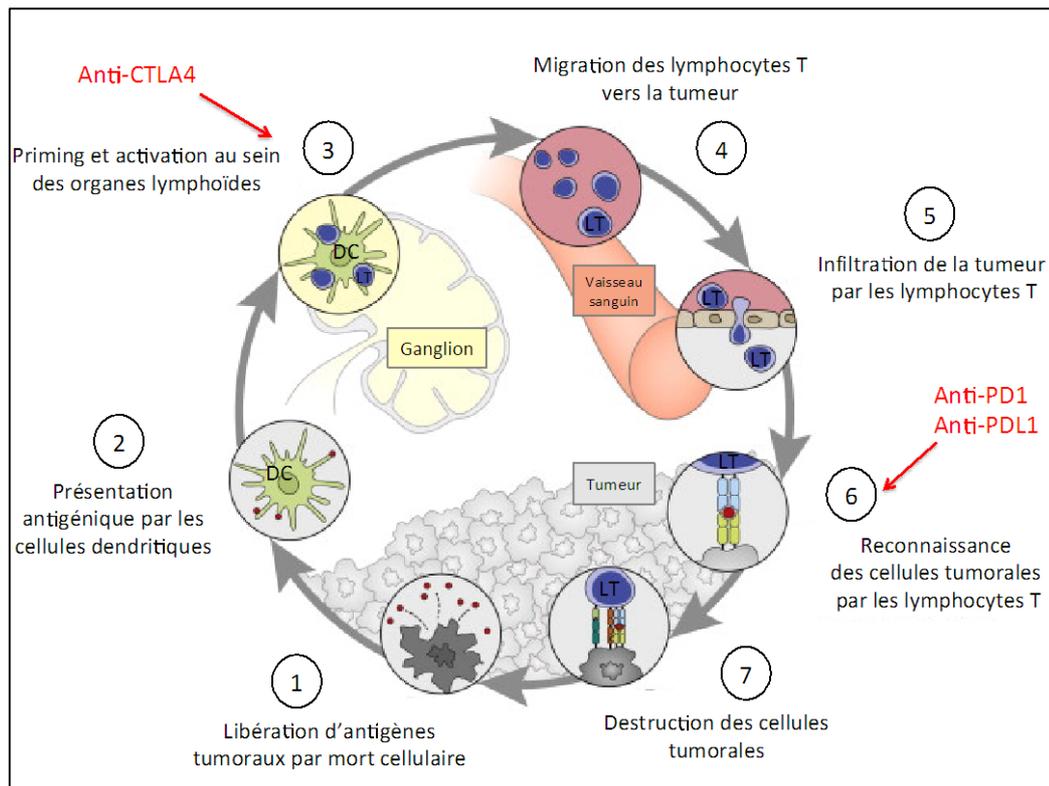
CAR Chimeric Antigen Receptor ; CTLA4 cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 ; LT Lymphocytes T ; PD-1 Programmed Death 1 ; PD-L1 Programmed Death Ligand 1.

Parmi ces nouvelles immunothérapies ciblant les immune checkpoints, le premier agent approuvé, en 2011, a été l'ipilimumab, pour le traitement du mélanome métastatique (8). L'ipilimumab est un anticorps spécifique du *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA4), un récepteur inhibiteur présent à la surface des lymphocytes pour empêcher l'activation du lymphocyte T (LT) et donc sa différenciation en T effecteur lors de la reconnaissance d'un antigène tumoral par son récepteur *T Cell Receptor* (TCR).

Après ce succès, d'autres inhibiteurs des rétrocontrôles immunitaires se sont développés, ciblant un autre récepteur inhibiteur, le *Programmed Death 1* (PD-1) et son ligand le *Programmed Death Ligand 1* (PD-L1). Ces molécules ont montré des taux de réponses durables sans précédent. Parmi les différentes méthodes d'immunothérapie développées au cours du temps, ce sont ces inhibiteurs des immune checkpoints, qui ciblent l'inhibition finale du cycle « cancer-immunité » décrit par Chen et al (9) (Figure 3), qui ont révolutionné l'efficacité et la place de l'immunothérapie. Actuellement en plein essor, ces

molécules sont considérées comme une innovation thérapeutique majeure en oncologie (10) (11), et l'immunothérapie est déjà qualifiée par la société américaine d'oncologie clinique (ASCO), de « progrès de l'année » pour 2016.

Figure 3 : Le cycle Cancer-Immunité, d'après Chen et al (9)



2. Mécanisme d'action des anti-PD-1

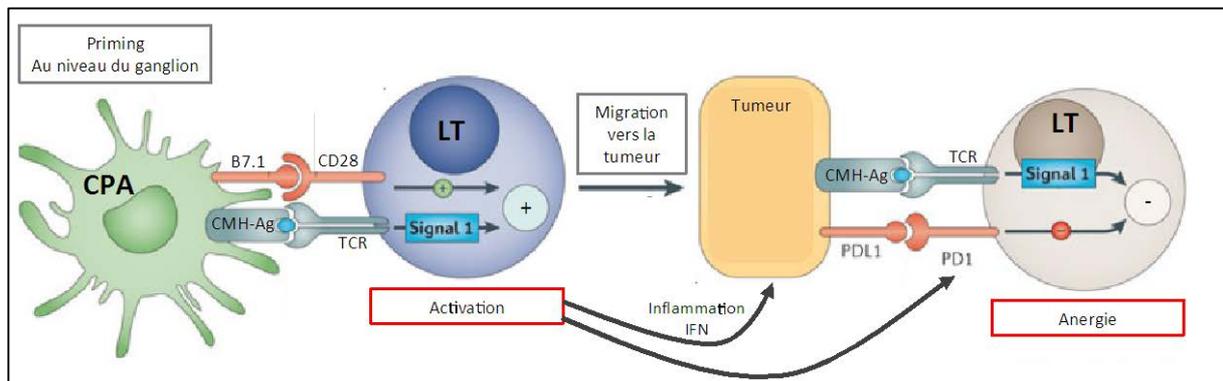
Les inhibiteurs des immune checkpoints cherchent à vaincre l'immunosuppression induite par la tumeur ou son microenvironnement, en ciblant des récepteurs inhibiteurs de la réponse immunitaire. Ces points de contrôle immunitaire sont nécessaires pour contrôler la réponse immune mise en jeu lors de phénomènes physiologiques tels qu'une infection, afin de maintenir la tolérance du Soi et éviter l'auto-immunité ; mais ils sont détournés par les cellules tumorales pour échapper à l'immunosurveillance.

La réponse immunitaire anti-tumorale est un processus complexe, où chaque étape est régulée par une balance de signaux activateurs et inhibiteurs, parmi lesquels les immune checkpoints. Les différentes étapes de cette réponse anti-tumorale ont été décrites par Chen et al, comme le cycle « cancer-immunité» (9) (Figure 3). D'abord, des néo-antigènes tumoraux sont libérés lors de la mort de cellules tumorales. Ces antigènes sont captés dans le tissu

périphérique, par des cellules dendritiques (DC) et dégradés pour être présentés au sein de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les cellules dendritiques migrent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont présenter ces antigènes à des LT naïfs et ainsi les activer en LT effecteurs CD8+. Ces derniers vont circuler vers la tumeur, où aura lieu la reconnaissance entre le TCR du lymphocyte et le complexe antigène tumoral – CMH I présent en surface des cellules tumorales. Cette reconnaissance permet l'activation du LT effecteur en LT cytotoxique, capable de lyser la cellule tumorale. Toutes ces étapes sont régulées par des co-récepteurs activateurs et inhibiteurs afin d'assurer un contrôle de la réponse immunitaire. Ainsi, pour qu'un lymphocyte puisse éliminer une cellule tumorale, il doit être activé successivement au niveau des organes lymphoïdes secondaires (priming) puis en périphérie, au niveau tumoral par la reconnaissance antigène-TCR. Cette reconnaissance est essentielle mais non suffisante, puisque l'activation finale du lymphocyte dépend alors de la balance des signaux des co-récepteurs activateurs et inhibiteurs. Parmi les récepteurs inhibiteurs impliqués dans ce cycle, CTLA4 est responsable d'une inhibition de l'activation des lymphocytes au niveau des organes lymphoïdes, et PD-1 intervient pour bloquer l'activation lymphocytaire en périphérie, au niveau tumoral (12).

Le récepteur PD-1 est exprimé sur un grand nombre de cellules immunitaires : LT (CD4 et CD8) mais aussi LT régulateurs, lymphocytes B, cellules NK (Natural Killer), cellules dendritiques et monocytes (13,14). Il intervient au niveau périphérique : son expression augmente au niveau des LT activés, en cas d'exposition antigénique prolongée et en présence de cytokines immunostimulatrices (IL2, IL7), permettant de limiter l'activation des lymphocytes et d'éviter une réponse immune excessive (15,16). Ce récepteur a deux ligands identifiés : PD-L1 (ou B7.H1 ou CD274) et PD-L2 (ou B7-DC ou CD273). PD-L1 est rarement exprimé dans les tissus sains mais est retrouvé sur de nombreuses cellules tumorales et immunitaires, qui peuvent être présentes au niveau du microenvironnement tumoral ou infiltrer la tumeur (TIL Lymphocytes Infiltrant la Tumeur) (17,18). PD-L2 est exprimé sur les macrophages et les cellules dendritiques, et interviendrait notamment dans la tolérance au niveau pulmonaire, mais est peu exprimé au niveau tumoral. Le couple PD-1/PD-L1 est responsable de la transduction d'un signal inhibiteur, qui va bloquer la cascade de signalisation se déroulant normalement en aval du TCR lors de l'activation du lymphocyte, et empêcher différents mécanismes lymphocytaires : migration, prolifération, sécrétion de médiateurs cytotoxiques, et donc la destruction des cellules tumorales. Il en résulte anergie et apoptose des lymphocytes T (19) (Figure 4).

Figure 4: Mécanisme d'action de l'axe PD-1 / PD-L1 dans la résistance immunitaire adaptative, d'après Pardoll et al (12).



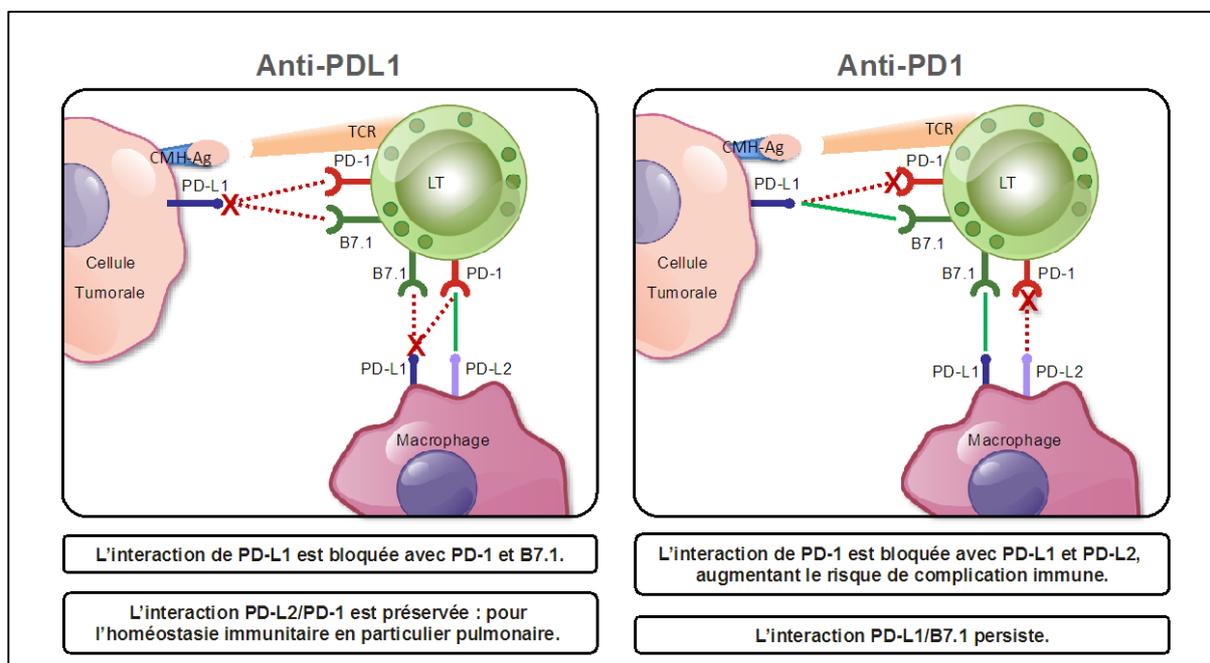
Les cellules tumorales peuvent exploiter ce récepteur inhibiteur afin d'échapper au système immunitaire, selon différents mécanismes innés ou acquis, pouvant coexister (20). Dans le cadre de la résistance immunitaire innée : la cellule tumorale surexprime le ligand PD-L1 à sa surface de façon constitutive, consécutivement à l'activation d'une voie de signalisation oncogénique (activation de la voie PI3K-AKT par perte de PTEN, ou activation de ALK par réarrangement, par exemple) (21,22). Un deuxième mécanisme constitue la résistance adaptative : la cellule tumorale, mais aussi les cellules de son environnement, surexpriment le ligand PD-L1 en réponse aux signaux inflammatoires de l'environnement (IFN notamment, interleukines...), générés par la réponse immune anti-tumorale (12,23). D'autres mécanismes encore sont probablement impliqués : par exemple, l'hypoxie augmenterait l'expression de PD-L1 (24); et les thérapies ciblées pourraient influencer son expression de façon variable en fonction des molécules (25).

Des anticorps monoclonaux ont été développés pour cibler ces points de rétrocontrôle immunitaire, lever l'inhibition des lymphocytes et ainsi rétablir et amplifier la réponse immune anti-tumorale. Il s'agit notamment des anticorps anti-PD-1 et anti-PD-L1. Ces anticorps, en amplifiant la réponse immunitaire anti-tumorale présente chez le patient, ont la particularité d'induire des réponses prolongées qui pourraient être liées à une mémoire immune anti-tumorale.

Les anticorps anti-PD-1 bloquent l'interaction de PD-1 avec ses deux ligands, PD-L1 et PD-L2. Un de leurs avantages pourrait être de saturer de façon plus efficace les récepteurs PD-1 des LT circulants, avant leur migration au niveau tumoral, et ainsi d'être actifs à de plus faibles concentrations. Les anticorps anti-PD-L1, empêchent la liaison de PD-L1 à PD-1 mais

aussi à un autre récepteur B7.1 (ou CD80), dont le rôle (activateur lorsqu'il peut interagir avec CD28) semble moins important (26). Par contre, les anti-PD-L1 respectent l'interaction de PD-1 avec PD-L2, qui semble moins exprimé au niveau tumoral, mais est impliqué dans la tolérance périphérique, notamment pulmonaire (Figure 5) (26–28). Ces deux catégories correspondent à des immunoglobulines monoclonales humaines ou humanisées dont le fragment Fc (fragment cristallisable) a dans la plupart des cas été modifié, afin d'éviter la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity).

Figure 5: Mécanisme d'action des anti-PD-1 et des anti-PD-L1



3. Activité des anti-PD-1 et des anti-PD-L1

Différents anticorps monoclonaux, administrés par voie veineuse, ciblant PD-1 ou PD-L1, sont en développement avec des résultats prometteurs observés dans de nombreux types tumoraux dès les phases I, y compris dans des histologies classiquement considérées comme peu sensibles à l'immunothérapie (Tableau 1). Néanmoins, pour un même type tumoral, ces réponses peuvent varier significativement en fonction de l'anticorps considéré (Tableau 2). De façon générale, les réponses à ces inhibiteurs des checkpoints immunitaires sont caractérisées par un délai de réponse allongé par rapport aux cytotoxiques classiques (souvent supérieur à 8 semaines), et une durée de réponse prolongée (souvent supérieure à 12 mois),

expliquant que le bénéfice du traitement se manifeste sur la survie globale (SG), plutôt que sur la survie sans progression (SSP).

Tableau 1: Molécules en développement ciblant la voie PD-1/PD-L1

Classe	Molécule	Société pharmaceutique	Type d'anticorps	AMM
Anti-PD-1	Nivolumab Opdivo® (BMS936558)	Bristol-Myers Squibb	IgG4 humaine	- Poumon (FDA, EMA) (FDA : CBNPC) (EMA : carcinome épidermoïde) - Mélanome (FDA, EMA) - Rein (FDA)
	Pembrolizumab Keytruda® (MK3475)	Merck	IgG4κ humanisée	-Mélanome (FDA, EMA) - Poumon (FDA)
	Pidilizumab (CT-011)	CureTech	IgG1κ humanisée	
	MEDI-0680	MedImmune/ Astra-Zeneca		
Anti-PD-L1	Atezolizumab (MDPL3280A)	Roche/Genentech	IgG1κ humaine	- Vessie (FDA)
	BMS936559	Bristol-Myers Squibb	IgG4 humaine	
	Avelumab (MSB0010718C)	Merck	IgG1 humaine	
	Durvalumab (MEDI4736)	MedImmune/ Astra-Zeneca	IgG1κ humaine	

CBNPC Cancer bronchique non à petites cellules, EMA European Medicines Agency, FDA Food and Drug Administration, Ig Immunoglobuline

a. Les anti-PD-1 :

- Nivolumab :

Le nivolumab est une immunoglobuline (Ig) de type G4, ciblant PD-1, qui a montré dès sa phase I, une efficacité notamment pour le mélanome, le cancer du rein et le cancer bronchique (29). Le nivolumab a déjà obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans différentes indications, à la dose de 3 mg/kg toutes les 2 semaines.

Il a d'abord été autorisé aux USA par la FDA (Food and Drug Administration) dès décembre 2014, puis en Europe par l'EMA (European Medicines Agency) en avril 2015 pour le traitement du mélanome avancé ou métastatique, suite aux résultats de l'essai de phase III le comparant à la dacarbazine (30). Dans cet essai, il augmentait le taux de réponse (40% versus 13,9%), la survie sans progression (5,1 versus 2,2 mois), et le taux de survie globale à 1 an (73% versus 42%, Hazard Ratio HR = 0,42, p<0,001).

Il a également obtenu une autorisation de mise sur le marché dans la prise en charge du cancer bronchique non à petites cellules métastatique de type épidermoïde, à partir de la deuxième ligne de traitement, en mars 2015 aux USA puis en juillet 2015 en Europe. Cette autorisation a depuis été étendue par la FDA aux cancers bronchiques métastatiques non à petites cellules, non épidermoïdes. Ceci fait suite aux essais de phase III Checkmate 057 et 017, évaluant le nivolumab par rapport au docetaxel, respectivement pour les carcinomes non épidermoïdes et épidermoïdes (31,32). Dans ces deux essais, le nivolumab permettait une amélioration significative du taux de réponse, de la SSP et de la SG. La survie globale était de 12,2 mois avec le nivolumab versus 9,4 mois avec le docetaxel pour les carcinomes non-épidermoïdes ($p < 0,001$) ; et de 9,2 mois versus 6 mois pour les carcinomes épidermoïdes ($p < 0,001$). Pour les carcinomes non-épidermoïdes, ce bénéfice était retrouvé dans la population totale et dans la population PD-L1+ en immunohistochimie (IHC) ; par contre, il n'y avait pas de bénéfice du nivolumab par rapport au docetaxel parmi les patients PD-L1 négatifs et parmi les patients EGFR mutés.

Aux USA, il est également autorisé depuis novembre 2015, pour la prise en charge du cancer du rein métastatique après traitement anti-angiogénique, suite à la phase III le comparant à l'everolimus, qui démontre un bénéfice en termes de réponse et de survie (SG : 25 mois versus 19,6 mois, $p = 0,002$) (33). En Europe, un avis favorable de l'EMA pour l'extension de l'autorisation au cancer du rein et au cancer bronchique non épidermoïde a été prononcé en février 2016.

Le nivolumab est en cours d'évaluation dans d'autres indications, avec des taux de réponse objective de 19% dans un essai de phase I/II dans le carcinome hépatocellulaire (CHC) (34); de 17% dans un essai de phase II dans le cancer de l'ovaire (35), de 18% dans une phase I/II dans le cancer bronchique à petites cellules (36).

- Pembrolizumab :

Le pembrolizumab est l'autre anticorps anti-PD-1 bénéficiant déjà d'une AMM en Europe depuis juillet 2015, à la dose de 2mg/kg toutes les 3 semaines, pour la prise en charge du mélanome métastatique, en deuxième ligne pour les tumeurs BRAF mutées, et dès la première ligne sinon. Dans la phase III par rapport à l'ipilimumab, il permettait un taux de réponse objective de 33,7% versus 11,9% avec l'ipilimumab, avec une amélioration de la SSP de 5,5 mois versus 2,8 mois ($p < 0,001$) (37). Des réponses ont été observées même chez les patients pré-traités par immunothérapie anti-CTLA4. Aux USA, le traitement est approuvé

depuis septembre 2014, mais l'indication a été élargie en décembre 2015 à la première ligne de traitement.

Des résultats prometteurs ont également été rapportés dans le cancer bronchique non à petites cellules, avec un taux de réponse de 19,4% dans la phase I (38), et un bénéfice en survie globale dans un essai de phase II/III comparativement au docetaxel (SG : 12,7 mois versus 8,5 mois, $p < 0,0001$) (39). Aux USA, le traitement a été approuvé pour les cancers bronchiques non à petites cellules PD-L1 positifs à partir de la deuxième ligne de traitement.

Enfin deux études de phase Ib, Keynote-028 et Keynote-012, ont présenté lors du congrès de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2015, les taux de réponse obtenus pour différentes histologies (Tableau 2), avec notamment 27,6% de taux de réponse pour les carcinomes urothéliaux (40), 30,4% pour les cancers de l'œsophage (41), 35% pour les cancers bronchiques à petites cellules (42) mais seulement 4,3% pour le cancer colorectal (43). Néanmoins, dans la population spécifique des cancers coliques avec instabilité des microsatellites, le taux de réponse était de 40% (44).

- Autres anti-PD-1 :

Le pidilizumab a été développé initialement pour les hémopathies malignes, mais est en cours d'évaluation dans les tumeurs solides, avec néanmoins des premiers résultats décevants pour le mélanome, avec un taux de réponse de 6% (45).

Le MEDI0680 est en cours d'évaluation en phase I dans le mélanome et le cancer du rein.

b. Les anti-PD-L1 :

- Atezolizumab:

L'essai de phase I de l'atezolizumab avait rapporté des réponses dans le mélanome (30%), le cancer bronchique non à petites cellules (23%) et le cancer du rein (14%) (46,47). Ces résultats ont été confirmés pour le cancer bronchique dans l'essai de phase II POPLAR, randomisé contre docetaxel, en 2^e-3^e ligne, qui a démontré un bénéfice de l'atezolizumab en survie globale (SG : 12,6 mois versus 9,7 mois ; HR = 0,73 ; IC95= 0,53-0,99, $p=0,04$) (48). L'atezolizumab vient d'être autorisé par la FDA en mai 2016, pour les cancers de vessie progressant après une première ligne par platine, à l'issue d'un essai de phase II simple bras retrouvant 15% de taux de réponse (49), et d'une phase I avec 26% de réponse objective (50).

- BMS936559:

Le BMS936559 est l'anticorps anti-PD-L1 développé par Bristol-Myers Squibb. Il a été évalué dans un essai de phase I dans différentes tumeurs solides avec des taux de réponse allant de 17% dans le mélanome (29% quand il était utilisé à la posologie de 3mg/kg), à 6% dans le cancer de l'ovaire (51), soit des résultats moindres qu'avec les anti-PD-1.

- Avelumab:

Les premiers résultats rapportés d'après les différentes cohortes de l'essai de phase Ib de l'avelumab, indiquent des taux de réponse de 15% dans le mésothéliome (52), de 13,6% dans les CBNPC (53) et de 10,7% dans le cancer de l'ovaire (54).

- Durvalumab:

Pour le durvalumab, les résultats les plus avancés concernaient à l'ASCO 2015, le cancer bronchique non à petites cellules, avec un taux de réponse de 16% d'après l'étude de phase I/II (55); et les carcinomes épidermoïdes ORL, avec un taux de réponse de 14% (56) ; et à l'ASCO 2016, le cancer de vessie avec 38% de taux de réponse (57).

Tableau 2 : Taux de réponse des anti-PD-1 et anti-PD-L1 dans les tumeurs solides

	Nivolumab	Pembrolizumab	Pidilizumab	Atezolizumab	BMS936559	Avelumab	Durvalumab
Mélanome	40%	33%	6%	30%	17%		
Poumon	CE 20% ADK 19% PC 18%	CE 23,5% ADK 18,7% PC 35%		NPC 15%	CE 8% ADK 11%	NPC 13,6%	NPC 16%
Mésothéliome		28%				15%	
Rein	25%			15%	12%		
Vessie		27,6%		15%			38,1%
Ovaire	17%	11,5%			6%	10,7%	
Sein		18,5%		19%			
CHC	19%						
ORL		24,8%					14%
Colon		4,3%					
Canal anal		20%					
Pancréas		17,4%					
Oesophage		CE 29,4% ADK 40%					
Estomac		22,2%					
Références	(30–36)	(37,38,40– 43,58–64)	(45)	(46,47,49,65,66)	(51)	(52–54)	(55–57)

ADK Adénocarcinome, CE Carcinome Epidermoïde, CHC Carcinome hépatocellulaire ; NPC Non à Petites Cellules ; PC Petites cellules

4. Enjeux des inhibiteurs de checkpoints immunitaires

Les immunothérapies de nouvelle génération, et en particulier les inhibiteurs de PD-1/PD-L1, sont source de beaucoup d'espoirs. Ayant déjà démontré un bénéfice clinique et une amélioration de la survie dans la prise en charge de certains cancers (mélanome, poumon, rein, vessie), ils sont en cours d'évaluation dans de nombreuses indications. Leur profil de réponse, prolongée et supérieure aux anti-CTLA4, et leur moindre toxicité, en font une arme thérapeutique de choix. Néanmoins, un certain nombre de challenges persistent actuellement pour l'utilisation de ces inhibiteurs des checkpoints immunitaires.

- Place de chaque anticorps dans la stratégie thérapeutique :

Tout d'abord, il sera nécessaire de comparer les performances de ces différents anticorps entre eux, en termes d'efficacité et de toxicité. Des différences sont prévisibles, du fait des différences de cible, d'affinité et d'isotype de ces anticorps. Par exemple, les immunoglobulines de type IgG1 ont une meilleure capacité à induire l'ADCC. Or, cette propriété peut à la fois être redoutée pour les anti-PD-1, avec lesquels elle pourrait favoriser la destruction des LT ré-activés ; ou au contraire, recherchée pour les anti-PD-L1, avec lesquels elle pourrait favoriser la destruction des cellules tumorales (26,67). De même en termes de toxicité, cibler PD-L1, en préservant les capacités de liaison de PD-L2, pourrait permettre de préserver la tolérance immune au niveau pulmonaire et de limiter ainsi les pneumopathies. Néanmoins, les résultats de l'essai POPLAR évaluant l'atezolizumab dans le cancer bronchique, n'ont pas confirmé cette hypothèse pour le moment (48). En terme d'efficacité, les résultats des premiers essais montrent des taux de réponse variables en fonction des molécules pour une même indication (Tableau 2), et la place de chaque anticorps dans la stratégie thérapeutique doit encore être définie. La place de ces traitements en adjuvant est aussi en cours d'évaluation. Les modalités de ces traitements devront également être précisées, en particulier, le rythme d'administration optimal et surtout la durée d'administration en cas de réponse, puisque des réponses persistant au-delà de l'arrêt du traitement ont été rapportées (68).

- Evaluation de la réponse :

La plupart des essais ont utilisés les critères RECIST afin d'évaluer la réponse tumorale. Cependant, des profils de réponse inhabituels ont été décrits avec les agents immunomodulateurs, notamment des réponses dissociées avec des réductions prolongées de

certaines lésions concomitantes de l'apparition initiale de nouvelles lésions; ainsi que des réponses retardées avec une augmentation initiale de la taille des lésions précédant la réponse (dites « pseudo-progression »). Ceci est lié à l'infiltrat inflammatoire présent au niveau tumoral, qui peut augmenter sous l'effet du traitement. Afin de ne pas conclure à tort à une progression, des critères d'évaluation adaptés aux immunothérapies ont été développés et sont en cours de validation : les critères irRC (immune-related Response Criteria) (69). Ces critères utilisent la somme des produits des plus grands diamètres perpendiculaires des lésions cibles afin de déterminer la masse tumorale en baseline. A chaque évaluation, la taille des lésions cibles et la taille d'éventuelles nouvelles lésions sont additionnées pour juger de l'évolution de la masse tumorale. La réponse partielle est définie par une diminution de plus de 50% par rapport au baseline ; la progression, par une augmentation de plus de 25% de la masse tumorale. Chaque réponse doit être confirmée par une nouvelle évaluation à au moins 4 semaines d'intervalle. Escudier et al ont montré que chez les patients traités par nivolumab pour un cancer du rein, la poursuite du traitement au delà de la première progression RECIST, permettait d'obtenir une réponse partielle chez 14% d'entre eux (70).

- Gestion des toxicités :

Les agents immunomodulateurs sont également caractérisés par un profil de toxicité qui les distingue des traitements anti-tumoraux conventionnels. En particulier, des toxicités spécifiques dites « immune-related Adverse Events » (irAE) ont été décrites : elles sont la conséquence des effets des LT activés au niveau des tissus sains. Si la tolérance des anti-PD1/PD-L1 est bonne et notamment meilleure que celle des anti-CTLA4, avec une majorité d'effets indésirables peu sévères et réversibles, ces toxicités doivent être minutieusement surveillées afin de permettre leur prise en charge rapide, et d'éviter ainsi certaines toxicités graves voire mortelles observées lors des essais précoces (29). La tolérance des anti-PD-L1 semblait initialement meilleure que celle des anti-PD-1 du fait de l'absence de pneumopathie sévère, ce qui pourrait être expliqué par le rôle préservé de PD-L2 dans le contrôle de la réponse immunitaire. Néanmoins, ces observations ne sont pas univoques et des pneumopathies de grade 3-4 ont été décrites avec l'atezolizumab (48). De façon générale, les toxicités les plus fréquentes concernent l'asthénie, les rashes cutanés, le prurit et les diarrhées. Dans les différents essais, des toxicités de tous grades sont observées dans environ 75% des cas, et celles de grade 3-4 chez 12% des patients (30,31,37,46). Des pneumopathies de grade 3-4 ont été à l'origine de 1% de décès dans la phase I du nivolumab, et ont nécessité de revoir l'algorithme de prise en charge en cas de symptomatologie respiratoire, afin de débiter

précocement une corticothérapie. Des toxicités digestives et hépatiques peuvent aussi nécessiter un recours à la corticothérapie. Des toxicités endocriniennes existent mais surviennent souvent plus tardivement et nécessitent un traitement substitutif. Dans certains cas, l'interruption temporaire ou définitive du traitement peut être nécessaire. Des recommandations de prise en charge de ces effets indésirables ont été proposées, mais restent à valider dans des essais (71–73).

- Définition d'associations thérapeutiques :

Malgré le succès clinique de ces nouvelles immunothérapies, les patients répondeurs restent minoritaires et la question des associations thérapeutiques, pour contourner les résistances, est déjà en cours d'évaluation dans différents essais cliniques. Améliorer notre connaissance des mécanismes immunitaires en jeu au niveau tumoral, pourrait aider à définir des associations thérapeutiques complémentaires voire synergiques. Par exemple, quatre types de microenvironnements tumoraux ont été décrits en fonction de l'expression de PD-L1 et de la présence de TIL (23,74), avec des mécanismes d'échappement immunitaire qui pourraient différer.

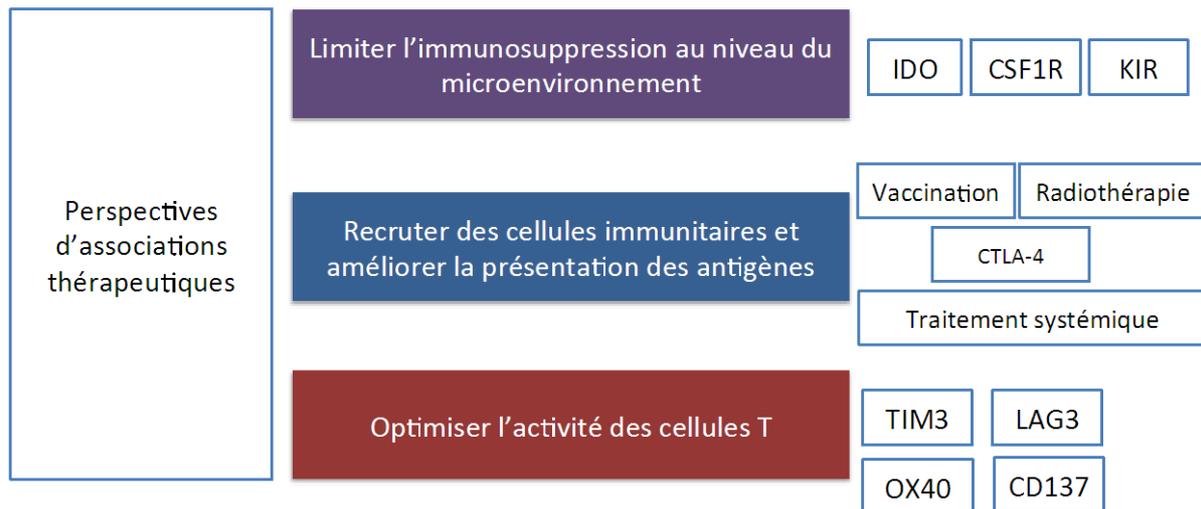
Ainsi, bloquer l'axe PD-1/PD-L1 serait une option de choix quand infiltrat de lymphocytes tumoraux et expression de PD-L1 coexistent. Pour potentialiser la levée d'inhibition du système immunitaire, des associations d'inhibiteurs d'immunes checkpoints avec des agonistes de molécules activatrices des LT (comme OX40 ou CD137) pourraient être envisagées (75).

Inversement, la présence de lymphocytes intra-tumoraux sans expression de PD-L1, pourrait nécessiter de cibler d'autres mécanismes inhibiteurs potentiels : d'autres molécules de costimulation inhibitrices au niveau des lymphocytes, telles que TIM3 (T cell Ig and Mucin-3), ou LAG3 (Lymphocyte Activation Gene-3) (76), mais aussi des voies immunosuppressives métaboliques avec l'IDO (Indoleamine 2,3 DiOxygenase) (77) ou des cibles présentes sur les cellules immunosuppressives du microenvironnement, comme CSF1R (Colony Stimulating Factor 1 Receptor) sur les cellules myéloïdes, ou KIR (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors) sur les cellules NK (20,78).

Enfin, en l'absence de TIL dans le microenvironnement, un pré-traitement permettant de recruter des lymphocytes au niveau tumoral pourrait être un préalable nécessaire (67,74), faisant envisager des associations avec un anti-CTLA4 pour rétablir le recrutement des LT au niveau tumoral (74) ; avec des cytotoxiques, des thérapies ciblées ou des rayonnements ionisants pour favoriser la libération d'antigènes tumoraux ; avec des stratégies de vaccination

anti-tumorale ou de transferts de lymphocytes pour induire ou reproduire une réponse immunitaire. Les associations avec les anti-CTLA4 ont déjà donné des résultats intéressants dans la prise en charge du mélanome, au prix néanmoins d'une toxicité non négligeable (79) .

Figure 6: Perspectives d'associations thérapeutiques



- Identification d'un biomarqueur prédictif :

Enfin, l'identification de facteurs prédictifs de réponse s'impose désormais comme l'enjeu principal du développement de ces immunothérapies. En effet, malgré des résultats prometteurs dans des types histologiques variés avec des taux de réponse allant jusqu'à 40% (Tableau 2), la majorité des patients ne répond pas à ces thérapies. Identifier précocement les patients susceptibles de répondre aux immunomodulateurs, est donc indispensable afin de limiter pour les autres patients, la perte de chance liée à la proposition d'un traitement inefficace et l'exposition à des toxicités inutiles pouvant être définitives ou mortelles. D'autre part, du fait du coût élevé de ces nouveaux traitements (prix pour 12 semaines de traitement par nivolumab > 41000 dollars ; prix pour 12 semaines de traitement par pembrolizumab > 33000 dollars), l'identification d'un tel biomarqueur est indispensable pour limiter les coûts pour nos systèmes de soins.

B. A la recherche d'un prédicteur moléculaire d'efficacité : intérêt de PD-L1

L'expression de la protéine PD-L1 pourrait constituer un biomarqueur d'efficacité, puisque des taux de réponse plus importants au niveau des tumeurs exprimant PD-L1 ont été décrits dès les phases I (29,46,80). La valeur prédictive de ce potentiel biomarqueur est aujourd'hui largement étudiée dans les essais.

1. Méthode de détermination du statut PD-L1

Pour chaque anticorps anti-PD-1/PD-L1 en développement, un test compagnon pour la détermination immunohistochimique (IHC) du statut PD-L1 de la tumeur, est en cours d'évaluation. Cependant, si le principe de détermination reste le même, l'immunohistochimie, les modalités pratiques de chaque test varient de façon importante concernant en particulier l'anticorps utilisé, la plateforme d'analyse, le marquage pris en compte (membranaire ou cytoplasmique), les cellules étudiées (tumorales ou/et immunitaires) ou encore le seuil de positivité retenu (variant de 1 à 50% selon les essais) (Tableau 3).

L'analyse IHC peut être réalisée à partir d'un échantillon frais ou archivé. Les prélèvements archivés étant le plus souvent fixés au formol et inclus en paraffine, une étape préalable consiste à les déparaffiner et les réhydrater. L'échantillon est ensuite incubé en présence d'anticorps spécifiques de PD-L1 qui seront révélés par des réactions colorées.

Tableau 3 : Caractéristiques des différentes méthodes de détection immunohistochimique du statut PD-L1 en fonction des essais. (Le seuil de positivité le plus souvent retenu dans les essais apparaît en gras; le seuil retenu pour l'AMM est souligné)

	Anticorps (IHC)	Méthode de détection	Intensité de marquage	Marquage	Cellules	Seuil
Nivolumab	28-8	Dako	Toutes	Membranaire	Tumorales	5% 1%, 10%
Pembrolizumab	22C3	Dako	Toutes	Membranaire	Tumorales	1% <u>50%</u>
Atezolizumab	SP142	Ventana	Modérée ou forte	Membranaire	Tumorales ou immunes	5%
Durvalumab	SP263	Ventana	Toutes	Membranaire	Tumorales	25%
Avelumab	ND	ND		ND	Tumorales	1%

ND Non disponible

Dans certains essais, différents seuils de positivité ont été comparés afin de déterminer celui qui aurait la meilleure association statistique avec la réponse. Ainsi, lors de la phase I du nivolumab, chez 41 patients atteints de mélanome, des seuils de positivité à 1% et 5% de marquage membranaire des cellules tumorales, ont été comparés. Avec le seuil de 1%, le taux de réponse objective était de 35% chez les patients PD-L1 positifs et de 13% chez les négatifs ; comparativement, le seuil de 5% reflétait mieux les réponses cliniques avec des taux respectifs de 44% et 13% (81). Ce seuil de 5% est celui le plus souvent retenu dans les différents essais du nivolumab, même si certains essais continuent de comparer les performances des seuils à 1%, 5% et 10% (31–33,82).

Concernant le pembrolizumab, des études ont été réalisées afin d'optimiser la méthode et de définir le meilleur cut-off pour la positivité du statut PD-L1. Par exemple, à partir des 182 patients de la cohorte cancer bronchique non à petites cellules de l'étude Keynote-001, 4 scores immunohistochimiques ont été comparés : le « Proportion Score » basé sur le pourcentage de cellules marquées quelle que soit leur intensité de marquage ; le « Proportion Moderate/Strong Score » qui ne prend en compte que les cellules marquées avec une intensité intermédiaire à forte ; le « Proportion Strong Score » ne considérant que le marquage de haute intensité, et le « H Score », somme des 3 scores précédents. Dans cette étude, contrairement aux essais cliniques du pembrolizumab, les différents scores ont évalué les cellules tumorales et les cellules immunitaires. Prendre en compte les cellules immunitaires n'améliorait pas les performances des tests. Les meilleurs résultats étaient obtenus avec le « H-Score », mais le « Proportion Score » (PS) en raison de ses performances proches et de sa simplicité a été retenu, avec un seuil de positivité à 50% pour les cellules tumorales. La positivité du statut PD-L1 avec le PS était associée au taux de réponse, à la SSP et à la SG (83).

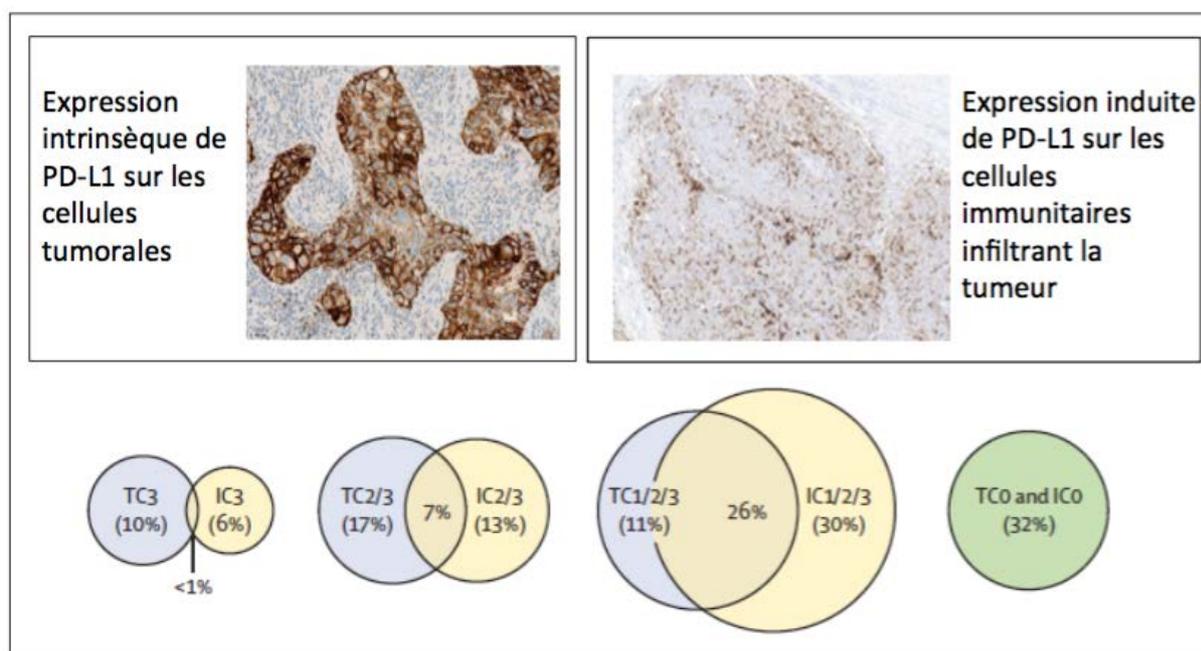
Inversement pour l'atezolizumab, l'étude de phase I sur 277 tumeurs solides avancées ou métastatiques, a mis en évidence une relation entre le statut PD-L1 et le taux de réponse clinique, quand le statut était déterminé sur les cellules immunitaires seulement ($p=0,007$). Cette relation n'était pas retrouvée avec le marquage des cellules tumorales ($p=0,079$) (46). Pour les essais concernant l'atezolizumab, le marquage des cellules tumorales et des cellules immunitaires est évalué et noté de 0 à 3 (Tableau 4). La positivité a été initialement le plus souvent définie par une expression de PD-L1 au niveau des cellules immunitaires de plus de 5%, mais dans les essais les plus récents, elle prend en compte à la fois le marquage des cellules immunitaires et tumorales (Figure 7) (48).

Tableau 4 : Score d'expression de PD-L1 pour l'atezolizumab.

Expression sur les cellules tumorales		Expression sur les cellules immunitaires	
Score	Pourcentage de cellules marquées	Score	Pourcentage de cellules marquées
TC3	> 50%	IC3	> 10%
TC2	5 à 50%	IC2	5 à 10%
TC1	1 à 5%	IC1	1 à 5%
TC0	< 1%	IC0	< 1%

Figure 7: Expression de PD-L1 sur les cellules immunitaires et tumorales dans l'essai POPLAR, d'après Fehrenbacher et al (48)

(Les pourcentages indiquent la prévalence de chaque groupe sans chevauchement).



2. Valeur prédictive du statut PD-L1

Dès les essais de phase I des différents anticorps anti-PD-1 et anti-PD-L1, des analyses ont été prévues pour la recherche de biomarqueurs, avec notamment l'évaluation du statut PD-L1 en IHC. La phase I du nivolumab a mis en évidence une relation entre le statut PD-L1 (avec un seuil à 5% des cellules tumorales) et le taux de réponse (patients PD-L1 + : 36% / patients PD-L1- : 0% ; p=0,006) (29). De même pour le pembrolizumab, Kefford et al rapportent à l'ASCO en 2014 pour la cohorte mélanome de Keynote-001, une association du

statut PD-L1 (avec un seuil de positivité à 1% pour les cellules tumorales) au taux de réponse, qui était de 51% pour les patients PD-L1+ et de 6% pour les PD-L1- ($p=0,012$) (84). Une relation du même type était identifiée dans la phase I de l'atezolizumab, entre le statut PD-L1 (avec un seuil à 5% des cellules immunitaires) et à la fois le taux de réponse et la SSP. Le taux de réponse était de 33,9% pour les patients PD-L1+ versus 16% pour les patients PD-L1 négatifs ($p=0,007$) pour la cohorte toutes tumeurs, et respectivement de 46,2% et 18% pour la cohorte poumon ($p=0,015$) (46).

La valeur prédictive du statut PD-L1 a été étudiée dans de nombreux essais, avec souvent des résultats discordants en fonction des molécules, et pour une même molécule, en fonction des essais considérés (Tableau 5). Pour le nivolumab et le pembrolizumab, l'association entre réponse et statut PD-L1 n'est pas toujours retrouvée selon les essais (Tableau 5). Quand une telle association est mise en évidence, sa valeur prédictive ou pronostique ne peut pas toujours être déterminée. Par exemple, dans les essais de phase III du nivolumab dans le cancer bronchique, l'association entre statut PD-L1 et réponse pour les carcinomes épidermoïdes, est retrouvée à la fois dans le bras nivolumab et dans le bras docetaxel, plaidant plutôt en faveur d'un rôle pronostique (32). Mais dans l'essai de phase III concernant les carcinomes non épidermoïdes, cette fois l'association statut PD-L1 et réponse n'existe que pour le bras nivolumab, en faveur dans ce cas d'une valeur prédictive (31). Dans les différents essais de l'atezolizumab par contre, l'association entre le statut PD-L1 et la réponse est toujours mise en évidence. Néanmoins, le seuil de positivité retenu varie dans certains essais.

Au delà des principaux essais industriels, de nombreuses études se sont intéressées à la valeur prédictive de PD-L1, utilisant d'autres anticorps, accessibles sur le marché, comme le clone E1L3N (Cell Signaling Technology). Leurs résultats sont également discordants en faveur dans certains cas d'une valeur prédictive, dans d'autres d'un rôle pronostique, et parfois d'une absence de relation entre statut PD-L1 et réponse (67). L'hétérogénéité des méthodologies, en termes d'anticorps, de méthodes d'évaluation et de seuils, est une limite pour comparer ces résultats. De la même façon, les résultats concernant l'association du statut PD-L1 avec des paramètres cliniques (tels que stade de la maladie, taille tumorale, tabagisme...) ou anatomopathologiques (grade histologique, atteinte ganglionnaire...) sont contradictoires.

Une méta-analyse à partir de 20 essais, incluant 1475 patients a été réalisée, et est en faveur d'une association entre le taux de réponse et le statut PD-L1 avec 34,1% de répondeurs parmi les patients PD-L1+ et 19,9% chez les PD-L1- ($p < 0,0001$) (85). Néanmoins, la définition de la positivité PD-L1 variait en fonction des essais dans cette méta-analyse. D'autre part, une proportion significative de patients PD-L1 négatifs répondait au traitement dans les différents essais.

Des alternatives au statut PD-L1 ont été envisagées : par exemple Taube et al, ont évalué différents éléments de l'axe PD-1/PD-L1. Parmi l'infiltrat de TIL et l'expression IHC de PD-1, PD-L1 et PD-L2, c'est l'expression de PD-L1 qui continuait de montrer la meilleure association avec la réponse aux anti-PD-1, quand elle était mesurée au niveau des cellules tumorales ($p = 0,025$) mais pas au niveau des cellules immunitaires ($p = 0,142$) (86).

Tableau 5 : Association du statut PD-L1 avec le taux de réponse, la survie sans progression et la survie globale dans les différents essais anti-PD-1 et anti-PD-L1. (La signification statistique (p) est mentionnée quand elle est disponible)

Tumeur	Positivité	Taux de réponse PD-L1+/-	Survie sans progression PD-L1+/-	Survie globale PD-L1+/-	Conclusion	Référence
Nivolumab						
Mélanome, rein, colon, CBNPC, prostate	5% CT	36%/0% $p = 0,006$			Association significative	(29)
Mélanome, CBNPC, rein, colon	5% CT	39%/6% $p = 0,025$			Association significative	(86)
Mélanome	5% CT	52,7/33,1%			PD-L1 n'est pas suffisant	(30)
Mélanome	5% CT	43,6/20,3%			Association	(87)
CBNPC ADK	5% CT (1%,10%)	36%/10% $p = 0,002$	5m/2,1m $p = 0,0001$	18/9,7m $p = 0,0004$	Valeur prédictive quel que soit le seuil	(31)
CBNPC CE	5% CT (1%,10%)	21%/15% $p = 0,29$	$p = 0,47$	$p = 0,16$	Valeur pronostique	(32)
CBNPC	5% CT (1%,10%)	24%/14%			Association	(82)
CBNPC	5% CT	15%/14%	3,3m/1,8m	7,8/10,5m	Pas d'association	(68)
Rein	5% CT (1%)			21,9/24,6m	Pas d'association	(33)
Rein	5% CT (1%)	31%/18%	4,9/2,9m	NA/18,2m	Association au seuil 5%	(88)
Rein	5% CT			NA/23,4m	Pas d'association	(89)

Pembrolizumab						
Mélanome	1% CT	51%/6%	12/3m		Association significative	(84)
		p=0,012	p=0,0004			
Mélanome	1% CT	26,4%/15,1%	3,6/2,8m		Valeur pronostique	(90)
Mélanome	1% CT	42%/9%	HR = 0,5	HR = 0,49	Association significative	(91)
		p<0,0001	p<0,0001	p=0,0005		
CBNPC	50% CT	43%/7,8%			Association à la réponse, la SSP et la SG	(83)
		OR=8,93				
CBNPC	50% CT	45,2%	6,3m	NA	Association significative pour le taux de réponse	(38)
	1-49%	16,5%	4,1m	10,6m		
	<1%	10,7%	4m	10,4m	(p<0,001)	
CBNPC	50% CT		5,8m	15,5m	Association au seuil 50%	(92)
	1-49%		2,3m	7,8m		
	<1%		2,1m	8,6m		
Estomac	1% CT+CI	p=0,082	p=0,269	p=0,01	Association significative	(64)
Vessie	1% CT+CI	29%/0%			Association	(40)
	1% CT	33%/9%				
Atezolizumab						
Toutes tumeurs	5% CI	33,9%/16%			Association à la réponse et la SSP	(46)
		p=0,007				
CBNPC	5% CI	46,2%/18%			Association	(46)
		p=0,015				
CBNPC	CT3-CI3	38%	7,8m	15,5m	Association avec la SG pour les CI et les CT	(48,93)
	CT-CII/2/3	18%	2,8m	15,5m		
	CT0-CI0	8%	1,7m	9,7m		
CBNPC	CT3-CI3	48%/16%	4m/ 3m	18m/16m	Association	(94)
Vessie	5% CI	50%/17%	6m/1m	NA/8m	Association à la réponse, la SSP et la SG	(95)
Vessie	CI-3	26%	2,1m	11,4m	Association à la réponse et la SG pour les CI	(49)
	CI-1/2/3	18%	2,1m	8,8m	(mais non pour les CT)	
	CI-0	8%				
Vessie	5% CI	43,3%/11,4%			Association significative	(50)
		p=0,026				
Rein	1% CI	18%/9%			Association	(47)
Durvalumab						
CBNPC	25% CT	27%/5%			Association réponse et SG	(55)
ORL (CE)	25% CT	18%/8%			Association	(56)
Vessie	25% CT ou CI	54%/7%			Association	(57)
Avelumab						
CBNPC	1% CT	15,6%/10%	3m/1,5m		Pas d'association	(53)
		p=0,738				
Ovaire	1% CT	12%/5,9%			Association	(96)

CBNPC Cancer Bronchique Non à Petites Cellules, CE Carcinome Epidermoïde, CI Cellules Immunitaires, CT Cellules Tumorales, m mois, NA Non atteint, SG Survie globale, SSP Survie sans progression.

3. Les enjeux du statut PD-L1

La sélection des patients en fonction du statut PD-L1 permet d'enrichir la population en répondeurs. Mais certains patients avec une tumeur PD-L1 négative répondent au traitement, avec le même profil de réponse que les patients PD-L1+, en particulier en terme de durée de réponse prolongée. Ainsi, il semble pour le moment difficile de sélectionner les patients uniquement en fonction du statut PD-L1, au risque d'exclure des patients qui pourraient avoir un bénéfice au traitement, ce qui constitue une réelle perte de chance sachant qu'ils n'ont souvent que peu, voire pas, d'alternative thérapeutique.

Pour autant l'identification d'un biomarqueur reste nécessaire, et le statut PD-L1 est à ce jour un candidat prometteur largement étudié, même si des controverses existent sur sa valeur prédictive ou pronostique, et que d'autres biomarqueurs potentiels émergent. Les tests compagnons permettant de déterminer le statut PD-L1 pour le nivolumab, le pembrolizumab et l'atezolizumab ont d'ailleurs été validés par la FDA. Le test est déjà en application pour le pembrolizumab dans le cancer bronchique aux Etats-Unis, où la prescription est restreinte à la population PD-L1+ d'après le test compagnon.

Il est donc nécessaire de poursuivre l'évaluation de PD-L1 en tant que biomarqueur prédictif, et dans ce cadre, d'évaluer les facteurs susceptibles d'influencer le statut PD-L1.

II. Problématique

Les immunothérapies ciblant les points de contrôle du système immunitaire, en particulier PD-1 et son ligand PD-L1, sont en plein essor. Elles constituent une avancée majeure dans la prise en charge de nombreux types tumoraux en permettant des réponses cliniques dont la caractéristique est d'être prolongées. Elles améliorent la survie globale dans certaines indications et ont déjà obtenu une autorisation de mise sur le marché dans le mélanome, le cancer bronchique, le cancer du rein et le cancer de la vessie. Néanmoins, leurs coûts élevés et leurs toxicités immunologiques, imposent aujourd'hui d'identifier un biomarqueur afin de pouvoir sélectionner les patients susceptibles de bénéficier du traitement et d'éviter des risques inutiles aux autres. Beaucoup de travaux cherchent à identifier un tel biomarqueur, et le meilleur candidat reste à ce jour le statut immunohistochimique PD-L1, même si les résultats concernant sa valeur prédictive restent discordants. Afin de préciser la valeur prédictive de PD-L1, il est nécessaire d'identifier les paramètres susceptibles d'influencer sa positivité.

L'objectif de cette thèse était d'étudier l'influence de facteurs cliniques, anatomopathologiques et immunohistochimiques sur la positivité du statut PD-L1 ; et de comparer la prévalence de la positivité du statut PD-L1 parmi une cohorte de patients traités à Gustave Roussy par rapport à la prévalence observée dans les essais internationaux, afin d'identifier des facteurs susceptibles d'interférer avec la détermination immunohistochimique du statut PD-L1.

III. Méthodologie

Population

Les patients pris en charge à Gustave Roussy (GR) en vue d'une inclusion dans un essai de phase I d'immunothérapie entre janvier 2014 et juillet 2015 ont été recensés. Les patients répondant aux critères d'inclusion de ces protocoles, et pour lesquels un échantillon tumoral permettait la détermination du statut PD-L1, ont été inclus.

Les données démographiques, les données cliniques relatives à la pathologie tumorale et à sa prise en charge et les données concernant l'échantillon tumoral testé pour le statut PD-L1 ont été recueillies de manière rétrospective à partir des comptes rendus de consultations et d'examen anatomopathologiques disponibles dans la base de données de Gustave Roussy.

Pour être inclus dans l'étude, les patients devaient :

- avoir plus de 18 ans,
- être atteints d'une tumeur solide localement avancée ou métastatique prouvée histologiquement, en échec des traitements standards,
- avoir un échantillon tumoral initial archivé ou provenant d'une biopsie récente, permettant de déterminer le statut PD-L1.

Les patients ayant déjà reçu un traitement par immunothérapie n'étaient pas éligibles. Les patients dont l'échantillon tumoral était absent ou non contributif ; et les patients pour lesquels le statut PD-L1 n'a pas pu être déterminé, ont été exclus de l'analyse.

Essais de phase I d'immunothérapie

Les essais de phase I d'immunothérapie recrutant des patients à GR durant la période concernée par l'étude étaient l'essai MK3475-028/KEYNOTE-28 de Merck, l'essai CD-ON-MEDI4736-1108 d'AstraZeneca et l'essai PCD4989g de Genentech.

L'essai MK3475-028/KEYNOTE-28 (MK3475) est une étude de phase Ib étudiant l'efficacité et la sécurité du MK3475 ou *pembrolizumab*, anticorps ciblant le récepteur PD-1, chez des patients atteints de tumeurs solides avancées (NCT02054806). Le MK3475 est un anticorps monoclonal humanisé d'isotype IgG4/kappa qui bloque l'interaction de PD-1 avec ses ligands PD-L1 et PD-L2.

L'essai CD-ON-MEDI4736-1108 (MedImmune) est une étude de phase I/II évaluant l'inocuité, la tolérance et le profil pharmacocinétique du MEDI4736 ou *durvalumab*, anticorps anti-PD-L1, chez des patients atteints de tumeurs solides avancées (NCT01693562).

Le MEDI4736 est un anticorps monoclonal humain IgG1/kappa qui bloque la liaison de PD-L1 avec ses récepteurs PD-1 et B7.1 (ou CD80).

L'essai PCD4989g (PCD), phase I, étudie chez des patients atteints de tumeurs solides avancées, la sécurité et les caractéristiques pharmacocinétiques du MPDL3280A ou *atezolizumab*, anticorps monoclonal anti-PD-L1 (NCT01375842). Le MPDL3280A est un anticorps monoclonal humain de type IgG1/kappa qui bloque l'interaction PD-L1/PD-1 et PD-L1/B7.1.

Echantillons de tissus tumoraux

Les patients éligibles pour un de ces 3 essais devaient avoir un échantillon tumoral disponible pouvant correspondre soit à du tissu archivé soit à une biopsie récente. Cet échantillon devait être transmis sous forme d'un bloc fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE), ou sous forme de lames non colorées.

Dans l'essai MK3475, l'échantillon devait provenir d'une lésion non irradiée.

Dans l'essai PCD, l'échantillon devait provenir d'une exérèse ou d'une biopsie à l'aiguille, les cytoponctions, les liquides de lavage et les brossages n'étaient pas acceptés.

Méthodes de détermination du statut PD-L1

Le statut PD-L1 était déterminé de façon centralisée par le laboratoire promoteur de l'essai, selon une méthode immunohistochimique (IHC).

L'essai MK3475 utilisait un anticorps monoclonal de souris anti-PD-L1 humain, le clone 22C3 de *Dako*. L'échantillon était considéré comme positif pour PD-L1 si >1% des cellules tumorales étaient marquées, quel que soit l'intensité du marquage.

MedImmune, utilisait un anticorps monoclonal de lapin anti-PD-L1 humain, le SP263 de *Ventana (Roche)*, avec un seuil de positivité fixé à > 25% des cellules tumorales.

L'anticorps utilisé dans PCD, le SP142 de *Genentech (Roche)*, est un anticorps monoclonal de lapin. Dans cet essai, le statut PD-L1 de l'échantillon était déterminé selon un score à 4 niveaux, prenant en compte la fixation de l'anticorps sur les cellules immunitaires (IC) infiltrant la tumeur. Les échantillons IC2 et IC3, correspondant à >5% de cellules marquées, étaient considérés comme positifs. Les échantillons IC1 et IC0 étaient classés PD-L1 négatifs.

Recueil des données

Pour chaque patient, les données démographiques (âge, sexe), cliniques (cancer primitif, type histologique, chronologie de la maladie métastatique) et thérapeutiques (nombre de lignes de traitement en phase métastatique, traitement antérieur local de type radiothérapie ou radiofréquence ou cryothérapie, traitement antérieur par thérapie ciblée, traitement antérieur dans le cadre d'un essai de phase I) étaient recueillies à partir du dossier médical.

Les caractéristiques de l'échantillon tumoral étaient collectées : lieu de l'analyse anatomopathologique initiale (dans un centre académique ou un centre privé), type de lésion prélevée (tumeur primitive, métastase ou rechute locorégionale après traitement locaux), tissu prélevé, méthode du prélèvement (pièce opératoire, biopsie ou copeaux de résection), pourcentage de cellules tumorales du prélèvement, ancienneté du prélèvement (en nombre de mois) et caractère pré-thérapeutique (antérieur à tout traitement) ou post-thérapeutique du prélèvement.

L'essai dans lequel le patient était évalué, ainsi que le résultat de l'analyse centralisée du statut PD-L1, étaient recueillis auprès du promoteur. Certains patients ont été testés à 2 reprises dans le même essai ou successivement dans deux essais, les statuts PD-L1 issus de ces différentes déterminations ont été confrontés.

Revue de la littérature

Une recherche a été effectuée à partir de la base de données pubmed en utilisant les termes « PD-1 », « PD-L1 », « pembrolizumab », « lambrolizumab », « MK3475 », « PCD4989 », « MPDL3280A », « atezolizumab », « Medi4736 » et « durvalumab ». Cette recherche a également été effectuée parmi les abstracts des congrès annuels de l'ASCO et de l'European Society for Medical Oncology (ESMO) sur leurs sites internet.

Analyse statistique

L'objectif principal de cette étude rétrospective était de comparer les populations PD-L1 positive et PD-L1 négative afin de rechercher des facteurs cliniques, anatomopathologiques ou immunohistochimiques susceptibles d'influencer le statut PD-L1. L'objectif secondaire était de comparer la prévalence de la positivité PD-L1 parmi les patients traités à Gustave Roussy, par rapport aux données des essais internationaux.

Les résultats sont donnés en effectif et pourcentage en cas de variable qualitative et en médiane et intervalle interquartile pour les variables quantitatives. Les données qualitatives

ont été analysées en utilisant un test du Chi 2. Les variables pour lesquelles l'effectif de patients était inférieur à 10, ont été exclues des analyses statistiques. Les données continues ont été analysées en utilisant le test t de Student. Les variables pour lesquelles le test du Chi-2 était statistiquement significatif avec un $p < 0,15$ ont été incluses pour les analyses uni et multivariées. Ces analyses ont été réalisées en utilisant une régression logistique descendante pour rechercher des facteurs associés à la positivité du statut PD-L1. Toutes les valeurs de p sont bilatérales. Le seuil de significativité a été fixé à une valeur de $p < 0,05$. L'analyse a été réalisée avec le logiciel SPSS version 23.

IV. Résultats

Caractéristiques des patients

Entre janvier 2014 et juillet 2015, 346 patients ont été évalués dans le cadre des essais de phase I anti-PD-1/PD-L1, MK3475, MedImmune et PCD, à Gustave Roussy. 32 patients ont été exclus d'emblée, le plus souvent du fait de l'absence d'échantillon tumoral contributif pour la détermination immunohistochimique du statut PD-L1. Parmi les 314 patients testés dans le cadre de ces essais, le statut PD-L1 est resté indéterminé pour 5 d'entre eux.

Au total, 309 patients dont le statut PD-L1 a été déterminé dans le cadre d'un des 3 essais MK3475, MedImmune ou PCD, ont été inclus dans notre étude (Figure 8). Les caractéristiques des patients et des échantillons tumoraux, pour l'ensemble de la population et pour chaque essai considéré, sont présentées dans les tableaux 6 et 7. Les types de cancer primitifs variaient en fonction des pathologies admises à l'inclusion dans les différents essais. En dehors de ce paramètre, les populations des 3 essais étaient comparables.

Comme attendu dans un essai de phase I, la population était majoritairement pré-traitée, avec une médiane de lignes de traitements reçues en phase métastatique de 3. 17% des patients étaient âgés de plus de 70 ans.

Concernant le prélèvement histologique, il s'agissait majoritairement (83%) de prélèvements de plus de 3 mois. Le délai médian entre le prélèvement et la détermination du statut PD-L1 était de 13,9 mois, variant de 4 jours à 13 ans. Plus de la moitié (58%) avaient été obtenus chez des patients déjà exposés à des traitements systémiques. Dans 2/3 des cas, le prélèvement provenait de la tumeur primitive.

Six patients ont été testés pour le statut PD-L1 à 2 reprises dans l'essai MK3475, à partir de prélèvements différents. Treize patients ont été testés successivement dans deux essais différents.

Figure 8 : Flow chart

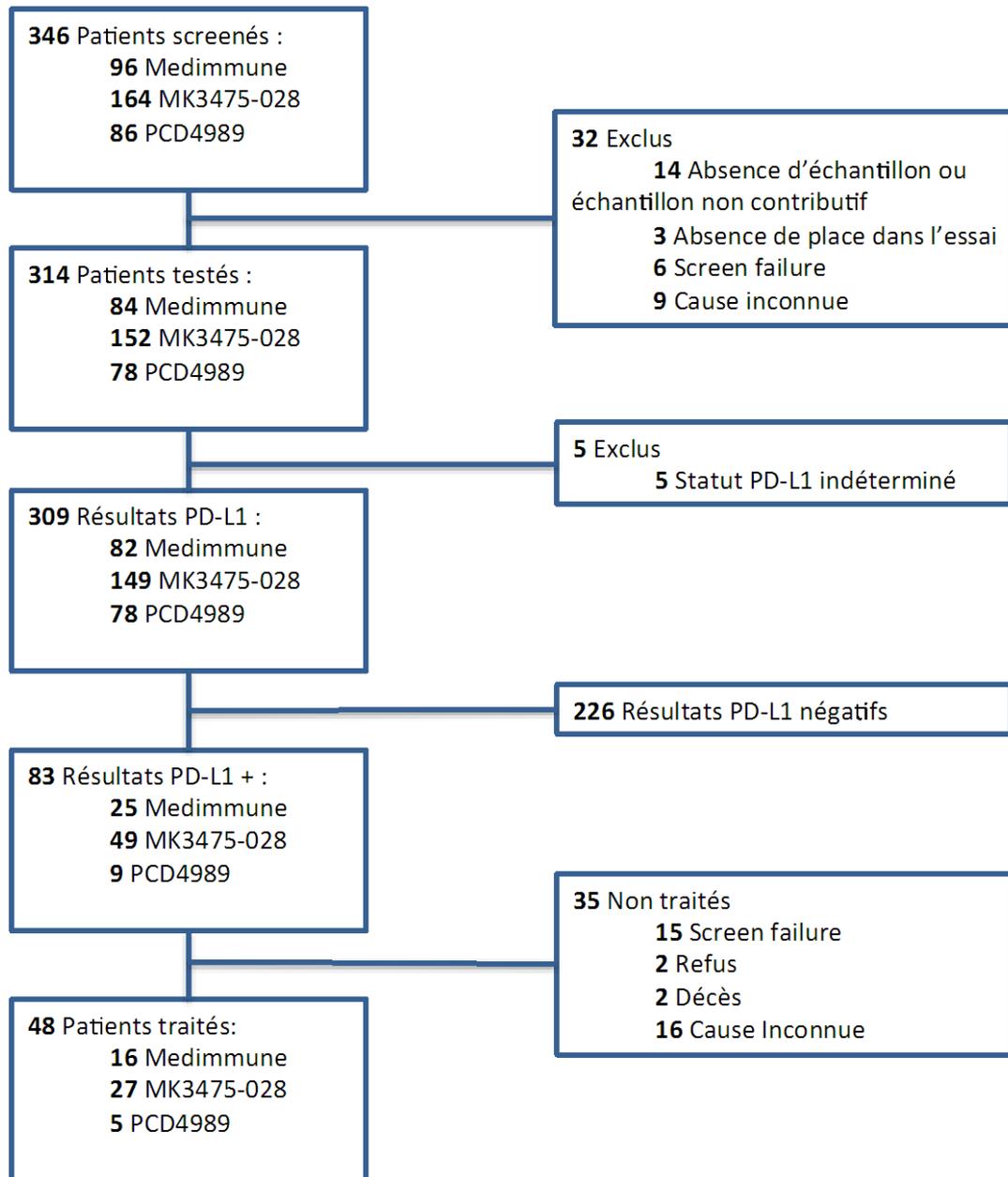


Tableau 6 : Caractéristiques cliniques des patients à l'inclusion pour la population totale (n=309) et pour chaque essai.

Résultats exprimés en médiane [intervalle interquartile] ou effectif (fréquence).

Caractéristiques		MedImmune n = 82	MK3475 n = 149	PCD n = 78	Total n=309
Age (ans)	Médiane	61 [49-68]	61 [52-68]	56 [45-65]	60 [50-67]
Age > 70 ans	Oui	14 (17%)	27 (18%)	11 (14%)	52 (17%)
	Non	68 (83%)	122 (82%)	67 (86%)	257 (83%)
Sexe	Homme	34 (41%)	78 (52%)	39 (50%)	151 (49%)
	Femme	48 (59%)	71 (48%)	39 (50%)	158 (51%)
Cancer	Oeso-gastrique	19 (23%)	1 (1%)	3 (4%)	23 (7%)
	Col		10 (7%)	2 (3%)	12 (4%)
	Endomètre		7 (5%)		7 (2%)
	Ovaire	18 (22%)	7 (5%)		25 (9%)
	Sein	15 (18%)	6 (4%)	27 (35%)	48 (16%)
	Neuroendocrine		23 (15%)		23 (7%)
	Poumon à PC		23 (15%)	1 (1%)	24 (8%)
	Poumon NPC	9 (11%)		1 (1%)	10 (3%)
	Glioblastome		15 (10%)	1 (1%)	16 (5%)
	ORL		8 (5%)	11 (14%)	19 (6%)
	Prostate		31 (21%)		31 (10%)
	Vessie	21 (26%)		26 (33%)	47 (15%)
	Autres		18 (12%)	6 (8%)	24 (8%)
Histologie	ADK	33 (40%)	50 (34%)	5 (6%)	88 (28%)
	CE	12 (15%)	11 (7%)	8 (10%)	31 (10%)
	CCI	13 (16%)	4 (3%)	26 (34%)	43 (14%)
	CU	17 (21%)		26 (34%)	43 (14%)
	TNE		23 (15%)		23 (8%)
	Carcinome à PC		23 (15%)	1 (1%)	24 (8%)
	Autres	7 (8%)	38 (26%)	12 (15%)	57 (18%)
Maladie d'emblée métastatique	Oui	34 (42%)	77 (52%)	23 (29%)	132 (43%)
	Non	48 (58%)	72 (48%)	55 (71%)	174 (57%)
Lignes de traitement métastatique	Médiane	3 [2-4]	3 [1-4]	2 [1-3.25]	3 [1-4]
Traitement local antérieur (radiothérapie, radiofréquence)	Oui	32 (39%)	89 (60%)	52 (67%)	174 (56%)
	Non	50 (61%)	60 (40%)	26 (33%)	135 (44%)
Thérapie ciblée antérieure	Oui	45 (55%)	47 (32%)	37 (47%)	124 (41%)
	Non	37 (45%)	102 (68%)	41 (53%)	176 (59%)
Essai de phase I antérieur	Oui	13 (16%)	20 (13%)	5 (6%)	38 (12%)
	Non	69 (84%)	129 (87%)	73 (94%)	271 (88%)

Autres cancers = canal anal, voies biliaires, pancréas, mésothéliome, rein, thyroïde.

ADK Adénocarcinome, CCI Carcinome canalaire infiltrant, CE Carcinome épidermoïde, CU Carcinome urothélial, NPC Non à petites cellules, PC Petites cellules, TNE Tumeur neuro-endocrine

Tableau 7 : Caractéristiques anatomopathologiques des échantillons tumoraux pour la population totale (n=309) et pour chaque essai.

Résultats exprimés en effectif (fréquence).

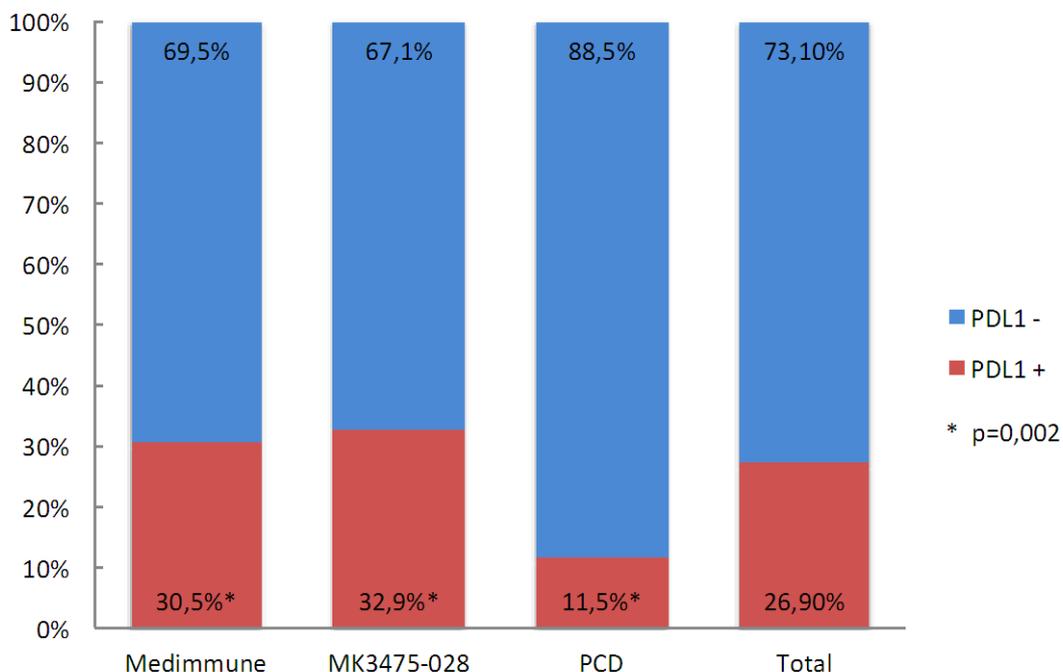
Caractéristiques n (%)		MedImmune n = 82	MK3475 n = 149	PCD n = 78	Total
Prélèvement de < 3 mois	Oui	20 (25%)	14 (9%)	16 (20%)	50 (16%)
	Non	61 (74%)	134 (90%)	62 (80%)	257 (83%)
	ND	1 (1%)	1 (1%)		2 (1%)
Ancienneté du prélèvement	< 3 mois	20 (25%)	14 (9%)	16 (20%)	50 (16%)
	3-6 mois	11 (13%)	8 (5%)	5 (7%)	24 (8%)
	6-12 mois	13 (16%)	28 (19%)	16 (20%)	57 (19%)
	12-18 mois	9 (11%)	20 (13%)	14 (18%)	43 (14%)
	> 18 mois	28 (34%)	78 (53%)	27 (35%)	133 (43%)
ND	1 (1%)	1 (1%)		2 (1%)	
Prélèvement pré- thérapeutique	Oui	35 (43%)	106 (71%)	37 (47%)	178 (58%)
	Non	44 (54%)	35 (24%)	39 (50%)	118 (38%)
	ND	3 (3%)	8 (5%)	2 (3%)	13 (4%)
Lieu de l'analyse anatomopathologique	Centre académique	43 (53%)	91 (61%)	45 (58%)	179 (58%)
	Centre privé	37 (45%)	54 (36%)	32 (41%)	123 (40%)
	ND	2 (2%)	4 (3%)	1 (1%)	7 (2%)
Site du prélèvement	Tumeur primitive	45 (55%)	107 (72%)	52 (67%)	204 (66%)
	Métastase	34 (41%)	35 (23%)	23 (29%)	92 (30%)
	Rechute LR	3 (4%)	7 (5%)	3 (4%)	13 (4%)
Méthode de prélèvement	Biopsie	50 (61%)	82 (55%)	39 (50%)	171 (56%)
	Pièce opératoire	27 (33%)	58 (39%)	33 (42%)	118 (38%)
	Copeaux de résection	4 (5%)	6 (4%)	6 (8%)	16 (5%)
	ND	1 (1%)	3 (2%)		4 (1%)
Pourcentage de cellules tumoraux	1-20%	10 (12%)	12 (8%)	6 (8%)	28 (9%)
	21-40%	22 (27%)	28 (19%)	13 (17%)	63 (20%)
	41-60%	22 (27%)	12 (8%)	5 (6%)	39 (13%)
	61-80%	19 (23%)	38 (26%)	14 (18%)	71 (23%)
	81-100%	6 (7%)	11 (7%)	3 (4%)	20 (6%)
	ND	3 (4%)	48 (32%)	37 (47%)	88 (29%)
Localisation métastatique prélevée (n=92)	Adénopathie	8 (24%)	12 (34%)	11 (50%)	31 (34%)
	Foie	6 (18%)	14 (40%)	2 (9%)	23 (25%)
	Masse pariétale	8 (24%)	1 (3%)	4 (18%)	13 (13%)
	Autres	12 (36%)	8 (23%)	5 (23%)	26 (28%)

LR Loco-régionale, ND Non disponible.

Prévalence du statut PD-L1 +

Au total, 83 patients avaient un statut PD-L1+, soit 26,9% de la population totale. Cette prévalence de positivité du statut PD-L1 variait de façon statistiquement significative entre les essais, avec une diminution de cette prévalence pour PCD (11,5%) par rapport à MK3475 (32,9%) et à MedImmune (30,5%) ($p=0,002$) (Figure 9).

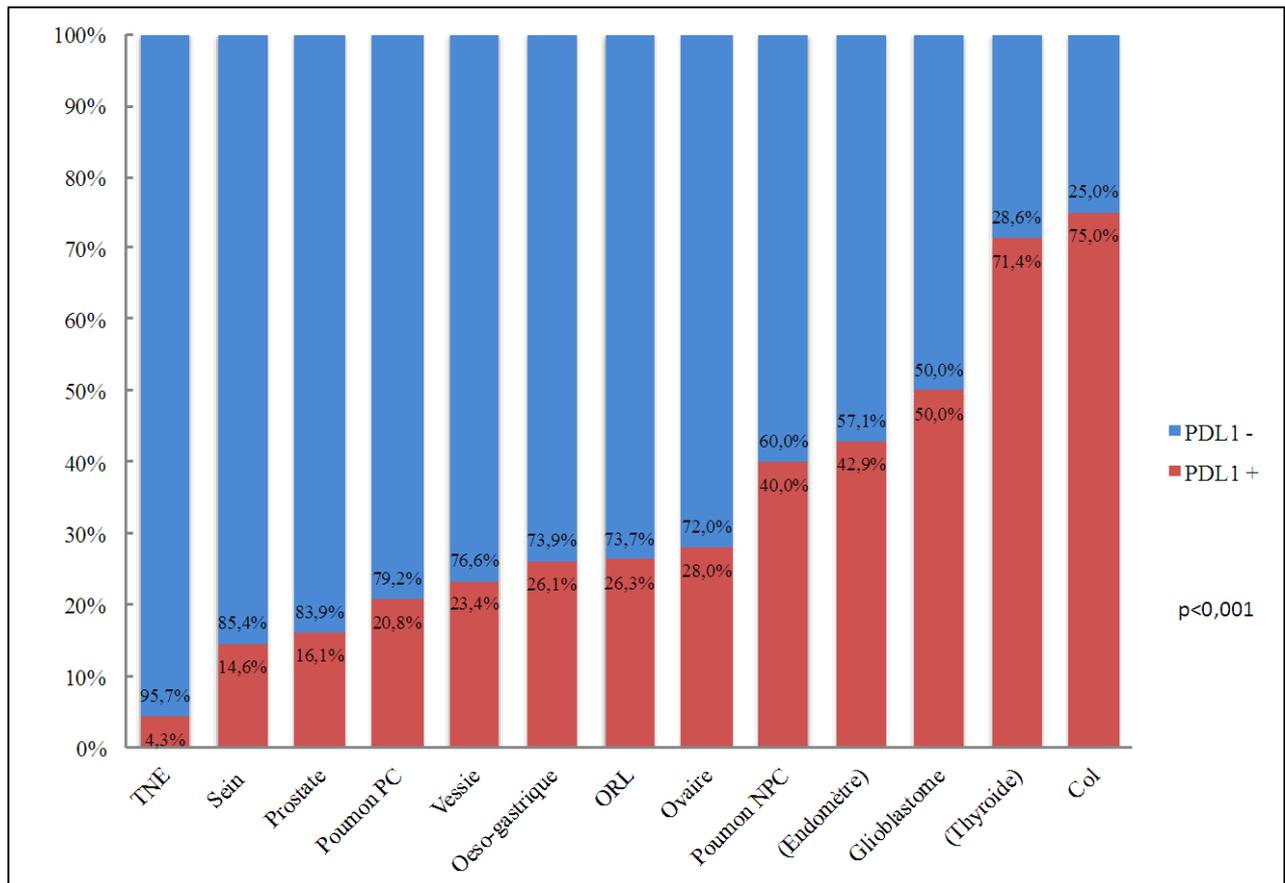
Figure 9 : Prévalence du statut PD-L1+ et PD-L1- dans la population totale et en fonction du protocole. Comparaison de la prévalence du statut PD-L1+ dans les différents protocoles par un test du chi-deux.



Prévalence du statut PD-L1 + en fonction du cancer primitif

La prévalence du statut PD-L1+ variait également selon le type de cancer (Figure 10). La figure 10 représente tous les types tumoraux pour lesquels l'effectif était supérieur à 7. Pour l'analyse statistique, seuls les types tumoraux correspondant à un effectif supérieur à 10 ont été considérés. La positivité la plus faible était retrouvée pour les tumeurs neuro-endocrines avec un taux de 4,3% ; et la plus forte était observée pour les cancers du col avec 75% de tumeurs PD-L1+. La différence de prévalence du statut PD-L1 en fonction du type tumoral était statistiquement significative ($p<0,001$).

Figure 10 : Prévalence du statut PD-L1+ et PD-L1- en fonction du type de cancer. Comparaison de la prévalence du statut PD-L1+ par un test du chi-deux. Les localisations citées entre parenthèses n'ont pas été prises en compte dans l'analyse du fait de leur faible effectif.



NPC Non à petites cellules, PC Petites cellules, TNE Tumeur neuro-endocrine,

Comparaison de la prévalence du statut PD-L1+ dans la population GR par rapport aux résultats des essais internationaux

La prévalence du statut PD-L1 à l'échelle internationale pour les essais MK3475, MedImmune et PCD a déjà été rapportée dans la littérature pour certains types tumoraux. Seuls les essais utilisant les mêmes seuils de positivité PD-L1 que ceux de notre étude, ont été retenus pour le tableau 8. Pour un même type tumoral, la positivité de PD-L1 varie de façon importante en fonction de l'essai considéré. Dans la littérature, quel que soit le type tumoral, les prévalences de statut PD-L1+ les plus élevées sont retrouvées dans l'essai MK3475 et les plus faibles dans l'essai PCD. La proportion de positivité observée parmi la population prise

en charge à Gustave Roussy, était le plus souvent inférieure aux prévalences rapportées dans la littérature (Tableau 8). Dans la population Gustave Roussy, la même répartition de prévalence était observée, avec une positivité de PD-L1 plus fréquente dans MK3475 et moindre dans PCD.

Tableau 8 : Comparaison de la prévalence PD-L1+ dans les essais internationaux et dans la population de Gustave Roussy.

	Essais internationaux			Population Gustave Roussy			
	MedImmune	MK3475	PCD	MedImmune	MK3475	PCD	Total
Poumon NPC	37 - 48%	66 – 86 %	20-25%	44%			40,9%
Poumon PC		28,6%			21,7%		20,8%
ORL	35,5%	78 - 93%	28%		37,5%	18,2%	30,8%
Oeso-gastrique		40-45%	18%	21,1%			26,1%
Vessie	36%	62%	27-46%	47,6%		3,8%	23,4%
Ovaire		51%		22,2%	42,9%		28%
Sein		58,6%		20%		11%	14,6%
<i>Références</i>	(55-57,97)	(38-42,59,64,98,99)	(46,48-50,95)				

CE Carcinome épidermoïde, NPC Non à petites cellules, PC Petites cellules

Concordance du statut PD-L1 en cas de déterminations multiples

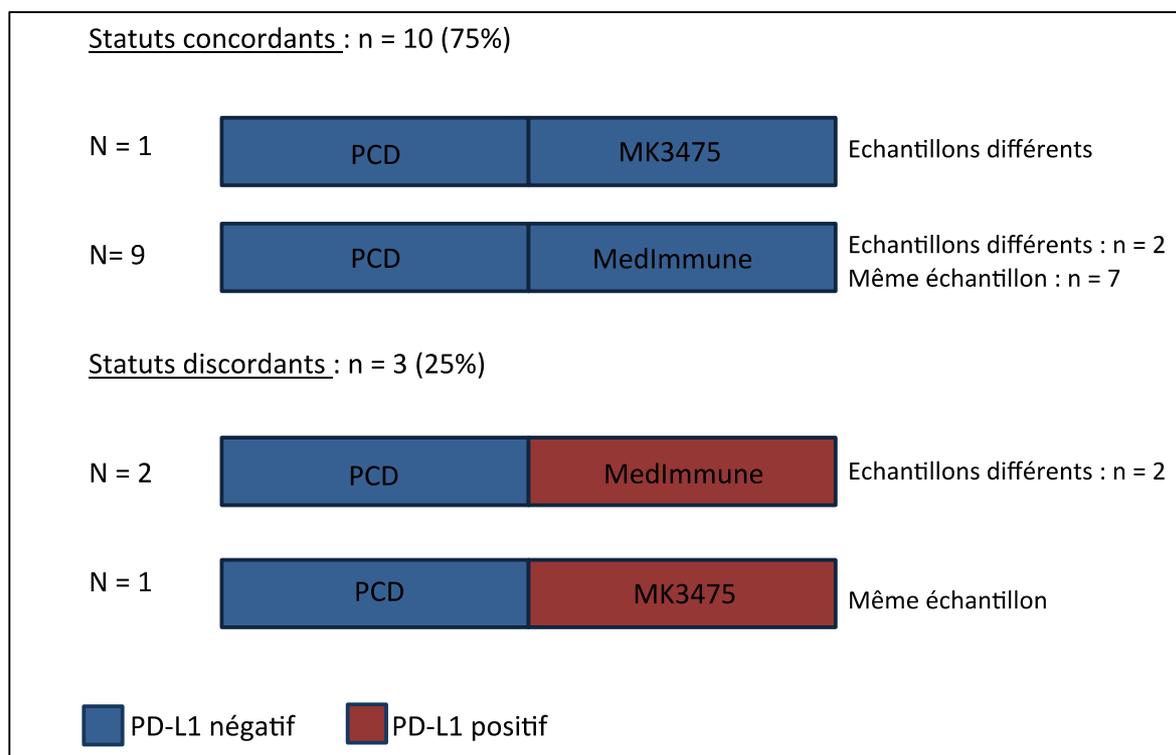
Dans l'essai MK3475, six patients ont été testés deux fois pour le statut PD-L1, à partir d'échantillons histologiques différents. Quatre d'entre eux avaient initialement un statut indéterminé et ont dû être testés à nouveau pour cette raison. Lors de cette deuxième détermination, 3 sur 4 étaient PD-L1 négatifs, et un seul PD-L1 positif. Les deux autres patients étaient PD-L1- dès la première détermination, et la deuxième analyse, réalisée sur un autre échantillon, a confirmé ce résultat.

Par ailleurs, 13 patients ont été testés successivement dans deux essais différents. Dans 75% des cas, le résultat était concordant et le patient était PD-L1- quel que soit l'essai. Pour 3 patients sur 13, le résultat était discordant : ces patients étaient PD-L1- d'après l'essai PCD et

PD-L1+ d'après MedImmune pour deux d'entre eux et MK3475 pour le troisième patient. Ces cas discordants avaient été déterminés dans 2 cas sur 3 à partir du même échantillon tumoral (Figure 11).

Parmi les 7 patients testés successivement sur 2 échantillons différents, dans le même essai ou dans des essais différents, l'expression de PD-L1 était concordante dans 5 cas sur 7. Les 2 cas discordants avaient été testés dans des essais différents.

Figure 11 : Concordance du statut PD-L1 en cas de déterminations multiples



Caractéristiques des populations PD-L1 + et PD-L1 -

La comparaison des populations PD-L1- et PD-L1+ prises en charge à GR ne mettait pas en évidence de différence concernant l'âge, le sexe, l'ancienneté de l'échantillon histologique, la proportion d'échantillons antérieurs à tout traitement systémique, le lieu de l'analyse anatomopathologique initiale (en centre académique ou en centre privé), et la cellularité du prélèvement (Tableau 9).

Pour le site de prélèvement, il n'existait pas de différence de positivité PD-L1 entre tumeur primitive et métastases. Les prélèvements provenant d'une rechute locorégionale

avaient tendance à être plus fréquemment PD-L1+, sans que cette différence soit statistiquement significative.

Concernant la méthode de prélèvement utilisée, aucune différence de prévalence du statut PD-L1+ n'était observée, que la détermination soit réalisée à partir d'une biopsie ou d'une pièce d'exérèse complète. La détermination du statut PD-L1 à partir de copeaux de résection (résection trans-urétrale de prostate ou de vessie, ou curetage biopsique) était associée à une prévalence moindre d'échantillons PD-L1+, non statistiquement significative.

Pour 92 patients, la détermination de PD-L1 a été réalisée à partir d'un échantillon issu d'une localisation métastatique. Les localisations les plus fréquentes correspondaient à des adénopathies, du tissu hépatique et des métastases tissulaires pariétales. La positivité des prélèvements n'était pas statistiquement différente selon le tissu prélevé, néanmoins la positivité de PD-L1 était moins fréquente pour les prélèvements hépatiques (12%).

Le seul paramètre qui différait statistiquement entre les populations PD-L1+ et PD-L1- concernait le type histologique ($p=0,009$). La positivité était plus fréquente pour les carcinomes épidermoïdes (45%) et moins fréquente pour les tumeurs neuro-endocrines (4%) et les carcinomes canauxaires infiltrants (14%).

Tableau 9 : Caractéristiques des populations PD-L1+ et PD-L1-

Résultats exprimés en médiane [intervalle interquartile] ou effectif (fréquence).

Caractéristiques		PD-L1- n=226 (73%)	PD-L1+ n=83 (27%)	p
Age	Moyenne	58,3	58,3	0,993
Age > 70 ans (n=309)	Oui Non	186 (72%) 40 (77%)	71 (28%) 12 (23%)	0,5
Sexe (n=309)	Homme Femme	110 (73%) 116 (73%)	41 (27%) 42 (27%)	0,91
Histologie (n=261)	ADK CE CCI CU TNE Carcinome à PC	67 (76%) 17 (55%) 37 (86%) 33 (77%) 22 (96%) 19 (79%)	21 (24%) 14 (45%) 6 (14%) 10 (23%) 1 (4%) 5 (21%)	0,009*
Prélèvement de < 3 mois (n=307)	Oui Non	36 (72%) 189 (74%)	14 (28%) 68 (26%)	0,822
Ancienneté du prélèvement (n=307)	< 3 mois 3-6 mois 6-12 mois 12-18 mois > 18 mois	36 (72%) 18 (75%) 43 (75%) 25 (58%) 103 (77%)	14 (28%) 6 (25%) 14 (25%) 18 (42%) 30 (23%)	0,169
Prélèvement pré-thérapeutique (n=296)	Oui Non	130 (73%) 87 (74%)	48 (27%) 31 (26%)	0,895
Lieu de l'analyse anatomopathologique (n=302)	Centre académique Centre privé	134 (75%) 87 (71%)	45 (25%) 36 (29%)	0,426
Site du prélèvement (n=309)	Tumeur primitive Métastase Rechute loco-régionale	149 (73%) 70 (76%) 7 (54%)	55 (27%) 22 (24%) 6 (46%)	0,238
Méthode de prélèvement (n=305)	Biopsie Pièce opératoire Copeaux de résection	125 (73%) 85 (72%) 13 (81%)	46 (27%) 33 (28%) 3 (19%)	0,609
Pourcentage de cellules tumorales (n=221)	1-20% 21-40% 41-60% 61-80% 81-100%	23 (82%) 43 (68%) 26 (67%) 51 (72%) 14 (70%)	5 (18%) 20 (32%) 13 (33%) 20 (28%) 6 (30%)	0,738
Localisations métastatiques prélevées (n=92)	Adénopathie Foie Masse pariétale	20 (65%) 22 (88%) 11 (73%)	11 (35%) 3 (12%) 4 (27%)	0,132

ADK Adénocarcinome, CCI Carcinome canalaire infiltrant, CE Carcinome épidermoïde, CU Carcinome urothélial, NPC Non à petites cellules, PC Petites cellules, TNE Tumeur neuro-endocrine

* Résultat statistiquement significatif

Facteurs associés à la positivité du statut PD-L1

Les paramètres précédemment décrits pour lesquels il existait une différence de prévalence PD-L1+ avec un $p < 0,15$, ont été intégrés dans des analyses uni puis multivariées afin d'identifier des facteurs susceptibles d'influencer le statut PD-L1 (Tableau 10). Il s'agissait du protocole, du cancer primitif, du type histologique et du tissu prélevé pour les localisations métastatiques.

En analyse univariée, le protocole, le cancer primitif et le type histologique était associés de manière significative au statut PD-L1 avec respectivement $p = 0,003$; $p = 0,006$ et $p = 0,023$. Parmi les protocoles, l'essai PCD était associé à une moindre positivité de PD-L1 (Odds Ratio [OR] = 0,29; IC95% [0,13-0,69]). Pour les types de cancer, le cancer du col était associé à une augmentation de la positivité de PD-L1 ([OR]: 8,5; IC95% [1,71-42,28]). Enfin concernant le type histologique, c'est le carcinome épidermoïde qui apparaissait comme un facteur de positivité ([OR] = 2,63 IC95% [1,11-6,21]). Les tumeurs neuro-endocrines avaient tendance à être associées à une négativité de PD-L1, non statistiquement significative. De la même façon, le tissu prélevé pour les localisations métastatiques n'étaient pas significativement associé au statut PD-L1, néanmoins les prélèvements hépatiques étaient un facteur de négativité.

En analyse multivariée, le protocole et le type histologique restaient statistiquement significatifs, confirmant l'association du protocole PCD à une moindre positivité de PD-L1 ([OR] = 0,14 IC95% [0,05-0,43], $p = 0,001$) et l'association des carcinomes épidermoïdes au contraire à la positivité de PD-L1 ([OR] = 4,29 IC95% [1,61-11,38], $p = 0,008$). En analyse multivariée, les carcinomes urothéliaux apparaissaient aussi statistiquement associés à la positivité de PD-L1.

Tableau 10 : Facteurs prédictifs du statut PD-L1

Variable	Analyse univariée OR [IC 95%]	p	Analyse multivariée OR [IC 95%]	p
Protocole		0.003		0.001
MedImmune	1		1	
MK3475	1.12 [0.62-1.99]		1.50 [0.64-3.55]	
PCD	0.29 [0.13-0.69]		0.14 [0.05-0.43]	
Type de cancer		0.006		
Oeso-gastrique	1			
Col	8.50 [1.71-42.28]			
Ovaire	1.10 [0.31-3.95]			
Neuroendocrine	0.13 [0.01-1.17]			
Poumon à petites cellules	0.75 [0.19-2.89]			
Poumon non à petites cellules	1.89 [0.39-9.09]			
Glioblastome	2.83 [0.73-10.94]			
ORL	1.01 [0.25-4.03]			
Prostate	0.55 [0.14-2.07]			
Vessie	0.86 [0.27-2.73]			
Sein	0.48 [0.14-1.65]			
Histologie		0.023		0.008
ADK	1		1	
CE	2.63 [1.11-6.21]		4.29 [1.61-11.38]	
CCI	0.52 [0.19-1.40]		1.51 [0.48-4.70]	
CU	0.97 [0.41-2.29]		3.32 [1.09-10.07]	
TNE	0.15 [0.02-1.14]		0.13 [0.02-1.06]	
Carcinome PC	0.84 [0.28-2.52]		0.79 [0.24-2.55]	
Localisations métastatiques (n=92)		0.08		
Adénopathie	1			
Foie	0.09 [0.1-0.73]			
Masse pariétale	0.81 [0.20-3.24]			

ADK Adénocarcinome, CCI Carcinome canalaire infiltrant, CE Carcinome épidermoïde, CU Carcinome urothélial, NPC Non à petites cellules, PC Petites cellules, TNE Tumeur neuro-endocrine

V. Discussion

A. Facteurs associés au statut PD-L1

L'identification d'un biomarqueur d'efficacité des inhibiteurs de l'axe PD-1/PD-L1 est un enjeu majeur actuellement. Le statut PD-L1 en immunohistochimie fait partie des biomarqueurs potentiels les plus étudiés, même si les résultats concernant sa valeur prédictive sont discordants. Afin de préciser les performances prédictives du statut PD-L1, il est nécessaire d'identifier les facteurs susceptibles d'influencer la positivité du statut PD-L1.

Dans ce travail rétrospectif réalisé sur une cohorte de 309 patients atteints de tumeurs solides avancées ou métastatiques, traités à Gustave Roussy dans le cadre d'un essai clinique d'immunothérapie, le principal facteur corrélé à la positivité du statut PD-L1 est l'essai clinique considéré, MedImmune, MK3475 ou PCD ($p=0,001$ en analyse multivariée). Ceci reflète l'impact des paramètres immunohistochimiques de détermination du statut PD-L1. Des facteurs anatomopathologiques, tels que le type tumoral et le sous-type histologique sont aussi associés au statut PD-L1 en analyse univariée, mais seul le type histologique reste significatif en multivarié. Enfin, parmi le sous-groupe de patients pour lesquels le statut PD-L1 a été déterminé à partir d'une localisation métastatique, le site métastatique biopsié est corrélé au statut PD-L1, avec notamment une tendance des métastases hépatiques à être plus fréquemment PD-L1 négatives en analyse univariée. Dans la littérature, de nombreuses études se sont intéressées aux paramètres associés à la positivité du statut PD-L1 avec des résultats discordants selon les paramètres considérés. L'impact sur le statut PD-L1, de différents paramètres liés à la méthode analytique et à l'échantillon analysé, ainsi que de facteurs histologiques et cliniques mérite d'être discuté.

1. Influence des paramètres immunohistochimiques :

Dans notre étude, les patients avaient statistiquement moins de chance d'être identifiés PD-L1 positifs en IHC et donc d'accéder à l'immunothérapie, quand ils étaient évalués dans le cadre du protocole PCD. Différents paramètres méthodologiques lors de la détermination immunohistochimique de l'expression de PD-L1 ont pu participer à cette différence :

- Les anticorps :

Les anticorps utilisés pour la détection de PD-L1 ne sont pas les mêmes selon les essais, or peu de données comparatives sont disponibles concernant les caractéristiques intrinsèques de ces anticorps. Il est probable que ces anticorps qui ciblent des épitopes différents de la protéine (intra ou extracellulaire), aient des performances différentes, en termes d'affinité ou de réactivité croisée (100). Par exemple, McLaughlin et al, ont comparé les performances en IHC de 3 anticorps, ciblant soit le domaine intracellulaire de PD-L1, E1L3N et SP142 (qui est le test compagnon de l'atezolizumab), soit le domaine intracellulaire avec le E1J2J. Les résultats ont montré une variabilité importante entre les méthodes, même lors de la comparaison des performances des deux anticorps dirigés contre le domaine intracellulaire. Inversement, Ratcliffe et al ont présenté au congrès 2016 de l'AACR (American Association for Cancer Research) les résultats de la comparaison de 3 anticorps développés comme tests compagnons : le SP263 (associé au durvalumab, avec un seuil de positivité à 25%), le 22C3 (associé au pembrolizumab, avec un seuil à 50%) et le 28-8 (associé au nivolumab, avec un seuil à 10%). Cette fois, la concordance était très bonne, estimée à 90%. Néanmoins, la comparaison s'intéressait ici uniquement à des anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire de PD-L1 et n'incluait pas le test compagnon de l'atezolizumab, dont la spécificité pour le domaine intracellulaire pourrait expliquer des différences de performance (101).

- Les méthodes de détection :

Selon les méthodes de détection, l'expression de PD-L1 mesurée peut être membranaire ou cytoplasmique : il est probablement plus logique de prendre en compte l'expression membranaire qui correspond à la forme active de la protéine. C'est le cas de l'ensemble des tests développés actuellement. Néanmoins, Mahoney et al ont décrit que les anticorps dirigés contre le domaine intra-cellulaire de PD-L1 permettaient de mieux individualiser ce marquage membranaire, par rapport aux anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire, qui seraient responsables d'une fixation cytoplasmique associée plus importante. Ainsi, même si c'est toujours l'expression membranaire de la protéine qui est évaluée, l'importance de la fixation cytoplasmique associée pourrait gêner l'interprétation et expliquer certaines différences de performances des tests (102).

- Le marquage :

Par ailleurs, différentes topographies de marquage peuvent être observées, diffus ou focal, n'ayant peut être pas la même signification histologique. En effet, un marquage diffus pourrait correspondre à l'expression constitutive de PD-L1 du fait d'une voie de signalisation oncogénique, expression qui est moins souvent associée à un infiltrat inflammatoire. Inversement, un marquage focal pourrait correspondre à une zone de réaction immunitaire induisant l'expression de PD-L1 à ce niveau, en réaction à un infiltrat lymphocytaire producteur de cytokines, ce qui pourrait avoir une meilleure valeur prédictive (103).

- L'intensité de marquage:

L'intensité de marquage acceptée diffère aussi selon les méthodes. Ainsi, pour le nivolumab et le pembrolizumab, une faible intensité de marquage suffit à considérer le statut positif. Par contre, pour l'atezolizumab, il faut au moins une intensité de marquage modérée pour définir la positivité. Cet élément pourrait être en cause dans la différence de prévalence de patients PD-L1 positifs observée dans notre étude.

- Les cellules marquées :

Les cellules prises en compte pour la détection en IHC (cellules tumorales ou cellules immunitaires) sont une autre source de variabilité. L'expression simultanée de PD-L1 au niveau de ces 2 types cellulaires est rare (48), et il faut donc déterminer quelle expression doit être privilégiée. Le plus souvent, seule l'expression de PD-L1 au niveau des cellules tumorales est prise en compte. En effet, pour le pembrolizumab, le marquage des cellules immunitaires n'améliorait pas les performances de la méthode et n'a pas été retenu (83). De même pour le nivolumab, c'est l'expression de PD-L1 au niveau des cellules tumorales seulement, qui obtenait la meilleure corrélation avec la réponse (86). Pour l'atezolizumab au contraire, le marquage des cellules immunitaires infiltrant la tumeur a été privilégié car il montrait une meilleure association avec la réponse clinique en phase I (46). Certains essais ont associé ensuite le marquage des cellules immunitaires et tumorales (48,94). L'essai de phase II des carcinomes urothéliaux, a confirmé cette association entre réponse et positivité de PD-L1 sur les cellules immunes (49); mais la phase II des cancers bronchiques, a retrouvé une association au statut PD-L1 des cellules immunes et des cellules tumorales (48). Cette différence méthodologique dans le choix des cellules considérées, peut être impliquée également dans la plus faible prévalence de l'expression PD-L1 dans la cohorte PCD de notre étude. Avec les cellules immunitaires, une limite reste que l'identification précise des cellules

concernées par l'expression de PD-L1 est souvent impossible, et que la localisation de ces cellules au sein de l'échantillon pourrait aussi être à prendre en compte.

- Le seuil de positivité:

Enfin, les seuils de positivité varient selon les études de 1 à 50%, ce qui participe certainement aux importantes variations de prévalence de PD-L1 rapportées selon les essais pour un même type tumoral. Par exemple, pour le cancer pulmonaire non à petites cellules, la positivité concerne 13 à 70 % des patients selon les essais (104). Des essais ont parfois été réalisés pour optimiser la méthode et retenir le meilleur seuil : c'est le cas pour le pembrolizumab, pour lequel différentes méthodes de détection et différents seuils ont été comparés, conduisant à retenir le seuil de 50% de marquage au niveau des cellules tumorales, seuil retenu pour l'AMM américaine dans le cancer bronchique (38,83). La signification d'un seuil à 1% semble critiquable, étant données l'hétérogénéité de l'expression de PD-L1 et la difficulté d'interprétation des marquages. La définition d'un seuil de positivité reste difficile, d'autant plus qu'il semble exister une relation continue entre le niveau d'expression de PD-L1 et la probabilité de réponse, comme le montrent les essais du pembrolizumab et de l'atezolizumab (38,48).

Ces nombreux facteurs de variabilité méthodologique peuvent expliquer les résultats discordants observés concernant le statut PD-L1. Dans notre étude, 13 patients ont été testés successivement pour leur statut PD-L1 dans le cadre de deux essais différents. Le taux de concordance était de 75%. Pour les 25% de discordance, il s'agissait dans tous les cas, d'un patient identifié PD-L1 négatif dans l'essai PCD, et positif dans l'autre essai (MK3475 ou MedImmune). Lors du congrès WCLC (World Conference on Lung Cancer) en 2015, une étude comparant les performances de différents anticorps (SP142, E1L3N, 28-8) pour 80 échantillons, a rapporté un taux de concordance proche, de 76% (105). Les résultats de ces comparaisons sont néanmoins variables, possiblement en fonction des anticorps considérés, avec une très bonne concordance, de 90%, dans l'étude de Ratcliffe et al (101) ; mais une concordance inférieure à 65% dans l'étude de McLaughlin et al (100).

Ces cas discordants, systématiquement négatifs dans l'essai PCD, associés à la moindre prévalence de l'expression de PD-L1 dans la cohorte PCD, doivent faire discuter l'implication des paramètres immunohistochimiques. Une limite à prendre en compte cependant est la forte représentation dans la cohorte PCD, de cancers du sein (33%) qui pourraient être moins

fréquemment associés à l'expression de PD-L1. Néanmoins, en tenant compte des types tumoraux représentés, l'impact de l'essai considéré sur la positivité du statut PD-L1 persiste en analyse multivariée, et l'essai PCD est un facteur associé à la négativité de PD-L1.

2. Influence des paramètres liés à l'échantillon analysé :

D'autres paramètres, liés cette fois à l'échantillon analysé, sont susceptibles d'influencer le statut PD-L1 et méritent d'être discutés.

- Ancienneté de l'échantillon:

L'ancienneté de l'échantillon a été incriminée comme pouvant détériorer la mesure de l'expression de PD-L1 en IHC, quand elle est supérieure à 6 mois (83). C'est pourquoi dans certains essais du pembrolizumab, un prélèvement récent et donc une éventuelle re-biopsie étaient demandés. Dans notre étude, le délai médian de conservation des prélèvements était de 13,9 mois avec une grande variabilité (4 jours à 13 ans). Ceci est comparable à ce qui est rapporté dans les études acceptant à la fois des prélèvements anciens et récents : par exemple, Taube et al ont étudié le statut PD-L1 sur 68 prélèvements dont le délai médian de conservation était de 2 ans (variant de 0 à 13 ans) (86). Dans notre étude, l'ancienneté du prélèvement n'est pas associée à l'expression de PD-L1. L'expression de PD-L1 est identifiée dans 28% des prélèvements de moins de 3 mois et dans 26% des prélèvements plus anciens. La prévalence de positivité de PD-L1 ne varie pas quel que soit le délai considéré (<3 mois ; 3-6mois ; 6-12 mois ; 12-18 mois ; > 18 mois). Madore et al ont décrit que l'ancienneté du prélèvement n'influçait pas le marquage de PD-L1 en IHC (106). Des résultats concordants ont été rapportés dans le cadre d'une phase II de l'atezolizumab, avec un taux de concordance pour le statut PD-L1 entre échantillons archivés et échantillons frais de 70 à 75% en fonction du seuil de positivité retenu (107). Ces observations devraient permettre de s'affranchir de la nécessité de re-biopsier systématiquement un patient pour déterminer le statut PD-L1, même si des questions relatives à l'hétérogénéité spatiale et temporelle de l'expression de PD-L1 persistent.

- Paramètres pré-analytiques :

Les paramètres pré-analytiques, liés à la préparation initiale de l'échantillon sont une source probable de variabilité. Il n'existe pas actuellement de littérature publiée sur le sujet,

mais il est possible que la durée de fixation, les réactifs utilisés et les conditions de conservation puissent modifier la détection de l'expression de PD-L1 (108). Dans notre étude, ces éléments n'ont pas pu être retrouvés à partir des compte-rendus anatomopathologiques. Une meilleure traçabilité de ces éléments serait nécessaire afin d'évaluer l'impact de ces facteurs pré-analytiques. Par contre, dans notre population, la comparaison du statut PD-L1 en fonction du lieu initial d'analyse et de préparation de l'échantillon anatomopathologique, en centre académique ou privé n'a mis en évidence aucune différence (respectivement 25% et 29% d'échantillons PD-L1+).

- Impact des traitements antérieurs:

L'expression de PD-L1 est connue pour être modifiée par la chimiothérapie (109), la radiothérapie (110) et les thérapies ciblées (111). Dans notre étude, la positivité de PD-L1 n'était pas influencée par le caractère pré ou post-thérapeutique de l'échantillon (respectivement 27 et 26% de positivité). Les données à ce sujet sont limitées. Gainor et al ont décrit des modifications du statut PD-L1 dans 20 à 25% des cas, chez des patients atteints de cancer bronchique, traités par inhibiteurs de tyrosines kinases, entre des échantillons pré et post-traitement (112). Inversement, dans la phase I du pembrolizumab pour le cancer bronchique, l'expression de PD-L1 ne différait pas (quel que soit le seuil de positivité retenu) entre les patients n'ayant reçu aucun traitement ou déjà pré-traités (50% et 43,9% pour un seuil de positivité fixé à 50% des cellules tumorales) (38).

- Type de prélèvement :

Dans notre étude, la prévalence de positivité de PD-L1 ne différait pas selon que le statut était déterminé à partir d'une biopsie (27%) ou d'une pièce opératoire (28%). Seules les analyses réalisées à partir de copeaux de résection (de prostate, de vessie ou d'endomètre) étaient associées à une moindre positivité (19%), de façon non statistiquement significative. Inversement, Rosenberg et al rapportent concernant l'atezolizumab dans les carcinomes urothéliaux, une plus forte prévalence de PD-L1 sur les pièces d'exérèse et les copeaux de résection (39 et 34%), par rapport aux biopsies (moins de 15% de PD-L1+) (49). La littérature rapporte des résultats discordants concernant la concordance du statut PD-L1 entre biopsie et pièce opératoire : dans le cancer bronchique, Ilie et al décrivent un taux de discordance entre biopsie et pièce opératoire de 48%, avec une sous-évaluation de l'expression de PD-L1 sur les biopsies (113) ; alors que Kitazono et al. retrouvent 92% de concordance (114). Ces études réalisées sur des prélèvements appariés, sont plus puissantes méthodologiquement.

Néanmoins, les résultats de notre étude sont rassurants sur la fiabilité de détermination du statut PD-L1 sur une biopsie, prélèvement fréquemment utilisé en oncologie, notamment chez le patient métastatique d'emblée. Ils rejoignent l'observation de Taube et al selon laquelle la taille du prélèvement n'influait pas le statut PD-L1 (86).

- Cellularité de l'échantillon:

Certaines études ont rapporté que la présence de nécrose tumorale au détriment de cellules tumorales viables, influait le statut PD-L1 (115), mais Taube et al ne retrouvaient aucun impact de la nécrose ($p=0,41$) (86). Nous nous sommes intéressés à la cellularité du prélèvement, plutôt qu'à la nécrose, et notre étude n'a pas mis en évidence d'association entre la positivité de PD-L1 et la cellularité du prélèvement ($p=0,738$).

- Origine primitive ou métastatique de l'échantillon:

Quelques études ont comparé la prévalence de positivité de PD-L1 sur des tumeurs primitives ou des lésions métastatiques. Certaines n'ont pas mis en évidence de différence de positivité (86), avec par exemple pour le cancer du rein 44% de tumeurs primitives positives et 43% de lésions métastatiques (116), ou pour le mélanome, des proportions respectives de 35% et 43% (23). Madore et al, retrouvaient des taux de positivité proches (51% pour les mélanomes primitifs et 57% pour les mélanomes métastatiques) mais avec 50% de taux de discordance quand plusieurs échantillons étaient disponibles pour un même patient (106). La méthodologie de leur étude avec un seuil de positivité à 1% participe peut être à cet important taux de discordance, puisque des prélèvements avec 1% ou 0% de cellules marquées étaient considérés comme discordants. Atkins en 2014 lors du congrès TAT (Targeted Anticancer Therapies), a rapporté un taux de concordance entre tumeur primitive et métastase de 70%. En 2015 lors du WCLC (World Conference Lung Cancer), Sheffield mentionnait pour le cancer bronchique, un taux de concordance de 81% (105) sur des prélèvements primitifs et métastatiques appariés. Enfin, Kowanetz a rapporté des taux de concordance de l'ordre de 75% pour des échantillons métachrones (primitif/métastase ou métastase/métastase) et de 80% pour des prélèvements synchrones (117). Dans notre étude, de la même façon, aucune différence de positivité n'était observée entre détermination du statut PD-L1 sur la tumeur primitive ou sur une localisation métastatique (PD-L1+ respectivement 27% et 24%). Seulement 7 patients ont eu une détermination de leur statut PD-L1 successivement sur 2 échantillons différents : le résultat était concordant pour 5 cas sur 7 (71%). Les 2 cas discordants avaient été testés dans des essais différents, la différence de statut pouvant donc

être liée aux paramètres immunohistochimiques. Malgré l'hétérogénéité spatiale et temporelle du statut PD-L1, ces observations, associées à l'absence de variation chez les patients pré-traités ou non, pourraient permettre de reconsidérer la nécessité de re-biopsier systématiquement le patient quand un traitement anti-PD-1 ou PD-L1 est envisagé, geste non dénué de risque et d'inconfort pour le patient.

- Influence du tissu prélevé pour les lésions métastatiques :

Dans notre étude, le statut PD-L1 de 92 patients a été déterminé à partir d'un prélèvement métastatique. Les localisations les plus fréquentes étaient les métastases ganglionnaires, hépatiques et pariétales. Il existait une tendance en faveur d'une positivité plus faible des métastases hépatiques (12%) par rapport aux adénopathies (35%) et aux masses pariétales (27%), à la limite de la significativité en analyse univariée ($p=0,08$), ce qui peut être lié à la petite taille de ce sous-groupe. En effet, une observation du même type a été formulée par Tumeh et al lors du congrès AACR (American Association for Cancer Research) en 2015, concernant la cohorte mélanome de la phase I du pembrolizumab : les métastases hépatiques étaient associées à une moindre infiltration par des lymphocytes intra-tumoraux, ainsi qu'une moindre expression de PD-1 et PD-L1. En terme de réponse clinique, le taux de réponse en cas de métastase hépatique (16%) était nettement inférieur à celui observé chez les patients atteints de métastases pulmonaires (64%) (118). Dans la cohorte poumon de cette étude de phase I, le taux de réponse était à nouveau moins important chez les patients atteints de métastases hépatiques (13,6%) par rapport aux autres localisations métastatiques (21,2%) (38). La même situation est observée dans le cancer de la vessie avec le durvalumab, avec 25% de taux de réponse en présence de métastases hépatiques versus 50% en cas de métastases ganglionnaires (57). Dans le carcinome hépatocellulaire, il a été décrit que l'expression de PD-L1 était limitée aux cellules de Kupffer du foie et aux cellules endothéliales des sinusoides hépatiques (119). Des spécificités hépatiques méritent donc d'être plus précisément recherchées et étudiées, notamment en termes d'impact sur la réponse clinique des patients atteints de métastases hépatiques.

Il existe une hétérogénéité tumorale spatiale (selon le site lésionnel, selon la zone du prélèvement considérée) et temporelle (spontanément ou sous l'effet des traitements) de l'expression de PD-L1. Cependant, les résultats de notre étude ainsi que les données de la littérature, sont rassurants concernant l'impact des caractéristiques de l'échantillon sur le

statut PD-L1. Le taux de discordance de 25% entre des prélèvements différents, justifie néanmoins d'envisager l'analyse d'un autre prélèvement si nécessaire.

3. Influence des paramètres histologiques et moléculaires:

- Influence du type tumoral :

Il existe une grande variabilité des taux de positivité PD-L1 rapportés dans la littérature en fonction du type tumoral considéré. La prévalence de PD-L1 est estimée par exemple à 36-80% dans le mélanome selon les essais (30,37,46), mais à seulement 13-33% pour le cancer colorectal (46,86). Une corrélation entre le statut PD-L1 et le type tumoral avait déjà été décrite par Taube (86). Notre étude a mis en évidence le même type d'association ($p < 0,001$), avec les plus faibles prévalences de PD-L1 observées dans les tumeurs neuro-endocrines (4,3%), les cancers du sein (14,6%) et de la prostate (16,1%); et les plus fortes, dans le cancer du col (75%), de la thyroïde (71,4%) et les glioblastomes (50%).

- Influence du type histologique :

L'association de l'expression de PD-L1 avec les principaux sous-types histologiques (carcinome épidermoïde et adénocarcinome) a été particulièrement étudiée dans le cancer bronchique, avec des résultats discordants. Dans la cohorte poumon de l'étude de phase I du pembrolizumab (Keynote-001), la fréquence de positivité de PD-L1 était proche pour les carcinomes épidermoïdes et non-épidermoïdes (respectivement 32% et 36%, pour un seuil de positivité à 50% des cellules tumorales), et le taux de réponse était plus important pour les carcinomes épidermoïdes (23,5%) par rapport aux carcinomes non épidermoïdes (18,7%) (38). Dans l'essai du durvalumab, la positivité de PD-L1 était plus fréquente pour les carcinomes épidermoïdes (54%) par rapport aux adénocarcinomes (43%), associée à un meilleur taux de réponse pour les carcinomes épidermoïdes (120). De même, d'après Mitchell et al, le type histologique du cancer bronchique était associé à la positivité de PD-L1 avec 39% de positivité pour les carcinomes épidermoïdes et 18% pour les adénocarcinomes (121). Inversement, aucune association avec le type histologique n'était retrouvée dans l'étude d'Ilie et la méta-analyse de Pan (113,122).

Dans notre étude, toutes tumeurs solides confondues, une différence significative de statut PD-L1 était observée selon le type histologique, avec en particulier une association des carcinomes épidermoïdes et des carcinomes urothéliaux avec la positivité de PD-L1 en

analyse multivariée ($p=0,023$). La prévalence de positivité de PD-L1 décrite pour les carcinomes épidermoïdes du canal anal (74,4%) (62) ou les carcinomes épidermoïdes ORL (78%) (98), va dans le sens de cette observation.

- Influence des anomalies moléculaires :

Cet aspect n'était pas évalué dans notre étude, néanmoins une association entre certaines anomalies moléculaires et le statut PD-L1 a été décrite. Ainsi, Garon et Gainor, ont mis en évidence une association de PD-L1 avec la mutation Kras et le réarrangement de Alk, mais pas avec les mutations de l'EGFR (38,112). Une association avec l'instabilité des microsatellites a également été décrite dans le cancer colorectal et le cancer de l'endomètre (44,123).

4. Influence des paramètres cliniques :

- Influence des critères démographiques (âge, sexe) :

Dans notre étude, comme dans de nombreux travaux (113,122), aucune association n'a été retrouvée entre le statut PD-L1 et les paramètres démographiques tels que l'âge et le sexe.

- Influence du tabagisme :

Le tabagisme actif est associé à une positivité du statut PD-L1 selon D'Incecco et al (124), avec une prévalence de sujets PD-L1+ de 34% chez les fumeurs, et seulement 10% chez les non-fumeurs d'après Mitchell et al (121). Des résultats contradictoires ont été rapportés dans l'étude de Ilie et al, et dans la méta-analyse de Pan et al (113,122), ne retrouvant aucune association avec le tabagisme. En termes de réponse, un taux de réponse plus important a été observé chez les fumeurs (actifs ou sevrés) par rapport aux non fumeurs dans la phase I du pembrolizumab (22,5% versus 10,3%), du nivolumab (30% versus 0%) et de l'atezolizumab (42% / 10%) (38,46,68), alors que dans la phase II de l'atezolizumab dans le cancer bronchique, le bénéfice du traitement était indépendant du tabagisme (48). Dans le cancer de la vessie, il n'y avait pas de différence de réponse en fonction du tabagisme (50).

- Influence du stade de la maladie :

Là encore, les observations issues de la littérature sont discordantes, parfois en faveur d'une association du statut PD-L1 avec le stade de la maladie (115,125) ou au contraire contre une telle association (23,113,122).

Au total, l'expression de PD-L1 est associée dans la plupart des essais à un bénéfice accru des traitements anti-PD-1/PD-L1. Mais la valeur prédictive de la détermination immunohistochimique de PD-L1 doit être confirmée et fait encore débat. Une attention particulière devra être portée aux facteurs susceptibles d'influencer la positivité du statut PD-L1. En effet, dans notre étude, les différences observées entre les essais, pourraient être la conséquence de ces facteurs de variabilité. Alors que les tests compagnons pour le nivolumab, le pembrolizumab et l'atezolizumab ont déjà été validés par la FDA ; l'harmonisation et la standardisation des méthodes de détection de l'expression de PD-L1 apparaissent désormais comme des enjeux majeurs, pour son utilisation en tant que biomarqueur.

B. Autres prédicteurs envisagés

L'immunohistochimie est une méthode simple, peu onéreuse et réalisable en pratique courante. Cependant, les caractéristiques de la protéine PD-L1, avec seulement 2 domaines hydrophiles, limite les sites de fixation pour les anticorps et les performances de cette méthode, et les résultats discordants issus de la littérature concernant la valeur du statut PD-L1 conduisent à envisager d'autres biomarqueurs potentiels (126).

Beaucoup d'études se sont intéressées aux lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL). Les TIL sont corrélés à l'expression de PD-L1 d'après Taube et al (86). Une association entre le taux de lymphocytes T CD8+ intra-tumoraux et le taux de réponse a été mise en évidence pour le pembrolizumab (127) et dans la phase II de l'atezolizumab (49), alors qu'elle n'avait pas été retrouvée dans la phase I de ce dernier (46). D'autres marqueurs liés à l'immunosuppression des LT ont montré une association avec la réponse, comme l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (46). L'expression de PD-L2 a aussi été évaluée en IHC, avec des résultats intéressants pour le pembrolizumab dans le cancer bronchique (128).

Des biomarqueurs circulants ont été recherchés en particulier parmi les cytokines circulantes (IL, IFN) (46), mais aussi avec la forme soluble de PD-L1 (129), sans valeur prédictive démontrée. Par contre, l'expression de Bim (Bcl2 interacting mediator of cell death), protéine impliquée dans l'apoptose des LT, a démontré une association avec la réponse dans le mélanome, quand elle est élevée au niveau des LT CD8+ circulant en pré-thérapeutique (130).

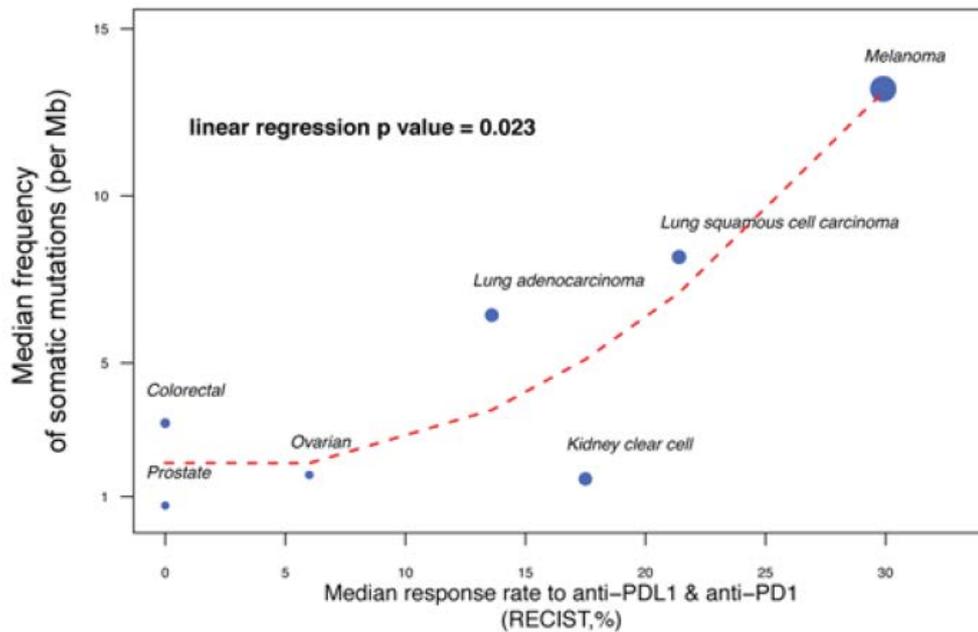
Différentes signatures géniques prédictives, impliquant des gènes liés à la réponse inflammatoire, notamment induits par l'interféron, ont été évaluées avec des résultats intéressants. Une relation entre le profil d'expression des gènes liés à l'IFN et la réponse a été mise en évidence dans le mélanome et les cancers ORL (131,132).

Un autre champ d'investigation prometteur concerne la charge mutationnelle. Une relation a été décrite entre le taux de mutations génétiques lié à l'instabilité génomique et l'expression de PD-L1 (26). Une association entre charge mutationnelle et réponse aux inhibiteurs des immune checkpoints a ensuite été observée dans différents essais, notamment par Rizvi et al dans l'essai du pembrolizumab dans le cancer bronchique (133) et de Rosenberg et al pour l'atezolizumab dans les carcinomes urothéliaux (49). De la même façon, dans le cancer colorectal, des réponses ont été décrites chez les patients présentant une instabilité des microsatellites, traités par pembrolizumab, alors que les patients sans déficience du système MMR (Mismatch Repair) n'avaient pas de bénéfice au traitement. Là encore, une association entre taux de mutations somatiques (favorisées par la déficience du système de réparation de l'ADN) et réponse, a été retrouvée (44). D'après les résultats de ces essais en terme de taux de mutations somatiques et de taux de réponse aux anti-PD-1/PD-L1, une corrélation entre charge mutationnelle et bénéfice des inhibiteurs des immune checkpoints a pu être démontrée parmi les différents types tumoraux (134) (Figure 12).

Dans les premiers travaux, la charge mutationnelle était déterminée par des méthodes de séquençage du génome entier. Depuis, dans un but de simplification, des panels restreints de gènes ont été étudiés, permettant de retrouver des résultats comparables au séquençage complet en terme d'association à la réponse aux anti-PD-1/PD-L1 (49).

Une des hypothèses concernant cette relation, est que le degré de mutagenèse pourrait refléter l'immunogénicité de la tumeur, car chaque mutation peut être à l'origine d'un néoantigène, théoriquement non exprimé par l'organisme et susceptible d'être reconnu par les LT et de déclencher une réaction immunitaire antitumorale. Une relation entre taux de néoantigènes et bénéfice clinique du traitement a également été démontrée par l'équipe de Van Allen et al, avec les anti-CTLA4 (135).

Figure 12 : Corrélation entre taux de mutations somatiques et réponse aux anti-PD-1/PD-L1 pour les différents types tumoraux, d'après Champiat et al. (134)



C. Limites des biomarqueurs prédictifs

L'identification d'un biomarqueur prédictif de l'efficacité des traitements ciblant l'axe PD-1/PD-L1 est aujourd'hui un des défis majeurs de l'immunothérapie, et de nombreux travaux à ce sujet existent.

Cependant, un certain nombre de ces travaux mettent en évidence une association entre l'expression de PD-L1 et le taux de réponse, sans pouvoir juger de la valeur prédictive ou pronostique de cette association. En effet, le rôle pronostique de PD-L1 a été largement décrit dans la littérature dans le cancer bronchique (119), le cancer du rein (115), le cancer de l'ovaire (35), ou le mélanome (125) notamment. La mise en évidence d'un rôle prédictif cette fois, nécessite que la valeur du statut PD-L1 soit évaluée dans des essais randomisés, afin de mettre en évidence une association avec la réponse qui n'existerait que pour le traitement évalué et pas pour le traitement de référence (136). De tels essais sont encore peu nombreux, et leurs résultats sont contradictoires. Ainsi, les deux essais de phase III, réalisés selon le même design et comparant le nivolumab au docetaxel dans les cancers bronchiques étaient en faveur d'un rôle prédictif pour les carcinomes non-épidermoïdes mais pas pour les carcinomes épidermoïdes qui avaient un bénéfice au nivolumab quelle que soit leur expression de PD-L1 (31,32).

La recherche de biomarqueurs est un objectif difficile. C'est un enjeu dans de nombreux domaines thérapeutiques, où des efforts importants peuvent être déployés pour en identifier, sans résultat systématiquement satisfaisant, comme on peut le constater avec le développement des anti-angiogéniques. Une des difficultés est liée au fait que les biomarqueurs prédictifs sont rarement binaires, et qu'il faut donc accepter une simple association statistique avec l'augmentation du taux de réponse. Même les biomarqueurs désormais parfaitement implantés dans la pratique quotidienne, comme le statut her2 déterminé en IHC et Fluorescence in situ hybridization (FISH), ont nécessité des travaux prolongés afin de déterminer le seuil de positivité et la méthodologie optimale, conduisant à des évolutions itératives des guidelines. Enfin, même si le rationnel scientifique suggère un biomarqueur prédictif positif, il faut savoir considérer d'autres possibilités et notamment celles des prédicteurs négatifs ; comme l'a montré la découverte de la mutation Kras, prédicteur négatif de la réponse aux traitements anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) dans le cancer colorectal.

Sachant qu'une proportion non négligeable de patients PD-L1 négatifs répond au traitement et qu'inversement la positivité de PD-L1 n'est pas systématiquement associée à une réponse, il est possible que l'expression de PD-L1 soit nécessaire sans être suffisante pour avoir une valeur prédictive si elle est considérée seule. D'autres facteurs liés à la tumeur et à son microenvironnement peuvent influencer l'expression de PD-L1, et participent à son hétérogénéité spatiale et temporelle. On peut penser que PD-L1 pourrait s'intégrer dans un score composite plus complexe, associant entre eux plusieurs biomarqueurs potentiels, afin d'affiner la performance prédictive obtenue avec chacun d'entre eux individuellement. Une perspective pour identifier les meilleurs candidats à une immunothérapie, pourrait être une classification immuno-histologique basée à la fois sur l'expression de PD-L1 et sur la présence de TIL (67,86,137). D'autres éléments immunologiques pourraient être pris en compte dans une telle classification, comme le phénotype des cellules immunitaires, l'évolution du répertoire T, le profil de cytokines produites dans le microenvironnement... L'association à d'autres paramètres, tels que la charge mutationnelle, mérite aussi d'être explorée.

Enfin, la finalité de PD-L1 comme prédicteur pourrait aussi évoluer : il pourrait s'agir par exemple d'identifier les candidats à une association d'inhibiteurs des points de contrôle immunitaire plutôt qu'à une monothérapie, comme le suggèrent les résultats de l'association

ipilimumab + nivolumab dans le mélanome, où l'association apporte un bénéfice par rapport à la monothérapie seulement chez les patients PD-L1 négatifs (79). Par ailleurs, une autre perspective sera à surveiller étroitement : l'utilisation du statut PD-L1 comme outil de régulation de l'accès au traitement et au remboursement. En effet, le pembrolizumab a déjà été approuvé par la FDA uniquement pour les cancers bronchiques PD-L1+, alors même que les résultats des essais montrent que le statut PD-L1 permet d'enrichir la population traitée en patients répondeurs, mais que des patients PD-L1 négatifs peuvent aussi répondre au traitement et que, parmi les patients PD-L1 positifs, une majorité n'a pas de bénéfice au traitement.

VI. Conclusion

Bien que de nombreuses études aient été menées et que différents facteurs prédictifs aient été étudiés, aucun biomarqueur prédictif n'est à ce jour formellement identifié pour guider le traitement par anti-PD-1/PD-L1. Un tel biomarqueur est pourtant nécessaire pour identifier les patients susceptibles de répondre au traitement, et limiter pour les autres les coûts et toxicités inutiles. Malgré les controverses, l'expression immunohistochimique de PD-L1 reste à ce jour, le facteur pour lequel l'association à la réponse est la plus forte.

Cette étude a mis en évidence une différence significative de positivité du statut PD-L1 en fonction du test compagnon considéré, démontrant que les facteurs méthodologiques liés à l'analyse immunohistochimique peuvent avoir un impact sur la prévalence de la positivité de PD-L1 observée en fonction des essais, avec des conséquences cliniques et pratiques sur le nombre de patients susceptibles d'accéder à un traitement par immunothérapie. Une comparaison rigoureuse des performances de ces tests compagnons et une harmonisation des méthodes de détermination immunohistochimique du statut PD-L1 est plus que jamais nécessaire.

Dans notre étude, les paramètres liés à l'échantillon et à l'hétérogénéité spatiale et temporelle de l'expression de PD-L1, avaient un impact modéré sur le statut PD-L1, ce qui laisse penser pour la pratique clinique, que des prélèvements récents, itératifs ou multiples ne sont pas indispensables, et que le statut PD-L1 peut être déterminé de façon fiable sur le matériel disponible, sans recourir systématiquement à de nouvelles biopsies.

Enfin, notre étude a confirmé l'association entre le type histologique et le statut PD-L1, déjà décrite dans d'autres travaux, et soulevé l'hypothèse de spécificités hépatiques. Ces éléments méritent d'être considérés pour orienter les futurs essais d'évaluation des anti-PD-1/PD-L1, en monothérapie ou en association, dans d'autres types tumoraux, et pour envisager de nouvelles hypothèses quant aux mécanismes d'action et de résistance à ces traitements.

Que PD-L1 s'impose comme un biomarqueur à part entière, ou qu'il s'intègre dans un score plus complexe, ces facteurs de variabilité devront être étudiés et pris en compte afin de limiter leur impact sur la valeur prédictive du biomarqueur, et les conséquences éventuelles en termes d'accès au traitement pour le patient.

VII. Bibliographie :

1. Coley WB. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc R Soc Med*. 1910;3(Surg Sect):1–48.
2. Mathé G, Schwarzenberg L, Halle-Pannenko O, Simmler MC. Discussion paper: experimental and clinical immunopharmacology data applicable to cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci*. 1976;277(0):467–84.
3. Alexandroff AB, Nicholson S, Patel PM, Jackson AM. Recent advances in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in bladder cancer. *Immunotherapy*. 2010. 2(4):551–60.
4. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565–70.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
6. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol*. 1996;14(1):7–17.
7. Rosenberg SA, Yang JC, White DE, Steinberg SM. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg*. 1998;228(3):307–19.
8. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711–23.
9. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1–10.
10. Robert C, Soria J-C, Eggermont AMM. Drug of the year: programmed death-1 receptor/programmed death-1 ligand-1 receptor monoclonal antibodies. *Eur J Cancer*. 2013;49(14):2968–71.
11. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science*. 2013;342(6165):1432–3.
12. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252–64.
13. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12293–7.
14. Talay O, Shen C-H, Chen L, Chen J. B7-H1 (PD-L1) on T cells is required for T-cell-mediated conditioning of dendritic cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(8):2741–6.
15. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26(1):677–704.

16. Lesokhin AM, Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. On being less tolerant: enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation. *Sci Transl Med.* 2015;7(280):280sr1.
17. Azuma T, Yao S, Zhu G, Flies AS, Flies SJ, Chen L. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood.* 2008;111(7):3635–43.
18. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(6):467–77.
19. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002;8(8):793–800.
20. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell.* 2015;27(4):450–61.
21. Crane CA, Panner A, Murray JC, Wilson SP, Xu H, Chen L, et al. PI(3) kinase is associated with a mechanism of immunoresistance in breast and prostate cancer. *Oncogene.* 2009;28(2):306–12.
22. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med.* 2007;13(1):84–8.
23. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Sci Transl Med.* 2012;4(127):127ra37.
24. Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, Graham CH. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res.* 2014;74(3):665–74.
25. Atefi M, Avramis E, Lassen A, Wong DJL, Robert L, Foulad D, et al. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. *Clin Cancer Res.* 2014;20(13):3446–57.
26. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular pathways: next-generation immunotherapy--inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin Cancer Res.* 2012;18(24):6580–7.
27. Yang J, Riella LV, Chock S, Liu T, Zhao X, Yuan X, et al. The novel costimulatory programmed death ligand 1/B7.1 pathway is functional in inhibiting alloimmune responses in vivo. *J Immunol.* 2011;187(3):1113–9.
28. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol.* 2012;24(2):207–12.
29. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2443–54.
30. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015;372(4):320–30.
31. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.*

- 2015;373(17):1627–39.
32. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(2):123–35.
 33. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015;373(19):1803-13
 34. El-Khoueiry A, Melero I, Crocenzi TS, Welling TH, Cheung Yau T, Yeo W, et al. Phase I/II safety and antitumor activity of nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC): CA209-040. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr LBA101.
 35. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Matsumura N, et al. Efficacy and safety of anti-PD-1 antibody (Nivolumab: BMS-936558, ONO- 4538) in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *J Clin Oncol* 32 5s Suppl Abstr 5511.
 36. Antonia SJ, Bendell JC, Taylor MH, Calvo E, Jaeger D, De Braud FG, et al. Phase I/II study of nivolumab with or without ipilimumab for treatment of recurrent small cell lung cancer (SCLC): CA209-032. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 7503.
 37. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2521–32.
 38. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(21):2018–28.
 39. Herbst RS, Baas P, Kim D-W, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han J-Y, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10027):1540–50.
 40. Plimack ER, Bellmunt J, Gupta S, Berger R, Montgomery RB, Heath K, et al. Pembrolizumab (MK-3475) for advanced urothelial cancer: Updated results and biomarker analysis from KEYNOTE-012. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 4502.
 41. Doi T, Piha-Paul SA, Jalal SI, Mai-Dang H, Yuan S, Koshiji M, et al. Pembrolizumab (MK-3475) for patients (pts) with advanced esophageal carcinoma: Preliminary results from KEYNOTE-028. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 4010.
 42. Ott PA, Elez Fernandez ME, Hirt S, Kim D-W, Moss RA, Winser T, et al. Pembrolizumab (MK-3475) in patients (pts) with extensive-stage small cell lung cancer (SCLC): Preliminary safety and efficacy results from KEYNOTE-028. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 7502.
 43. O’Neil B, Wallmark J, Lorente D, Elez E, Raimbourg J, Gomez-Roca C, et al. Pembrolizumab (MK-3475) for patients (pts) with advanced colorectal carcinoma (CRC): Preliminary results from KEYNOTE-028. *Eur Cancer Congr* 2015 Abstr502.
 44. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509–20.
 45. Atkins MB, Kudchakar RR, Sznol M, McDermott DF, Schachter J, Wolchok JD, et al. Phase 2, multicenter, safety and efficacy study of pidilizumab in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 325s 2014 Suppl Abstr 9001.
 46. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive

- correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563–7.
47. McDermott DF, Sosman JA, Sznol M, Massard C, Gordon MS, Hamid O, et al. Atezolizumab, an Anti-Programmed Death-Ligand 1 Antibody, in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Long-Term Safety, Clinical Activity, and Immune Correlates From a Phase Ia Study. *J Clin Oncol*. 2016;34(8):833-42
 48. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387:1837-46
 49. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. 2016;387:1909-20.
 50. Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 2014;515:558–62.
 51. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2455–65.
 52. Hassan R, Thomas A, Patel M, Nemunaitis J, Bennouna J, Powderly J. Safety and clinical activity of avelumab (MSB001078C), an anti-PD-L1 antibody, in patients with advanced, unresectable mesothelioma: A phase IB trial. *Eur Cancer Congr 2015 Abstr*3110.
 53. Gulley JL, Spigel DR, Kelly K, Chandler JC, Rajan A, Hassan R, et al. Avelumab (MSB001078C), an anti-PD-L1 antibody, in advanced NSCLC patients: A phase 1b, open-label expansion trial in patients progressing after platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 8034.
 54. Disis M.L, Patel M, Pant S, Hamilton E.P, Lockhart A.C, Kelly K, et al. Avelumab (MSB001078C), an anti-PD-L1 antibody, in patients with recurrent or refractory ovarian cancer: A phase Ib trial reporting safety and clinical activity. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 5509.
 55. Rizvi NA, Brahmer JR, Ou S., Segal NH, Khleif S, Hwu W-J. Safety and clinical activity of MEDI4736, an anti-programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) antibody, in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 8032.
 56. Segal NH, Ou S., Balmanoukian AS, Fury MG, Massarelli E, Brahmer JR. Safety and efficacy of MEDI4736, an anti-PD-L1 antibody, in patients from a squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) expansion cohort. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 3011.
 57. Massard C, Gordon MS, Sharma S, Rafii S, Wainberg ZA, Luke JJ. Safety and efficacy of durvalumab (MEDI4736), a PD-L1 antibody, in urothelial bladder cancer. *J Clin Oncol* 34 2016 Suppl Abstr 4502.
 58. Alley EW, Molife LR, Santoro A, Beckey K, Yuan S, Cheng JD, et al. Abstract CT103: Clinical safety and efficacy of pembrolizumab (MK-3475) in patients with malignant pleural mesothelioma: Preliminary results from KEYNOTE-028. *Cancer Res*. 2015;75(15 Supplement):CT103-CT103.

59. Varga A, Piha-Paul SA, Ott PA, Mehnert J, Berton-Rigaud D, Johnson E. Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients (pts) with PD-L1 positive advanced ovarian cancer: Interim results from a phase Ib study. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 5510.
60. Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, et al. Pembrolizumab in patients with advanced triple-negative breast cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol* 2016; JCO648931.
61. Seiwert TY, Haddad RI, Gupta S, Mehra R, Tahara M, Berger R. Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients (pts) with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): Preliminary results from KEYNOTE-012 expansion cohort. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr LBA6008.
62. Ott PA, Piha-Paul SA, Munster P, Pishvaian M., Van Brummelen E, Cohen R. Pembrolizumab (MK-3475) for PD-L1-positive squamous cell carcinoma (SCC) of the anal canal: Preliminary safety and efficacy results from KEYNOTE-028. *Eur Cancer Congr* 2015 Abstr 500.
63. Bang Y-J, Doi T, De Braud FG, Piha-Paul SA, Hollebecque A, Abdul Razak A. Safety and efficacy of pembrolizumab (MK-3475) in patients (pts) with advanced biliary tract cancer: Interim results of KEYNOTE-028. *Eur Cancer Congr* 2015 Abstr 525.
64. Bang Y., Chung H., Shankaran V, Geva R, Catenacci DVT, Gupta S. Relationship between PD-L1 expression and clinical outcomes in patients with advanced gastric cancer treated with the anti-PD-1 mono. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 4001.
65. Spira A, Park K, Mazières J, Vansteenkiste J, Rittmeyer A, Ballinger M. Efficacy, safety and predictive biomarker results from a randomized phase II study comparing MPDL3280A vs docetaxel in 2L/3L NSCLC (POPLAR). *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 8010.
66. Emens LA, Braiteh FS, Cassier P, Delord J-P, Eder JP, Fasso M, et al. Abstract 2859: Inhibition of PD-L1 by MPDL3280A leads to clinical activity in patients with metastatic triple-negative breast cancer (TNBC). *Cancer Res.* 2015;75(15 Supplement):2859–2859.
67. Sznol M, Chen L. Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(5):1021–34.
68. Gettinger SN, Horn L, Gandhi L, Spigel DR, Antonia SJ, Rizvi NA, et al. Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(18):2004–12.
69. Wolchok JD, Hoos A, O’Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res.* 2009;15(23):7412–20.
70. Escudier B, Motzer RJ, Sharma P, Wagstaff J, Plimack ER, Hammers HJ. Treatment beyond progression with nivolumab (nivo) in patients with advanced renal cell carcinoma (aRCC) in the phase III CheckMate 025 study. *J Clin Oncol* 34 2016 Suppl Abstr 4509.
71. Champiat S, Lambotte O, Barreau E, Belkhir R, Berdelou A, Carbonnel F, et al. Management of immune checkpoint blockade dysimmune toxicities: a collaborative position paper. *Ann Oncol.* 2016;27(4):559-74.
72. Naidoo J, Page DB, Li BT, Connell LC, Schindler K, Lacouture ME, et al. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann Oncol.* 2015;26(12):2375–91.

73. Teply BA, Lipson EJ. Identification and management of toxicities from immune checkpoint-blocking drugs. *Oncology (Williston Park)*. 2014;28 Suppl 3:30–8.
74. Teng MWL, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 2015;75(11):2139–45.
75. Aspeslagh S, Postel-Vinay S, Rusakiewicz S, Soria J-C, Zitvogel L, Marabelle A. Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer*. 2016;52:50–66.
76. Woo S-R, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res*. 2012;72(4):917–27.
77. Soliman H, Mediavilla-Varela M, Antonia S. Indoleamine 2,3-dioxygenase: is it an immune suppressor? *Cancer J*. 2010;16(4):354–9.
78. Hellmann MD, Friedman CF, Wolchok JD. Chapter Six - Combinatorial Cancer Immunotherapies. In: Schreiber RD, editor. *Advances in Immunology*. Academic Press; 2016. p. 251–77. (Tumor Immunology; vol. 130).
79. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373(1):23–34.
80. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol*. 2010;28(19):3167–75.
81. Hodi FS, Sznol M, Kluger HM, McDermott DF, Carvajal RD, Lawrence DP. Long-term survival of ipilimumab-naïve patients (pts) with advanced melanoma (MEL) treated with nivolumab (anti-PD-1, BMS-936558, ONO-4538) in a phase I trial. *J Clin Oncol* 32s 2014 Suppl Abstr 9002.
82. Rizvi NA, Mazières J, Planchard D, Stinchcombe TE, Dy GK, Antonia SJ, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(3):257–65.
83. Dolled-Filhart M, Roach C, Toland G, Musser J, Lubiniecki GM, Ponto G. Development of a PD-L1 immunohistochemistry (IHC) assay for use as a companion diagnostic for pembrolizumab (MK-3475) in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 11065.
84. Kefford RF, Ribas A, Hamid O, Robert C, Daud A, Wolchok JD. Clinical efficacy and correlation with tumor PD-L1 expression in patients (pts) with melanoma (MEL) treated with the anti-PD-1 monoclonal antibody MK-3475. *J Clin Oncol* 32s 2014 Suppl Abstr 3005.
85. Carbone L, Pilotto S, Milella M, Vaccaro V, Brunelli M, Calì A, et al. Differential Activity of Nivolumab, Pembrolizumab and MPDL3280A according to the Tumor Expression of Programmed Death-Ligand-1 (PD-L1): Sensitivity Analysis of Trials in Melanoma, Lung and Genitourinary Cancers. *PloS One*. 2015;10(6):e0130142.
86. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res*. 2014;20(19):5064–74.

87. 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(4):375–84.
88. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Redman BG, Kuzel TM, Harrison MR, et al. Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial. *J Clin Oncol*. 2015;33(13):1430–7.
89. Choueiri TK, Fishman MN, Escudier B, McDermott DF, Kluger HM, Stadler WM. Immunomodulatory activity of nivolumab in metastatic renal cell carcinoma (mRCC): Association of biomarkers with clinical outcomes. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 4500.
90. Puzanov I, Dummer R, Schachter J, Pavlick AC, Gonzalez R, Ascierto PA. Efficacy based on tumor PD-L1 expression in KEYNOTE-002, a randomized comparison of pembrolizumab (pembro; MK-3475) versus chemotherapy in patients (pts) with ipilimumab-refractory (IPI-R) advanced melanoma (MEL). *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 3012.
91. Daud A, Ribas A, Robert C, Hodi FS, Wolchok JD, Joshua AM. Long-term efficacy of pembrolizumab (pembro; MK-3475) in a pooled analysis of 655 patients (pts) with advanced melanoma (MEL) enrolled in KEYNOTE-001. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 9005.
92. Soria J-C, Flotten O, Horn L, Felip E, Gandhi L, Hui R. Efficacy and Safety of Pembrolizumab (Pembro; MK-3475) for Patients (Pts) With Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Enrolled in KEYNOTE-001. *Eur Cancer Congr* 2015 Abstr 33LBA.
93. Vansteenkiste J, Fehrenbacher L, Spira A, Mazieres J, Park K, Smith D. Atezolizumab monotherapy vs docetaxel in 2L/3L non-small cell lung cancer: Primary analyses for efficacy, safety and predictive biomarkers from a randomized phase II study (POPLAR). *Eur Cancer Congr* 2015 Abstr 14LBA.
94. Horn L, Spigel DR, Gettinger SN, Antonia SJ, Gordon MS, Herbst RS. Clinical activity, safety and predictive biomarkers of the engineered antibody MPDL3280A (anti-PDL1) in non-small cell lung cancer (NSCLC): update from a phase Ia study. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 8029.
95. Petrylak DP, Powles T, Bellmunt J, Braithe FS, Loriot Y, Zambrano. A phase Ia study of MPDL3280A (anti-PDL1): Updated response and survival data in urothelial bladder cancer (UBC). *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 4501.
96. Disis M., Patel M, Pant S, Hamilton E., Lockhart A., Kelly K. Avelumab (MSB0010718C), an anti-PD-L1 antibody, in patients with recurrent or refractory ovarian cancer: A phase Ib trial reporting safety and clinical activity. *Eur Cancer Congr* 2015 Abstr 2749.
97. Higgs B., Robbins P., Blake-Haskins A, Zhu W, Morehouse C, Brohawn P. High tumoral IFN γ mRNA, PD-L1 protein, and combined IFN γ mRNA/PD-L1 protein expression associates with response to durvalumab (anti-PD-L1) monotherapy in NSCLC patients. *Eur Cancer Congr* 2015 Abstr 15LBA.
98. Seiwert TY, Burtness B, Weiss J, Gluck I, Eder JP, Pai S. A phase Ib study of MK-3475 in patients with human papillomavirus (HPV)-associated and non-HPV-associated head and neck (H/N) cancer. *J Clin Oncol* 325s 2014 Suppl Abstr 6011.
99. Hsu C, Lee S-H, Ejadi S, Even C, Cohen R, Le Tourneau C. Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with PD-L1-positive nasopharyngeal carcinoma: Interim results

- from a phase 1b study. Eur Cancer Congr 2015 Abstr 2801.
100. McLaughlin J, Schalper KA, Carvajal-Hausdorf DE, Pelekanou V, Velcheti V, Haack H, et al. Abstract 1310: Programmed death ligand-1 (PD-L1) heterogeneity in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cancer Res.* 2015;75(15 Supplement):1310–1310.
 101. Ratcliffe M, Sharpe A, Midha A, Barker C, Scorer P, Walker J. A comparative study of PD-L1 diagnostic assays and the classification of patients as PD-L1 positive and PD-L1 negative. *Am Assoc Cancer Res Congr 2016 Abstr LB094.*
 102. Mahoney K, Sun H, Liao X, Hua P, Callea M, Greenfield E. PD-L1 antibodies to its cytoplasmic domain most clearly delineate cell membranes in immunohistochemical staining of tumor cells. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(12):1308–15.
 103. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(4):847–56.
 104. Kerr KM, Tsao M-S, Nicholson AG, Yatabe Y, Wistuba II, Hirsch FR, et al. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? *J Thorac Oncol.* 2015;10(7):985–9.
 105. Sheffield B. Predictive biomarker testing for programmed death 1 inhibition in non-small cell lung cancer. *16th World Conf Lung Cancer.* 2015; ORAL 13.05.
 106. Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, et al. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28(3):245–53.
 107. Spigel DR, Chaft JE, Gettinger SN, Chao BH, Dirix LY, Schmid P. Clinical activity and safety from a phase II study (FIR) of MPDL3280A (anti-PDL1) in PD-L1-selected patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 8028.
 108. Adam J, Planchard D, Marabelle A, Soria J-C, Scoazec J-Y, Lantuéjoul S. [PD-L1 expression: An emerging biomarker in non-small cell lung cancer]. *Ann Pathol.* 2016;36(1):94–102.
 109. Bracci L, Schiavoni G, Sistigu A, Belardelli F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ.* 2014;21(1):15–25.
 110. Ngiow SF, McArthur GA, Smyth MJ. Radiotherapy complements immune checkpoint blockade. *Cancer Cell.* 2015;27(4):437–8.
 111. Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res.* 2013;19(3):598–609.
 112. Gainor J, Sequist LV, Tsang Shaw A, Azzoli CG, Piotrowska Z, Huynh T. Clinical correlation and frequency of programmed death ligand-1 (PD-L1) expression in EGFR-mutant and ALK-rearranged non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 8012.
 113. Ilie M, Long-Mira E, Bence C, Butori C, Lassalle S, Bouhlef L, et al. Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann Oncol.* 2016;27(1):147–53.

114. Kitazono S, Fujiwara Y, Tsuta K, Utsumi H, Kanda S, Horinouchi H, et al. Reliability of Small Biopsy Samples Compared With Resected Specimens for the Determination of Programmed Death-Ligand 1 Expression in Non--Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2015;16(5):385–90.
115. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res*. 2006;66(7):3381–5.
116. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 2005;104(10):2084–91.
117. Kowanetz M, Koeppen H, Boe M. Spatiotemporal effects on programmed death ligand 1 (PD-L1) expression and immunophenotype of non-small cell lung cancer (NSCLC). 16th World Conf Lung Cancer. 2015; ORAL13.03.
118. Tumei* PC, Rosenblum* M, Handley N, Tsai K, Rodriguez RRS, Khurana N, et al. Abstract 2857: Metastatic site and response to pembrolizumab (anti-PD1 antibody) in melanoma. *Cancer Res*. 2015;75(15 Supplement):2857–2857.
119. Wang A, Wang HY, Liu Y, Zhao MC, Zhang HJ, Lu ZY, et al. The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2015;41(4):450–6.
120. Rebelatto M. Development of a PD-L1 companion diagnostic assay for treatment with MEDI4736 in NSCLC and SCCHN patients. *J Clin Oncol* 33. 2015. Suppl Abstr 8033.
121. Mitchell P, Murone C, Asadi K. PD-L1 expression in NSCLC: analysis of a large early stage cohort; and concordance of expression in primary, nodes and metastasis. 16th World Conf Lung Cancer. 2015; ORAL 13.06.
122. Pan Z-K, Ye F, Wu X, An H-X, Wu J-X. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand1 (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *J Thorac Dis*. 2015;7(3):462–70.
123. Howitt B., Sholl L., Ritterhouse L, Watkins J., Rodig SJ, Strickland K. Association of POLE-mutated and MSI endometrial cancers with an elevated number of tumor-infiltrating and peritumoral lymphocytes and higher expression of PD-L1. *J Clin Oncol* 33 2015 Suppl Abstr 5511.
124. D’Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V, Rossi E, Capodanno A, Landi L, et al. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer*. 2015 Jan 6;112(1):95–102.
125. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 2010;116(7):1757–66.
126. Meng X, Huang Z, Teng F, Xing L, Yu J. Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(10):868–76.
127. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515(7528):568–71.

128. Yearley JH, Gibson C, Yu N. PD-L2 expression in human tumors: relevance to anti-PD-1 therapy in cancer. *Eur Cancer Congr 2015 Abstr 18LBA*.
129. Frigola X, Inman BA, Lohse CM, Krco CJ, Chevillat JC, Thompson RH, et al. Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011;17(7):1915–23.
130. Dronca R.S, Markovic S, Kottschade L.A, McWilliams R.R, Block M.S, Nevala W.K, et al. Bim as a predictive T-cell biomarker for response to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma (MM). *J Clin Oncol 33 2015 Suppl Abstr 9013*.
131. Ribas A, Robert C, Hodi FS, Wolchok JD, Joshua AM, Hwu W-J. Association of response to programmed death receptor 1 (PD-1) blockade with pembrolizumab (MK-3475) with an interferon-inflammatory immune gene signature. *J Clin Oncol 33 2015 Suppl Abstr 3001*.
132. Seiwert TY, Burtneff B, Weiss J, Eder JP, Yearley JH, Murphy E. Inflamed-phenotype gene expression signatures to predict benefit from the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in PD-L1+ head and neck cancer patients. *J Clin Oncol 33 2015 Suppl Abstr 6017*.
133. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348(6230):124–8.
134. Champiat S, Ferté C, Lebel-Binay S, Eggermont A, Soria JC. Exomics and immunogenics: Bridging mutational load and immune checkpoints efficacy. *Oncoimmunology*. 2014;3(1):e27817.
135. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*. 2015;350(6257):207–11.
136. Buyse M, Sargent DJ, Grothey A, Matheson A, de Gramont A. Biomarkers and surrogate end points--the challenge of statistical validation. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(6):309–17.
137. Kohrt HE, Tumeh PC, Benson D, Bhardwaj N, Brody J, Formenti S, et al. Immunodynamics: a cancer immunotherapy trials network review of immune monitoring in immuno-oncology clinical trials. *J Immunother Cancer*. 2016 ;4:15.

Biomarqueurs des immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 : facteurs cliniques, histologiques et immunohistochimiques associés au statut PD-L1

Les inhibiteurs de l'axe PD-1/PD-L1 marquent une révolution de la prise en charge thérapeutique en oncologie. Cependant, seule une minorité des patients répond au traitement, et des biomarqueurs prédictifs de réponse sont indispensables pour sélectionner ces patients. Le biomarqueur le plus étudié est l'expression immunohistochimique (IHC) de PD-L1, avec des résultats discordants. Les données cliniques, histologiques et IHC de 309 patients traités dans un essai anti-PD-1/PD-L1, par pembrolizumab (P), durvalumab (D) ou atezolizumab (A), entre janvier 2014 et juillet 2015 à Gustave Roussy ont été analysées de façon rétrospective à la recherche de facteurs associés au statut PD-L1. 83 patients (26,9%) étaient PD-L1 positifs, avec une différence significative en fonction de l'essai dans lequel les patients avaient été inclus : P = 32,9% ; D= 30,5% et A = 11,5% (p=0,002). En analyse multivariée, le statut PD-L1 était associé au test IHC réalisé et au type histologique (respectivement p= 0,001 et 0,008) : le test compagnon de l'atezolizumab (anticorps SP142) était associé à une moindre positivité; tandis que les histologies de type épidermoïde et carcinome urothélial étaient associées à la positivité. Parmi le sous-groupe des patients métastatiques, les prélèvements provenant de métastases hépatiques avaient tendance à être associés à une moindre positivité. L'ancienneté du prélèvement, sa cellularité, le site (primitif ou métastase) et la méthode de prélèvement (exérèse ou biopsie) n'influençaient pas le statut PD-L1. Ces résultats mettent en évidence la nécessité d'évaluer les facteurs IHC et histologiques associés au statut PD-L1, afin de prendre en compte leur impact.

Mots clés : Immunothérapie, PD-1/PD-L1, biomarqueur, immunohistochimie, checkpoint immunitaire

Biomarkers in cancer immunotherapy : analysis of clinical, histological and immunohistochemical factors associated with PD-L1 status.

Inhibitors of PD-1/PD-L1 have changed the treatment paradigm in oncology. However, only a minority of patients respond to these therapies and therefore there is a critical need to identify molecular predictors. PD-L1 expression, detected by immunohistochemistry is currently the most explored biomarker, but its predictive value is still unclear.

We reviewed in detail the files of 309 patients who were treated with anti-PD-1/PD-L1 antibodies (pembrolizumab P, durvalumab D or atezolizumab A) at Gustave Roussy Cancer Campus between January 2014 and July 2015. Clinical, histological and immunohistochemical (IHC) features were retrospectively collected for all of them in order to identify factors affecting PD-L1 status.

83 patients (26.9%) were positive for PD-L1 in IHC. PD-L1 positivity varied significantly depending on the treatment considered: P = 32.9% ; D= 30.5% et A = 11.5% (p=0.002). This suggests a relation between the companion test used for IHC and PD-L1 positivity. Multivariate analysis showed that PD-L1 expression was associated with IHC test and histological type (respectively p= 0.001 et 0.008). Atezolizumab companion test (SP142) was associated with low PD-L1 expression; while squamous cell carcinoma and urothelial carcinoma were associated with high expression. Among metastatic patients, samples from liver metastasis showed a trend for lower PD-L1 expression. There was no significant relationship with sampling method (biopsy or surgical resection), nor with sample's age, cellularity, or sample location (primary or metastatic site).

This study identified IHC and histological factors associated with PD-L1 positivity, which need to be further investigated.

Keywords: Immunotherapy, PD-1/PD-L1, biomarker, immunohistochemistry, immune checkpoint

Université Paris Descartes
Faculté de Médecine Paris Descartes
15, rue de l'École de Médecine
75270 Paris cedex 06