



**HAL**  
open science

**Analyse de l'expression de PD-L1 par les carcinomes non à petites cellules pulmonaires et de CD103 par le microenvironnement tumoral : analyse clinique, histologique et immunohistochimique d'une cohorte de 70 patients traités par nivolumab et de 74 patients opérés d'un adénocarcinome pulmonaire**

Lisa Maloberti

► **To cite this version:**

Lisa Maloberti. Analyse de l'expression de PD-L1 par les carcinomes non à petites cellules pulmonaires et de CD103 par le microenvironnement tumoral : analyse clinique, histologique et immunohistochimique d'une cohorte de 70 patients traités par nivolumab et de 74 patients opérés d'un adénocarcinome pulmonaire. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-01806274

**HAL Id: dumas-01806274**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01806274>**

Submitted on 1 Jun 2018

**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.

**Thèse pour l'obtention du  
DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE**

Discipline : Anatomie et Cytologie Pathologiques

Présentée et soutenue publiquement le 25/04/2018

**Par Lisa MALOBERTI**

Née le 03 octobre 1989 à Colombes (92)

**ANALYSE DE L'EXPRESSION DE PD-L1 PAR LES CARCINOMES NON A  
PETITES CELLULES PULMONAIRES ET DE CD103 PAR LE  
MICROENVIRONNEMENT TUMORAL**

---

*Analyse clinique, histologique et immunohistochimique d'une cohorte de 70 patients traités par nivolumab et de 74 patients opérés d'un adénocarcinome pulmonaire.*

**Directeur de thèse**

Monsieur le Docteur Hugues BEGUERET

**Membres du jury**

Monsieur le Professeur Jean-Philippe MERLIO	Président
Madame le Professeur Béatrice VERGIER	Juge
Madame le Maître de conférence universitaire Audrey GROS	Juge
Monsieur le Docteur Rémi VEILLON	Juge

**Rapporteur** : Madame le Maître de conférence universitaire Audrey GROS

## TABLE DES MATIERES

---

LISTE DES ABREVIATIONS .....	1
INTRODUCTION.....	3
GENERALITES.....	6
1. Système immunitaire et cancer .....	6
1.1 Lien entre immunité et cancer.....	6
1.2 Les différents acteurs de l'immunité anti-cancer.....	8
1.3 Echappement tumoral .....	18
1.4 Concept de point de contrôle immunitaire.....	21
2. Avancées des essais cliniques sur l'immunothérapie anti-PD1/PD-L1 dans le carcinome pulmonaire .....	24
2.1 Nivolumab ( <i>Opdivo</i> , BMS).....	26
2.2 Pembrolizumab ( <i>Keytruda</i> , MSD).....	32
2.3 Atézolizumab, durvalumab et avélumab : trois immunothérapies anti-PD-L1 .....	34
2.4 Effets secondaires et immunothérapie .....	37
2.5 Mécanismes de résistance acquise aux anti-PD-1 .....	40
3. Critères biologiques prédictifs de l'efficacité de l'immunothérapie anti-PD1/PD-L1 : les différentes voies possibles.....	43
3.1 La charge mutationnelle et en néo-antigènes.....	43
3.2 Microenvironnement tumoral .....	50
3.3 Expression des points de contrôle de l'immunité .....	58
4. Place de l'immunomarquage anti-PD-L1 dans les différents essais cliniques.....	60
4.1 Dans les essais de phase III sur le nivolumab : clone 28.8.....	60
4.2 Dans les essais de phase III sur le pembrolizumab : clone 22C3 .....	63
4.3 Dans les essais sur l'atézolizumab : clone SP142.....	63
4.4 Dans les essais sur le durvalumab : clone SP263 .....	64
4.5 Dans les essais sur l'avélumab : clone 73-10.....	64
5. Différents anticorps anti-PD-L1 pour différentes thérapeutiques .....	66
5.1 Les différents anticorps anti-PD-L1.....	66
5.2 Caractéristiques de l'anticorps anti-PD-L1 .....	71

OBJECTIFS .....	75
1. PARTIE I.....	75
1.1 Objectif principal .....	75
1.2 Objectifs secondaires .....	75
2. PARTIE II .....	76
2.1 Objectif principal .....	76
2.2 Objectif secondaire .....	76
PARTIE I.....	77
MATERIEL ET METHODES .....	78
1. Sélection initiale des cas .....	78
2. Recueil des prélèvements et étude morphologique .....	78
3. Etude immunohistochimique.....	79
4. Recueil des données de survie et évaluation de la réponse thérapeutique .....	83
4.1 Recueil des données de survie .....	83
4.2 Evaluation de la réponse thérapeutique .....	83
5. Analyses statistiques .....	84
RESULTATS .....	85
1. Caractéristiques descriptives de la population .....	85
1.1 Caractéristiques cliniques et histologiques .....	85
1.2 Caractéristiques immunohistochimiques .....	87
2. Les réponses selon RECIST v 1.1 .....	89
3. Survie globale et données immunohistochimiques .....	90
3.1 Survie globale en fonction du statut PD-L1 des CT .....	91
3.2 Survie globale en fonction du statut PD-L1 des CI .....	93
3.3 Survie globale en fonction du statut CD8 des CI intra-tumorales .....	94
3.4 Survie globale en fonction du statut CD103 des CI intra-tumorales .....	95
4. Taux de réponse selon RECIST v1.1 et données immunohistochimiques.....	96
4.1 Taux de réponse et statut PD-L1 des CT .....	96
4.2 Taux de réponse et statut PD-L1 des CI intra-tumorales .....	96
4.3 Taux de réponse et statut CD8 et CD103 des CI intra-tumorales.....	97

5. Taux de réponse et lymphocytose .....	98
6. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et CI et l'expression de CD103 par les CI intra-tumorales .....	99
7. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et l'expression de CD8 par les CI intra-tumorales .....	100
8. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et l'apparition d'effets secondaires sous immunothérapie .....	101
<b>PARTIE II</b> .....	<b>102</b>
<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>103</b>
1. Sélection initiale des cas .....	103
2. Recueil des prélèvements et des données histologiques .....	103
3. Etude immunohistochimique.....	106
4. Recueil des données cliniques et de survie .....	107
5. Recueil des données théranostiques et moléculaires .....	107
6. Analyses statistiques .....	107
<b>RESULTATS</b> .....	<b>108</b>
1. Caractéristiques descriptives de la population .....	108
1.1 Caractéristiques cliniques .....	108
1.2 Caractéristiques histopathologiques.....	110
1.3 Caractéristiques immunohistochimiques .....	111
1.4 Caractéristiques moléculaires .....	112
2. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et les critères histopronostiques des adénocarcinomes .....	113
3. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CI et les critères histopronostiques des adénocarcinomes .....	117
4. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et CI et l'expression de CD103 par les CI intra-tumorales.....	118
5. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et l'expression de CD8 par les CI intra-tumorales.....	120
6. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et les données moléculaires.....	123
7. Relation entre l'expression de CD103 par les CI intra-tumorales et les critères histopronostiques des adénocarcinomes .....	124
8. Relation entre l'expression de CD103 et de CD8 par les CI intra-tumorales .....	125

9. Relation entre l'expression de CD103 par les CI intra-tumorales et les données moléculaires.....	126
10. Survie sans progression et données immunohistochimiques.....	127
10.1 Survie sans progression en fonction du statut PD-L1 des CT .....	128
10.2 Survie sans progression en fonction du statut PD-L1 des CI.....	129
10.3 Survie sans progression en fonction du statut CD8 et CD103 des CI intra-tumorales.....	129
DISCUSSION .....	130
1. Partie I .....	130
2. Partie II.....	133
3. L'anticorps E1L3N.....	135
4. Limites principales de l'étude .....	136
CONCLUSION .....	137
BIBLIOGRAPHIE .....	139
ANNEXES .....	150
SERMENT D'HIPPOCRATE .....	158

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

ADCC: Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity = cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps

ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase

AMM: Autorisation de Mise sur le Marché

CBNP : Carcinome Bronchique Non à Petites Cellules

CD: Cellules Dendritiques

CDK: Kinases Dépendantes des Cyclines

CDx: Cluster de Différenciation

CHU: Centre Hospitalier Universitaire

CI: Cellules Immunes

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA: Cellules Présentatrices d'Antigènes

CT: Cellules Tumorales

CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

HAS: Haute Autorité de Santé

HES: Hématoxyline Eosine Safran

HR: Hazard Ratio

ICI: Inhibiteur des points de Contrôle de l'Immunité

IDO: Indoléamine-2, 3-Dioxygénase.

IFN: interféron

Ig: immunoglobuline

IL-: interleukine

JAK: Janus Kinase

KIR: Killer cell Immunoglobulin-like Receptors

LDT: Laboratory-Developed Test

LT: Lymphocytes T

LB: Lymphocytes B

MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cell = cellules myéloïdes suppressives

MSI: MicroSatellite Instability

NCR: Natural Cytotoxicity Receptors

NGS: Next Generation Sequencing

NK: Natural Killer

OS: Overall Survival

OR: Odd Ratio

PD1/PDL1: Programmed Death-1 receptor and its Ligand

PS: Performans Status

RAG: Recombination Activating Gene

PFS = SSP : survie sans progression

TAM: tumor-associated macrophage = macrophages associés aux tumeurs

TCR: T Cell Receptor = récepteur des cellules T

TGF $\beta$ : Tumor Growth Factor

Th: T helper

TILs: Tumor-Infiltrating Lymphocytes / lymphocytes infiltrant la tumeur

TKI: Tyrosine Kinase Inhibitor

TNF: Tumor Necrosis Factor

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine



## INTRODUCTION

Le cancer du poumon occupe la 4<sup>ème</sup> place des cancers les plus fréquents en Europe ; les carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBNPC) représentent 80% de l'ensemble des cancers du poumon. Il s'agit de l'une des principales causes de décès par cancer dans le monde (1).

Dans le cadre du CBNPC, les principales avancées thérapeutiques depuis les années 2000 concernent les thérapies ciblées chez les patients présentant une addiction oncogénique : les mutations d'*EGFR* conférant une sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) (erlotinib, gefitinib...), la mutation de résistance T790M d'*EGFR* ciblée par l'osimertinib et les translocations d'*ALK* et de *ROS* ciblées par le crizotinib sont les plus courantes. Ainsi, les techniques de recherche d'expression protéique par immunohistochimie, de réarrangement chromosomique par hybridation *in situ* et de mutation par NGS (Next Generation Sequencing) à but diagnostique, théranostique ou pronostique, sont utilisées en routine (2). Cependant, les patients éligibles représentent un faible pourcentage (mutation *EGFR* 11%, *ALK* 5% et *BRAF* 2%) (figure 1) des patients atteints de CBNPC et ces thérapies ont une efficacité limitée par l'apparition, dans le temps, de clones tumoraux résistants (3) (4). De nouvelles thérapeutiques sont donc nécessaires.

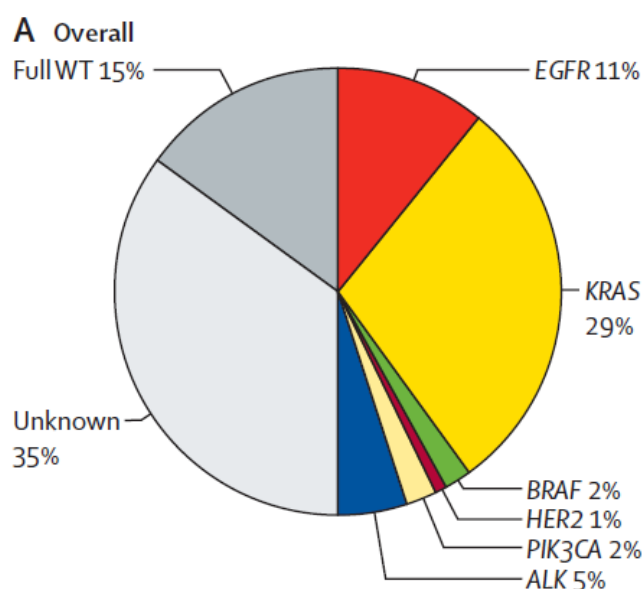


Figure 1 : Fréquence des altérations moléculaires de 6 gènes évaluée à partir de 18 679 échantillons de CBNPC. D'après *Barlesi et al* (3).

Le concept d'immunothérapie est défini par l'HAS comme un traitement visant à stimuler les défenses de l'organisme contre les cellules cancéreuses (5). En effet, les tumeurs se composent non seulement de cellules tumorales présentant des altérations génétiques, mais également d'autres types cellulaires présents dans le microenvironnement tumoral avec lequel elles interagissent. Le système immunitaire, *via* une réponse innée ou spécifique, joue un rôle anti-tumoral au cours d'un cycle soumis à de multiples signaux activateurs ou inhibiteurs de la réponse immune (6). Parmi les signaux immunosuppresseurs contrôlant l'immunité, les principaux points de contrôle de l'immunité sont l'axe CTLA-4/B7-2 (receptor cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4 and its ligand) et l'axe PD-1/PD-L1 (Programmed death-1 receptor and its ligand) (7). PD-1 est une molécule de co-stimulation exprimée par les lymphocytes T activés; son engagement avec son ligand, PD-L1, déclenche un signal inhibant les capacités cytotoxiques des lymphocytes T CD8+. Dans le cadre de la théorie des 3E, PD-L1 est alors exprimé par les cellules tumorales et l'interaction PD-1/PD-L1, à leur surface, leur permet d'échapper à la surveillance immunitaire (8). Récemment, de nouvelles immunothérapies en oncologie ciblant l'axe PD-1/PD-L1 ont montré, dans plusieurs essais, une amélioration de la survie des patients non seulement en deuxième ligne de traitement, mais aussi en première ligne de traitement des CBNPC (9) (10) (11) (12). Le nivolumab et le pembrolizumab sont les deux principales immunothérapies anti-PD1 ayant l'AMM dans les CBNPC en France. Cependant, la réponse thérapeutique n'est pas homogène et n'est pas toujours prolongée soulignant la nécessité de développer des biomarqueurs prédictifs d'efficacité.

A l'heure actuelle, différents axes sont étudiés pour prédire la réponse à l'immunothérapie. Actuellement, seule l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales est réalisée en routine. PD-1/PD-L1 en tant que biomarqueur prédictif est encore controversé et se confronte à plusieurs difficultés techniques et d'interprétation avec la présence de différents clones et de différents scoring (13). La prescription de nivolumab n'est pas conditionnée par le statut PD-L1 tandis qu'une expression d'au moins 1% ou de plus de 50% des cellules tumorales est nécessaire pour la prescription du pembrolizumab respectivement en deuxième et première ligne (11) (14).

L'étude du microenvironnement tumoral immun constitue un second axe de développement de biomarqueur prédictif. En effet, la présence d'un infiltrat inflammatoire lymphocytaire intra-tumoral, dénommé TILs (tumor-infiltrating lymphocytes), est un facteur pronostique indépendant dans de nombreuses pathologies cancéreuses (sein, poumon, colon...) et notamment dans le cancer pulmonaire (15) (16) (17). La densité de l'infiltrat inflammatoire T

cytotoxiques CD8+ est corrélée à une meilleure survie globale et survie sans progression (18) (19). Parallèlement, l'interaction entre les cellules immunes et tumorales met en jeu des molécules d'adhésion telles que le CD103, sous-unité  $\alpha E$  de l'intégrine  $\alpha E\beta 7$ . Les cellules CD103+ intra-tumorales ont un rôle dans le recrutement et l'efficacité cytotoxique du système immunitaire (20). La présence de TILs CD103+ est corrélée à une meilleure survie globale dans le carcinome épidermoïde pulmonaire (21).

Enfin, la charge mutationnelle constitue le troisième axe de recherche, actuellement évaluée dans certains essais thérapeutiques. La distinction entre les tumeurs « inflammatoires » immunogènes et les tumeurs « non inflammatoires » sous-tend que l'immunogénicité d'une tumeur serait corrélée à sa réponse à l'immunothérapie (22) .

Dans ce travail de thèse, nous avons exploré les deux premiers axes.

Dans un premier temps, nous avons évalué, de manière rétrospective et unicentrique, sur une cohorte de patients traités par nivolumab en 2<sup>ème</sup> ligne pour un CBNPC localement avancé ou métastatique, la valeur prédictive de l'expression de PD-L1 et de la présence des sous-populations lymphocytaires CD8+ ou CD103+ sur la survie globale et le taux de réponse au traitement.

Dans un second temps, nous avons analysé, de manière rétrospective et unicentrique, sur une cohorte de patients opérés d'un adénocarcinome pulmonaire, les facteurs histopronostiques liés à l'expression immunohistochimique de PD-L1 ainsi que l'intérêt de l'étude du microenvironnement tumoral CD8+ ou CD103+.

## GENERALITES

---

### 1. Système immunitaire et cancer

---

#### 1.1 Lien entre immunité et cancer

De nombreuses études ont permis d'améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués dans la prolifération tumorale. Les tumeurs sont complexes et constituées de cellules différentes qui interagissent avec leur microenvironnement et, notamment, avec les cellules immunitaires.

Tout d'abord, des études expérimentales et épidémiologiques ont introduit le concept d'immunosurveillance qui joue un rôle primordial dans le contrôle de la prolifération tumorale via l'interaction entre la cellule immune et la cellule tumorale.

Chez des souris immunodéficientes (déficientes pour le gène *RAG* qui intervient dans le réarrangement des gènes des immunoglobulines et du récepteur T (TCR)), on observe une augmentation de la fréquence des tumeurs spontanées ou induites (23).

Chez l'homme, on observe, de façon similaire, une fréquence accrue de cancer chez des patients transplantés ou atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) tels que les sarcomes de Kaposi, les lymphomes non Hodgkiniens et les lymphomes de Burkitt (24).

Par la suite, la théorie des 3E a émergé et divise l'interaction entre le système immunitaire et les cellules tumorales en 3 phases qui sont l'élimination, l'équilibre et l'échappement (25). Durant la phase d'élimination, le système immunitaire inné et adaptatif lutte contre la prolifération cancéreuse au fur et à mesure de l'apparition des cellules tumorales jusqu'à un point d'équilibre où il contrôle leur prolifération. De ce concept résulte la sélection de clones tumoraux résistants et un « façonnage » de la tumeur par le système immunitaire que l'on nomme l'immunoediting (Figure 2) (8).

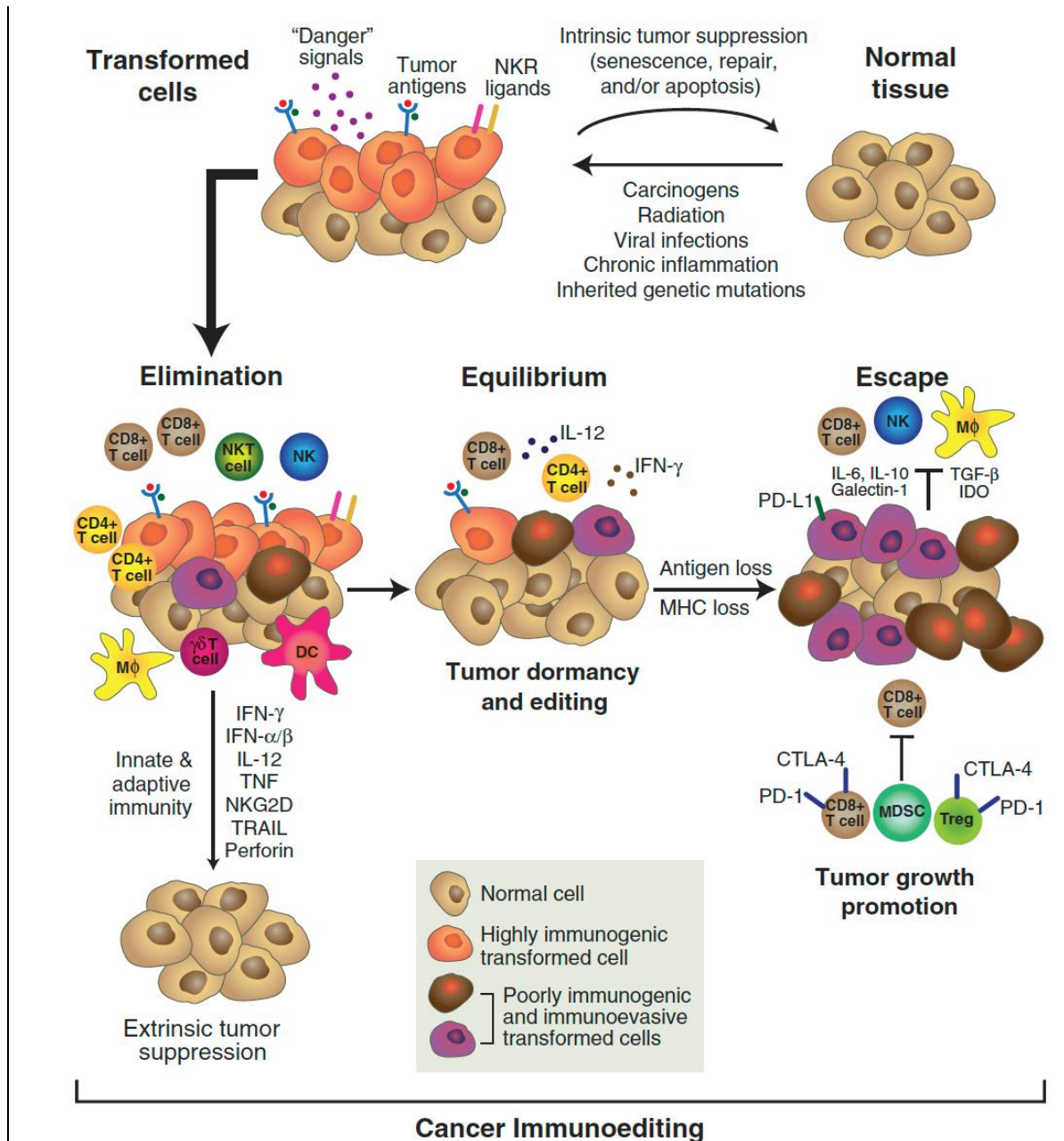


Figure 2 : Théorie des 3E et concept d'immunoediting.

D'après Schreiber et al (8).

## 1.2 Les différents acteurs de l'immunité anti-cancer

On distingue les acteurs de l'immunité innée et ceux de l'immunité acquise spécifique d'antigène (figure 3) (26).

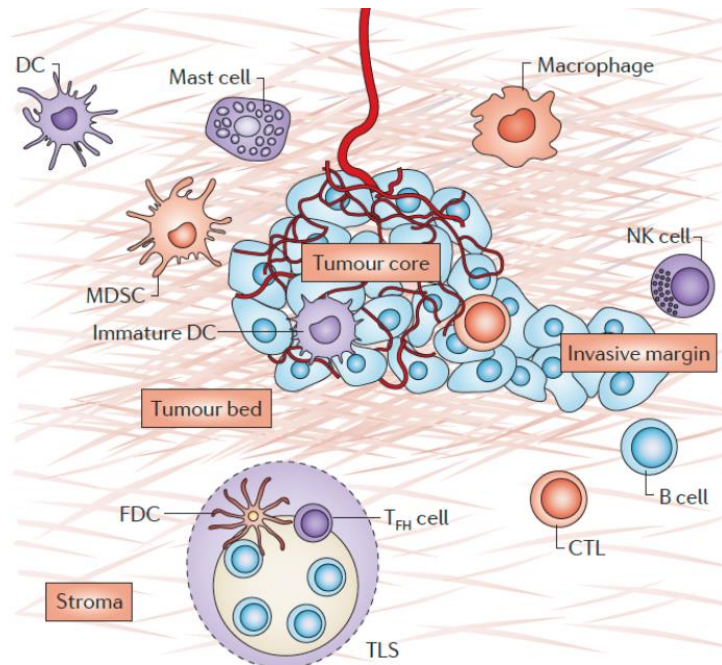


Figure 3 : Les différents acteurs de l'immunité innée et adaptative anti-tumorale.

D'après Galon *et al.* (26).

**Les cellules de l'immunité innée** sont les cellules natural killer (NK, effecteurs principaux), les macrophages, les cellules dendritiques immatures et les polynucléaires.

Les cellules NK sont responsables d'une immunité non spécifique, non CMH restreinte et sans réponse mémoire.

Différentes études ont mis en évidence l'intérêt et le rôle des cellules NK sur des modèles murins (27), chez des patients atteints du syndrome de Chediak-Higashi présentant un défaut en cellules NK (28) et dans une étude épidémiologique prospective sur 11 ans (29) et montrent l'augmentation de l'incidence de cancer dans des cas de défaillance des cellules NK.

Les cellules NK expriment à leur surface des récepteurs inhibiteurs et activateurs.

En effet, les récepteurs killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR), NKG2A et TIGIT sont des récepteurs inhibiteurs qui détectent la présence des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sur les cellules cibles et inhibent ainsi

l'activation des cellules NK. Ceci permet de préserver les cellules saines exprimant des molécules de classe I du CMH.

Parmi les récepteurs activateurs, on trouve NKG2D et les natural cytotoxicity receptors (NCR) qui se lient à des molécules exprimées par des cellules infectées ou transformées (MIC, ULBP) et qui activent les cellules NK (30) (figure 4).

On trouve, également, le CD16 qui se fixe à la portion Fc (portion cristal) des immunoglobulines et permet l'activation des cellules NK via un processus de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC : Antibody-dependent NK cell-mediated cytotoxicity) (figure 4 et 6). En effet, les anticorps d'isotype IgG opsonisés sur leurs cellules cibles sont capables d'interagir par leur portion cristal avec des cellules myéloïdes et lymphoïdes exprimant des récepteurs de cette portion (FcγR). L'engagement du FcγR par l'anticorps active la cellule effectrice conduisant à la dégradation de son contenu cytotolytique qui induit la mort de la cellule cible.

Ainsi, des cellules exprimant faiblement des molécules du CMH de classe I et/ou fortement des ligands de récepteurs activateurs, ou des cellules tumorales recouvertes d'IgG, peuvent activer des cellules NK. Le facteur majeur d'activation des cellules NK est la perte des molécules du CMH qui inhibe les récepteurs KIR (figure 6) (30).

Suite à leur activation, deux mécanismes de lyse interviennent avec la lyse directe (pro-apoptotique) via les couples récepteurs/ligands appartenant à la famille des tumor necrosis factor-tumor necrosis factor receptor (TNF-TNFR) que sont FAS/FAS-L et TRAIL-R/TRAIL ainsi que la lyse via l'exocytose de granules contenant des substances cytotoxiques (granzyme, perforine) (figure 5) (31).

Une fois activées, les cellules NK prolifèrent et produisent des cytokines (IFN $\gamma$ , GM-CSF, TNF $\alpha$ ) et des chimiokines qui participent au recrutement et à l'activation d'autres cellules immunitaires.

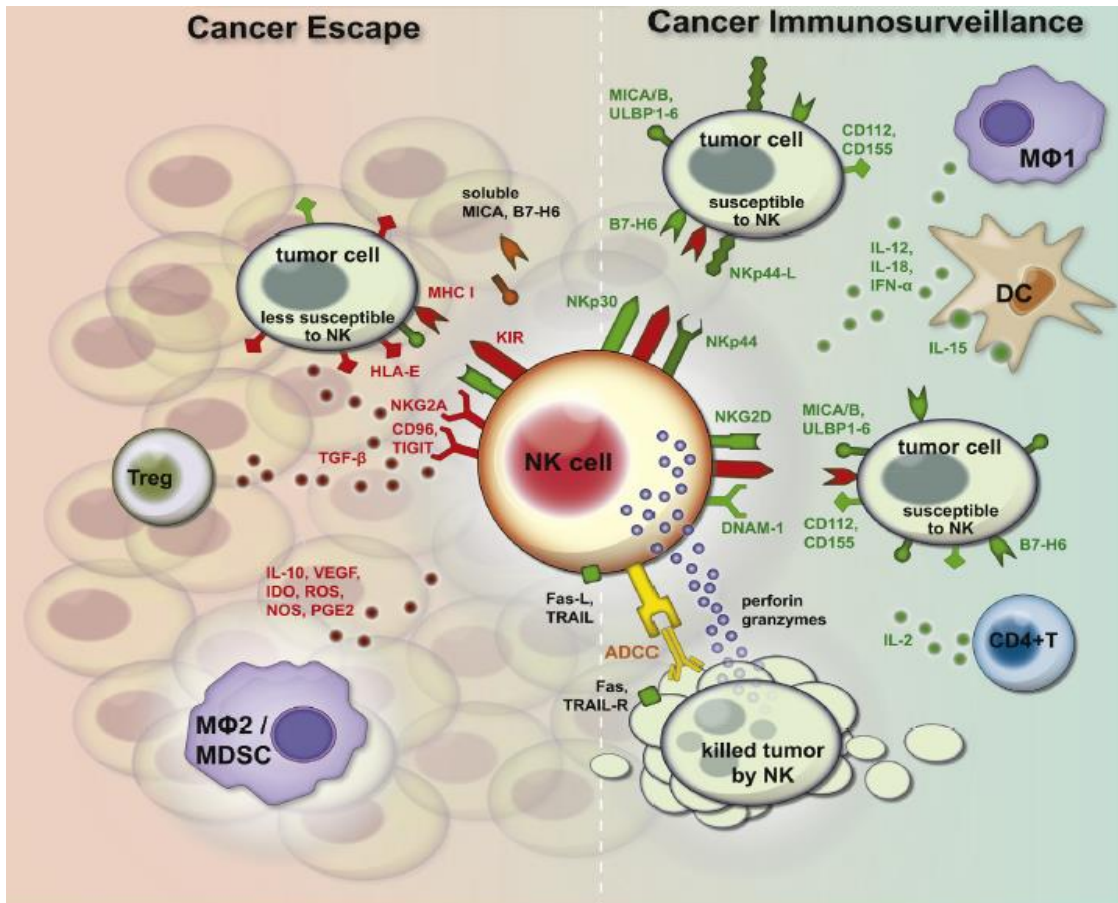


Figure 4: Régulation de la cytotoxicité des cellules NK au cours de l'immunosurveillance / échappement tumoral et inactivation des cellules NK (rouge : récepteurs/cytokines inhibiteurs, vert : récepteurs/cytokines activateurs). D'après Pahl J et al.(32).

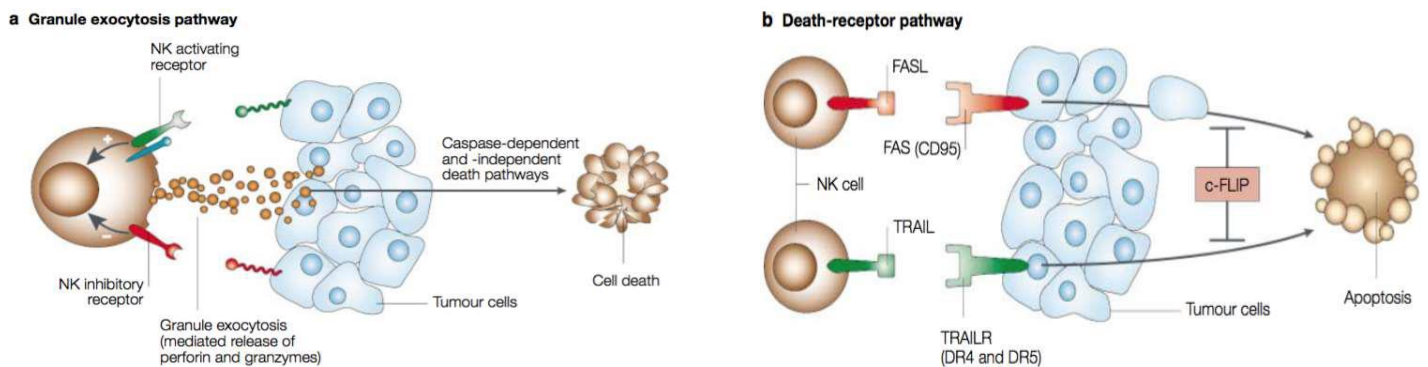
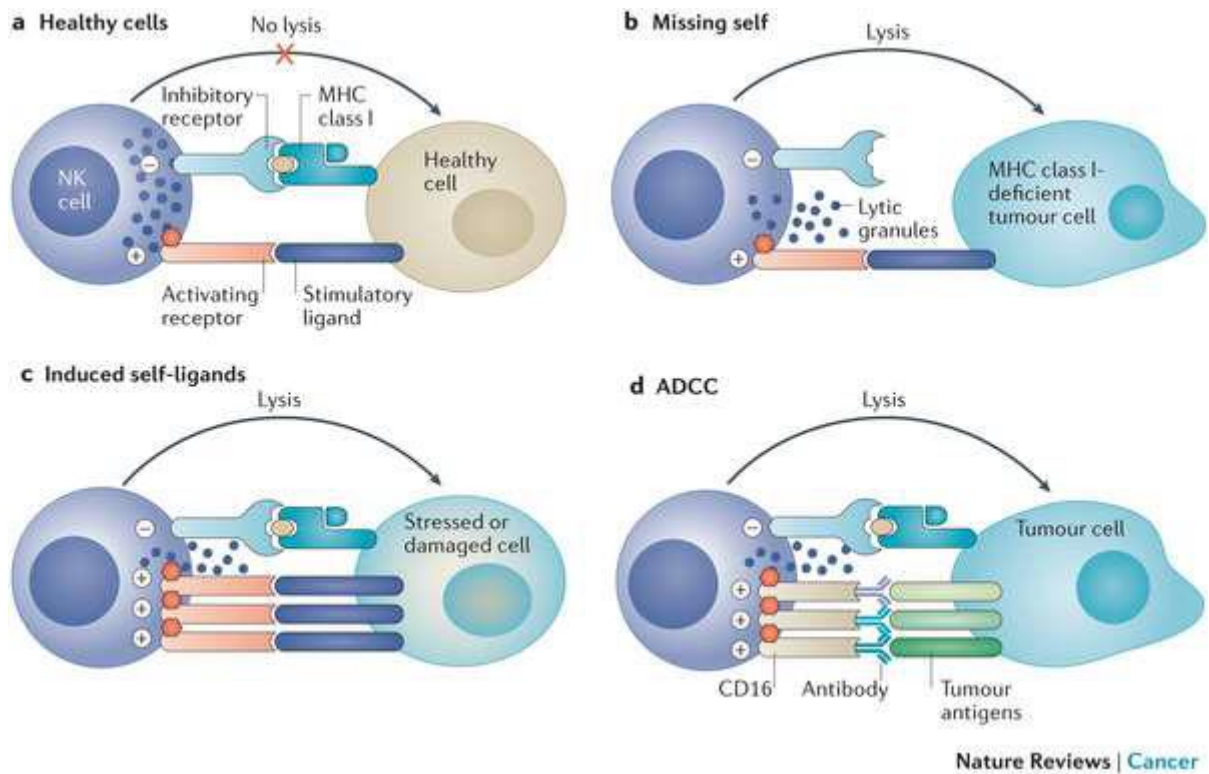


Figure 5 : Voies d'apoptose des cellules tumorales par les cellules NK.

D'après Smyth et al (31).

- a- Lyse via l'exocytose de granules cytotoxiques.
- b- Lyse directe via le couple récepteur/ligand de la famille des TNF.





**Figure 6 :** Représentation schématique des fonctions physiologiques anti-tumorales des cellules NK.

D'après *Morvan et al* (30).

- a) Reconnaissance des cellules normales grâce à un équilibre des signaux reçus par les récepteurs activateurs et inhibiteurs.
- b) Lyse des cellules tumorales ayant perdu l'expression du CMH.
- c) Lyse des cellules tumorales surexprimant des ligands de stress reconnus par les récepteurs activateurs des cellules NK.
- d) ADCC via le CD16.

Les macrophages de type M1 sont activés par l'IFN $\gamma$  synthétisé par les cellules NK activées et leur récepteur NKG2D. Une fois activés, ils lysent les cellules via la synthèse de TNF $\alpha$  et de dérivés de l'oxygène et de l'azote.

Les macrophages de type M1 vont infiltrer les sites inflammatoires que sont les sites tumoraux et vont basculer vers une polarisation de type M2-like caractérisant les macrophages associés aux tumeurs (les TAMs). Les TAMs présentent alors des propriétés immunosuppressives en produisant des molécules immunosuppressives telles que l'IL-10,IDO, arginase-1 et produisent également des facteurs de croissance favorisant la prolifération tumorale ainsi que du VEGF favorisant l'angiogenèse (figure 7) (33) (34).

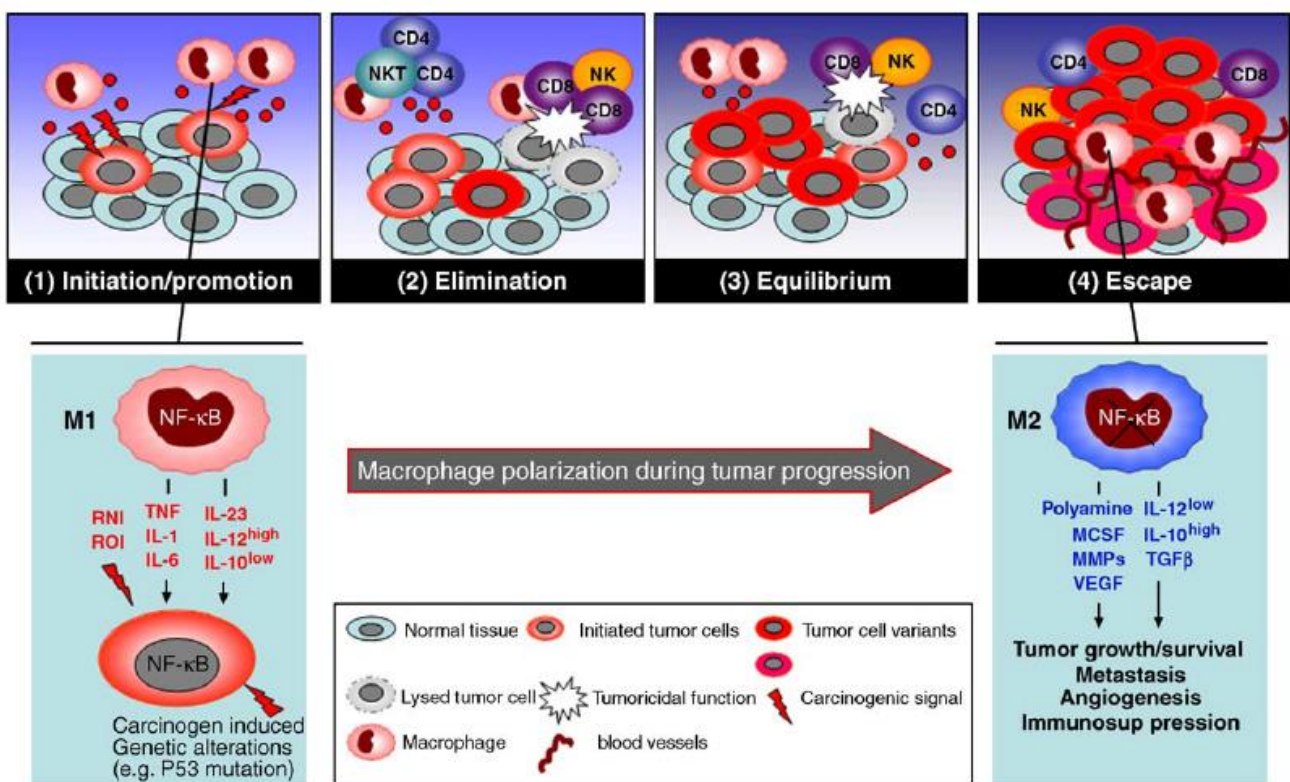


Figure 7 : Polarisation de type M2 des TAMs. D'après Mantocani A et al. (35).

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont des cellules définies fonctionnellement par leur capacité à prendre l'antigène et à le présenter aux lymphocytes. Un des principaux acteurs est la cellule dendritique.

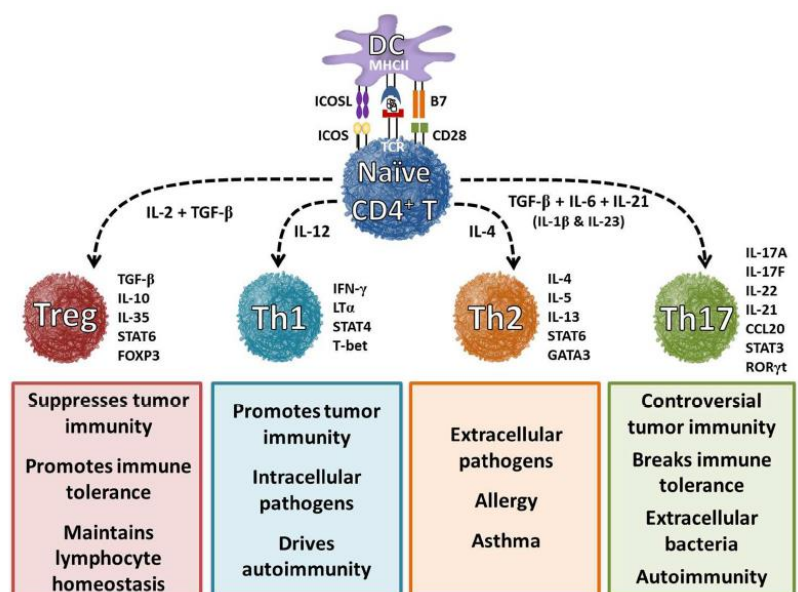
**Les cellules de l'immunité acquise, dans le cadre du cancer,** sont les lymphocytes B (LB, immunité humorale) et majoritairement les lymphocytes T (LT, immunité cellulaire). Après avoir été soumis aux sélections positives et négatives du thymus, les LT entrant dans la circulation sont dits « naïfs » car ils n'ont pas encore rencontré l'antigène. La reconnaissance spécifique du complexe CMH-peptide par le récepteur T (TCR) entraîne un processus de sélection clonale aboutissant à l'activation et à l'expansion des LT spécifiques. L'activation des lymphocytes T nécessite 3 éléments :

- un premier signal via la reconnaissance par le TCR du complexe HLA-peptide ;
- un second signal délivré par différentes molécules de co-stimulation ;
- un environnement cytokinique propice. Sans le signal fourni par les molécules de co-stimulation, le lymphocyte restera anergique, même après reconnaissance antigénique.

Les lymphocytes T CD4 + (lymphocytes auxiliaires) ont un rôle de lyse tumoral mais ont pour principale fonction la différenciation des lymphocytes T CD8+ en cellules mémoires (36). Ils peuvent se différencier en trois sous-populations principales de cellules effectrices qui produisent des types distincts de cytokines exerçant des fonctions différentes dans le système immunitaire. On distingue la sous-population Th1 avec l'IFN $\gamma$ , le récepteur CD40 et l'activation classique des macrophages ; la sous-population Th2 qui produit les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 qui ont un rôle dans la production d'IgE et l'activation alternative des macrophages ; la sous-population Th17 qui produit l'IL-17 induisant le recrutement de neutrophiles (figure 8) (37).

Figure 8 : La différenciation des lymphocytes T helper.

D'après Bailey SR et al. (37).



Les lymphocytes T CD8+ sont les principales cellules T cytotoxiques avec reconnaissance spécifique d'antigènes ayant un rôle primordial dans le cycle de l'immunité anti-cancer. Les cellules présentatrices d'antigènes sont à l'origine de l'activation des lymphocytes au sein des organes lymphoïdes. Il s'agit, le plus souvent, de cellules dendritiques qui, d'abord immature, vont être stimulées par des produits d'apoptose ou de lyse des cellules tumorales par les cellules NK et vont pouvoir maturées et ainsi exprimer à leur surface l'antigène tumoral à l'aide du complexe CMH de classe I (voie cytosolique) ou de classe II (voie endosomale). Les fragments peptidiques présentés par les molécules CMH de classe II vont être reconnus par les lymphocytes T CD4 tandis que les fragments peptidiques présentés par les molécules de CMH de classe I vont être reconnus par les lymphocytes T CD8 (6) (38) (figure 9).

Les lymphocytes T CD8+, ainsi activés, vont acquérir de nouveaux profils d'expression de récepteurs aux chimiokines qui vont leur permettre de migrer au sein du site de la tumeur (figure 10). Ainsi, les lymphocytes T CD8+, suite au lien récepteur TCR/complexe CMH-antigène, vont pouvoir lyser les cellules tumorales via les mêmes voies que les cellules NK qui sont soit la voie perforine/granzyme, soit l'interaction avec des TNF ou encore par la libération de cytokines telles que l'interféron $\gamma$ .

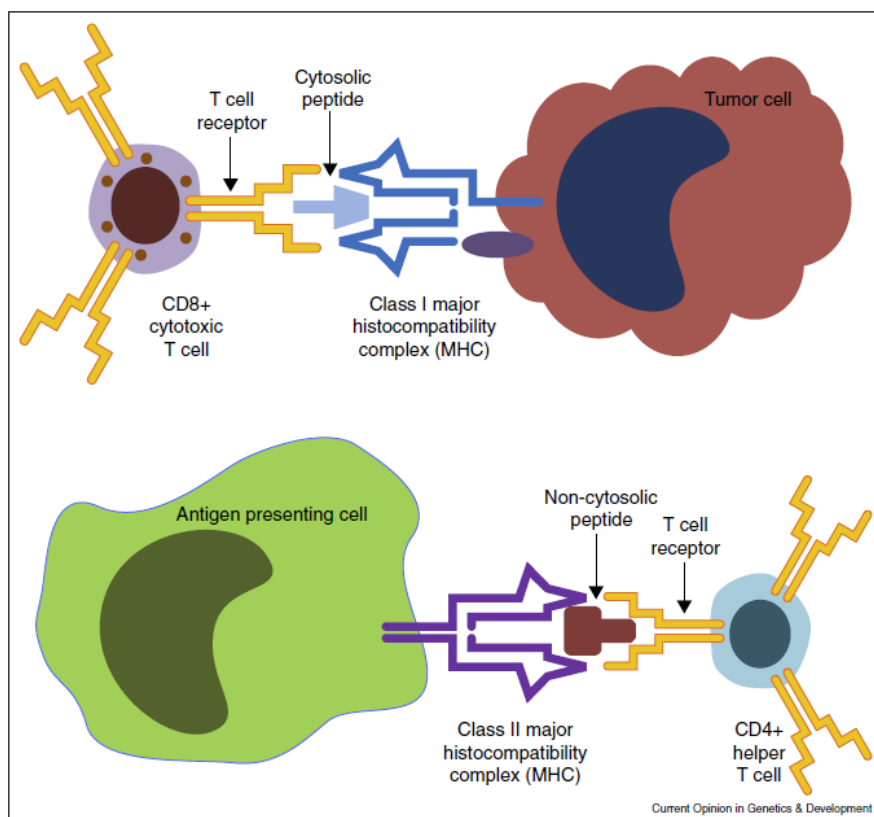


Figure 9 : Présentation antigénique. D'après Snyder A *et al* (38).

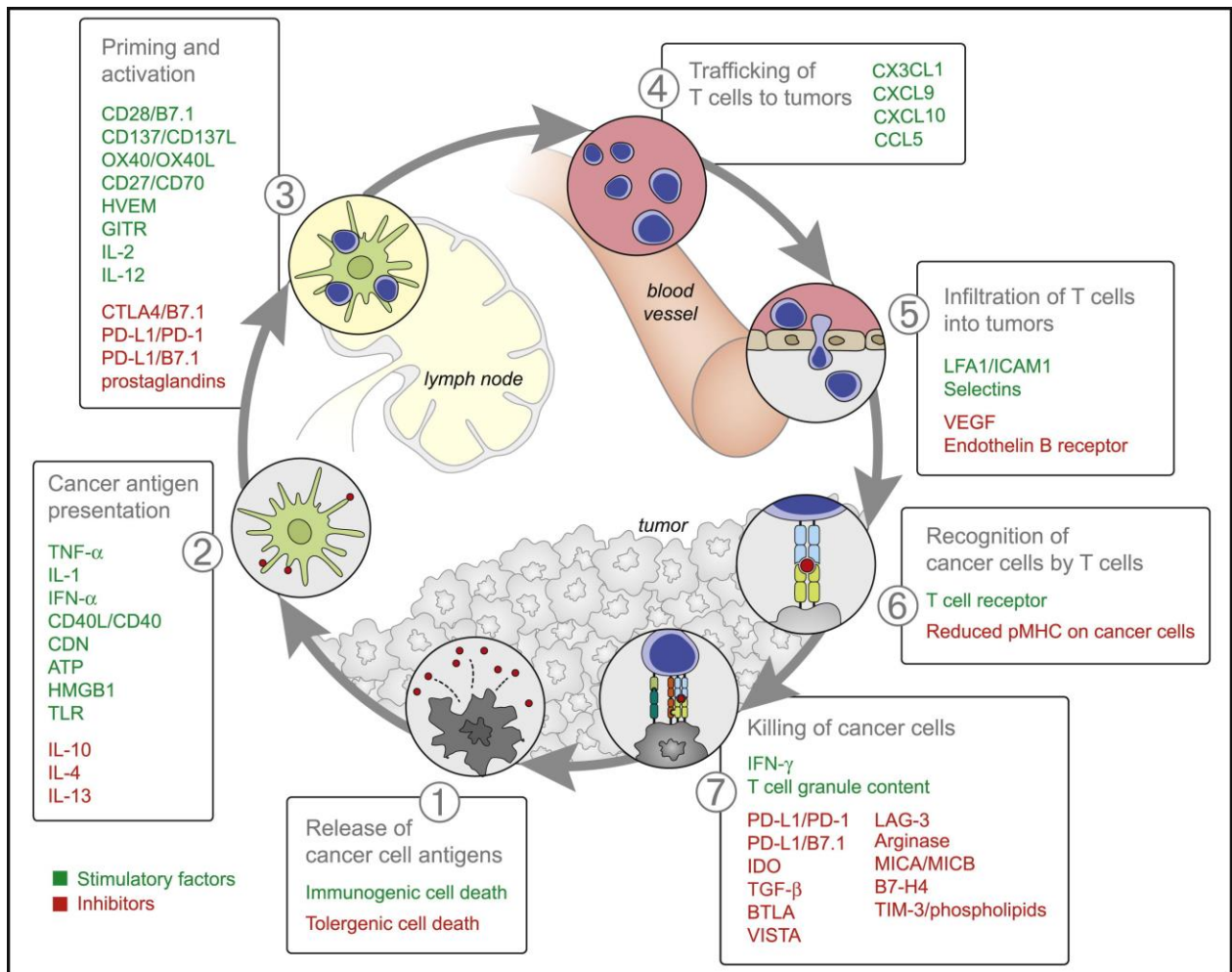


Figure 10 : Cycle de l'immunité anti-cancer. D'après Chen DS et Mellman I (6).

- 1- Relargage de néo-antigènes tumoraux par les cellules tumorales suite à leur apoptose et captation par les CPA ;
- 2- Présentation des antigènes tumoraux par les CPA aux lymphocytes T au sein des organes lymphoïdes ;
- 3- Initiation et activation des lymphocytes T ;
- 4- Recrutement des lymphocytes T vers la tumeur ;
- 5- Infiltration de la tumeur par les lymphocytes T ;
- 6- Reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes via le récepteur TCR et le CMH de classe I
- 7- Lyse des cellules tumorales via l'exocytose de granules cytotoxiques ou la voie perforine/granzyme ou l'interaction avec les TNF

A chacune de ces étapes, le lymphocyte est soumis à des signaux activateurs et inhibiteurs.

En effet, cette activation est contrebalancée par des molécules de co-inhibition, comme le point de contrôle immunitaire, dont le rôle est d'éviter une auto-immunité et d'assurer une tolérance périphérique (dans le cas de la grossesse et du placenta par exemple).

**Les molécules de co-activation et de co-inhibition** appartiennent à deux grandes familles de récepteurs-ligands composées de nombreuses molécules activatrices ou inhibitrices (figure 12) (39) (figure 13) (40) :

- La superfamille des immunoglobulines qui comprend la famille des B7-CD28 composée de molécules activatrices : (CD80(B7-1)-CD86(B7-2)/**CD28**, ICOSL/**ICOS**) et de molécules inhibitrices (CD80-CD86/**CTLA-4**, PD-L1-PD-L2/**PD-1**) (figure 11) (41) et d'autres molécules inhibitrices telles que TIM3, TIGIT et LAG3.

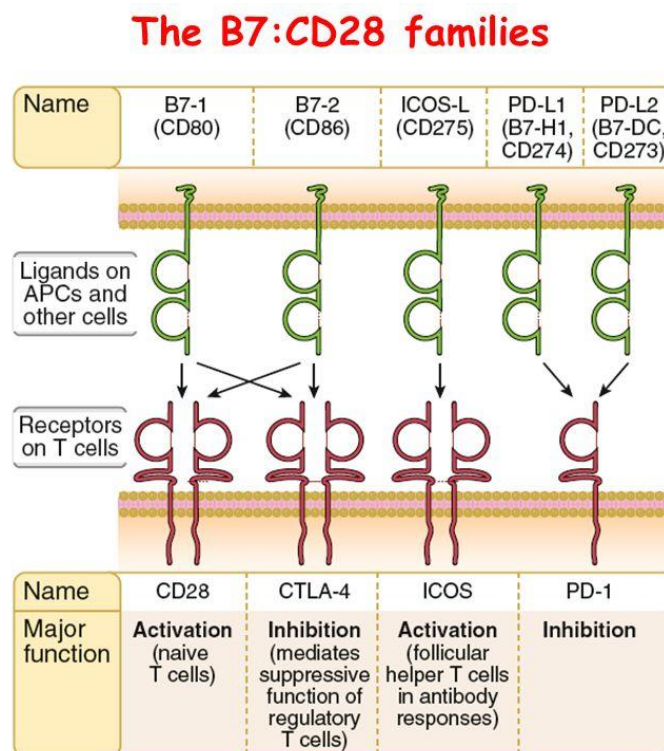


Figure 11: Protéines de la famille B7-CD28. Issu du livre « Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique » *Abbas AK. et al.*(41)

- La superfamille des TNF-récepteurs qui a une action principalement co-stimulatrice : OX40L-**OX40**, CD40/CD40L, GITRL/**GITR**, HEVM, CD30L-CD30, 4-1BBL/4-1BB.

Ces molécules sont exprimées à la surface des lymphocytes T mais également à la surface d'autres cellules immunitaires et interviennent à différents temps de la réponse immunitaire.

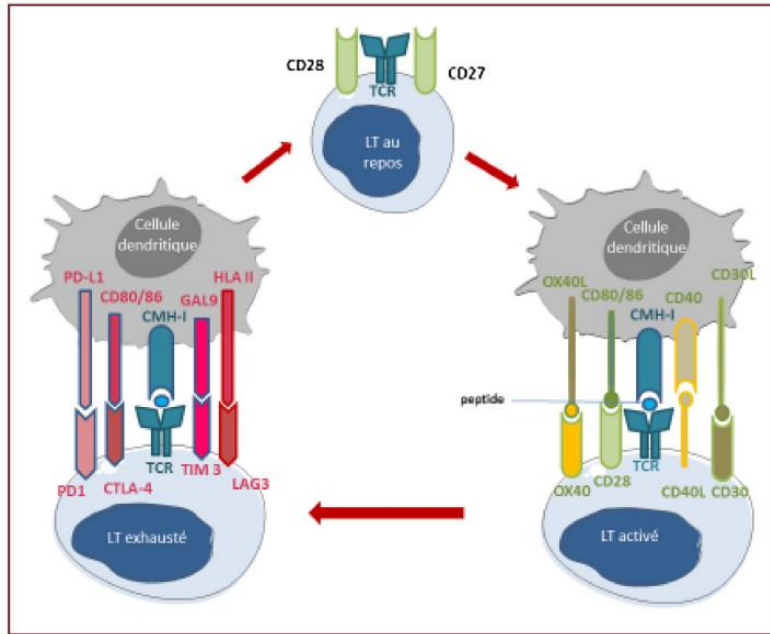


Figure 12 : Molécules de co-stimulation activatrices ou inhibitrices au cours de l'activation des LT. D'après Granier C et al (39).

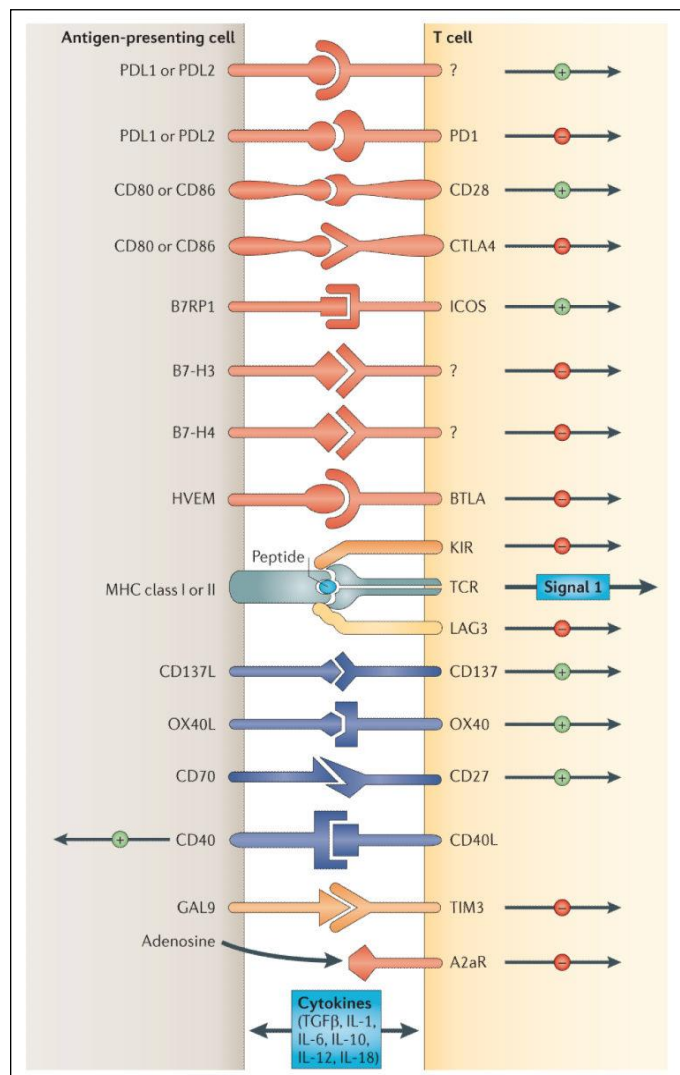


Figure 13 : Synthèse des molécules co-activatrices ou co-inhibitrices.

D'après Pardoll and al (40).

### 1.3 Echappement tumoral

Dans la théorie des 3E, la phase d'échappement correspond à la période où la cellule tumorale va élaborer différents mécanismes d'échappement au système immunitaire.

En premier lieu, on distingue les modifications intrinsèques à la cellule tumorale avec :

- la diminution voire l'absence totale d'expression des molécules du CMH de classe I à leur surface entraînant une diminution de la présentation des antigènes tumoraux et une absence de reconnaissance de la cellule tumorale par les lymphocytes T CD8+ ;
- la résistance des cellules tumorales à l'apoptose par perte ou diminution de FAS (42) ou TRAIL (43), par expression de FAS-L ou, par expression de molécules anti-apoptotiques (Bcl2-,c-Flip) (44).

Ensuite, la tumeur peut créer un microenvironnement suppresseur. En effet, les cellules tumorales sont capables de sécréter des cytokines immunosuppressives (TGF $\beta$ , IL-10, VEGF, IDO) et de favoriser le recrutement ou la différenciation de cellules suppressives d'origine myéloïde ou lymphoïde.

Les cellules suppressives d'origine myéloïde sont les cellules dendritiques, les macrophages infiltrant les tumeurs (TAMs), les neutrophiles associés aux tumeurs (TAN) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC).

*Les cellules dendritiques (CD)* vont être affectées au niveau de leur maturation et au niveau de leur différenciation en CD régulatrices qui inhibent l'activation des lymphocytes T soit par l'expression de molécules régulatrices telles que PD-L1, soit par la production de facteurs suppresseurs comme l'arginase ou l'IDO.



Les MDSC sont caractérisées par l'expression du CD33, l'absence de marquage de lignée et la faible expression de molécule du CMH de classe II. Elles sont de deux types avec les MDSC monocytiques exprimant le CD14 et les MDSC granulocytiques exprimant le CD15. Ces cellules ont la capacité (figure 14) (45) :

- d'inhiber les lymphocytes T CD8 via la déplétion des nutriments nécessaires aux lymphocytes et la génération d'un stress oxydatif par l'expression de la NADPH oxydase et de NO synthase inductible ;
- de bloquer les cellules NK via l'expression de TGFβ ;
- d'induire la différenciation de lymphocytes T régulateurs.

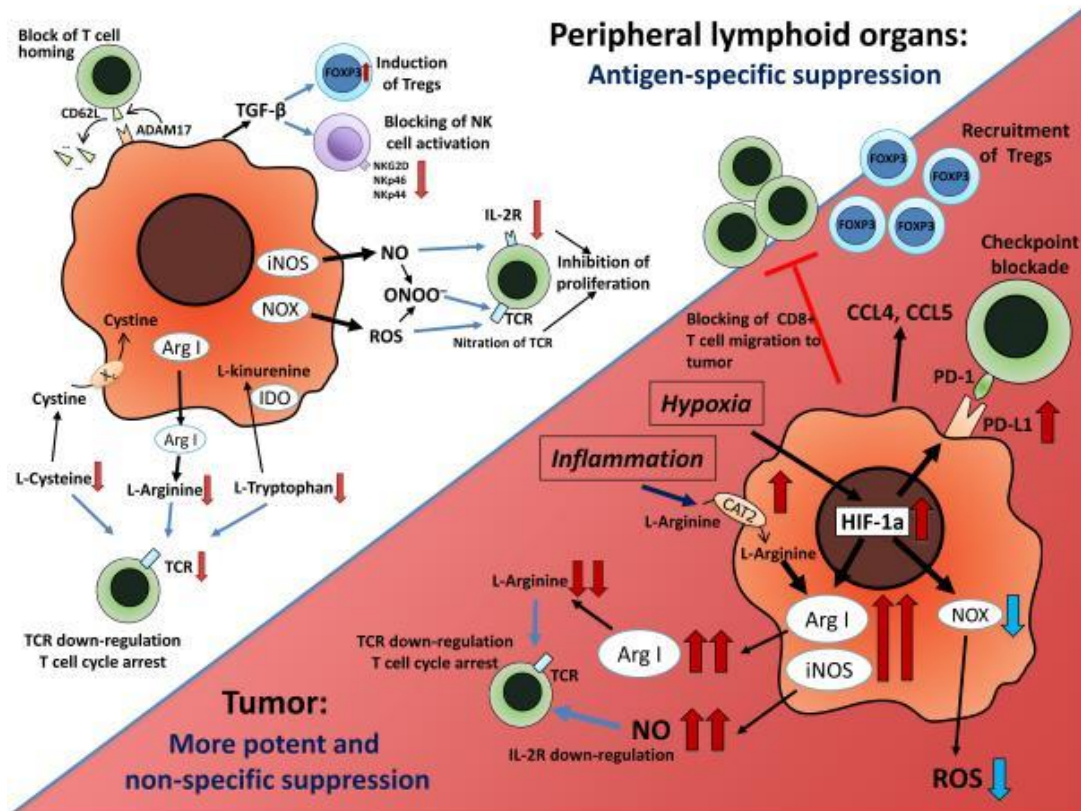


Figure 14 : Capacités de la cellule myéloïde suppressive. D'après Kumar V et al (45).

Les cellules suppressives d'origine lymphoïde sont les lymphocytes T régulateurs (Treg), sous-type de lymphocytes T CD4+.

*Les lymphocytes Treg* sont caractérisés par l'expression du CD4, CD25, et du facteur de transcription FOXP3. Les Treg incluent les Treg naturels générés dans le thymus et les Treg induits qui se différencient à partir des lymphocytes T CD4+ conventionnels sous la stimulation antigénique en présence de facteurs tels que le TGF $\beta$  et l'acide rétinoïque.

Ces cellules ont un rôle majeur dans l'immunosuppression induite par les tumeurs par différents mécanismes (46) :

- inhiber les CPA via l'expression du CTLA4 ;
- inhiber les lymphocytes T CD8 par la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF $\beta$ ), l'expression de perforine et granzyme, la consommation d'IL-2 par le CD25 ou la dégradation de l'ATP par les ectonucléotidases CD39 et CD73.

Enfin, au cours du développement du cancer, le système immunitaire va, peu à peu, s'épuiser et les lymphocytes T CD8 ne vont plus être capables de lyser les cellules tumorales.

## **1.4 Concept de point de contrôle immunitaire**

Le mécanisme qui va nous intéresser dans notre étude est celui d'activation des points de contrôle de l'immunité.

Dans le cycle physiologique de l'immunité que nous avons décrit, l'activation des lymphocytes T est contrebalancée par les mécanismes de régulation négative reposant sur l'augmentation de l'expression des molécules de co-inhibition. Ceci permet d'éviter un emballement du système immunitaire et une auto-immunité. Il s'agit d'un rétrocontrôle négatif physiologique induisant un phénomène de tolérance.

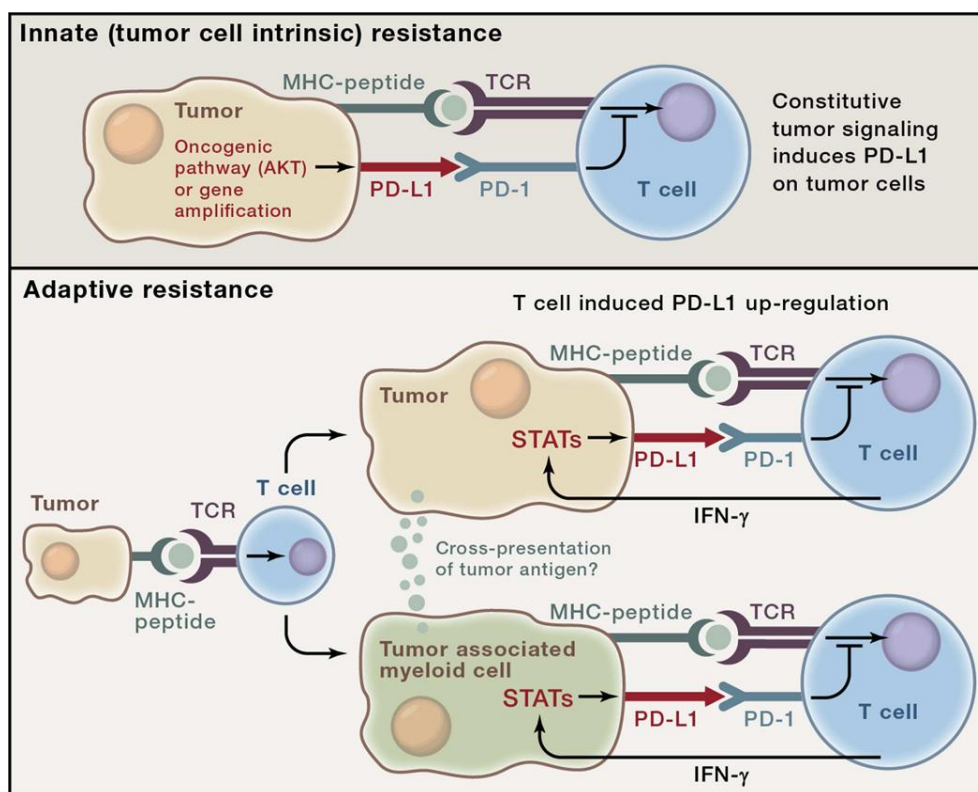
La cellule tumorale va ainsi utiliser et exprimer les ligands de ces co-inhibiteurs afin de contrer le système immunitaire en entraînant l'anergie voire l'élimination des lymphocytes T effecteurs, utilisant ainsi les propriétés immunosuppressives du point de contrôle immunitaire.

La molécule de co-stimulation inhibitrice que nous allons détailler ici est l'axe PD-1/PD-L1.

Le PD-1 est exprimé à la surface des lymphocytes T après l'engagement du TCR et possède comme ligand PD-L1 et PD-L2. L'ensemble constitue un signal co-inhibiteur de la prolifération lymphocytaire. La cellule tumorale peut exprimer PD-L1 à sa surface selon deux principaux mécanismes (Figure 15) (47) :

- expression constitutive (« innate ») de PD-L1 secondaire à des événements oncogéniques intrinsèques comme l'activation de la voie PI3K-AKT, des altérations chromosomiques, ou des amplifications géniques. Il s'agit d'un mécanisme de résistance à l'immunosurveillance.
- expression de PD-L1 adaptative induite par l'IFN $\gamma$  produit par les LT activés et les cellules NK activées. Il s'agit d'un mécanisme d'adaptation secondaire des tumeurs à la réaction immunitaire anti-tumorale.

PD-1/PD-L1-2 sont exprimés par diverses cellules immunes (cellules dendritiques, cellules NK, lymphocytes...).



**Figure 15** : Mécanismes d'expression du point de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1.

D'après *Topalian et al* (47).

L'association de PD-1 avec son ligand va entraîner différentes actions au sein de la cellule cible (figure 16) (48).

Tout d'abord (A), ITIM et ITSM, sous-unités de PD-1, recrutent par phosphorylation SHP1 et SHP2 qui inhibent par déphosphorylation les voies de signalisation activatrices du TCR et du CD28 soit PI3K/AKT et RAS/Erk. Il en résulte (B) une inhibition de CDK2 et une augmentation de Smad3, protéines impliqués dans le cycle cellulaire, ce qui aboutit à la mort cellulaire.

Ensuite (C), la liaison de PD-1 avec son ligand entraîne une activation d'ubiquitine ligases qui ubiquitinent le TCR entraînant son endocytose et une perte de la reconnaissance antigénique du lymphocyte.

Enfin (D), il existe une modification du métabolisme de glycolyse en un métabolisme de bêta-oxydation d'acide gras qui favorise la différenciation de lymphocytes T CD4+ en lymphocytes Treg.

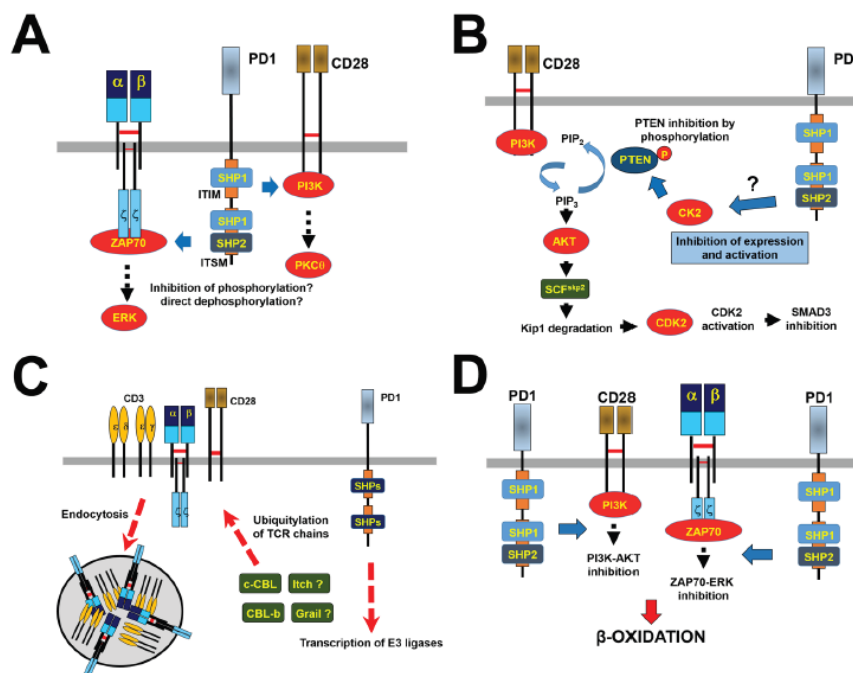


Figure 16: Actions/conséquences de l'activation de l'axe PD-1/PD-L1.

D'après Arasanz *et al* (48).

Ce point de contrôle est la cible des immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 et a fait l'objet de nombreuses études.

## 2. Avancées des essais cliniques sur l'immunothérapie anti-PD1/PD-L1 dans le carcinome pulmonaire

---

Le traitement de base des CBNPC métastatiques ou localement avancés, ni mutés *EGFR* ni réarrangés *ALK*, ce qui correspond à environ 85% des cas, repose sur des décisions multidisciplinaires prenant en compte l'âge du patient, le PS, les comorbidités, la volonté du patient, le type histologique, et la présence ou non d'altérations moléculaires (figure 17) (49). Avant les avancées récentes, la principale démarche thérapeutique était la mise en place, en première ligne, d'une chimiothérapie associant un sel de platine avec un cytotoxique de 3<sup>ème</sup> génération soit le pemetrexed dans les carcinomes non épidermoïdes soit la gemcitabine dans les carcinomes épidermoïdes. Les bénéfices cliniques de ces thérapies restaient faibles avec une survie évaluée entre 8 à 12 mois (50). En seconde ligne, les choix se restreignaient, le plus souvent, à une mono-chimiothérapie par docétaxel ou à une thérapie ciblée contre *EGFR* (erlotinib).

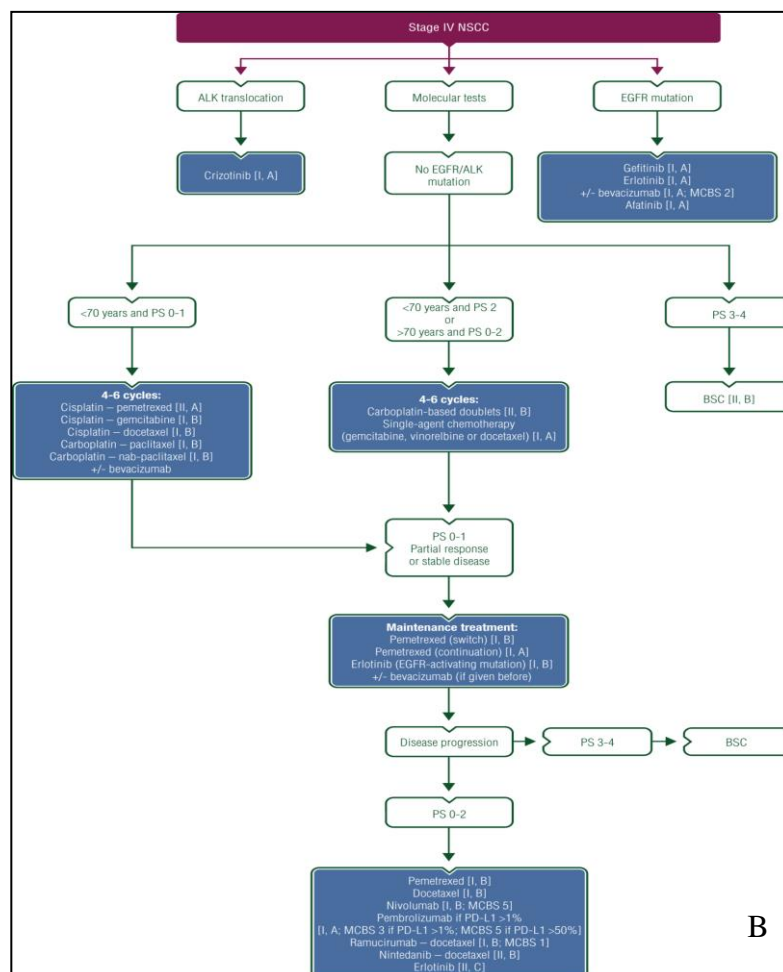
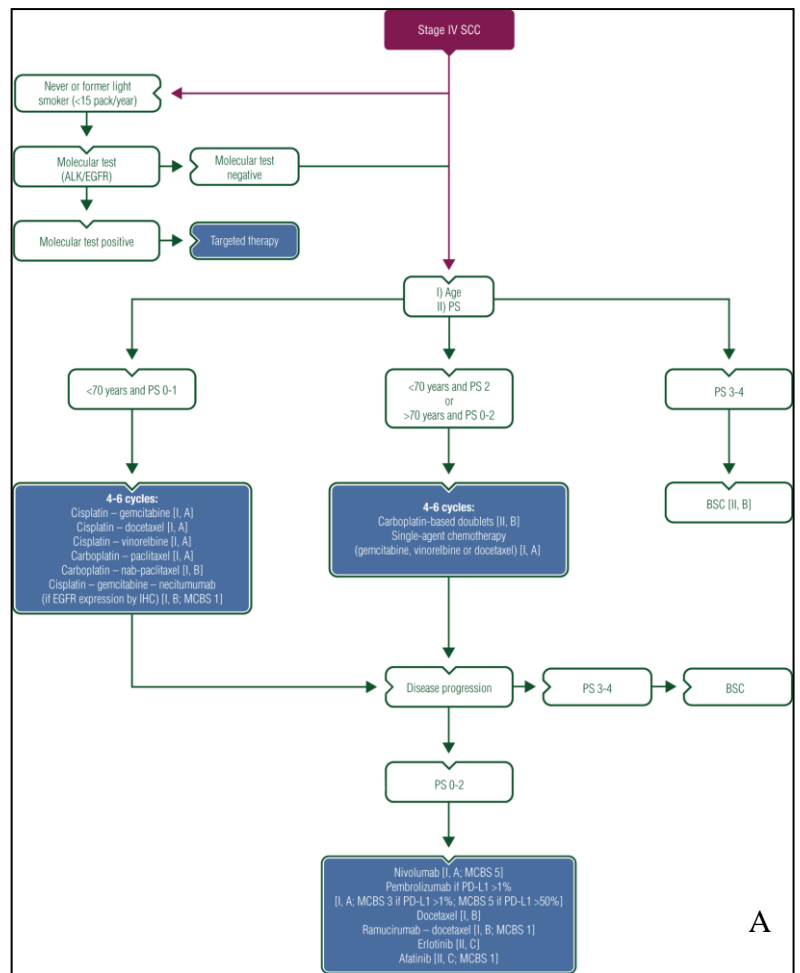
Le concept d'immunothérapie est ancien et vise à stimuler les défenses de l'organisme contre les cellules tumorales. De nombreuses thérapies ont émergé avec les vaccins immunologiques, l'immunisation in situ, ou encore l'immunisation intra-tumorale.

Depuis le début des années 2010, les inhibiteurs des points de contrôle de l'immunité (ICI) se sont développés. Ils reposent sur l'utilisation de molécules levant l'interaction PD-1/PD-L1 ou CTLA4/CTLA4-L et réactivant ainsi la réponse immunitaire préexistante. Il s'agit d'anticorps monoclonaux administrés par voie intraveineuse.

**Figure 17 :** Algorithmes thérapeutiques pour les carcinomes épidermoïdes (A) et non épidermoïdes (B) de stade IV en 2016.

(*ALK*, anaplastic lymphoma kinase; *EGFR*, epidermal growth factor receptor; *PS*, performance status; *IHC*, immunohistochemistry; *BSC*, best supportive care; *MCBS*, Magnitude of Clinical Benefit Scale).

D'après *Clinical Practice Guidelines ESMO (09/2016)* (49).



En France, actuellement, on distingue deux principales immunothérapies anti-PD-1 qui ont obtenues l'AMM selon les termes suivants:

- le nivolumab (*Opdivo*, BMS) « *en monothérapie dans le traitement des adultes atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) localement avancé ou métastatique après une chimiothérapie antérieure* ».
- le pembrolizumab (*Keytruda*, MSD) « *dans le traitement des patients adultes atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) localement avancé ou métastatique dont les tumeurs expriment PD-L1, et ayant reçu au moins une chimiothérapie antérieure. Les patients présentant des mutations tumorales d'EGFR ou d'ALK doivent également avoir reçu un traitement autorisé pour ces mutations avant de recevoir Keytruda* » et « *en monothérapie dans le traitement de première ligne des patients adultes atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) métastatique dont les tumeurs expriment PDL1 avec un score de proportion tumorale (TPS)  $\geq$  50%, sans mutation tumorale d'EGFR ou d'ALK* ».

## **2.1 Nivolumab (*Opdivo*, BMS)**

Le nivolumab est un anticorps IgG4 humain dirigé contre PD-1.

Deux principaux essais ont exploré son intérêt thérapeutique face à une chimiothérapie standard par docétaxel en 2<sup>ème</sup> ligne chez des patients atteints d'un CBNPC de type épidermoïde dans le Checkmate 017 et de type non épidermoïde dans le Checkmate 057. Les patients inclus devaient n'avoir reçu qu'une ligne de chimiothérapie à base de sels de platine à l'exception de ceux mutés *EGFR* et réarrangés *ALK*.



Dans l'étude Checkmate 017 sur les carcinomes épidermoïdes, il a été démontré une survie globale significativement supérieure en faveur du bras nivolumab (9,2 versus 6 mois, HR = 0,59,  $p < 0,001$  avec un IC95% [0.44-0.79]) avec une supériorité du taux de réponse par rapport au bras docétaxel de 20% versus 9% (figures 18, 19 et 20) (10).

La courbe de survie de cette étude montre un bénéfice de survie globale précoce avec deux courbes qui se séparent très tôt et un plateau tardif caractéristique des courbes de survie observées avec les immunothérapies. En effet, un pourcentage de patients sous immunothérapie (environ 30% ici) présente un bénéfice prolongé du nivolumab.

Un bénéfice en terme de survie sans progression (figure 18) a également été retrouvé (3,5 versus 2,8 mois avec  $p < 0,001$  HR = 0,62 (0,47-0,81)).

Dans l'étude Checkmate 057 sur les carcinomes non épidermoïdes, on observe un bénéfice de survie globale avec une survie médiane de 12,2 mois sous nivolumab contre 9,4 mois sous docétaxel (HR = 0,73,  $p = 0,002$ ) (figures 18, 19 et 20) (9). Le bénéfice de survie est moins ample que dans le Checkmate 017 et n'est pas homogène. En effet, les courbes de survie se croisent avec évolution défavorable, dans les 3 premiers mois, pour certains patients du groupe sous nivolumab. La survie médiane sans progression est supérieure dans le groupe docétaxel (4,2 versus 2,3 mois) sans que cela ne se traduise par une différence en terme de risque de progression (HR=0,92 IC95% (0,77-1,11),  $p = 0,39$ ).

Le taux de réponse était statistiquement supérieur dans le groupe nivolumab (19 contre 12%) avec des durées de réponse très longue.

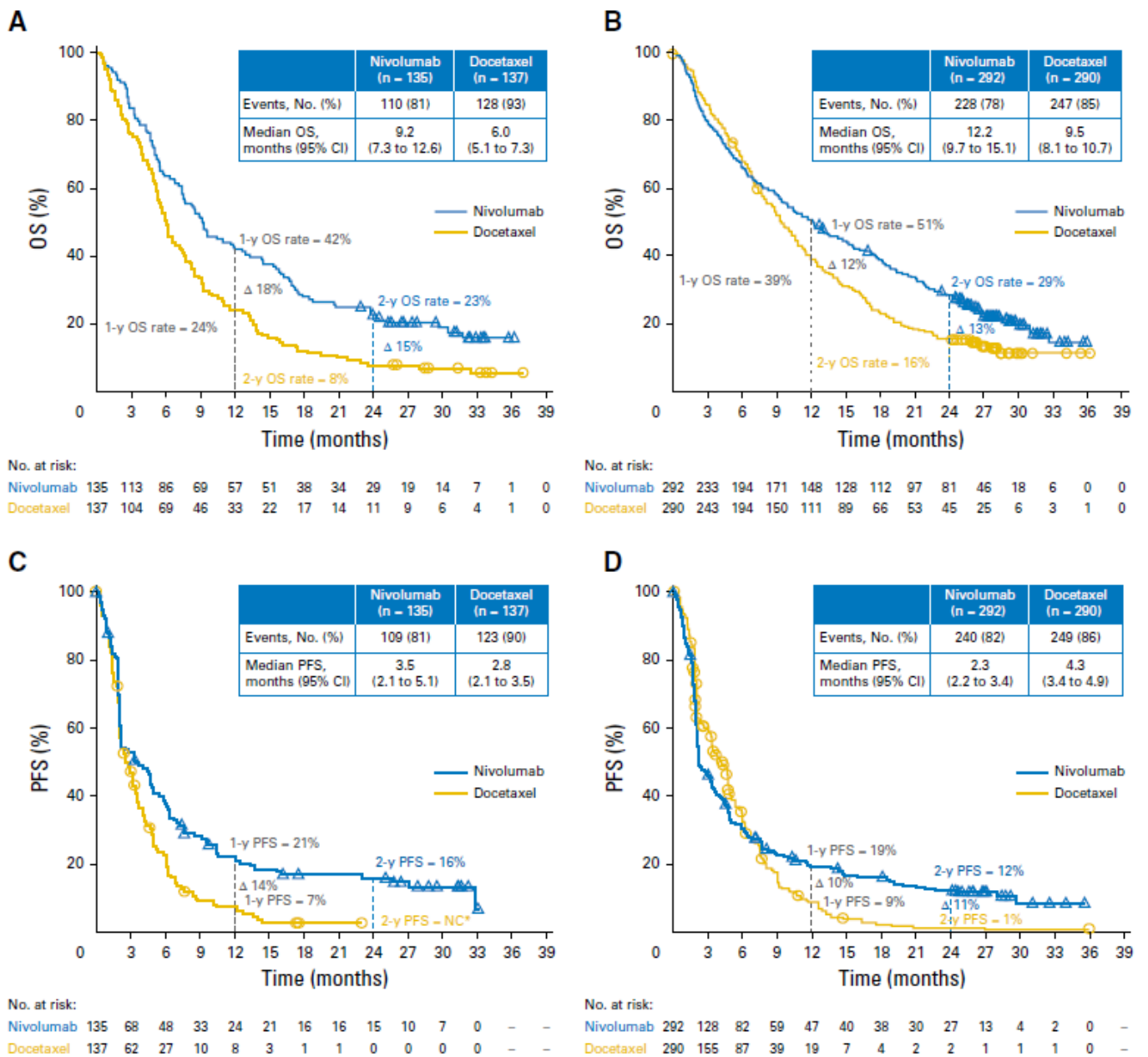


Figure 18 : Courbes de survie globale (OS) et de survie sans progression (PFS) des essais Checkmate 017 (carcinomes épidermoïdes, A et C) et Checkmate 057 (carcinomes non épidermoïdes, B et D) après deux ans de suivi.

D'après Horn *et al* (51).

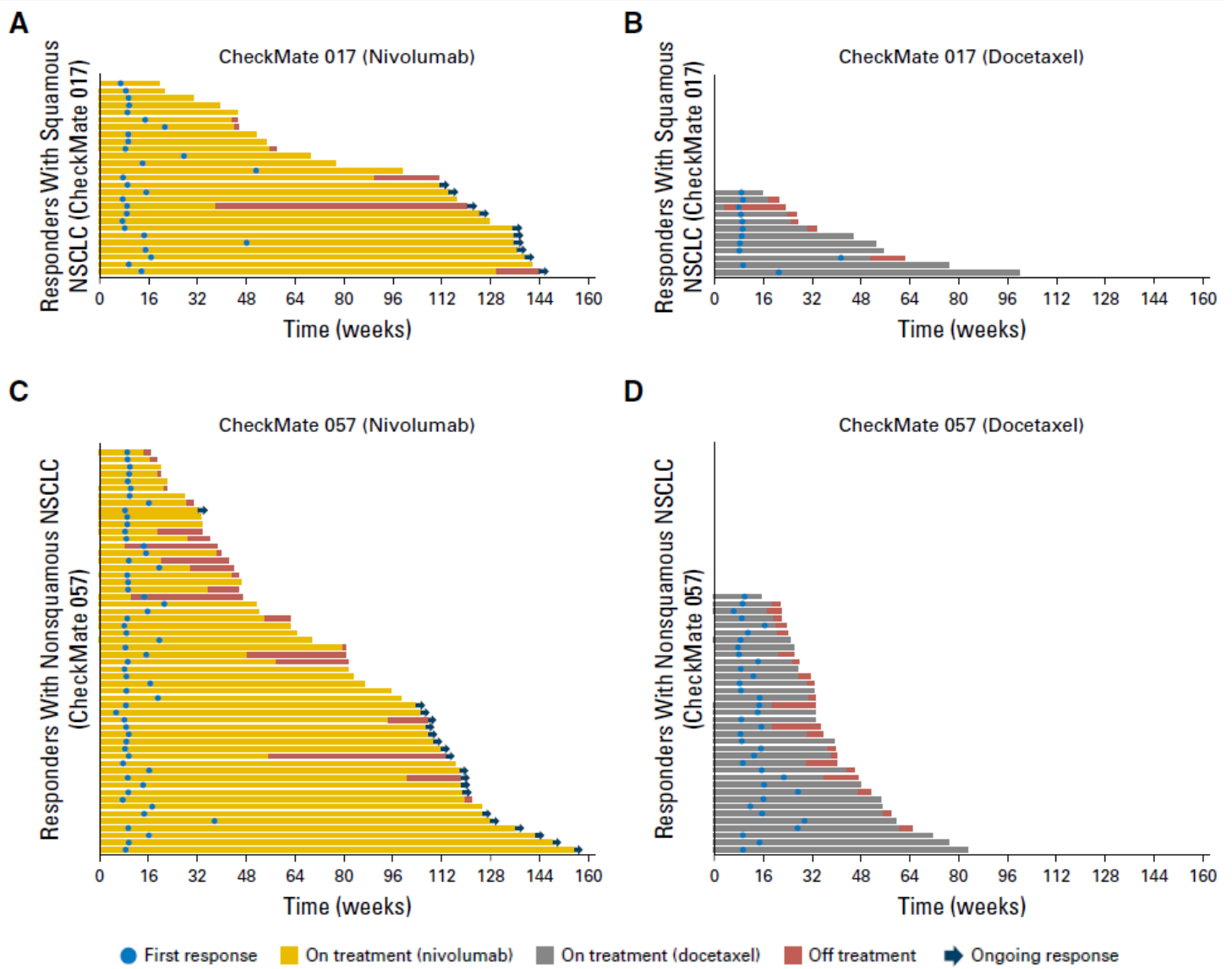


Figure 19 : Délai et durée de réponse (selon RECIST v1.1) des patients traités par nivolumab ou docétaxel dans les essais Checkmate 017 et 057.

D'après *Horn et al* (51).

Études	Histologie	Objectif principal	Ligne de traitement et statut PD-L1	Bras de traitement	Taux de réponse objective (%)	Durée de réponse médiane (médiane, mois)	Survie sans progression (médiane, mois)	Survie globale (médiane, mois)	Taux de survie à 1 an (%)
Brahmer et al. Phase III CHECKMATE 017 [13]	Épidermoïde	Survie globale	Deuxième ligne	Nivolumab (n= 135)	20	Non atteinte	3,5	9,2	42
			Pas de sélection sur PD-L1	Docetaxel (n= 137)	9	8,4	2,8	6,0	24
Borghaei et al. Phase III CHECKMATE 057 [14]	Non épidermoïdes	Survie globale	Deuxième ligne	Nivolumab (n= 292)	19	17,2	2,3	12,2	51
			Pas de sélection sur PD-L1	Docetaxel (n= 290)	12	5,6	4,2	9,4	39

Figure 20 : Principaux résultats de survie des essais cliniques sur le nivolumab.

D'après *Duruiseaux et al* (52).

Le nivolumab a été évalué en première ligne dans les CBNPC de stade IV ou récidivants avec des résultats encourageants dans l'essai de phase I Checkmate 012 (53) (54). Cependant, l'essai de phase III Checkmate 026 comparant le nivolumab en monothérapie à la chimiothérapie de référence à base de platine n'a pas montré de différence de survie sans progression ou de survie globale entre les 2 groupes. Les patients étaient sélectionnés de manière prospective sur une expression de PD-L1  $\geq 5\%$  (figure 21) (55).

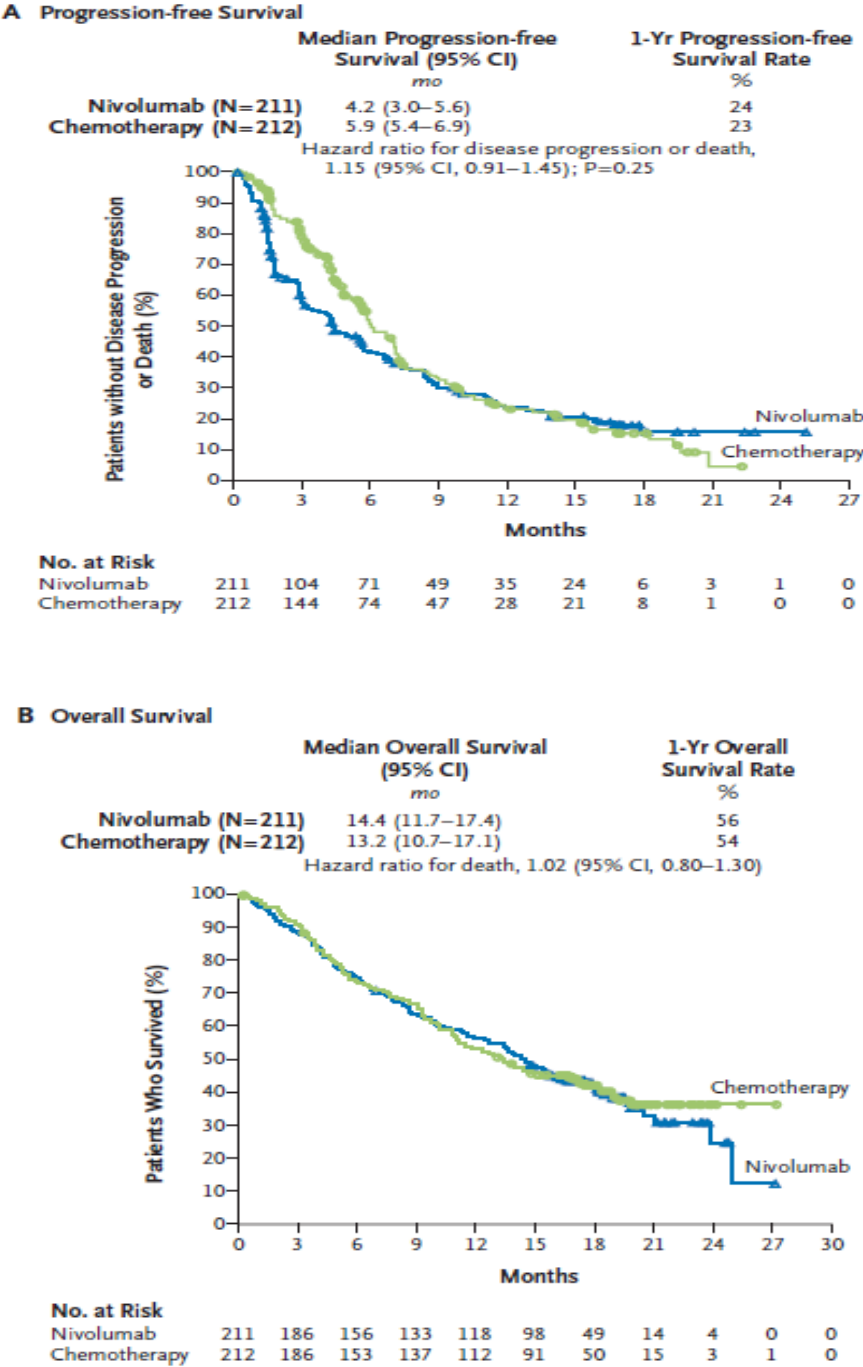


Figure 21 : Survie sans progression et survie globale chez des patients exprimant PD-L1 $\geq 5\%$ . *Checkmate 026*. D'après Carbone DP et al (55).

## 2.2 Pembrolizumab (*Keytruda*, MSD)

En ce qui concerne l'immunothérapie par pembrolizumab (anti-PD1), deux principaux essais de phase III ont exploré son intérêt thérapeutique face à une chimiothérapie standard par docétaxel chez des patients atteints d'un CBNPC quel que soit l'histologie en 2<sup>ème</sup> ligne dans le Keynote-010 et en 1<sup>ère</sup> ligne dans le Keynote-024. Les patients inclus pouvaient avoir reçu plus d'une ligne de chimiothérapie.

Dans l'étude Keynote-010, les patients ont été sélectionnés à l'issue de l'évaluation prospective de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales (seuil d'inclusion fixé à 1% de cellules tumorales positives) et séparés en deux groupes selon une expression faible entre 1 et 49% et une expression forte à plus de 50%. Elle a démontré un bénéfice de survie globale pour le groupe sous pembrolizumab avec une diminution du risque de décès de 29% (2mg/kg) et de 39% (10mg/kg) par rapport au docétaxel notamment dans le groupe exprimant PD-L1 à plus de 50% avec un HR à 0,54 sous 2mg/kg et à 0,50 sous 10mg/kg. Le taux de réponse était statistiquement supérieur dans le groupe sous pembrolizumab (18% contre 9%) (figure 22) (11).

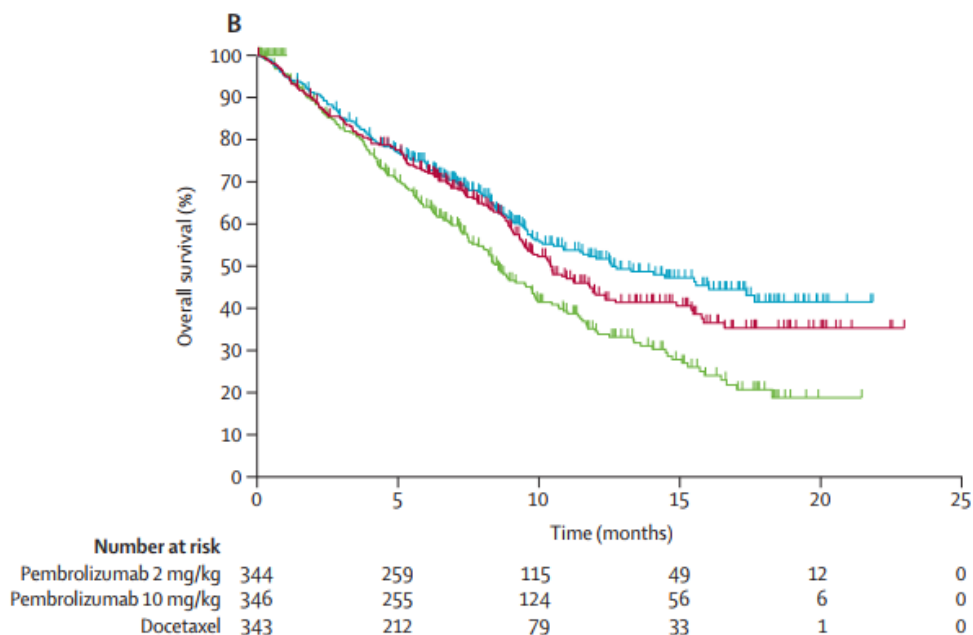


Figure 22 : Courbes de survie globale comparant le bras sous docétaxel (vert) et le bras sous pembrolizumab à 2mg/kg (rose) et à 10 mg/kg (bleu) en 2<sup>ème</sup> ligne thérapeutique.

*Keynote 010*. D'après Roy S Herbst et al (11).

Dans l'étude *Keynote-024*, seuls les patients dont la tumeur exprimait PD-L1 à plus de 50%, sans mutation *EGFR* et sans réarrangement d'*ALK* ont été inclus. Elle a démontré la supériorité d'une monothérapie par pembrolizumab en première ligne comparée à une chimiothérapie de référence avec une meilleure survie sans progression (10,3 versus 6 mois, HR= 0,5,  $p < 0,001$ , IC95% [0,37-0,68]) et une meilleure survie globale (HR=0,60, IC95% 0,41 ; 0,89,  $p = 0,005$ ) pour les patients sous pembrolizumab (figures 23 et 24) (12).

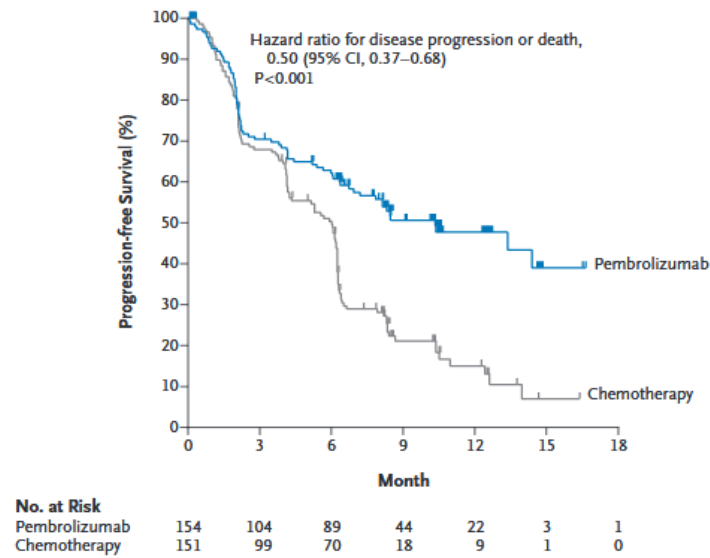


Figure 23 : Courbes de survie sans progression comparant le bras sous pembrolizumab et le bras sous chimiothérapie standard en 1<sup>ère</sup> ligne. *Keynote 024*. D'après *Reck and al* (12).

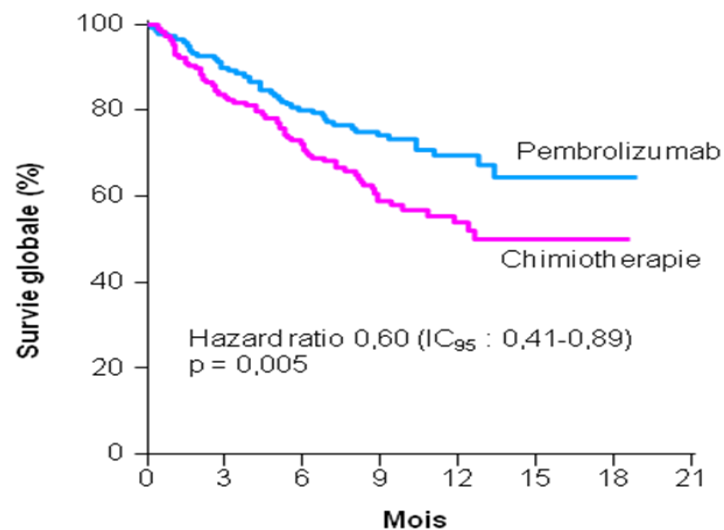


Figure 24 : Courbes de survie globale comparant le bras sous pembrolizumab et le bras sous chimiothérapie standard en 1<sup>ère</sup> ligne. *Keynote 024*. D'après *Reck and al* (12).

## 2.3 Atézolizumab, durvalumab et avélumab : trois immunothérapies anti-PD-L1

En ce qui concerne l'atézolizumab, deux études, dont une de phase II (POPLAR) (56) et une de phase III (OAK) (57), ont montré la supériorité de l'atézolizumab par rapport au docétaxel, sur la survie globale, dans le traitement de patients atteints d'un CBNPC en 2<sup>ème</sup> ligne thérapeutique suite à une ou deux lignes de chimiothérapie. Les patients n'étaient pas sélectionnés sur leur statut PD-L1.

L'essai POPLAR montre un bénéfice de survie globale avec 12,6 mois de survie médiane sous atézolizumab contre 9,7 mois sous chimiothérapie standard (HR=0,73 ; IC95% 0,53-0,99 ; p=0,04) (figure 25).

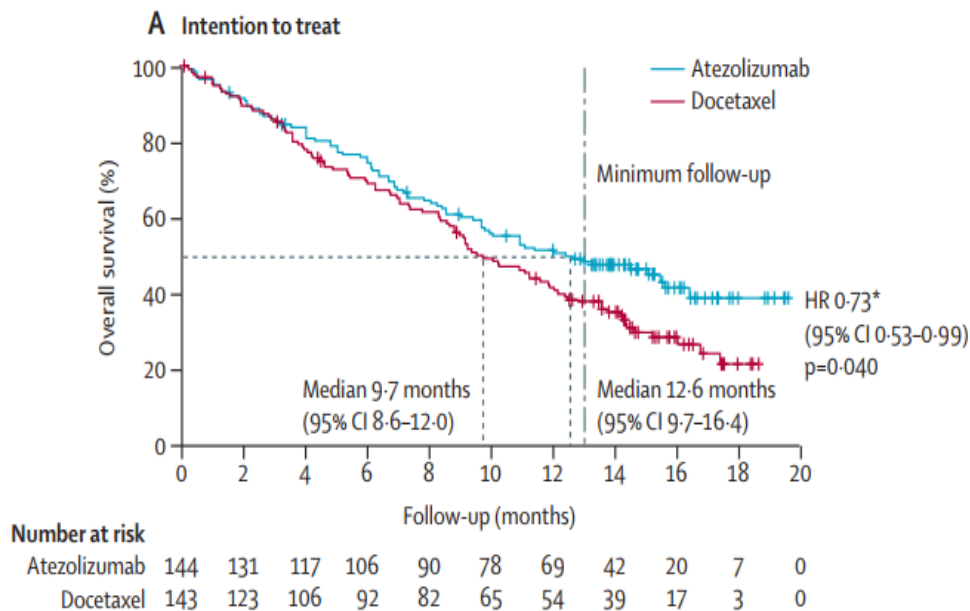


Figure 25 : Courbes de survie globale comparant le bras sous docétaxel et le bras sous atézolizumab. *POPLAR*.

D'après *Louis Fehrenbacher et al* (56).

L'essai OAK montre un bénéfice de survie globale avec 13,8 mois de survie médiane sous atézolizumab contre 9,6 mois sous chimiothérapie standard (HR=0,73 ; IC95% 0,62-0,87 ; p=0,003).



**En ce qui concerne le durvalumab (MEDI4736), l'essai PACIFIC le compare à un placebo en traitement de consolidation post-radio-chimiothérapie chez des patients atteints d'un CBNPC localement avancé, de stade III, non résecable (58). Cette étude montre un bénéfice de survie sans progression avec une médiane de survie sans progression de 16,8 mois sous durvalumab contre 5,6 mois sous placebo (figure 26) ainsi qu'un meilleur taux de réponse (28,4% contre 16%, p<0,001).**

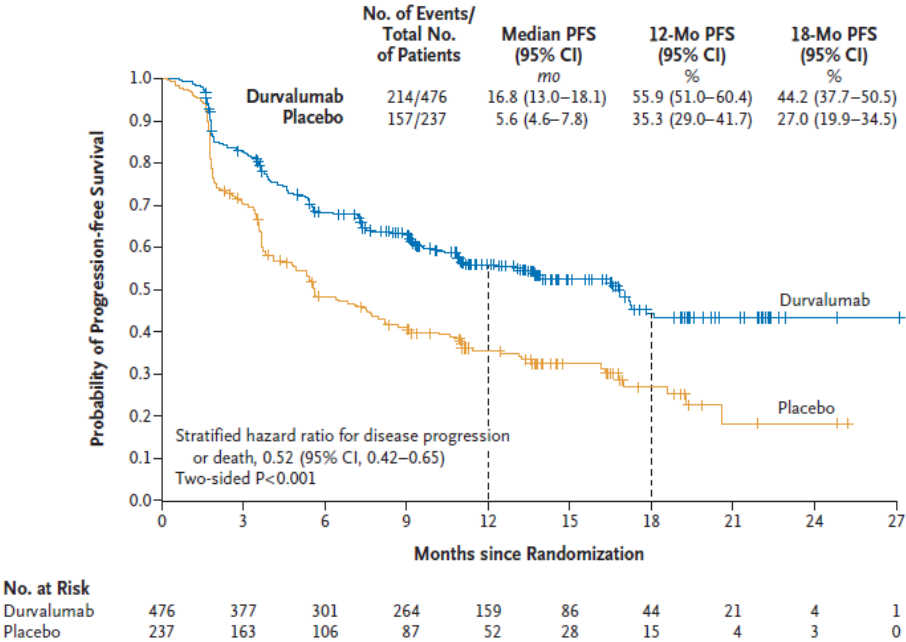


Figure 26 : Courbes de survie sans progression comparant le bras sous durvalumab et le bras sous placebo. PACIFIC.

D'après Antonia SJ et al (58).

L'étude de phase III MYSTIC compare, dès la première ligne, le durvalumab, en monothérapie ou en bithérapie avec le tremelimumab (anti-CTLA4), à la chimiothérapie standard à base de platine (figure 27) (59). L'étude est en cours et montre des résultats prometteurs.

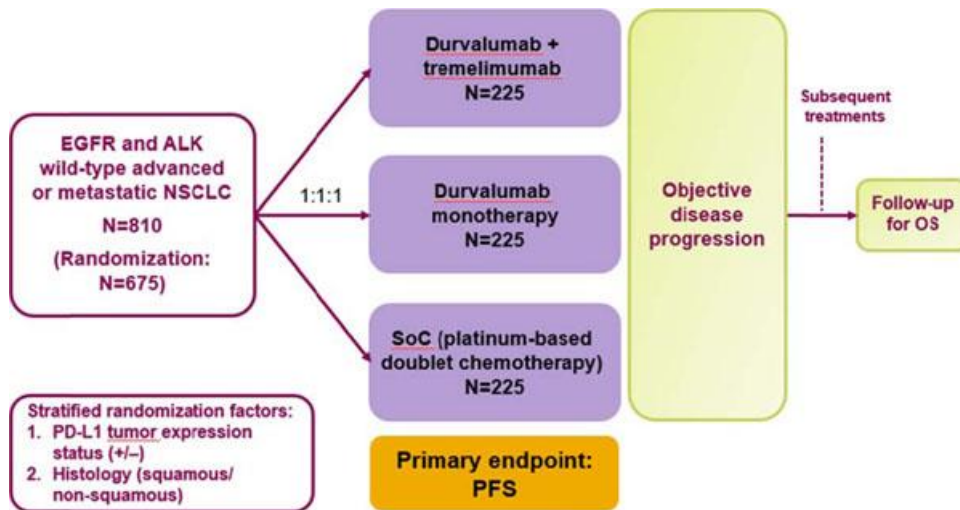


Figure 27 : Schéma de l'étude MYSTIC. D'après Rizvi et al (59).

De façon similaire, l'étude de phase III ARCTIC, teste l'efficacité du durvalumab par rapport à la thérapie standard chez des patients PD-L1 positifs ainsi que celle de l'association durvalumab+ tremelimumab, du durvalumab seul, du tremelimumab seul ou de la thérapie standard chez des patients PD-L1 négatifs. L'étude est en cours de recrutement.

**En ce qui concerne l'avélumab**, des études précoces sont prometteuses avec un taux de réponse globale de 12 % pour des patients en progression après une chimiothérapie à base de platine et de 18,7% en 1<sup>ère</sup> ligne thérapeutique (60) (61).

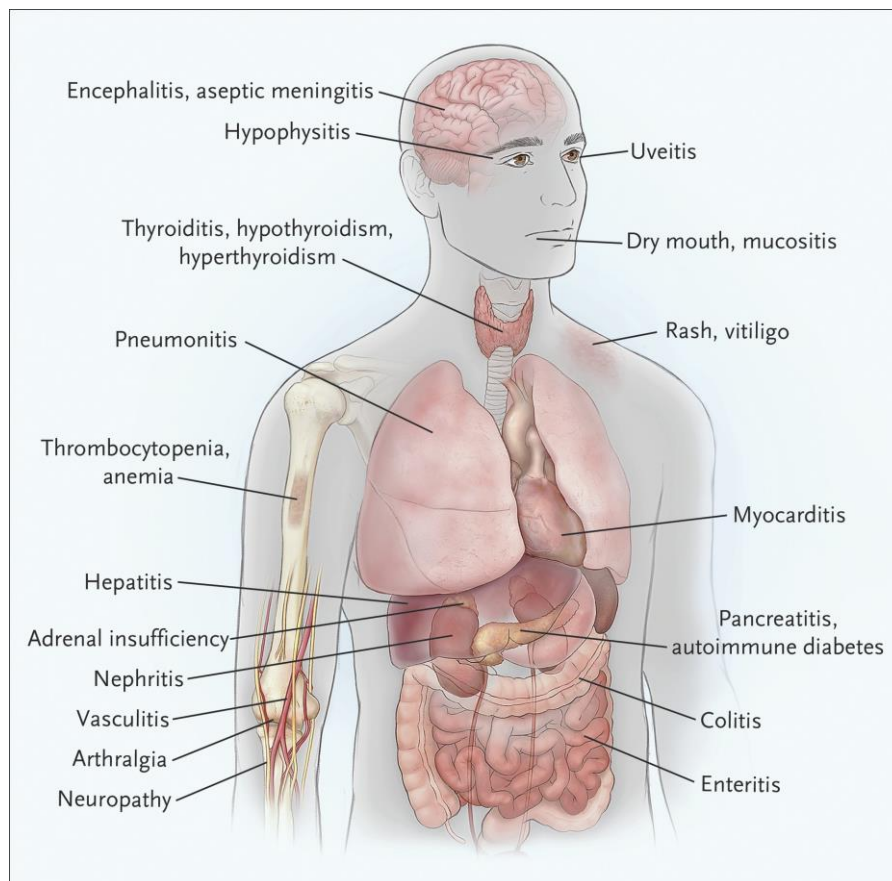
Un récapitulatif des résultats de l'ensemble des essais de phase III publiés sur l'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 se situe en **annexe 1**.

## 2.4 Effets secondaires et immunothérapie

Les inhibiteurs des points de contrôle de l'immunité, en stimulant le système immunitaire de façon non spécifique, peuvent être à l'origine de toxicités auto-immunes appelées « immune-related adverse events (irAE) ». Les toxicités les plus fréquentes surviennent au niveau de la peau (rash, prurit), du tube digestif (colites, diarrhées), du système endocrinien (thyroïdites, hypophysites, ...), et du foie (cytolyse) (62) (63) (figure 28).

Ces effets secondaires restent inférieurs à ceux développés sous chimiothérapie.

Ils peuvent survenir quelques semaines ou mois après un traitement par ICI. La durée du traitement n'augmente pas leur incidence (64).



**Figure 28 :** Les différents effets secondaires connus sous immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 et anti-CTLA4. D'après *Michael A Postow et al* (65).

Les effets secondaires sont gradés de 1 à 5 selon le CTCAE :

*Grade 1* : léger ; asymptomatique ou symptômes légers ; diagnostic à l'examen clinique uniquement ; ne nécessitant pas de traitement.

*Grade 2* : modéré ; nécessitant un traitement minimal, local ou non-invasif ; interférant avec les activités instrumentales de la vie quotidienne.

*Grade 3* : sévère ou médicalement significatif mais sans mise en jeu immédiate du pronostic vital ; indication d'hospitalisation ou de prolongation d'hospitalisation ; invalidant ; interférant avec les activités élémentaires de la vie quotidienne.

*Grade 4* : mise en jeu du pronostic vital ; nécessitant une prise en charge en urgence.

*Grade 5* : décès lié à l'effet indésirable.

Certaines études ont montré que les anti-CTLA4 entraînaient des effets secondaires plus sévères, de type colite et hypophysite, que les immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 (pneumopathie, thyroïdite) (66) (67).

Dans les essais sur le nivolumab, 58% des patients atteints d'un CBNPC avancé réfractaire à la chimiothérapie, et 79% de ceux atteints d'un CBNPC métastatique ont présenté un effet secondaire à l'immunothérapie avec, respectivement, 7 et 19% d'effets secondaires de grade 3-4 (9) (10).

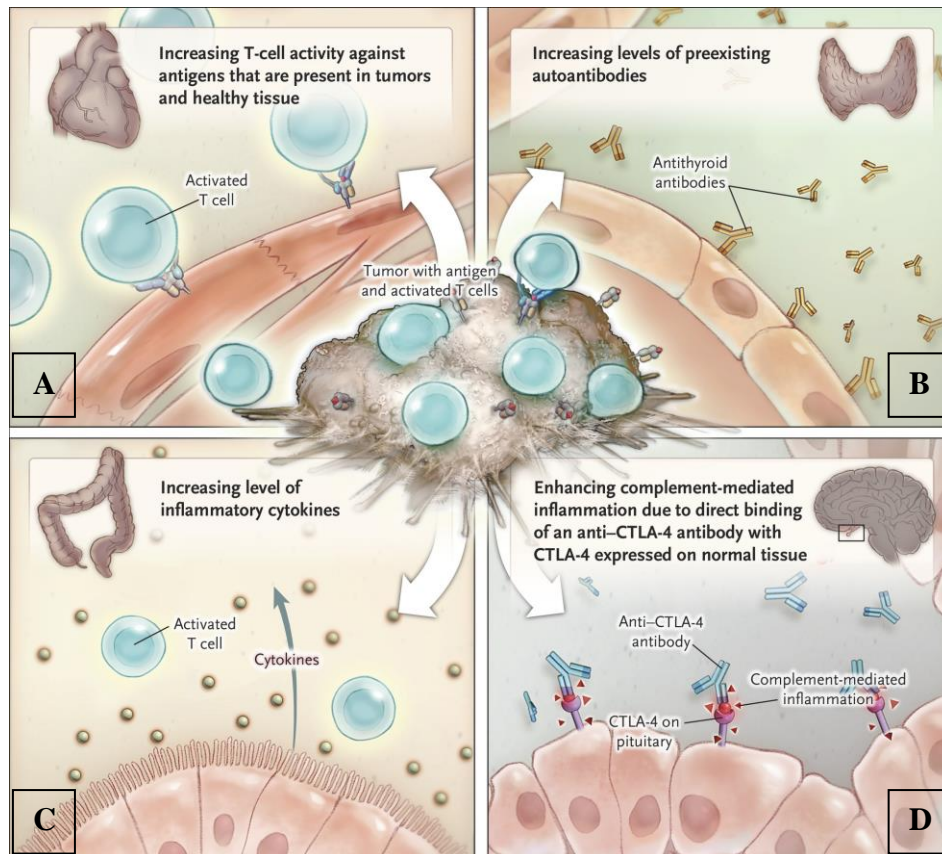
Dans les essais sur le pembrolizumab, 14% des patients inclus dans l'essai Keynote 002 ont présenté un effet secondaire de grade 3-4 contre 13-16% dans le Keynote 010 (11) (12).

Différents algorithmes de prise en charge sont développés dans les guides de pratique clinique de l'ESMO selon l'organe atteint avec notamment la prescription de glucocorticoïdes ou d'inhibiteurs de l'IL-17 tels que l'ixekizumab (68).

Aucun lien n'a été mis en évidence entre l'apparition d'effets secondaires et une meilleure réponse au traitement par ICI (69) sauf dans le cas d'effets secondaires très spécifiques d'organe et d'anticorps tels que le vitiligo (70).

L'arrêt prématuré du traitement suite à de sévères effets secondaires ne semble pas modifier le bénéfice de survie globale ou de survie sans progression obtenu (71).

Les mécanismes physiopathologiques d'apparition de ces effets secondaires sont en cours d'étude afin de trouver des thérapeutiques permettant de les contrôler. Ils semblent reposer sur l'action physiologique des points de contrôle de l'immunité dans le maintien de l'homéostasie immunologique et sont résumés ci-dessous (65) (figure 29).



**Figure 29:** Les mécanismes possibles expliquant les effets secondaires liés aux ICI.

D'après *Michael A Postow et al* (65).

*A : augmentation de l'activité cytotoxique des lymphocytes T présents au sein de la tumeur et des tissus sains.*

*B : augmentation des anticorps pré-existants, avec apparition/aggravation de maladie auto-immune.*

*C : augmentation du taux de cytokine inflammatoire telle que l'IL17.*

*D : renforcement de la réponse inflammatoire médiée par le complément par liaison direct d'un anticorps anti-CTLA-4 sur le récepteur CTLA-4 exprimé sur les cellules de tissus normaux tels que la glande pituitaire.*

## 2.5 Mécanismes de résistance acquise aux anti-PD-1

Différentes études ont cherché à expliquer l'apparition de résistance aux immunothérapies ciblant les points de contrôle de l'immunité chez des patients initialement répondeurs.

Tout d'abord, une étude récente propose trois modes de résistance (figure 30) (72):

- une anergie des LT spécifiques de la tumeur caractérisée par des taux élevés d'expression des récepteurs PD-1.
- l'expression d'autres récepteurs inhibiteurs tels que LAG3 ou TIM3.
- la sécrétion de métabolites immunosuppresseurs comme l'IDO ou l'Adénosine.

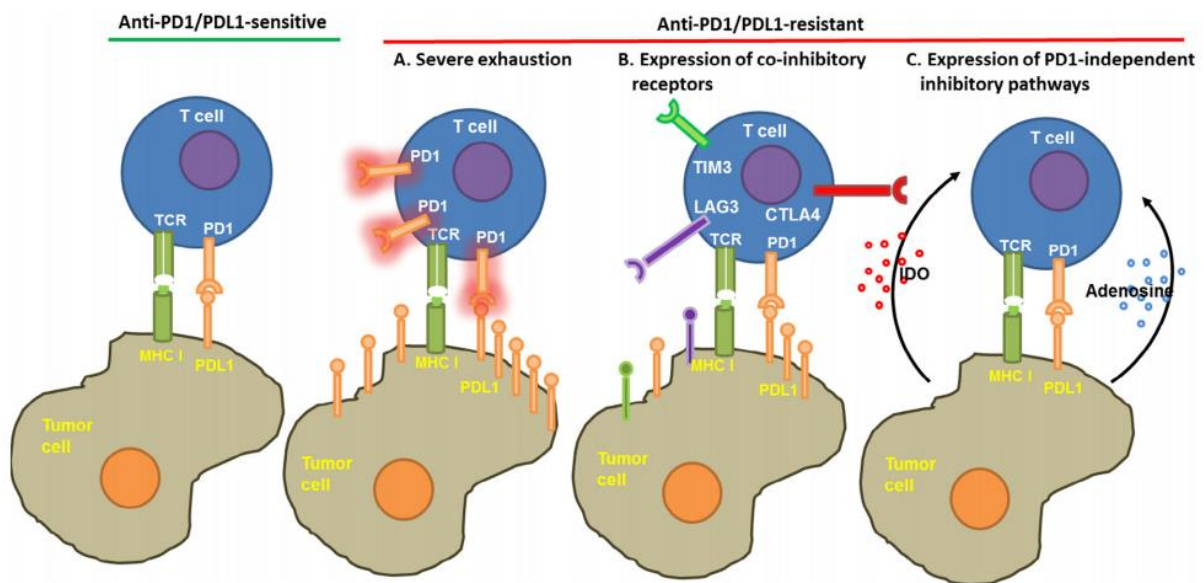


Figure 30 : Mécanisme de résistance aux anti-PD-1. D'après O'Donnell et al (72).

Comme nous l'avons détaillé précédemment, la reconnaissance antigénique via le CMH de classe I et la sécrétion de cytokines telles que l'interféron sont des mécanismes de cytotoxicité des lymphocytes T CD8+. L'IFN $\gamma$  a un rôle dans la stimulation de l'expression de PD-L1 et du CMH de classe I par les cellules immunes et tumorales.

Deux études ont mis en évidence deux voies de résistance potentielle aux immunothérapies anti-PD-1 :

- **la perte de la sensibilité des cellules tumorales à l'IFN $\gamma$  :**

Physiologiquement il existe trois types d'interféron : le type I (IFN $\alpha/\beta$ ) qui se fixe sur un récepteur complexe formé par les chaînes IFNAR1 et IFNAR2, le type II (IFN $\gamma$ ) qui se fixe sur les chaînes IFNGR1 et IFNGR2, et le type III (IFN $\lambda$ ) qui se fixe sur les chaînes IFNLR1 et IL-10R2 (figure 31) (73).

A l'état normal, la formation de ces complexes IFN-récepteur active les tyrosines kinases associées (JAK-1, JAK-2, ou TYK-2) qui permettent la phosphorylation des molécules STAT1 ou STAT2. L'IFN $\gamma$  conduit à la formation d'homodimères de STAT1 qui stimuleront la transcription d'une famille de gènes possédant des séquences GAS dans leurs promoteurs.

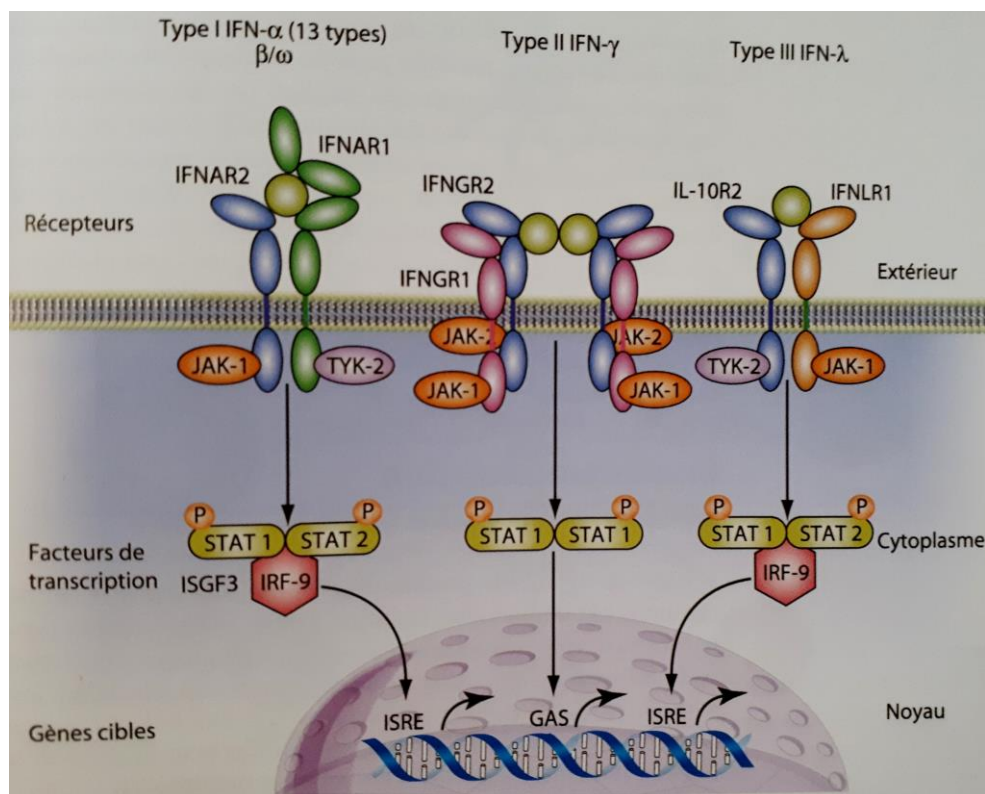


Figure 31 : Cascade de signalisation des complexes interféron-récepteur. D'après le livre « les cibles de l'immunité » de Cartron G. et Viens P (73).

L'étude en question a réalisé un séquençage de l'exome entier sur des prélèvements datant d'avant le traitement par immunothérapie et d'après le développement d'une résistance chez 4 patients traités par pembrolizumab pour un mélanome métastatique (figure 32) (74). Ils ont ainsi identifié, sur les échantillons prélevés suite à la rechute et non sur les prélèvements initiaux de 2 patients, la présence de mutations des gènes codant pour JAK-1 et JAK-2 entraînant une perte de fonction protéique. La cellule tumorale est ainsi insensible au message immunosuppresseur de l'IFN $\gamma$ , avec une diminution de la présentation antigénique par le CMH.

- la perte d'expression du CMH de classe I par les cellules tumorales par mutation dans le gène codant pour la B2M (beta-2-microglobuline) (75).

*Un cas étant identifié également dans la 1ère étude.*

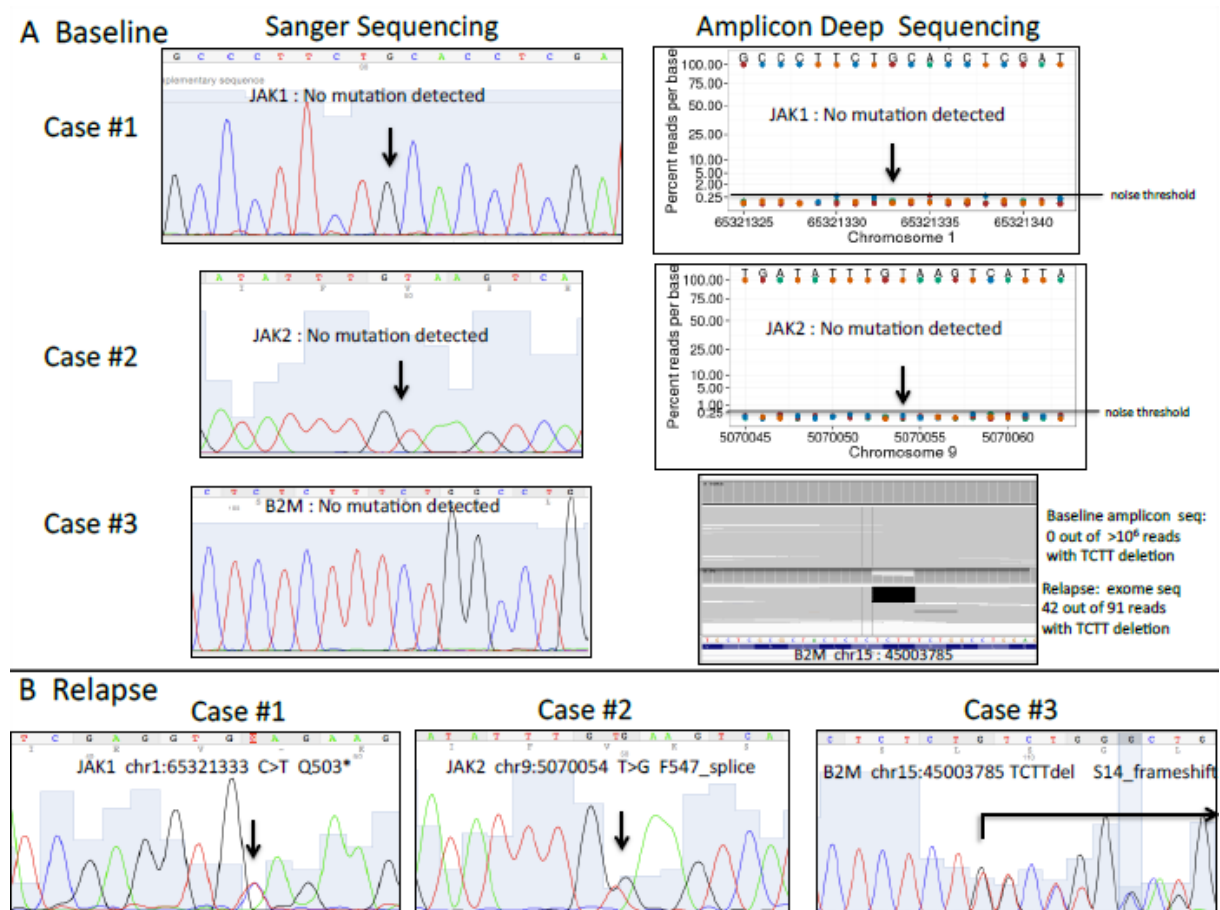


Figure 32: Mutations JAK-1, JAK-2 et B2M lors de rechute sous immunothérapie.

D'après Zaretsky JM (74).



### 3. Critères biologiques prédictifs de l'efficacité de l'immunothérapie anti-PD1/PD-L1 : les différentes voies possibles

Les réponses aux immunothérapies sont hétérogènes. Trois principaux axes de recherche se développent afin de prédire la réponse à l'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1.

#### 3.1 La charge mutationnelle et en néo-antigènes

##### 3.1.1 Biomarqueur prédictif

Les essais cliniques, sur le nivolumab (9) et le pembrolizumab (11), suggèrent une absence de bénéfice de l'immunothérapie anti-PD-1 chez les patients mutés *EGFR*.

Une autre étude s'est intéressée à l'intérêt de l'immunothérapie anti-PD-1 chez les patients *EGFR* mutés ayant développés une résistance aux TKI. Elle montre également que la présence d'une mutation driver de l'*EGFR* et/ou d'un réarrangement d'*ALK* sont corrélés à une plus courte survie et à une moins bonne réponse à l'immunothérapie anti-PD1/PD-L1 (figure 33) (76).

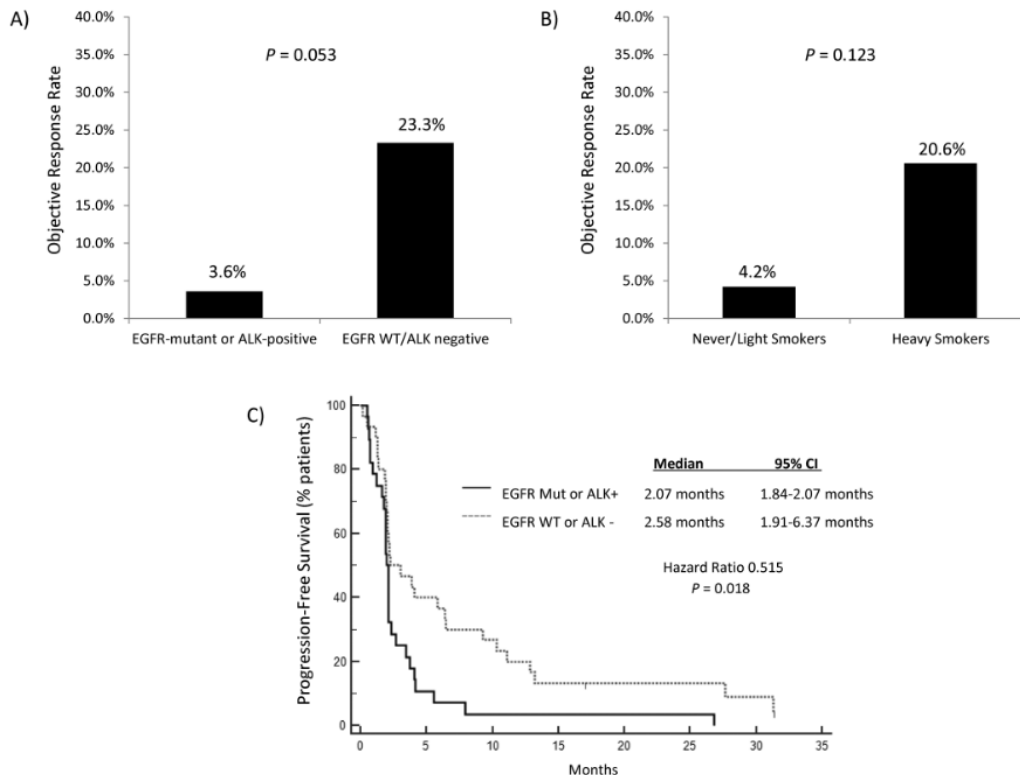


Figure 33 : Taux de réponse et survie sans progression en fonction du statut EGFR muté/ALK réarrangé. D'après JF. Gainor et al (76).

Les carcinomes pulmonaires mutés *EGFR* ou réarrangés *ALK* sont, le plus souvent, associés à une absence de tabagisme et donc potentiellement à une charge mutationnelle plus faible.

Les tumeurs à forte charge mutationnelle, dites « immunogènes », qui stimulent l'immunité médiée par les lymphocytes T notamment par la production de néo-antigènes, surexprimeraient PD-L1 et seraient de meilleures candidates aux immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 (22). Ces tumeurs correspondraient au groupe des tumeurs dites « chaudes » ou « inflammatoires » à l'opposé des tumeurs dites « froides » qui correspondraient à celles présentant une addiction oncogénique (*EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ROS*, *MET*), candidates aux thérapies ciblées et qui ne surexprimeraient pas PD-L1 (77). Une étude moléculaire a subdivisé les tumeurs en 2 groupes avec un seuil d'expression de PD-L1 à plus ou moins 50% et montre une répartition similaire (figure 34) (78).

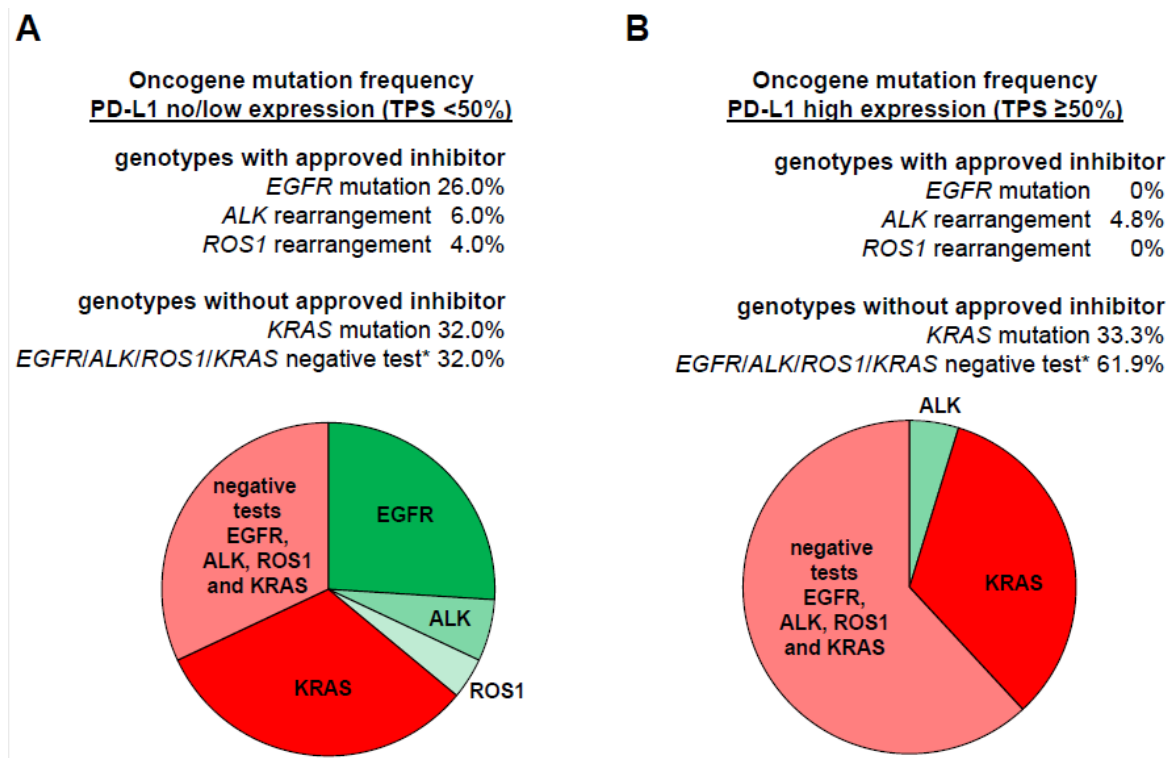


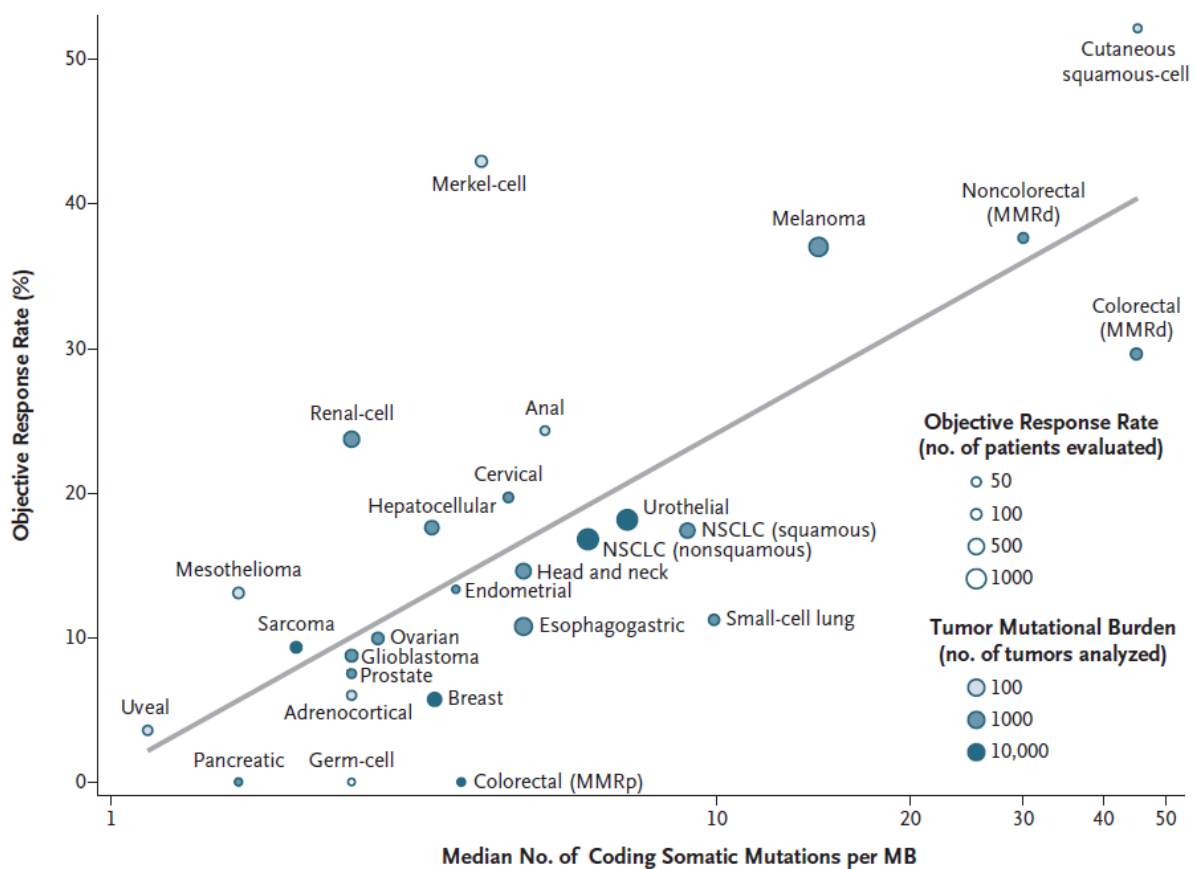
Figure 34 : Répartition des différentes mutations en fonction de l'expression de PD-L1 dans plus ou moins de 50% des cellules tumorales.

D'après *Deepa Rangachari et al* (78).

De nombreux travaux ont étudié la corrélation entre la charge mutationnelle et le bénéfice clinique des anti-PD-1/PD-L1 notamment sur le mélanome, le cancer pulmonaire et les tumeurs MSI.

Une correspondance, publiée dans *The New England Journal of Medicine*, détaille une étude sur la charge mutationnelle comme « biomarqueur émergent » (79). Cette étude a regroupé les différentes données de taux de réponse objective issues d'études d'au moins 10 patients n'ayant pas réalisé de sélection sur l'expression de PD-L1. A ces données ont été comparées celles de la charge mutationnelle. Ceci a été entrepris sur 27 types ou sous-types histologiques de tumeur.

Une corrélation statistiquement significative entre la charge mutationnelle et le taux de réponse objective a été mise en évidence (coefficient de corrélation 0,74,  $p < 0,001$ ) (figure 35).



**Figure 35:** Corrélation entre la charge mutationnelle et le taux de réponse objective aux thérapies anti-PD1/PD-L1 dans 27 sous-types tumoraux. D'après *Van Allen E. et al* (79).

Une des limites de cette étude est que les données cliniques et moléculaires n'ont pas été recueillies sur les mêmes échantillons.

Pour le mélanome, trois principales études de *Snyder et al.* (80) (figure 36), de *Van Allen et al.* (81) et de *Hugo et al.* (82), ont montré, respectivement, une corrélation entre charge mutationnelle et bénéfice clinique, entre charge en néo-antigènes et bénéfice clinique et, entre charge mutationnelle et survie globale. Toutes ces études ont procédé à un séquençage de l'exome entier (Whole-Exome Sequencing).

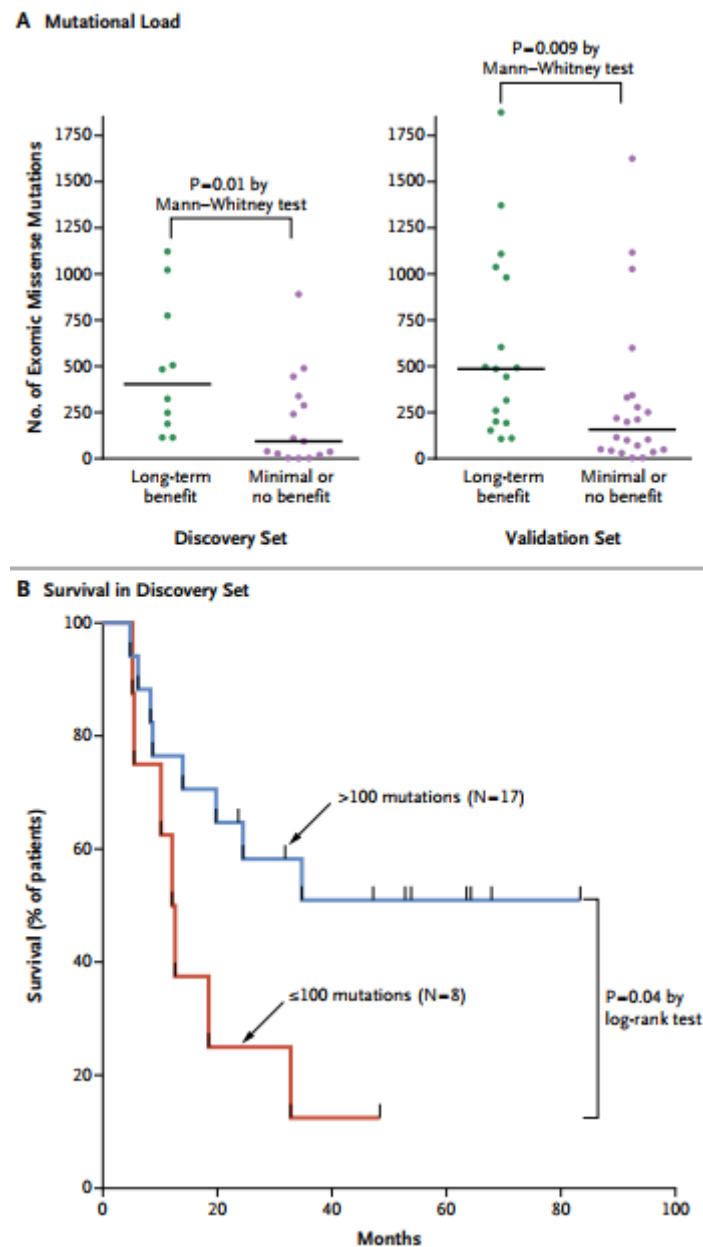
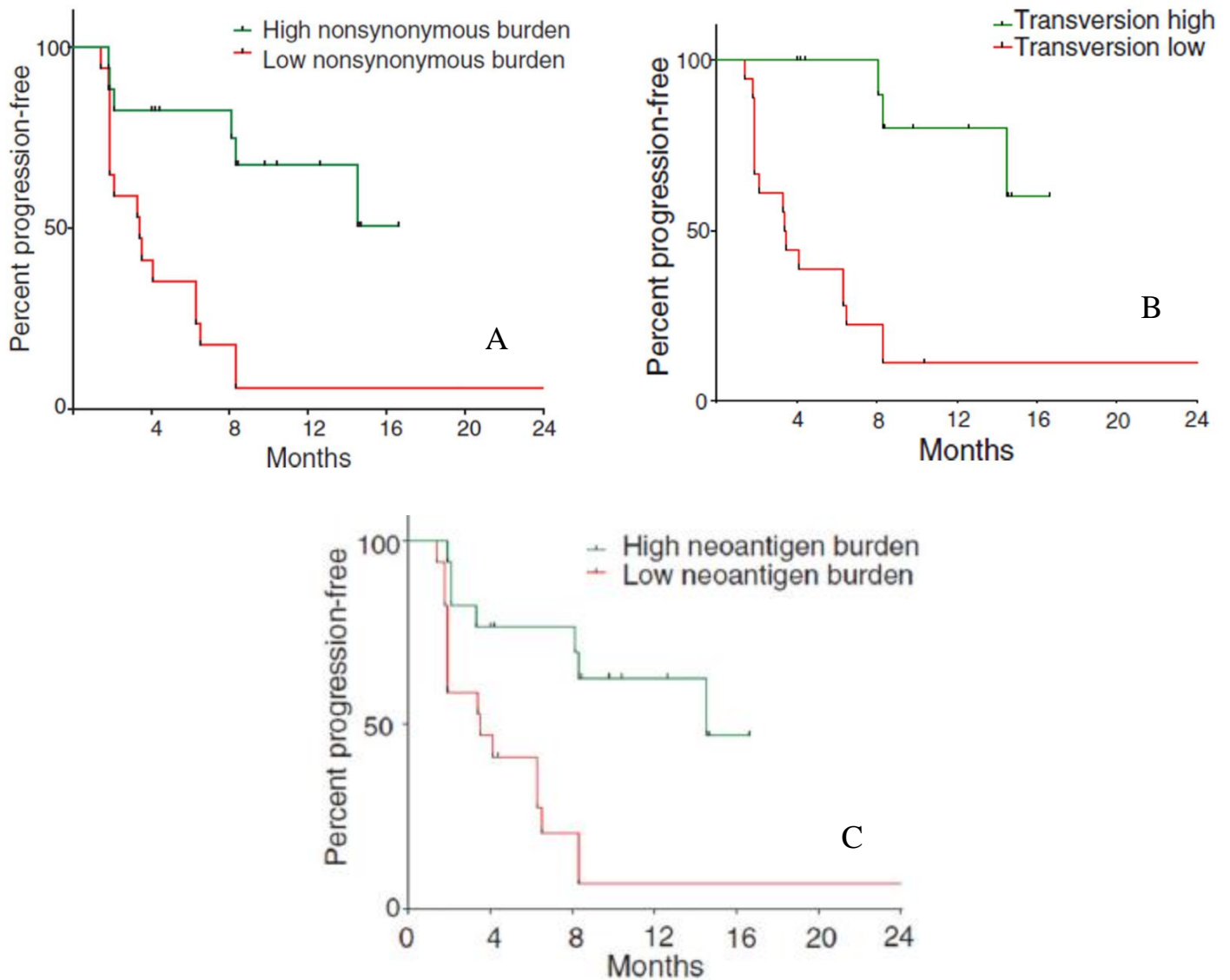


Figure 36 : Bénéfice clinique, survie globale et charge mutationnelle.

D'après *Snyder et al* (80).

Pour le CBNPC, une étude de *Rizvi NA et al.* montre une corrélation entre la charge mutationnelle non synonyme, le taux de transversions induites par le tabagisme et la charge en néo-antigènes avec le taux de réponse objective, la durée de réponse, et la survie sans progression (HR 0.19, 95% CI 0.08–0.47,  $p = 0.0004$ ) (figure 37) (83).



**Figure 37 :** Immunothérapie anti-PD-1 et survie sans progression : impact prédictif de la charge mutationnelle, du taux de transversions et de la charge en néo-antigènes.

D'après *Rizvi et al* (83).

- A- SSP selon la charge mutationnelle non synonyme.
- B- SSP selon le taux de transversions lié au tabagisme.
- C- SPP selon la charge en néo-antigènes.

L'étude Checkmate 026 a réalisé une étude en sous-groupe exploratoire (sur 58% des patients), non prévue dans les objectifs initiaux, comparant l'expression de PD-L1 ainsi que la survie sans progression et la survie globale selon la charge mutationnelle des patients. La charge mutationnelle a été obtenue par un séquençage de l'exome entier et a été subdivisée en 3 groupes (faible taux de mutation : 0 à 100 mutations, taux moyen : 100 à 242 mutations et fort taux :  $\geq 243$  mutations) (figure 38) (55).

Elle conclut que, chez les patients présentant un fort taux de mutation, le nivolumab est associé à un meilleur taux de réponse comparé à la chimiothérapie standard (47% contre 28%) avec une survie sans progression plus longue (9,7 contre 5,8 mois, HR : 0,62 (IC 95% 0,38-1)) et sans différence de survie globale. Aucune association entre la charge mutationnelle et l'expression de PD-L1 n'a été mise en évidence (coefficient de corrélation de Pearson : 0,059).

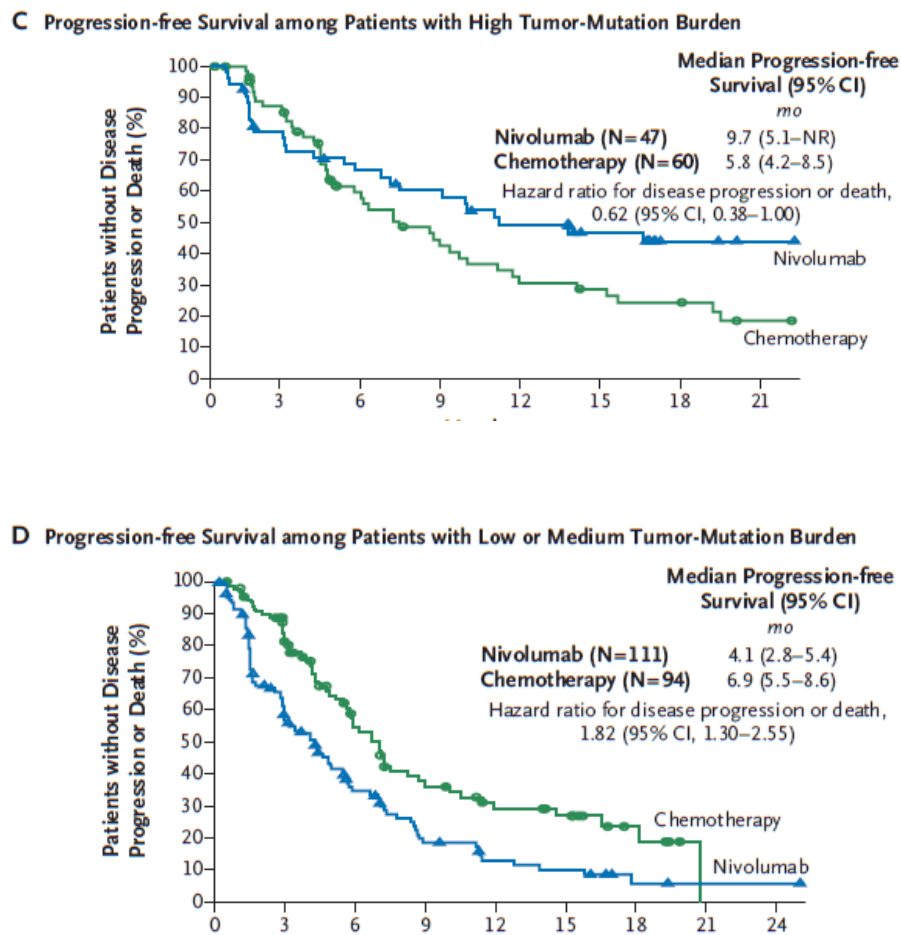
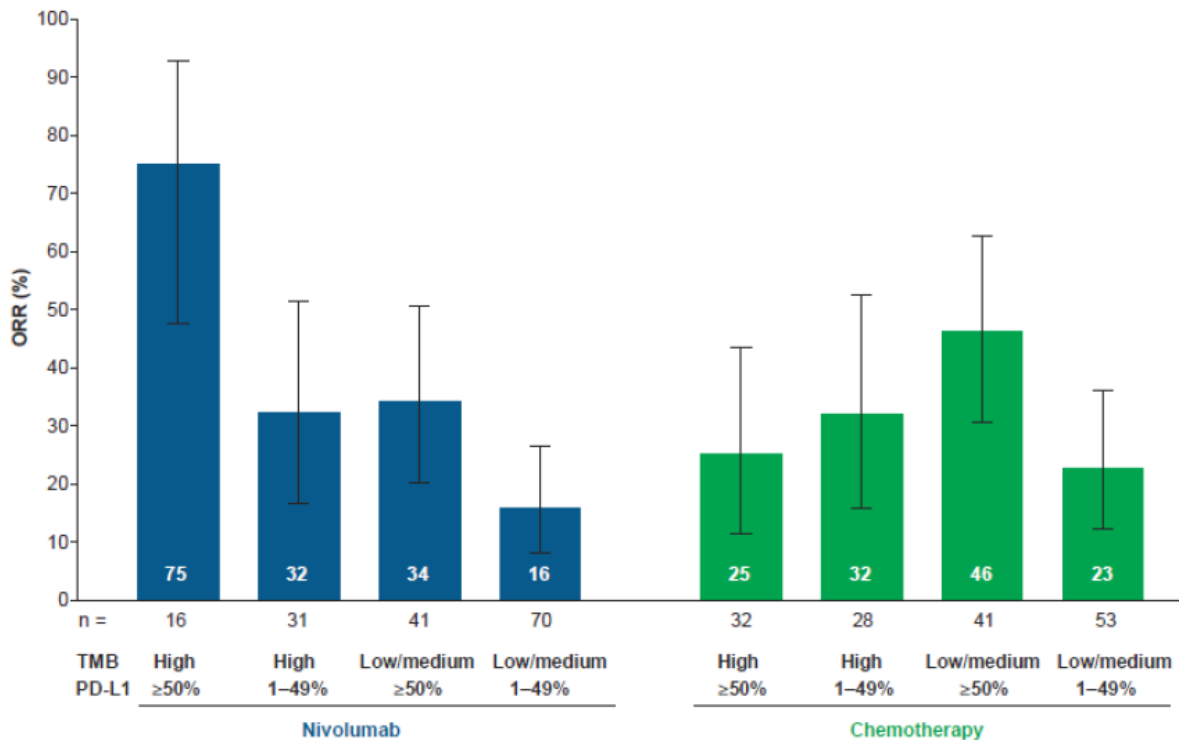


Figure 38 : Courbes de survie sans progression en cas de charge mutationnelle forte (C) ou faible/moyenne (D). D'après Carbone DP et al (55).

De plus, en associant la charge mutationnelle et le taux de cellules tumorales exprimant PD-L1, cette étude retrouve une réponse thérapeutique et une survie sans progression meilleure sous nivolumab que sous chimiothérapie chez les patients présentant un fort taux de mutation et une expression de PD-L1 par plus de 50 % des cellules tumorales (figure 39). Ainsi, l'association des données moléculaires et immunohistochimiques permettrait de redresser les discordances observées dans l'association entre l'expression de PD-L1 et la réponse thérapeutique.



**Figure 39 :** Taux de réponse globale en fonction du taux de mutation associé au statut PD-L1 des cellules tumorales. D'après *Carbone DP et al* (55).

### 3.1.2 Rôle du tabac

Le tabagisme représente aujourd'hui la principale cause de décès évitables dans le monde. Il s'agit d'un facteur de risque de nombreux cancers et il tue près de 6 millions de personnes chaque année (10% de la population mondiale) dont 600 000 par tabagisme passif. En France, on estime que le tabac est responsable de 78 000 décès par an, dont 47 000 par cancer (84) (85). Le tabac contient près de 60 constituants mutagènes modifiant l'ADN cellulaire. Il existe une association entre l'apparition d'un cancer induit par le tabac et la charge mutationnelle de ce dernier (86).

## 3.2 Microenvironnement tumoral

### 3.2.1 Les lymphocytes infiltrant la tumeur : TILs

En 1863, Rudolf Virchow avait observé la présence de leucocytes infiltrant les tumeurs et proposé l'existence d'un lien entre la présence d'un infiltrat inflammatoire et le développement d'un cancer (87).

L'intérêt pronostic de la présence d'un infiltrat inflammatoire dans une tumeur est retrouvé dans plusieurs études s'intéressant aux tumeurs solides notamment les cancers colorectaux (88) mais également le cancer pulmonaire (89).

Dans le mélanome, certains auteurs proposent de classer les mélanomes en 4 patterns « immuns » selon la positivité de PD-L1 et la présence de TILs (figure 40) (90). Ces différents sous-types répondraient différemment à l'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 avec une sensibilité plus importante du pattern associant expression de PD-L1 et présence de TILs. Une autre étude sur le mélanome a décrit différents patterns d'infiltrat lymphocytaire tumoraux en distinguant la catégorie « brisk » de localisation continue en péri-tumorale linéaire ou en intra-tumorale sur toute la surface de la catégorie « non brisk » correspondant à des foyers focaux (figure 41) (91).



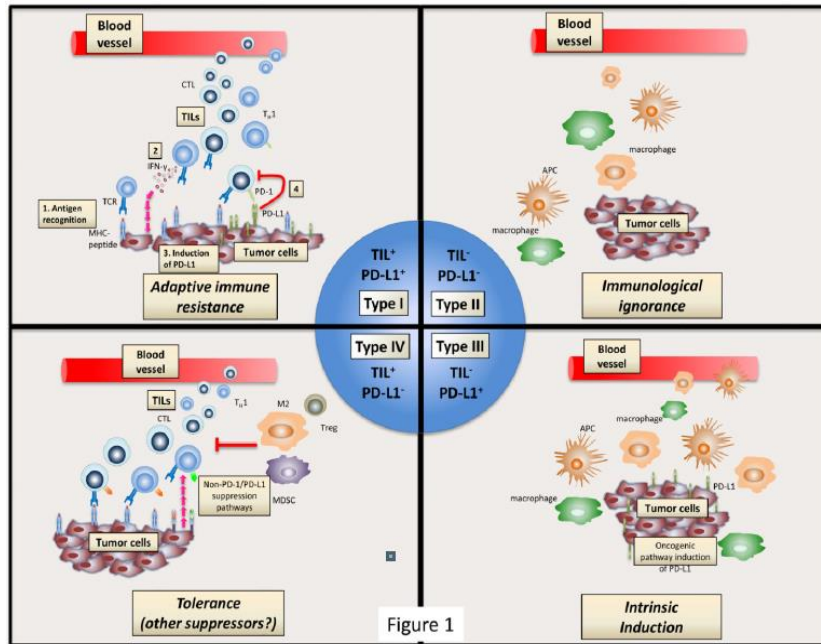


Figure 1

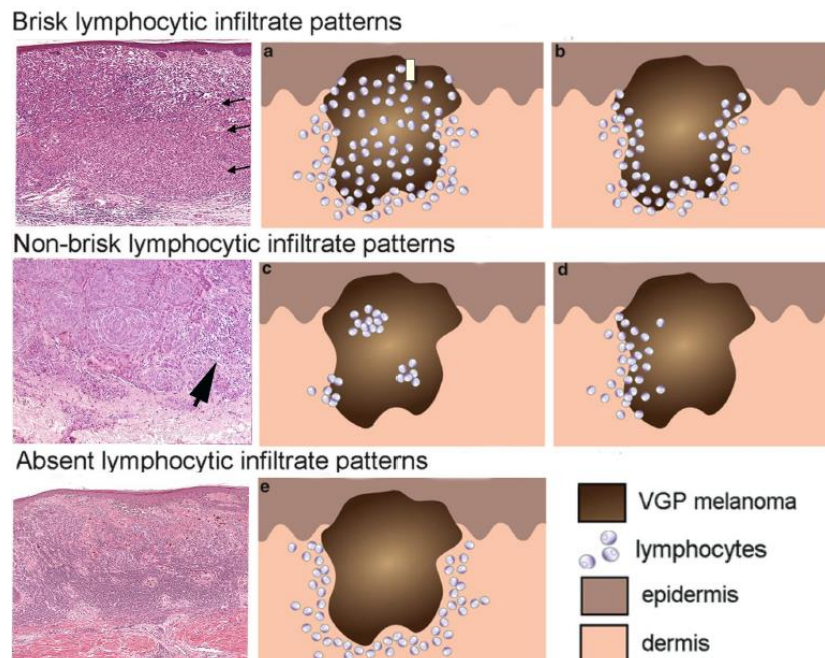
**Figure 40 :** Patterns associant l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et la présence de TILs. D'après *Teng et al* (90).

*Type 1 : tumeurs PD-L1+/TILs+, plus sensible aux immunothérapies anti-PD1/PD-L1.*

*Type 2 : tumeurs PD-L1-/TILs-, les moins sensibles aux immunothérapies anti-PD1/PD-L1.*

*Type 3 : tumeurs PD-L1+/TILs-, expression forte et diffuse probablement lié à une activation oncogénique, peu sensibles aux immunothérapies anti-PD1/PD-L1.*

*Type 4 : tumeurs PD-L1-/TILs+, phénomène de tolérance immune, peu sensible aux immunothérapies anti-PD1/PD-L1.*

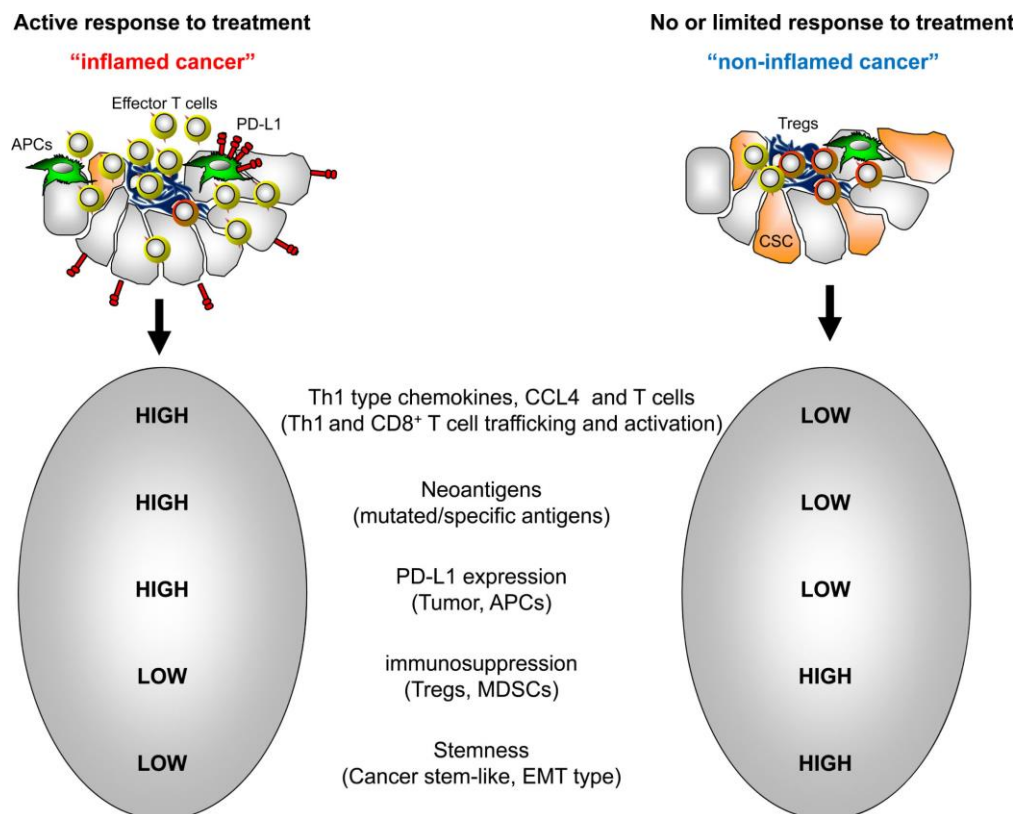


**Figure 41 :** Les différents patterns de TILs décrits dans le mélanome. D'après *Mihm et al* (91).

### 3.2.2 Immunomarquage CD8 et CD103

Les cellules immunitaires de l'environnement tumoral sont morphologiquement hétérogènes avec une majorité de lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques et polynucléaires. La composition de ce microenvironnement pourrait permettre de trier les répondeurs et non répondeurs aux ICI.

On oppose schématiquement, comme décrit précédemment pour la charge mutationnelle, les tumeurs dites « inflammatoires » aux tumeurs dites « non inflammatoires ». Les tumeurs « inflammatoires » se caractérisent par une infiltration par des lymphocytes T cytotoxiques CD8+, une expression d'un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires, une expression tumorale de PD-L1 et un profil d'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire Th1, tel que le gène de l'IFN $\gamma$ . Ces tumeurs sont les cibles privilégiées des immunothérapies anti-PD-1/PD-L1. Les tumeurs « non inflammatoires » ne présentent pas ces éléments dans leur microenvironnement et seraient plutôt résistantes aux immunothérapies (figure 42) (92) (93).



**Figure 42:** Caractéristiques des tumeurs « inflammatoires » et des tumeurs « non inflammatoires ». D'après Zou *et al* (93).

Le CD8 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée par les cellules T cytotoxiques.

Il a été démontré que la présence d'un infiltrat inflammatoire lymphocytaire T CD8+ est un facteur de bon pronostic et de meilleure survie dans le CBNPC (94) (95) (figure 43) et notamment l'expression associée de PD-1 et de CD8 dans le carcinome épidermoïde basaloïde pulmonaire (96).

Une autre étude a mis en évidence que les tumeurs présentant un infiltrat inflammatoire lymphocytaire T CD8+ intra-tumoral exprimaient plus souvent PD-L1 que celles le présentant dans le stroma péri-tumoral (77).

De plus, certaines études montrent que la présence d'une immunité préexistante notamment riche en lymphocytes T CD8+ est corrélée à une meilleure réponse à l'immunothérapie anti-PD1/PD-L1 (figure 44) (97) (98).

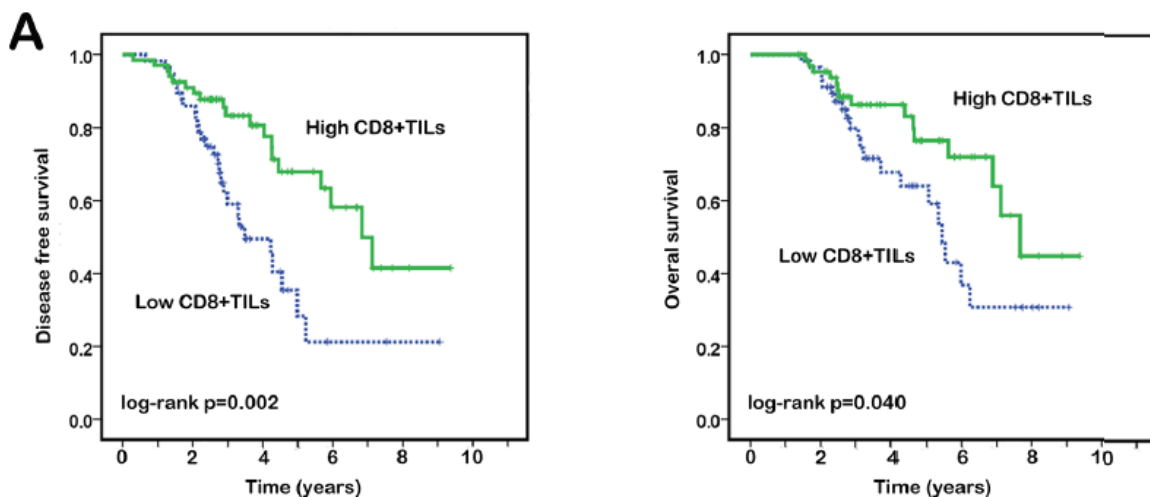


Figure 43 : Survie sans progression et survie globale en fonction de l'intensité des TILs CD8+ dans le CBNPC. D'après *Teng F et al* (95).

*High CD8+ TILs*  $\geq 30\%$  et *Low CD8+ TILs*  $< 30\%$ .

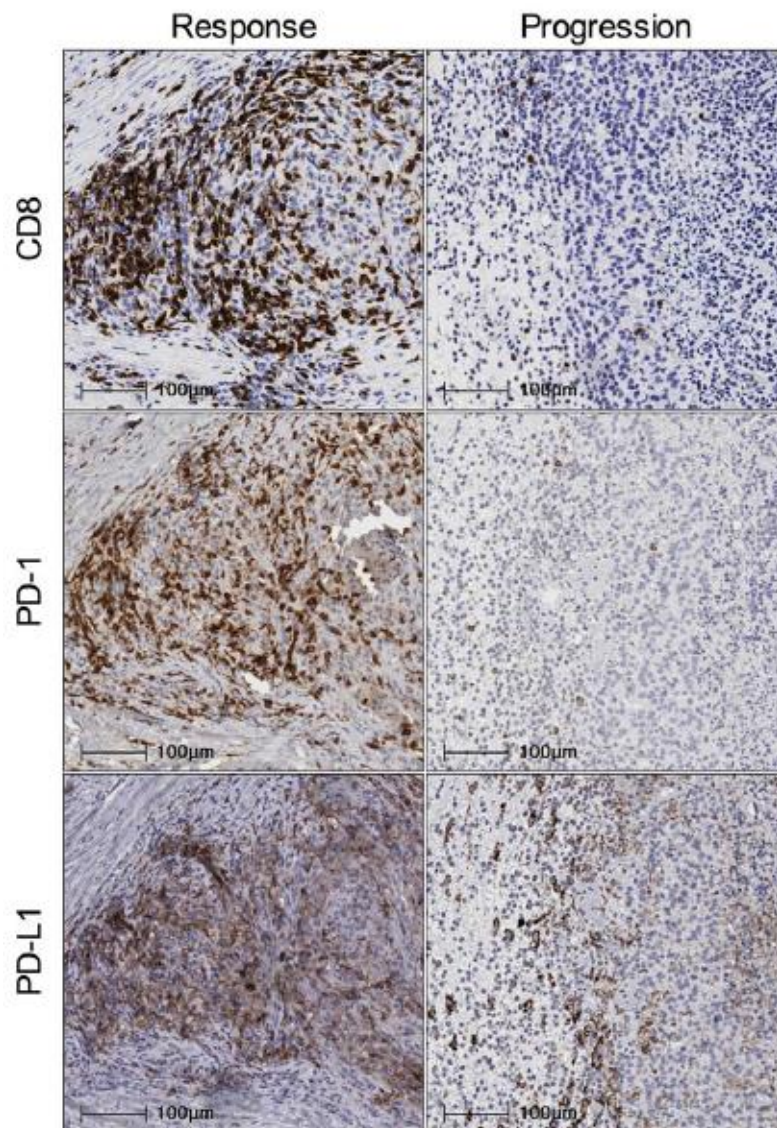


Figure 44 : Expression de CD8, PD-1 et PD-L1 en fonction de la réponse thérapeutique  
 D'après *Tumeh PC et al (97)*.

Le CD103 est une protéine intégrine, sous-unité  $\alpha E$  de l'intégrine  $\alpha E\beta 7$ , qui permet l'adhésion, la migration et la signalisation cellulaire. Il est exprimé par de nombreuses cellules immunes telles que les lymphocytes CD4+, CD8+, les cellules NK et les cellules dendritiques. Il est physiologiquement exprimé par les lymphocytes T mémoires des tissus périphériques tels que la peau ou les muqueuses. Il est actuellement utilisé comme argument diagnostique pour les lymphomes T associés aux entéropathies et dans les leucémies à tricholeucocytes.

Il est également souvent exprimé par les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs). Les cellules CD103+ jouent un rôle majeur dans la réponse immune contre le cancer. Leur présence favorise le recrutement de lymphocytes T spécifiques avec un potentiel prolifératif et cytotoxique plus élevé (20). L'interaction de l'intégrine CD103, avec son ligand, le marqueur des cellules épithéliales E-Cadhérine, exprimé à la surface des cellules tumorales, est nécessaire à la polarisation des granules cytotoxiques et à leur exocytose déclenchant ainsi la lyse de la cellule cible (99).

Deux études ont montré la valeur pronostique de la présence de TILs CD103+ au sein des TILs CD8+ dans le carcinome séreux de haut grade de l'ovaire (100) et dans le carcinome urothélial (101).

Dans les CBNPC, on observe une relation entre l'infiltration de la tumeur par des lymphocytes T CD103+, indépendamment de leur localisation intra-tumorale ou stromale, et une meilleure survie sans progression. Cette étude n'a pas mis en évidence de relation entre la survie et la présence de TILs CD8+ et émet ainsi l'hypothèse de l'identification d'une sous-population CD8+ CD103+ plus prédictive du pronostic des patients (17). CD103 serait alors le marqueur d'une réponse immune anti-tumorale CD8+ plus « active ».

Parallèlement, une étude récente a mis en évidence un intérêt pronostique de l'immunomarquage CD103 par les cellules du microenvironnement tumoral dans les carcinomes épidermoïdes (figure 45) (21). Elle conclut qu'une forte densité de cellules CD103+ intra-tumorales est associée à une survie sans progression et une survie globale prolongées dans les carcinomes épidermoïdes et non dans les adénocarcinomes pulmonaires.

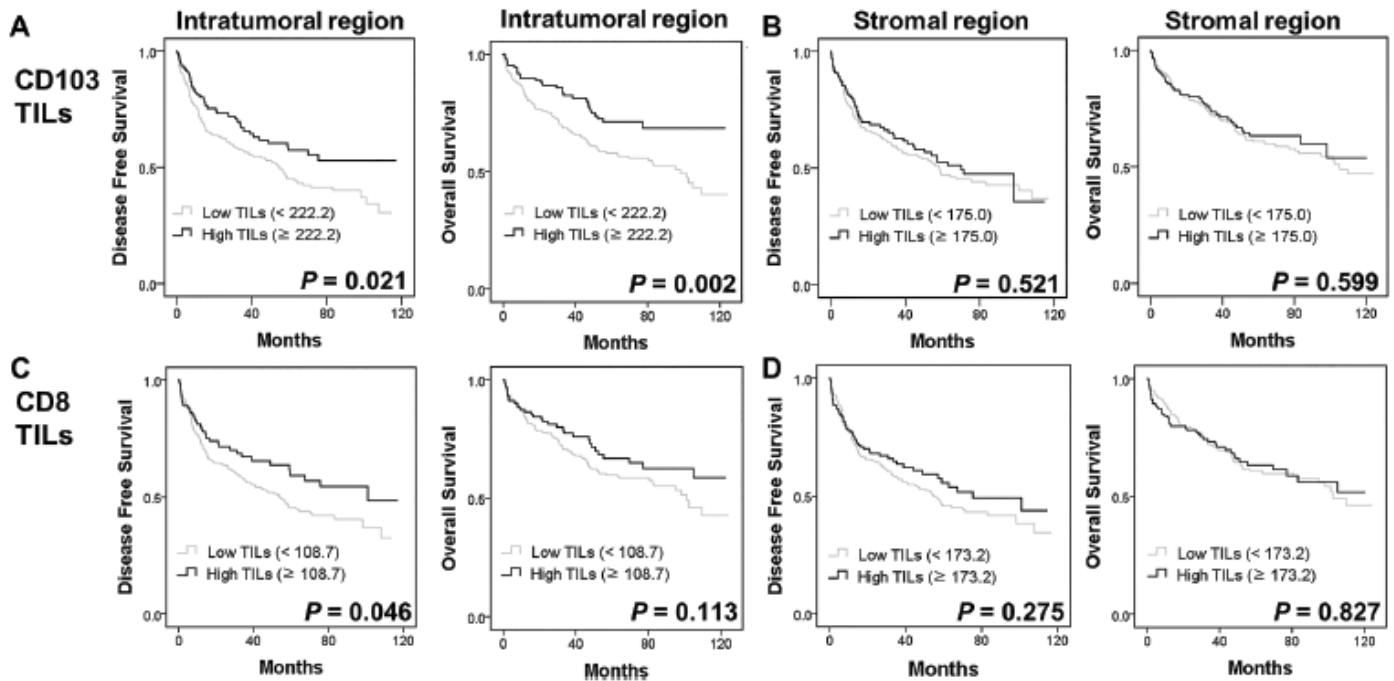
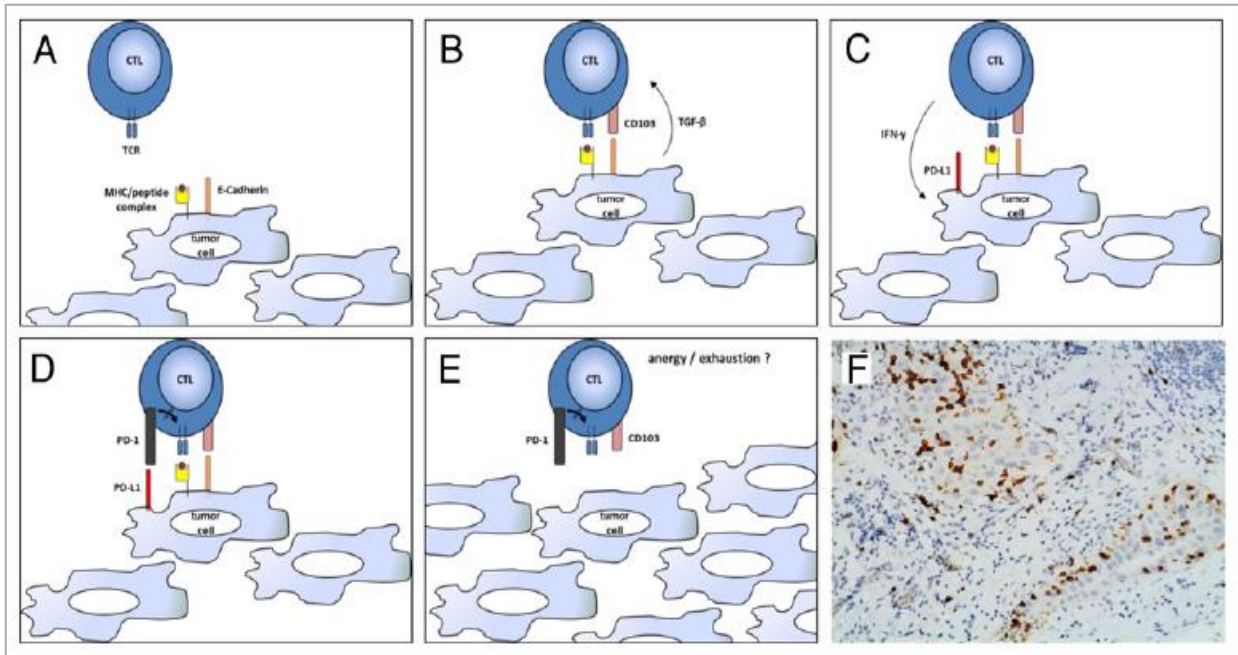


Figure 45 : Survie sans progression et survie globale chez des patients atteints d'un carcinome épidermoïde pulmonaire en fonction de la densité de cellules immunes CD103+ ou CD8+ de localisation intra-tumorale ou stromale. D'après Koh J. et al (21).

Ils ont également observé une forte corrélation entre l'expression de CD103 et l'expression de PD-L1 par les TILs des carcinomes épidermoïdes. Ils émettent ainsi l'hypothèse de l'utilisation du CD103 comme biomarqueur prédictif de la réponse aux immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 dans les carcinomes épidermoïdes.

De la même façon, une étude schématise l'interaction des cellules CD103+ du microenvironnement tumoral, décrites comme marqueur des lymphocytes spécifique d'antigènes intra-tumoraux, avec les cellules tumorales dans le carcinome ovarien (figure 46) (102).



**Figure 46 :** Action des TILs CD103+ dans le carcinome ovarien. D'après *Webb et al* (102).

*A-B :* tout d'abord, les lymphocytes infiltrant la tumeur expriment CD103 à leur surface en réponse à la stimulation antigénique spécifique et à la production de TGFβ par la tumeur. CD103 favorise l'adhésion cellulaire via l'intégrine.

*C-D-E :* les cellules CD103+ contrôlent la prolifération tumorale jusqu'à l'intervention de l'axe PD-1/PD-L1 stimulé, entre autres, par la production d'IFNγ.

*F :* expression de CD103 par les TILs d'un carcinome ovarien de haut grade.

### 3.3 Expression des points de contrôle de l'immunité

L'expression de PD-L1, par les cellules tumorales ou immunes, constitue le 3<sup>ème</sup> axe de recherche dans la prédiction de la réponse aux inhibiteurs des points de contrôle de l'immunité. Cependant, la situation est complexe et sera détaillée dans les chapitres 5 et 6.

Actuellement, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales conditionne le traitement par pembrolizumab dans les CBNPC métastatiques ou localement avancés en 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> ligne.

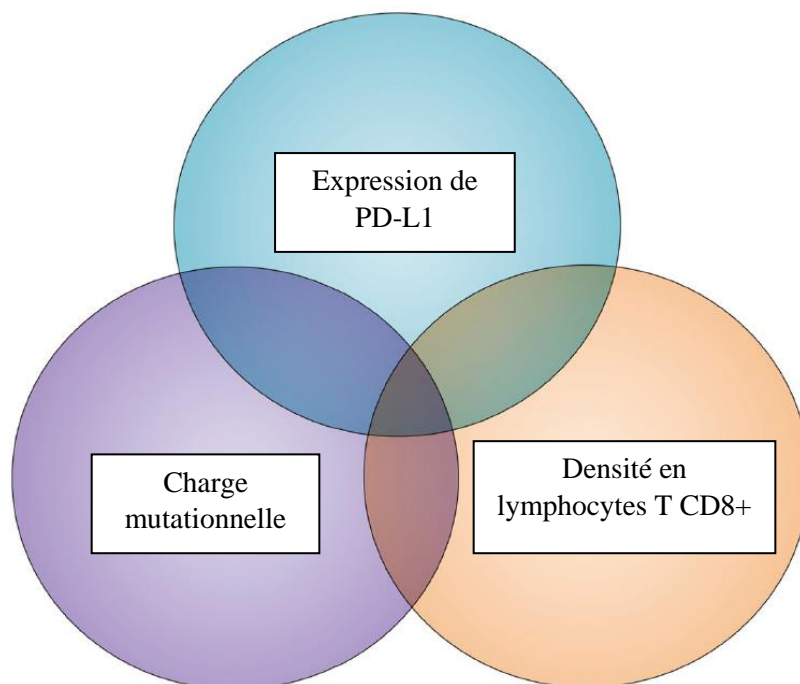
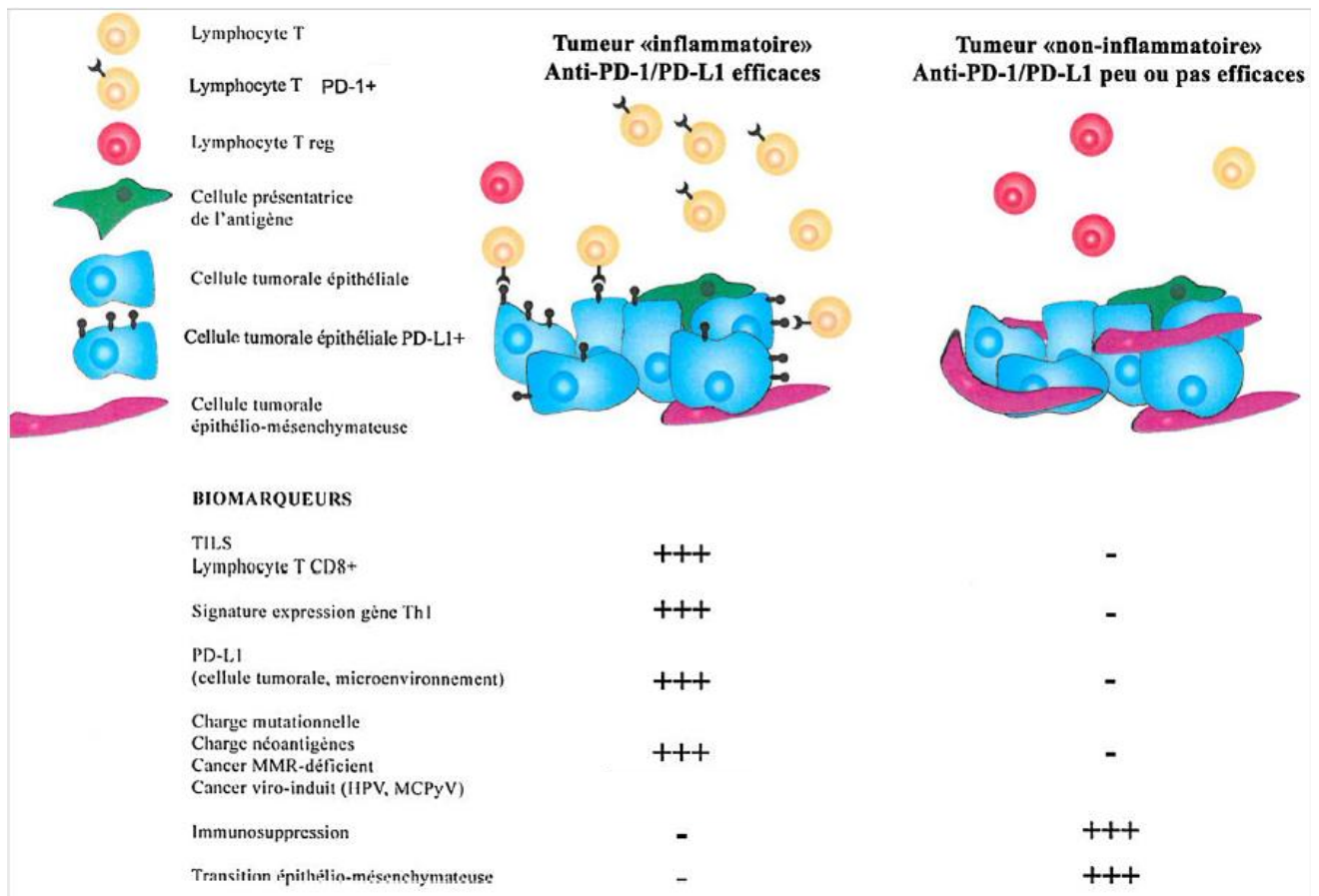


Figure 47 : Les différents biomarqueurs prédictifs de la réponse à l'immunothérapie anti-PD1.

D'après *Topalian et al.* (103).



Les facteurs influençant la survie et la réponse à l'immunothérapie sont multiples et résumés dans la figure 48.



**Figure 48 :** Biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des anti-PD-1/PD-L1 selon le statut « inflammatoire » ou « non inflammatoire » de la tumeur.

D'après Michaël Duruisseaux et al.(104).

Les tumeurs « inflammatoires » sont associées à une immunité anti-tumorale préexistante corrélée à une plus grande charge mutationnelle et en néo-antigènes, expliquant l'infiltration par des lymphocytes de type Th1. Cette réponse anti-tumorale peut-être à l'origine d'une résistance immunitaire adaptative et d'une expression de PD-L1 par les cellules tumorales et du microenvironnement. Les tumeurs « non inflammatoires » sont plus riches en cellules immunosuppressives comme les Treg et en cellules tumorales avec un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse.

## 4. Place de l'immunomarquage anti-PD-L1 dans les différents essais cliniques

Les tumeurs exprimant PD-L1 sont, indépendamment des autres facteurs pronostiques, associées à un pronostic moins bon et à une maladie plus agressive que les tumeurs PD-L1 négatives (105) (106).

### 4.1 Dans les essais de phase III sur le nivolumab : clone 28.8

L'expression de PD-L1 par étude immunohistochimique a été évaluée de manière rétrospective sur des échantillons tumoraux archivés et ne représentait pas un critère de sélection des patients.

Dans l'étude *Checkmate 017* (carcinome épidermoïde), l'expression de PD-L1 n'a pas démontré, de manière statistiquement significative, sa valeur prédictive d'un bénéfice de survie globale, de survie sans progression ou bien de taux de réponse objective quel que soit le seuil de positivité choisi (figure 49) (10).

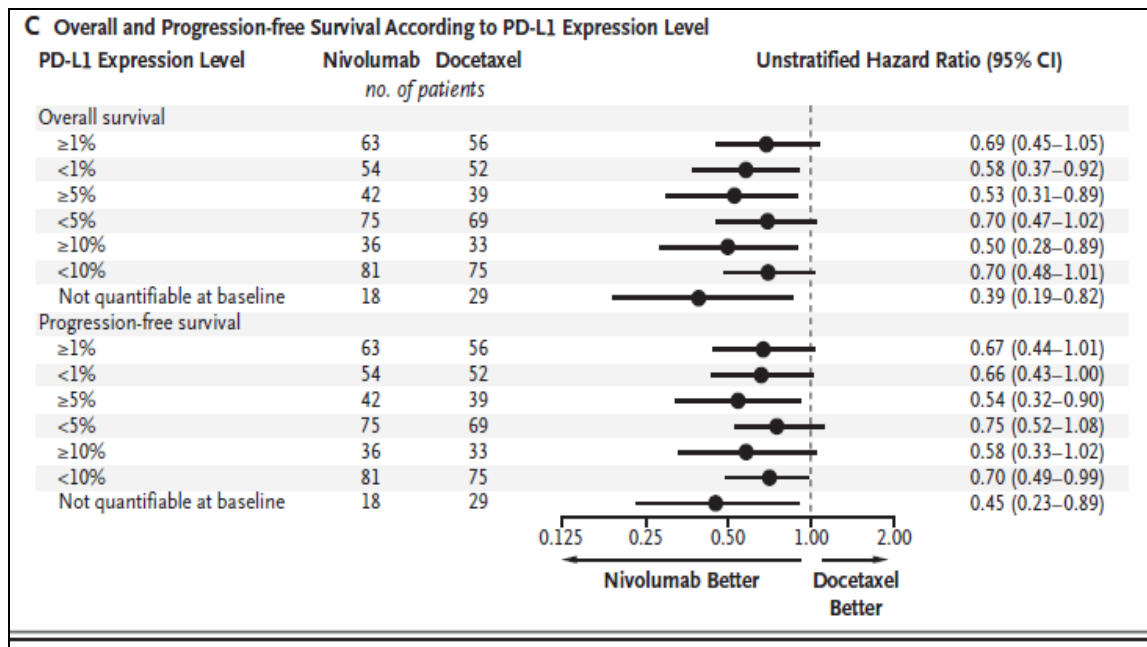


Figure 49: Survie globale et sans progression en fonction du statut PD-L1 des cellules tumorales. *Checkmate 017*. D'après *Brahmer et al* (10).

Dans l'étude *Checkmate 057* (carcinome non épidermoïde), une étude immunohistochimique a été réalisée chez 78% des patients. Un test d'interaction, à titre exploratoire, retrouve une association entre l'expression de PD-L1 et un bénéfice de survie globale, de survie sans progression et de taux de réponse objectif quel que soit le seuil retenu (<1% vs  $\geq$ 1%, <5% vs  $\geq$ 5%, <10% vs  $\geq$  10%) (figures 50 et 51) (9). Ceci souligne l'hypothèse qu'il existe un microenvironnement différent au sein des carcinomes épidermoïdes et des carcinomes non épidermoïdes.

Cependant, même les patients avec une expression de PD-L1 < 1%, soit 47% des patients traités par nivolumab dans cet essai, présentent un taux de réponse de 9% avec une durée médiane de survie de 18 mois ce qui représente un bénéfice non négligeable. De plus, les patients exprimant PD-L1 à ou au-delà de 1% présentent une progression dans 45% des cas dans les 3 premiers mois.

Une plus grande proportion de patients est décédée au cours des 3 premiers mois dans le groupe sous nivolumab (59/292, 20,2%) comparé au groupe sous docétaxel (44/290, 15,2%). Les résultats d'une analyse post-hoc en sous-groupe, exploratoire, multivariée, ont indiqué que les patients traités par nivolumab présentant des caractéristiques de moins bon pronostic et/ou une maladie agressive associée à une absence ou une plus faible expression de PD-L1 (par exemple <50%), pourraient présenter un risque plus élevé de décès dans les 3 premiers mois (107).

Le statut PD-L1 serait donc intéressant notamment pour identifier les patients hyperprogressseurs.

Le test PD-L1 a été validé comme test complémentaire pour la prescription de nivolumab dans les CBNPC non épidermoïdes et non comme test compagnon avec un seuil de positivité fixé à 1%.

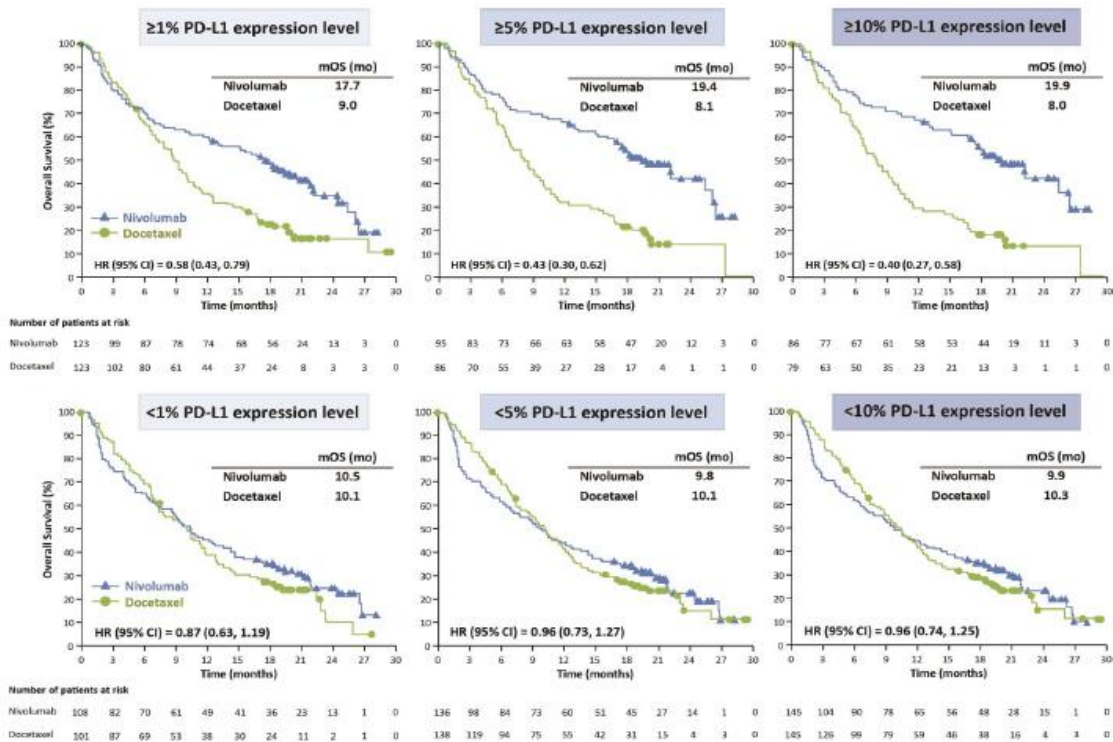


Figure 50 : Courbes de survie globale comparant le bras sous nivolumab et le bras sous docétaxel selon l'expression immunohistochimique de PD-L1 par les cellules tumorales. *Checkmate 057*. D'après *Borghaei et al (9)*.

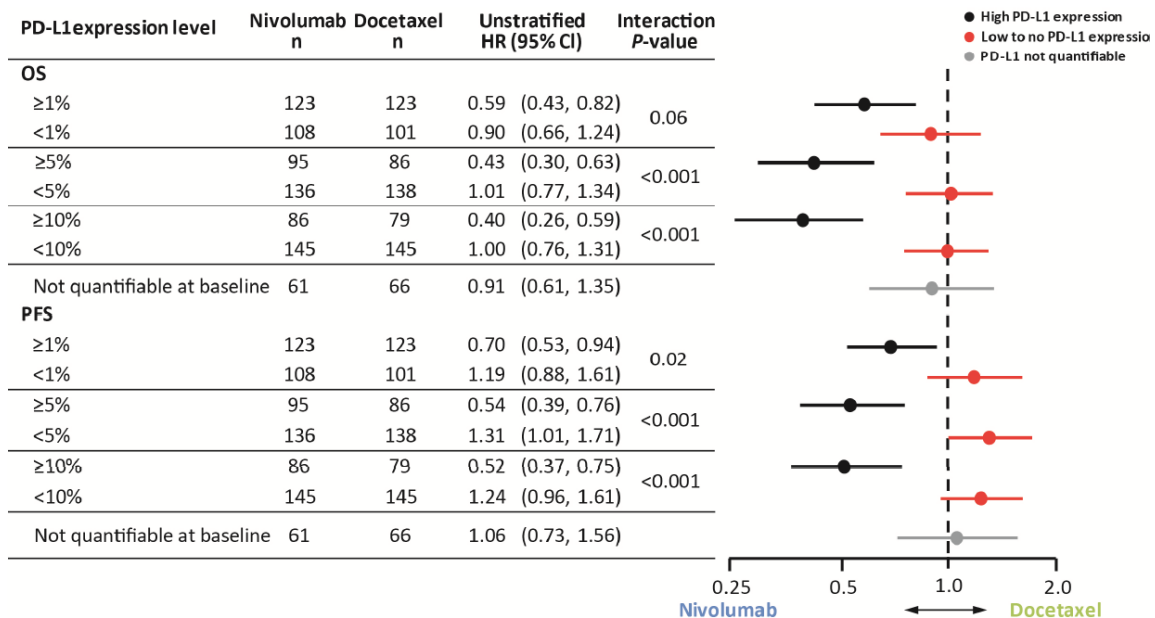


Figure 51 : Survie globale et sans progression en fonction du statut PD-L1 des cellules tumorales. *Checkmate 057*. D'après *Borghaei et al (9)*.

## 4.2 Dans les essais de phase III sur le pembrolizumab : clone 22C3

Les essais cliniques étudiant le pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne (Keynote 024) et en 2<sup>ème</sup> ligne (Keynote 010) ont évalué le statut PD-L1 de façon prospective et ont montré l'intérêt thérapeutique d'identifier les patients selon leur statut PD-L1.

Le pembrolizumab représente une nouvelle option thérapeutique :

- en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement, chez les patients dont la tumeur exprime fortement PD-L1 ( $\geq 50\%$ ) sur les cellules tumorales et ne présente pas de mutation d'*EGFR* ou de réarrangement d'ALK.
- à partir de la 2<sup>ème</sup> ligne de traitement, chez les patients dont la tumeur exprime PD-L1 à un taux  $\geq 1\%$ , en absence de mutation sauf à partir de la 3<sup>ème</sup> ligne.

Il est souhaitable que le statut PD-L1 soit déterminé dès le diagnostic de CBNPC avancé afin d'éclairer la décision thérapeutique le plus précocement possible.

Le test PD-L1 a été validé comme test compagnon du pembrolizumab.

## 4.3 Dans les essais sur l'atézolizumab : clone SP142

Dans ces études, le statut PD-L1 a été évalué sur les cellules immunitaires et les cellules tumorales.

Dans l'essai de phase II POPLAR, l'expression de PD-L1 a été évaluée sur les cellules tumorales et sur les cellules immunitaires avec une répartition en 4 sous-groupes. L'analyse en sous-groupe montre que les patients TC0 IC0 (soit absence d'expression de PD-L1  $< 1\%$ ) ne présentaient pas d'amélioration significative de leur survie dans le bras sous atézolizumab par rapport au bras sous chimiothérapie avec un HR à 1,04 IC95% (0,62-1,75) alors que les autres patients présentaient une amélioration significative de leur survie globale avec un HR d'autant plus en faveur de l'atézolizumab que le pourcentage de cellules PD-L1 positives augmentait (TC3IC3 HR à 0,49 IC95% (0,22-1,07)) (56).

Dans l'essai de phase III OAK, l'analyse des différents sous-groupes d'expression de PD-L1, ne retrouve pas les mêmes résultats et montre un gain statistiquement significatif de survie globale (13,8 mois contre 9,6 mois ; HR=0,73 ; IC95% = 0,62-0,87 ; p=0,003) dans le groupe sous atézolizumab par rapport au groupe sous chimiothérapie quel que soit le groupe d'expression (57).

#### 4.4 Dans les essais sur le durvalumab : clone SP263

L'étude PACIFIC n'a pas mis en évidence de différence de survie en fonction de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales en comparant les groupes l'exprimant à moins et plus de 25% (figure 52) (58).

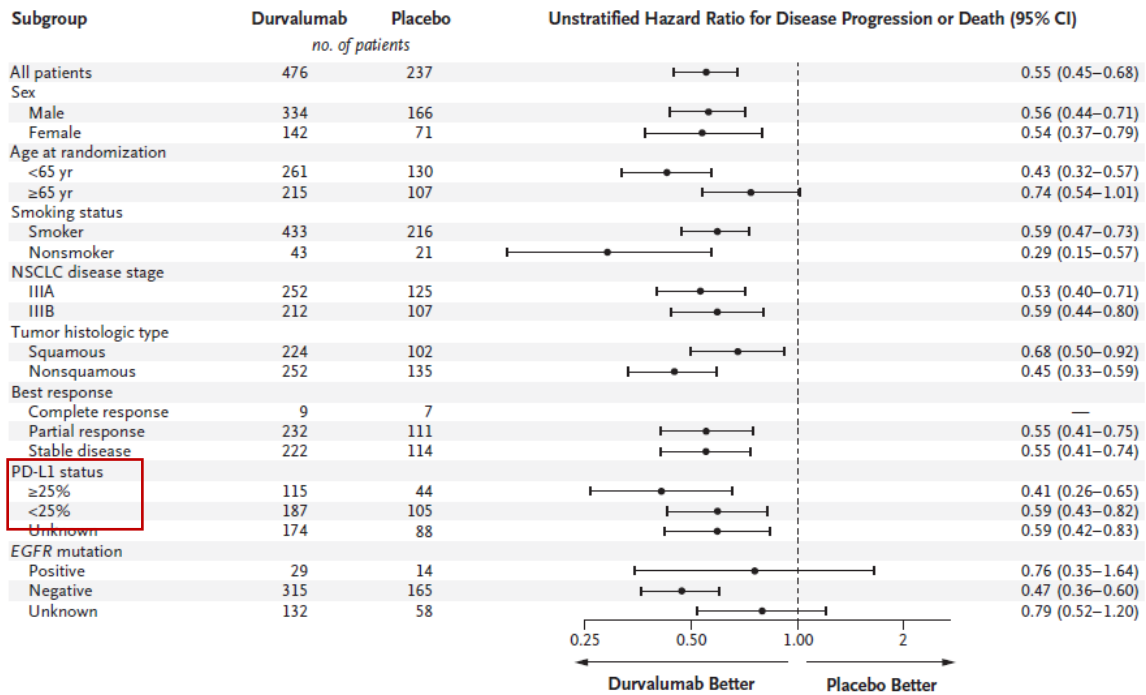


Figure 52 : Les différents HR en analyse multivariée en fonction des variables cliniques, histologiques et immunohistochimiques. *PACIFIC*.

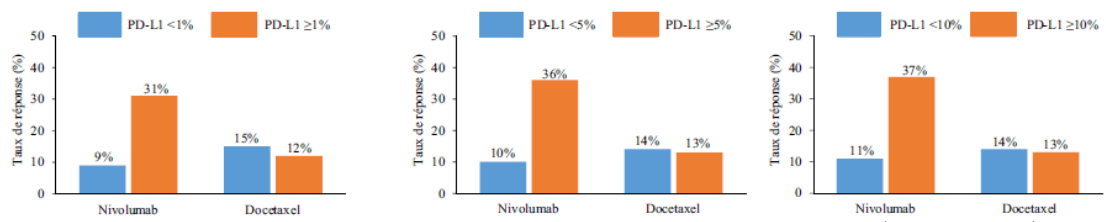
D'après Antonia SJ et al (58).

#### 4.5 Dans les essais sur l'avélumab : clone 73-10

Les patients exprimant PD-L1 semblent avoir une meilleure réponse thérapeutique dans les essais précoces.

A.

CHECKMATE 057



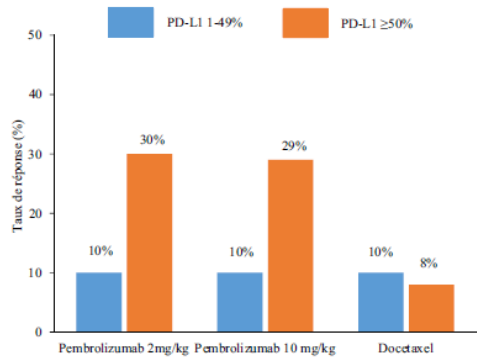
Nombre de répondeurs	10/108	38/123	15/101	15/123
Durée médiane de réponse, mois	18,3	16,0	5,6	5,6
Médiane de survie, mois	10,5	17,7	10,1	9,0

	14/136	34/95	19/138	11/86
	18,3	16,0	5,6	5,6
	9,8	19,4	10,1	8,1

	16/145	32/86	20/145	10/79
	18,3	16,0	5,6	5,6
	9,9	19,9	10,3	8,0

B.

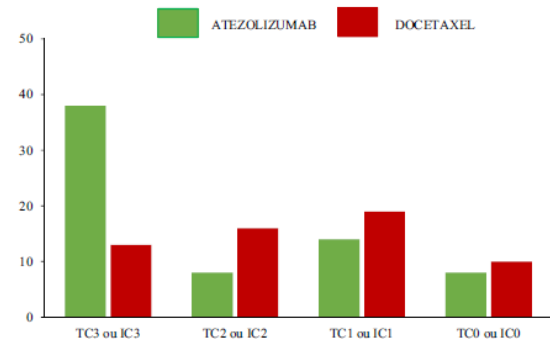
KEYNOTE 010



Nombre de répondeurs	20/205	42/139	20/195	44/151	20/191	12/152
----------------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

C.

POPLAR



Médiane de survie, mois	15,5	11,1	9,0	6,2	15,6	12,4	9,7	9,7
-------------------------	------	------	-----	-----	------	------	-----	-----

Figure 53: Récapitulatif des différents taux de réponse dans les essais cliniques en fonction de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales.

D'après Duruisseaux et al (108).

A l'heure actuelle, il n'existe pas d'utilité clinique à l'évaluation de l'expression de PD-L1 par les cellules immunitaires pour la prescription des traitements disponibles.

## 5. Différents anticorps anti-PD-L1 pour différentes thérapeutiques

### 5.1 Les différents anticorps anti-PD-L1

Voici un tableau récapitulatif des anticorps anti-PD-L1 avec les différents scoring utilisés dans les essais cliniques :

Clone	Espèces	Fournisseur	Thérapie associée	Cut-off
<b>22C3</b>	<b>Souris</b>	Agilent Dako	pembrolizumab = anti-PD1	Seuil de positivité : 1% Fort si $\geq 50\%$ 1 <sup>er</sup> ligne
<b>28-8</b>	<b>Lapin</b>	Agilent Dako	nivolumab = anti-PD1	CT $\geq 1\%$
<b>E1L3N</b>	<b>Lapin</b>	Cell Signaling Technology	Aucun	Le plus souvent CT $\geq 5\%$
<b>SP142</b>	<b>Lapin</b>	Spring (Roche) Ventana	atézolizumab MDPL3280 = anti-PDL1	CT <1%, 1-4%, 5-49%, $\geq 50\%$ (score CT0 à CT3) CI <1%, 1-4%, 5-9%, $\geq 10\%$ (score CI0 à CI3)
<b>SP263</b>	<b>Lapin</b>	Astra Zeneca Ventana	durvalumab = anti-PDL1	CT $\geq 25\%$
			Pour le nivolumab	CT <1%, 1-5%, 5-10%, $\geq 10\%$
<b>73-10</b>		Agilent Dako	avélumab = anti-PD-L1	CT $\geq 1\%$

*CT : cellules tumorales CI: cellules immunitaires*

Tableau 1 : Les différents anticorps anti-PD-L1.

L'anticorps utilisé dans les essais Checkmate 017 et 057 était le 28.8 d'Agilent Dako.

L'anticorps utilisé dans les essais Keynote 010 et 024 était le 22C3 d'Agilent Dako.



Ces différents clones ont des cibles différentes. Le SP142 et l'E1L3N ciblent des épitopes intracellulaires tandis que le clone 28.8 cible des épitopes extracellulaires de PD-L1. Les clones 22C3 et 28-8 sont commercialisés soit « prêts à être utilisés » sur n'importe quel automate soit sous forme de kit avec solution et tampons nécessaires comme le SP263 et le SP142. Ces anticorps ne sont utilisables que sur plateformes et automates dédiés ce qui pose des problèmes dans le travail de routine d'un laboratoire de pathologie.

Différentes études ont comparé ces anticorps.

La première étude comparative est l'étude « *Blue Print Project* » pilotée par *Hirsch et al* qui a comparé, sur 39 CBNPC, les clones SP142, SP263, 22C3 et 28.8 (figure 54) (109). Ces études immunohistochimiques ont été réalisées de manière centralisée par les compagnies *Agilent Dako* et *Roche Ventana* et ont été interprétées par 3 pathologistes de *Ventana* et *Agilent Dako*, en triple insu.

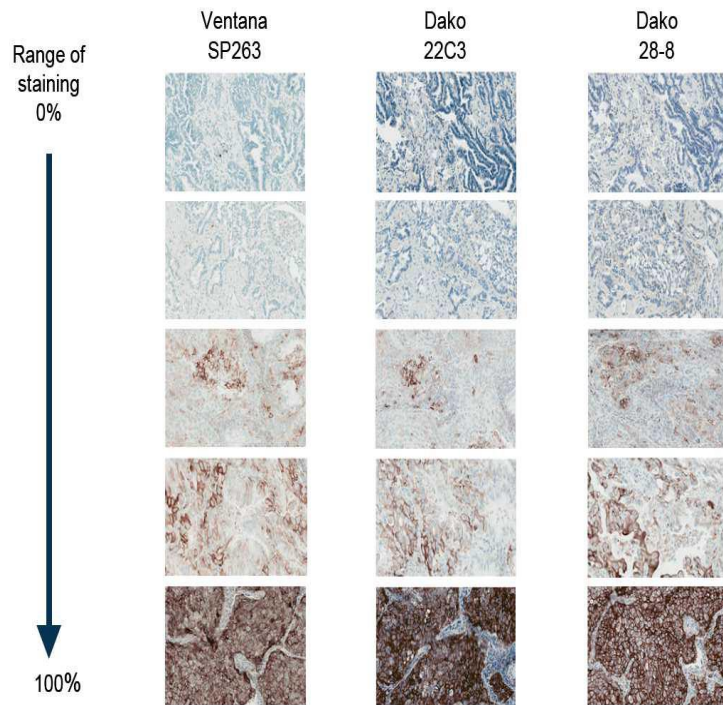
L'étude allemande « *Ring German Study* » de *Scheel et al* a comparé 15 CBNPC marqués en centralisé avec les anticorps 28.8, 22C3, SP142 et SP263 et interprétés par 9 pathologistes en indépendant et en aveugle (110).

Ces études ont montré que les anticorps 22C3, 28.8 et SP263 ont des performances similaires sur le marquage des cellules tumorales dans les CBNPC alors que le SP142 en révèle un pourcentage inférieur. En ce qui concerne les cellules immunitaires, aucune discordance majeure n'a été mise en évidence.

La concordance entre les anticorps pour les seuils de 1, 5, 10 et 50% était relativement bonne pour les cellules tumorales avec un Kappa entre 0,6 et 0,8 mais médiocre pour les cellules immunitaires avec un Kappa évalué à 0,2.

Suite à ces deux études, le SP263 peut actuellement être utilisé comme test complémentaire pour la prescription du nivolumab chez des patients atteints d'un CBNPC non épidermoïde en utilisant comme scoring les sous-groupes <1%, 1-5%, 5-10%, ≥10%.

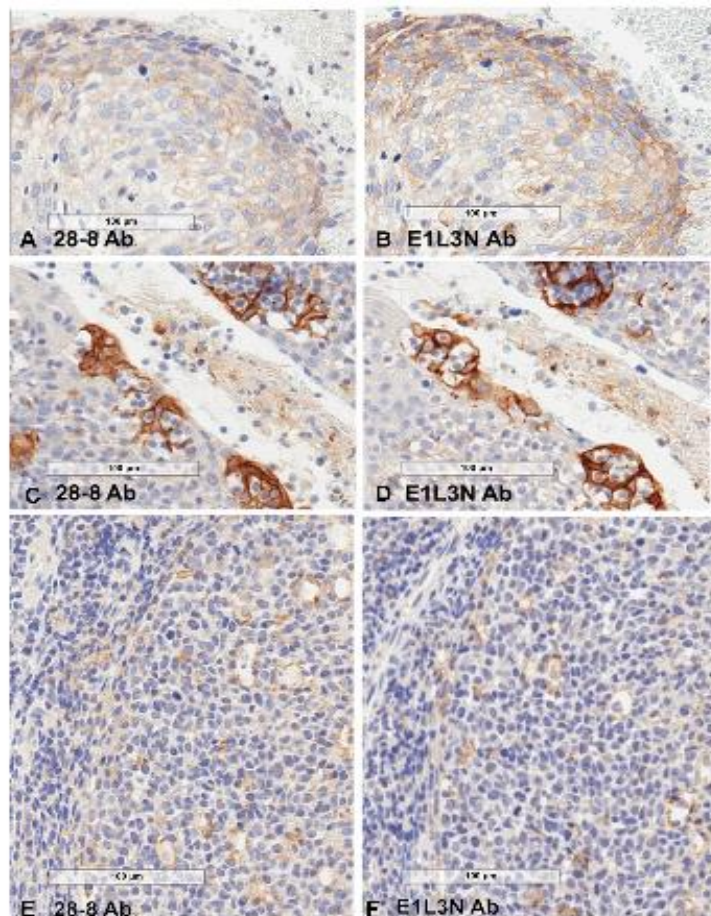
L'étude de *Cogswell J et al* (figure 55) (111) et l'étude de *Rimm et al.* (figure 56) (112) ont comparé l'anticorps E1L3N au clone 28.8 et ont montré que ces deux anticorps donnaient des résultats similaires sur une série de CBNPC.

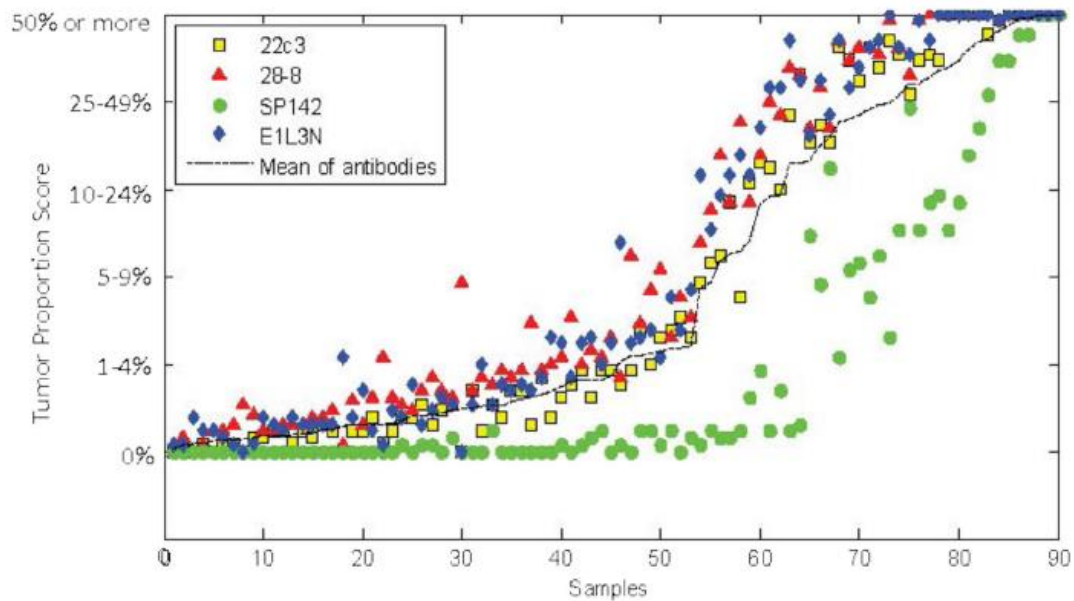


**Figure 54:** Illustration de résultats immunohistochimiques comparant les 3 anticorps SP263, 22C3 et 28.8. D'après *Hirsch et al* (109).

**Figure 55 :** Comparaison de l'anticorps E1L3N et du clone 28.8.

D'après *Cogswell et al* (111).





**Figure 56:** Pourcentage de cellules tumorales marquées, dans différents échantillons, par les différents clones 22C3, 28-8, SP142 et E1L3N.

D'après *Rimm et al* (112).

Une étude d'harmonisation française multicentrique (7 centres participants) visant à tester les anticorps anti-PD-L1 en les associant à différents types d'automates a été réalisée (figure 57) (113). Chaque centre a collecté 3 cas d'adénocarcinomes et 3 cas de carcinomes épidermoïdes pulmonaires avec dans chaque groupe un cas exprimant PD-L1 à moins de 1%, un cas l'exprimant entre 1 et 49% et un cas à plus de 50%. Les tests PD-L1 ont été réalisés, dans 3 centres, sur automate Dako AS Link 48, pour 2 centres, sur Ventana Benchmark et pour les 2 autres cas sur Leica Bond III. Différents anticorps anti-PD-L1 (22C3, 28.8, E1L3N, SP142 et SP263) ont été utilisés en testant notamment les LDT (laboratory-developed tests) ainsi que les anticorps non CE-IVD.

Une bonne corrélation entre les anticorps SP263, 22C3 et 28.8 a été retrouvée entre les différents centres (figure 57). En ce qui concerne les LDT, une partie d'entre eux (50%) présente une performance similaire sur les différents automates avec, cependant, une précaution importante à prendre en ce qui concerne leur élaboration et leur validation dans les plateformes d'immunohistochimie. Il est recommandé de valider et d'étalonner régulièrement la technique d'immunohistochimie PD-L1. Il est conseillé d'effectuer un bilan régulier du nombre de cas négatifs, faiblement positifs ou fortement positifs. Le taux de tumeur avec moins de 1% ou plus de 50% de CT marquées ne doit pas excéder respectivement 50% et 20% de l'ensemble des prélèvements (11) (14).

Les anticorps CE-IVD (*In Vitro Diagnostic*) répondant aux exigences de la norme ISO 13485, sont à privilégier par rapport à ceux destinés à un usage en recherche exclusif (*Research Use Only*, RUO).

Le SP263 ressort comme un anticorps particulièrement interchangeable dans les différentes conditions techniques.

L'E1L3N (RUO) a montré une forte concordance avec les anticorps 28.8, 22C3 et SP263.

	Dako			Ventana		Leica		Reference
	Center 1	Center 2	Center 3	Center 4	Center 5	Center 6	Center 7	
28-8	Ref.	0.94	0.79	0.8	0.73	0.6	0.58	28-8 (center 1)
22C3	Ref.	0.91	0.82	0.81	0.77	0.5	0.62	22C3 (center 1)
SP263	0.83	0.83	0.86	0.81	Ref.	0.83	0.86	SP263 (center 5)
SP142	0.68	0.38	0.61	0.43	0.45	0.78	0.81	SP263 (center 5)
E1L3N	0.63	0.65	0.77	0.6	0.81	0.75	0.78	SP263 (center 5)

Figure 57: Comparaison des anticorps anti-PD-L1 aux tests de référence (cases grises) sur différentes plateformes d'immunohistochimie (case verte : bonne concordance avec coefficient Kappa  $\geq 0,75$  ; case rouge : concordance insuffisante).

D'après *Julien Adam et al* (113).

Une autre étude de comparabilité des différents anticorps sur les différents automates « *PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples* » (*Blueprint 2*) par *Tsao MS et al* est en cours d'élaboration et donne, pour le moment, les mêmes résultats avec une bonne reproductibilité inter-observateur du scoring des cellules tumorales.

Plusieurs études ont montré la bonne concordance entre les prélèvements cytologiques, biopsiques ou chirurgicaux (114) (115). Cependant, l'utilisation des échantillons cytologiques n'a pas été validée dans les essais cliniques et n'est pas recommandée actuellement pour l'utilisation des tests PD-L1. Ces données seront complétées par l'étude *Blueprint 2*.

## 5.2 Caractéristiques de l'anticorps anti-PD-L1

L'anticorps anti-PD-L1 est exprimé dans un certain nombre de tissus ou cellules normales tels que le trophoblaste placentaire, l'épithélium amygdalien, les macrophages et les cellules dendritiques (figure 58) (116).

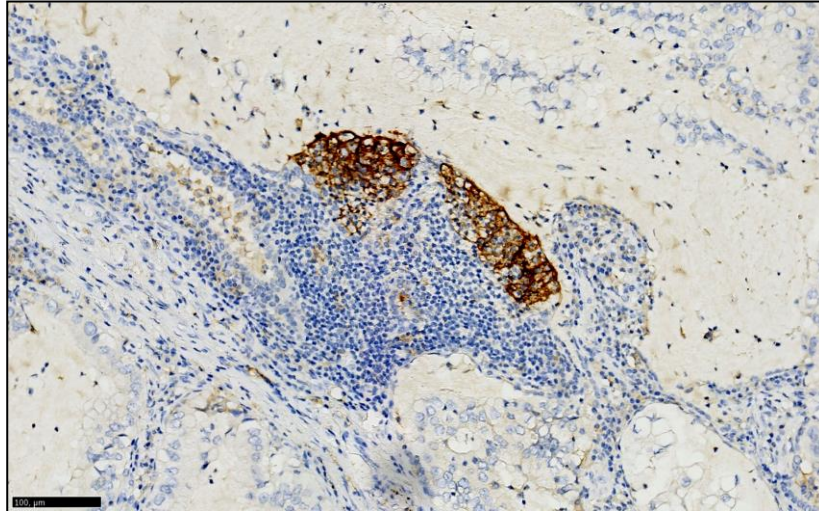


Figure 58 : Expression de PD-L1 par les cellules dendritiques.

L'amygdale ou le placenta (que nous avons utilisé) peuvent ainsi facilement être utilisés comme témoin positif externe.

Les recommandations d'interprétation du marquage avec l'anticorps anti-PDL1 sont les suivantes :

- **contributif : avoir au moins 100 cellules tumorales viables analysables (117)**
- **marquage positif = marquage membranaire complet ou non, basolatéral ou granulaire**
- **quelle que soit son intensité**
- **sur les cellules tumorales viables**
- **avec un témoin interne (cellules immunes) ou externe positif**

Il faut déterminer la proportion de cellules tumorales exprimant PD-L1 sur l'ensemble des cellules tumorales présentes sur la coupe histologique.

Pour l'évaluation immunohistochimique, il faut faire attention à quelques pièges d'interprétation (figure 59) :

- Ne pas prendre en compte et reconnaître le marquage de la nécrose, et les artefacts de marquage liés à l'hémossidérine et à l'antracose.
- Ne pas prendre en compte, dans le score des cellules immunes, les cellules immunitaires intra-vasculaires ainsi que les macrophages intra-alvéolaires

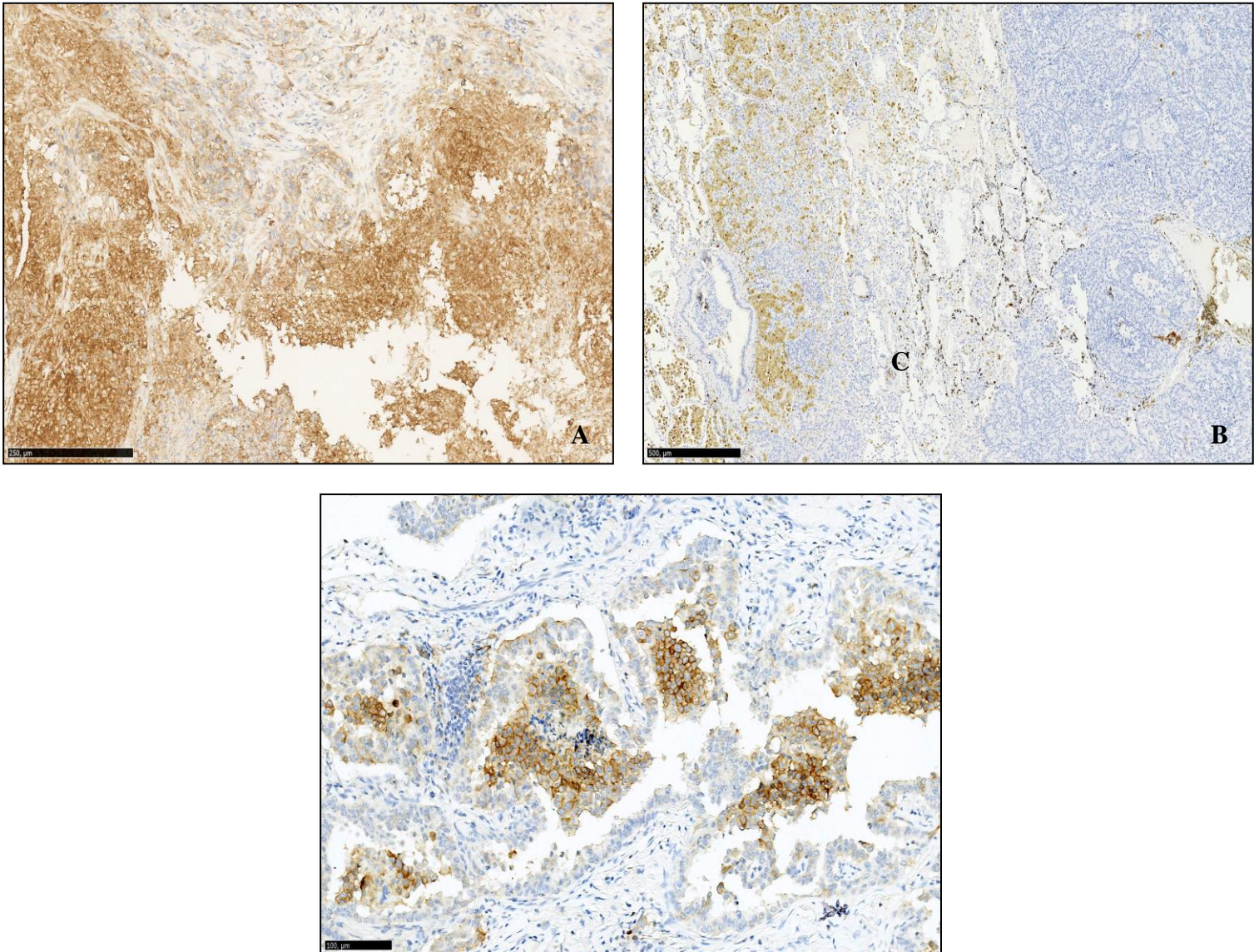


Figure 59 : Faux positifs et pièges du marquage avec l'anticorps anti-PD-L1.

*A : faux positif de la nécrose tumorale.*

*B : faux positif de l'antracose.*

*C : expression par les macrophages alvéolaires.*

Les principales difficultés concernant l'analyse de ce biomarqueur sont :

**Difficultés biologiques :**

- hétérogénéité spatiale et temporelle inter-tumorale notamment entre la tumeur primitive et la métastase ganglionnaire avec jusqu'à 20% de discordance (118). La discordance observée a été mise sur le compte d'une différence de morphologie, d'une potentielle dédifférenciation entre les deux localisations nécessitant de bien sélectionner son échantillon pour l'analyse de PD-L1 ;
- hétérogénéité spatiale et temporelle intra-tumorale avec des expressions différentes sur différentes zones de la tumeur se traduisant, notamment, par une différence entre le statut PD-L1 sur la biopsie et celui sur la pièce opératoire correspondante avec des discordances atteignant 48% (figure 60 et 61) (119) ;

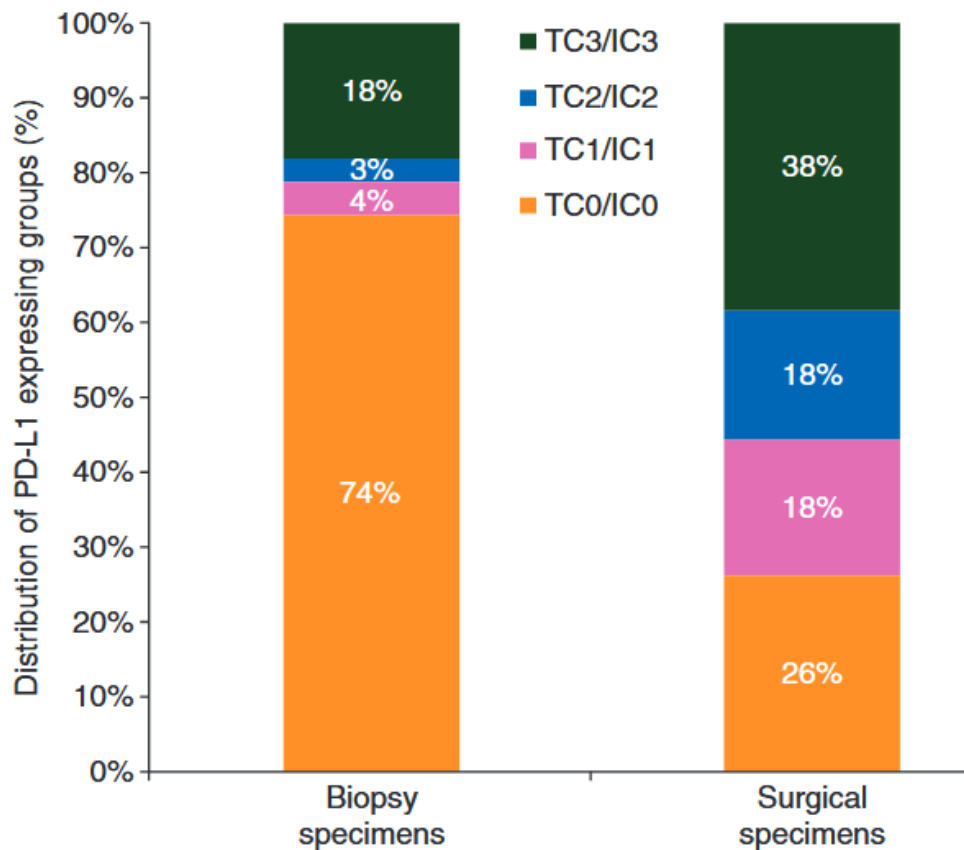


Figure 60 : Distribution de l'expression de PD-L1 par les cellules immunes et tumorales sur biopsie puis sur pièce opératoire (étude réalisée avec le clone SP142).

D'après *Ilié et al* (119).



Figure 61 : Hétérogénéité d'expression de PD-L1 au sein de la même tumeur.

- modification de l'expression de PD-L1 suite à un traitement oncologique (120) ;
- variation de l'expression de PD-L1 en fonction des altérations génomiques, de l'hypoxie et de la production d'interféron $\gamma$ .

**Difficultés techniques : qualité des techniques pré-analytiques**

- type de fixateur, durée, délai de fixation et âge des lames blanches ;
- existence de différents clones ne présentant pas la même affinité pour PD-L1 et ne reconnaissant pas le même épitope ;
- les différents anticorps sont commercialisés sous forme de kits, avec solutions et tampons, nécessaires à la technique et utilisables uniquement sur automate et plateformes dédiées.

**Difficultés d'évaluation du statut immunohistochimique :**

- existence de différents scoring pour les différents anticorps commercialisés et associés à différentes molécules thérapeutiques (anti-PD-1, anti-PD-L1) ;
- scoring des cellules tumorales et/ou des cellules immunitaires ;
- concordance inter et intra-observateur, nécessité de formation.



## OBJECTIFS

---

Les ICI ont montré leur efficacité dans le traitement des CBNPC. Cependant, celle-ci est inégale en fonction des patients. Définir le meilleur biomarqueur prédictif de la réponse thérapeutique est actuellement l'objet de nombreuses études. L'expression immunohistochimique de PD-L1 est, aujourd'hui, utilisée en routine mais est confrontée à des contraintes techniques avec une grande disparité de tests. Elle n'a pas montré son intérêt prédictif dans le traitement par nivolumab mais conditionne le traitement par pembrolizumab dans le CBNPC avancé.

Notre travail s'organise en deux parties.

### 1. PARTIE I

---

#### 1.1 Objectif principal

Notre objectif principal est d'évaluer, dans une cohorte rétrospective de patients traités par nivolumab pour un CBNPC métastatique ou localement avancé, la survie globale et le taux de réponse selon le score RECIST v 1.1 en fonction de l'expression immunohistochimique de PD-L1 par les cellules tumorales (CT) et par les cellules immunitaires (CI) et en fonction des sous-populations immunes CD8+ ou CD103+ au sein de la tumeur.

#### 1.2 Objectifs secondaires

- évaluer la relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et la présence de CI intra-tumorales CD103 + ou CD8+.
- évaluer l'expression de PD-L1 par les CT en fonction de l'apparition d'effets secondaires et évaluer la réponse thérapeutique (RECIST) en fonction du taux de lymphocytes sanguins.

## **2. PARTIE II**

---

### **2.1 Objectif principal**

Notre objectif principal est d'évaluer, dans une cohorte rétrospective de patients opérés d'un adénocarcinome pulmonaire, les caractéristiques morphologiques, phénotypiques et moléculaires ainsi que le microenvironnement tumoral CD8+ ou CD103+ en fonction de l'expression de PD-L1 par les CT et CI.

### **2.2 Objectif secondaire**

Notre objectif secondaire est d'évaluer, dans cette même cohorte, la survie sans progression en fonction de l'expression de PD-L1 par les CT et CI ainsi qu'en fonction de la présence de CI intra-tumorales CD8+ ou CD103+.

## **PARTIE I**

---

## MATERIEL ET METHODES

---

### 1. Sélection initiale des cas

---

La sélection des patients a été réalisée de manière unicentrique et rétrospective par le Dr. Rémi VEILLON (oncopneumologue, service des maladies respiratoires Hôpital Haut-Lévêque) et le Dr. Pierre HELLY DE TAURIERS (ancien interne en pneumologie).

Les patients sélectionnés pour notre étude avaient les caractéristiques suivantes :

- Traités par nivolumab (au moins une injection, 3mg/kg tous les 15 jours) en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus pour un carcinome épidermoïde ou un adénocarcinome pulmonaire localement avancé ou métastatique histologiquement prouvé ;
- Avec un Perfomans Status de 0-1 ;
- Dans le service d'oncopneumologie de l'hôpital Haut-Lévêque de Bordeaux ;
- Sur la période de mai 2015 à novembre 2016.

Les patients exclus sont ceux ayant bénéficié du nivolumab dans le cadre d'un essai thérapeutique ou d'une immunothérapie en première ligne.

Au total, 70 patients ont été initialement inclus.

### 2. Recueil des prélèvements et étude morphologique

---

Les échantillons tumoraux fixés au formol tamponné à 10% et inclus en paraffine correspondent essentiellement à du matériel micro-biopsique archivé (le plus ancien datant de 2001).

Après avoir évalué la représentativité tumorale du matériel restant sur le bloc d'inclusion comparativement à la lame colorée en HES (Hématoxylin Eosine Safran), 51 patients étaient éligibles à la réalisation d'une étude immunohistochimique. Pour les 19 autres patients, le matériel avait principalement été épuisé pour des analyses immunohistochimiques ou de biologie moléculaire à visée diagnostique ou théranostique.

Ceci reflète la difficulté des analyses théranostiques sur des prélèvements exigus tels que des micro-biopsies pulmonaires.

Des coupes histologiques au microtome ont été réalisées à 3 micromètres d'épaisseur pour les cas sélectionnés.

### **3. Etude immunohistochimique**

---

L'immunohistochimie est une technique permettant de détecter et de localiser des protéines à partir de coupes histologiques selon le principe d'une réaction antigène-anticorps. L'analyse immunohistochimique a été réalisée sur les lames blanches fraîches ou coupées dans les 3 mois précédents. Selon l'étude Keynote 001, l'utilisation de matériel d'archive est possible et ne constitue pas une difficulté à condition d'utiliser des lames précoupées dans les 6 mois (117).

Les études immunohistochimiques ont été réalisées sur des lames blanches de 3 micromètres. Tous les protocoles d'analyse immunohistochimique ont été réalisés sur automate Leica-Bond III (Bond-III™, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, U.K) en utilisant des réactifs standards fournis par le fabricant. Après l'application d'une solution de récupération antigénique pendant 20 min, les lames déparaffinées sont incubées avec l'anticorps primaire pendant 15 minutes à température ambiante (anticorps monoclonal anti-PD-L1, clone E1L3N, dilution de 1 : 100, Cell Signaling technology; anticorps monoclonal anti-CD8, clone C8/144B, dilution de 1 : 50, Dako; anticorps polyclonal anti-CD103, dilution 1 : 50, quartett).

Ensuite, un kit de détection Bond™ Polymer Refine (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, U.K) est utilisé en accord avec les instructions du fabricant.

Sur chaque lame est déposé, pour les immunomarquages anti-PD-L1, un témoin externe contrôle positif (placenta).

L'anticorps E1L3N est celui que nous avons choisi pour des raisons de coût et de faisabilité dans une utilisation de routine dans un laboratoire d'anatomopathologie sans perte de sensibilité de marquage par rapport aux anticorps utilisés dans les essais cliniques.

Pour l'interprétation de l'expression de PD-L1, nous avons décidé, par analogie et en se basant sur les publications, d'utiliser la méthodologie du scoring des CT (figure 62) et des CI (figure 63) élaborée pour l'anticorps SP142 (121).

Figure 66 : scoring de l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales.

<b>CT : score sur les cellules tumorales</b>	
0	: <1%
1	: 1-4%
2	: 5-49%,
3	: >50%

SP142 IHC Assay: TC expression (Images at 10x magnification)

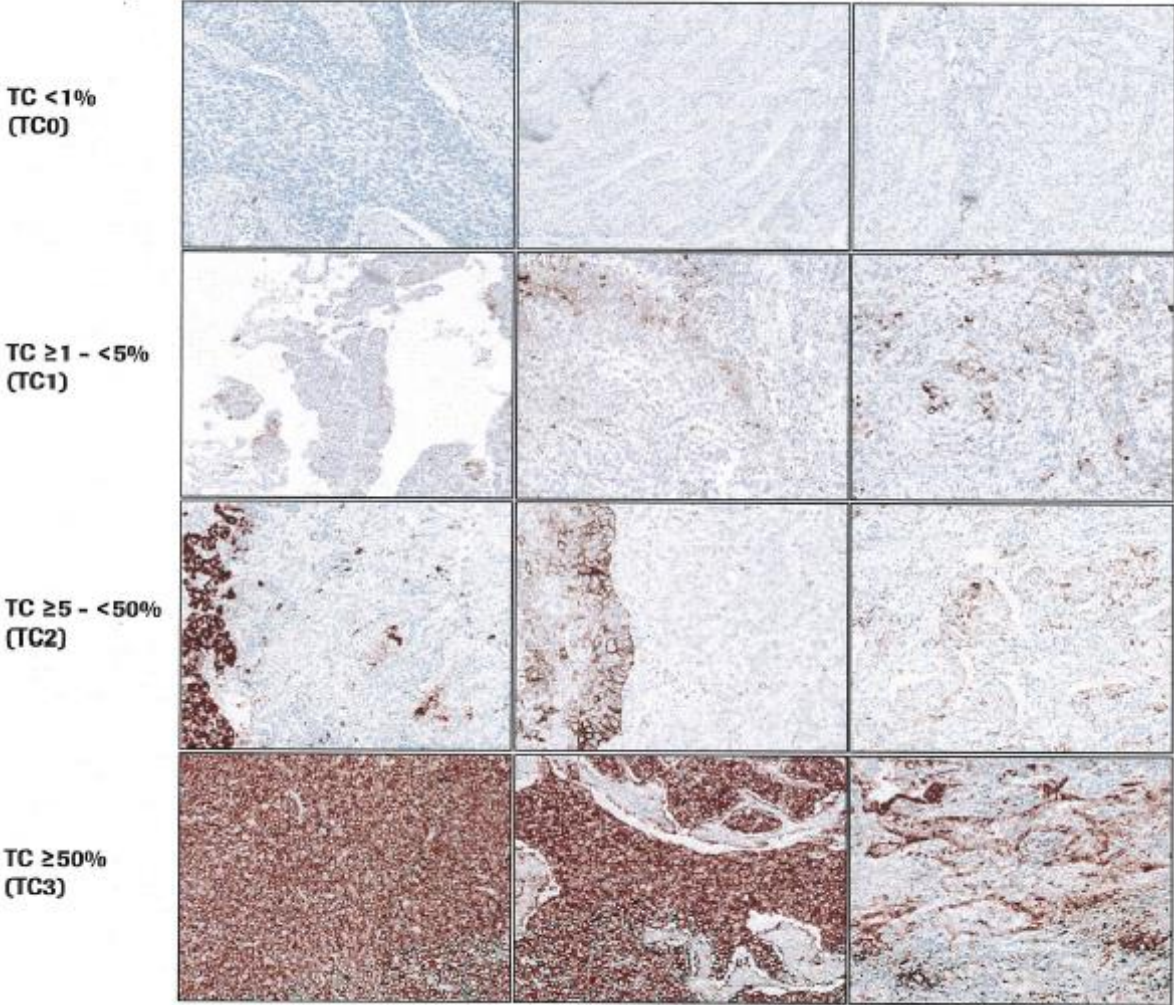


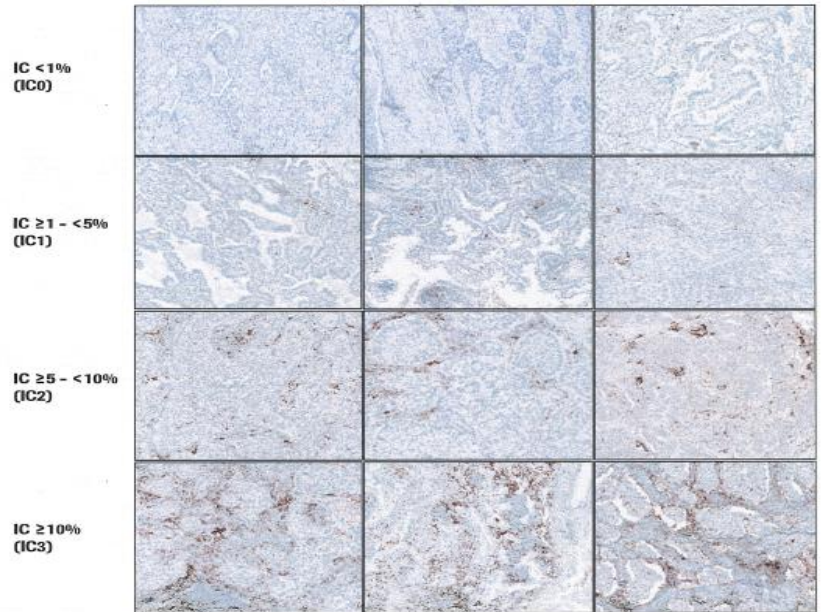
Figure 62: Scoring de l'expression de PD-L1 par les CT. Modèle d'aide au scoring.

D'après Roche Ventana (page 22).

SP142 IHC Assay: IC expression – Aggregates (Images at 10x magnification)

**CI : score sur les cellules immunitaires**

0 : <1%  
 1 : 1-4%  
 2 : 5-9%  
 3 : ≥10%



1015370EN Rev A

PROPRIETARY TO ROCHE TISSUE DIAGNOSTICS

23

SP142 IHC Assay: IC expression – Single cell spread (Images at 10x magnification)

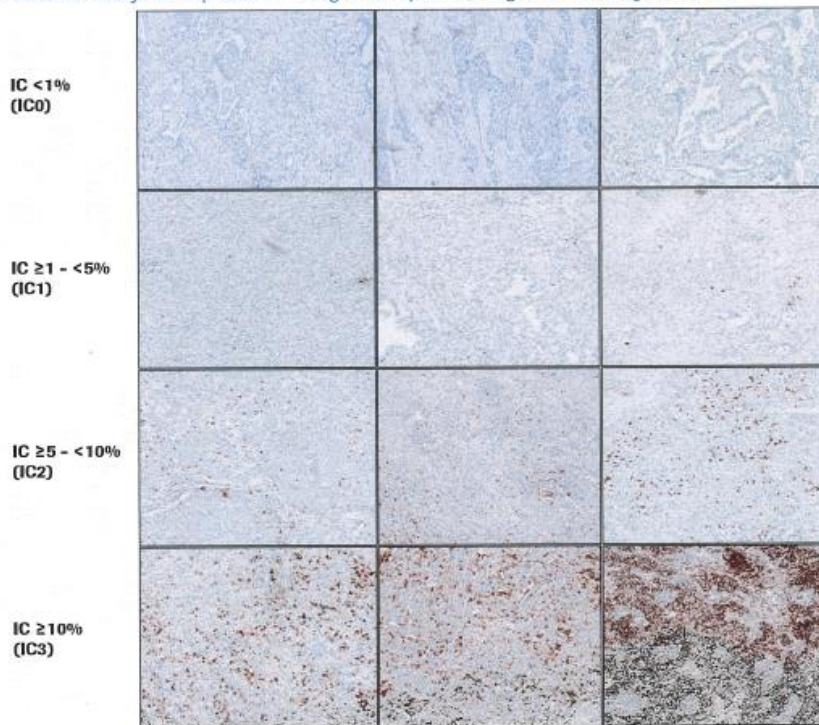


Figure 63 : Scoring de l'expression de PD-L1 par les CI. Modèle d'aide au scoring.

D'après Roche Ventana (pages 23-24).

La présence d'un marquage dit « eyeliner » c'est-à-dire présent sur l'ensemble de la périphérie de la tumeur constitue un score CI2.

Pour l'interprétation de l'expression de CD8 et de CD103, nous avons utilisé le même scoring que celui utilisé pour l'expression de PD-L1 par les CI.

Au vu de la sous-représentation du microenvironnement péri-tumoral sur prélèvement micro-biopsique, nous avons également évalué la présence ou l'absence (oui/non) de cellules immunes intra-tumorales CD103+ (figure 64).

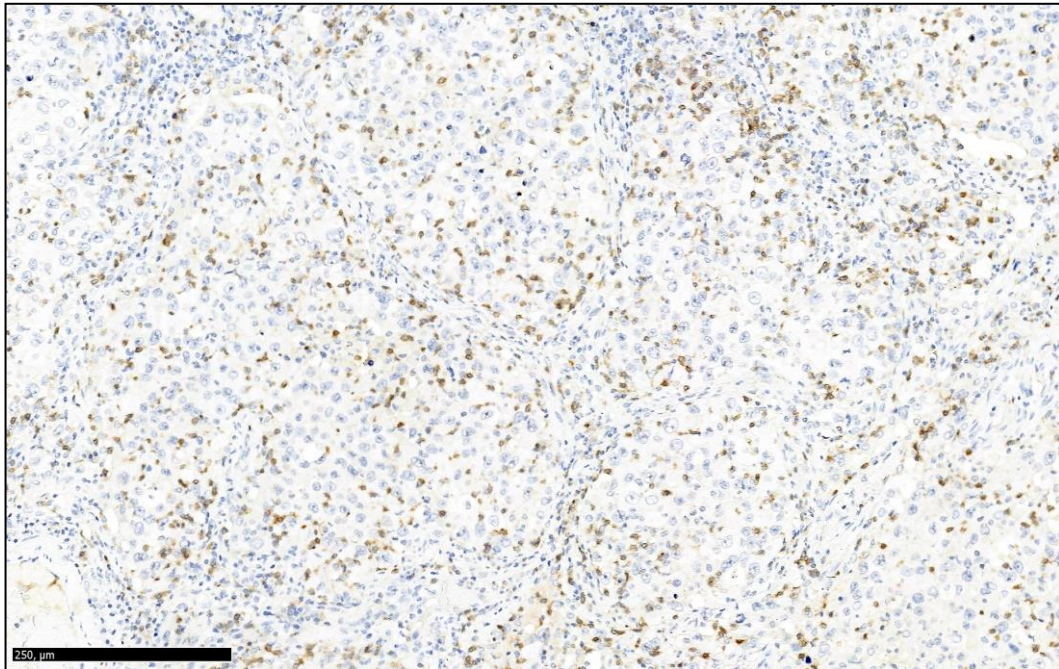


Figure 64 : Expression du CD103 par les cellules immunes intra-tumorales.

Nous avons donc réalisé, sur les 51 patients éligibles à une étude immunohistochimique, une lecture commune de chaque lame en aveugle de la réponse clinique.



## 4. Recueil des données de survie et évaluation de la réponse thérapeutique

---

### 4.1 Recueil des données de survie

Les données cliniques ont été recueillies (avec l'aide du Dr Pierre HELLY DE TAURIERS) de manière rétrospective à l'aide du logiciel Dxcare avec notamment les comptes rendus de RCP, du logiciel CHIMIO ou de l'appel direct du médecin traitant ou du spécialiste. Le calcul de la survie globale s'est basé sur l'intervalle entre la date de début du traitement par nivolumab (date de la première injection) et la date des dernières nouvelles ou du décès. Les données ont pu être retrouvées pour l'ensemble des patients éligibles à l'étude immunohistochimique.

### 4.2 Evaluation de la réponse thérapeutique

Pour chaque patient, le Dr. Pierre HELLY DE TAURIERS a calculé le score RECIST v1.1 (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) afin d'évaluer la réponse thérapeutique au nivolumab.

Ce score consiste à observer, en rétrospectif, sur les scanners (réalisés tous les 2 mois), en fonction du scanner baseline (réalisé dans les 4 semaines précédant la première injection), l'évolution de la taille des lésions cibles mesurables avant et après traitement par nivolumab.

On obtient alors des résultats en terme de :

- Réponse partielle (PR : partial response) : diminution d'au moins 30% de la somme des diamètres des lésions cibles par rapport à la somme initiale des diamètres.
- Progression (PD : progressive disease) : augmentation  $\geq 20\%$  et d'au moins 0,5 cm de la somme des diamètres des lésions cibles par rapport à la plus petite somme des diamètres observés / apparition d'une ou plusieurs nouvelles lésions.
- Stabilisation (SD : stable disease) : ni PR ni PD.

## **5. Analyses statistiques**

---

Les analyses statistiques ont été réalisées, à l'aide du Dr. Sébastien COSSIN (AHU, service Information Médicale, unité IAM, CHU Pellegrin), sur le logiciel R version 3.3.2. Pour l'analyse de survie, des courbes de type Kaplan Meier ont été réalisées avec test du Log Rank et, pour les variables qualitatives, des tests de Fisher ou de Khi2.

## RESULTATS

---

### 1. Caractéristiques descriptives de la population

---

#### 1.1 Caractéristiques cliniques et histologiques

Les caractéristiques des patients sont résumées dans le tableau 2. 71,4% des patients sont de sexe masculin quasiment tous tabagiques soit sevrés soit actifs. L'âge médian est de 64 ans (IC95% 58-68). 70% présentent un adénocarcinome bronchique et 67% sont au stade IV. La plupart des patients n'étaient pas éligibles à une chirurgie (81,4%). Ils ont reçu, majoritairement (98%), une chimiothérapie première à base de sel de platine puis un traitement par nivolumab soit en 2<sup>ème</sup> ligne (54%) soit après la 2<sup>ème</sup> ligne (46%).

Les 19 patients sans statut PD-L1 étaient comparables à la population décrite ci-dessus.

		N=70	Pourcentage %
SEXE	Homme	50	71,4
	Femme	20	28,6
TABAC	Jamais	1	1,4
	Sevré	30	42,9
	Actif	39	55,7
HISTOLOGIE	Adénocarcinome	49	70
	Carcinome épidermoïde	21	30
STADE AU DIAGNOSTIC	IA	1	1,4
	IIA	5	7,1
	IIB	2	2,9
	IIIA	10	14,4
	IIIB	5	7,1
	IV	47	67,1
CHIRURGIE	Oui	13	18,6
	Non	57	81,4
TRAITEMENT ANTERIEUR	Chimiothérapie	69	98
	Traitement de maintenance	34	48,6
	Thérapie ciblée	6	8,6
	Bévacizumab	9	12,9
NIVOLUMAB	En 2 <sup>ème</sup> ligne	38	54
	Après la 2 <sup>ème</sup> ligne	32	46
PERFORMANS STATUS	1	35	50
	2	31	44,3
	3	4	5,7
METASTASE CEREBRALE	Oui	21	30,4

**Tableau 2 : Caractéristiques cliniques, histologiques et thérapeutiques de la population étudiée**

## 1.2 Caractéristiques immunohistochimiques

### 1.2.1 Statut PD-L1 de la population étudiée

	PD-L1<1%	PD-L1 1-4%	PD-L1 5-49%	PD-L1 ≥50%	Statut inconnu
	TC0	TC1	TC2	TC3	
Nombre de patient (N=70)	29	2	12	8	19
Pourcentage (%)	41,4	2,9	17,1	11,4	27,2

Tableau 3 : Statut PD-L1 des CT dans la population étudiée.

Dans notre étude, nous avons choisi de regrouper les cas TC1 et TC2 pour des soucis de petits effectifs et de précision statistique. Les seuils de ce regroupement, soit 1% et 50%, correspondant aux seuils étudiés dans la littérature.

Concernant les CT, une majorité de patients (43 cas, 84,3%) ont un statut PD-L1 < 50% et seulement 8 cas (15,7%) ≥ 50%.

Concernant les CI, la majeure partie des patients était PD-L1 négatif (43 patients, 84,3%). Les rares patients présentant une expression de PD-L1 par les CI l'exprimaient seulement entre 1 et 4%.

### 1.2.2 Statut CD8 de la population étudiée

	CD8<1%	CD8 1-4%	CD8 5-9%	CD8≥10%	Statut inconnu
	CI0	CI1	CI2	CI3	
Nombre de patient (N=70)	12	6	13	16	21
Pourcentage	17,1	8,6	18,6	22,9	32,8

Tableau 4 : Répartition du statut CD8 des CI intra-tumorales dans la population étudiée.

2 patients sont exclus pour cause de matériel biopsique épuisé pour la réalisation des études immunohistochimiques de CD8 et CD103.

### 1.2.3 Statut CD103 de la population étudiée

	CD103<1%	CD103 1-4%	CD103 5-9%	CD103≥10%	Statut inconnu
Nombre de patient (N=70)	27	15	6	1	21
Pourcentage	35,7	21,5	8,6	1,4	32,8

Tableau 5 : Répartition du statut CD103 des CI intra-tumorales dans la population étudiée.

Afin d'éviter la présence de sous-groupes de faible effectif gênant une analyse statistique cohérente, deux groupes de patients sont formés en fonction de la présence ou non (oui/non) de CI intra-tumorales exprimant CD103. Ainsi, 20 patients (40,8%) présentaient des CI intra-tumorales CD103+.

## 2. Les réponses selon RECIST v 1.1

---

	Nombre de patient	Pourcentage
PD : progressive disease	33	47,1
SD : stable disease	18	25,7
PR : partial response	19	27,1

Tableau 6 : Réponse RECIST dans la population étudiée.

Les 19 patients sans statut PD-L1 présentaient la répartition suivante en ce qui concerne la réponse thérapeutique : 31,5% de PR, 31,5% de SD et 36,9% de PD.

### 3. Survie globale et données immunohistochimiques

---

Pour l'ensemble des 70 patients, la médiane de suivi à partir du diagnostic est de 21,8 mois (étendue : 17,3-25,9). La médiane de suivi à partir de l'instauration du traitement par nivolumab est de 10,5 mois (étendue : 3,5-15). La médiane de survie à partir de l'initiation de l'immunothérapie est de 10,6 mois (IC95% 6,7-) (figure 65).

Sur les 70 patients analysés, 37 (52,9%) sont décédés dont 9 parmi les cas non éligibles à une étude immunohistochimique.

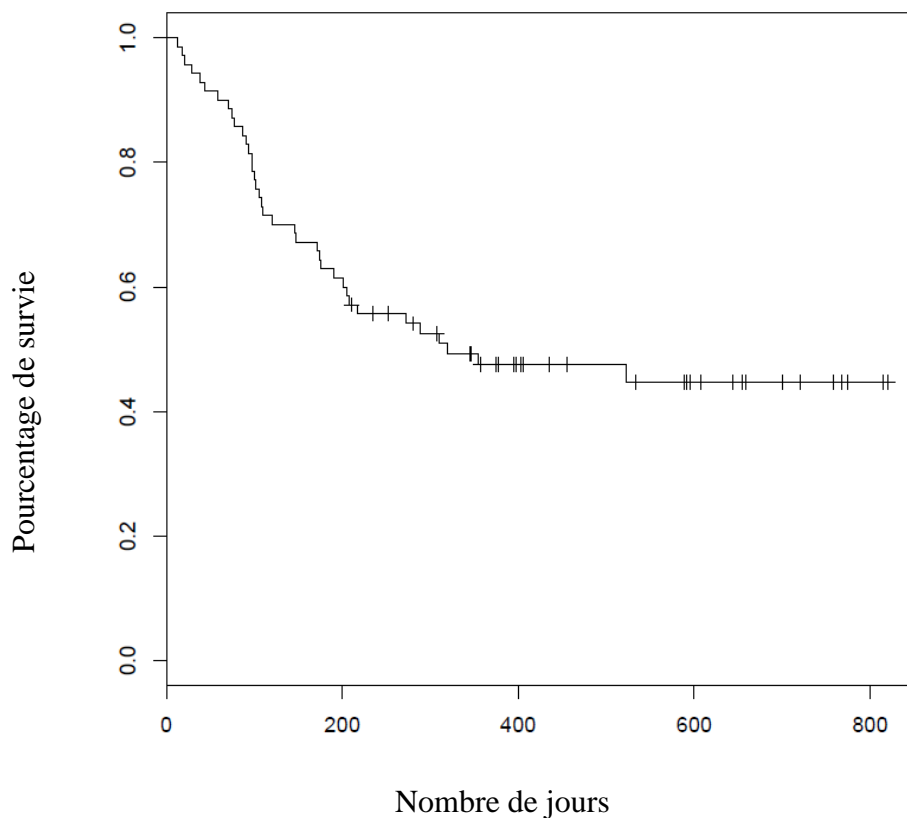


Figure 65 : Survie globale de la population étudiée.



### 3.1 Survie globale en fonction du statut PD-L1 des CT

Il n'existe pas de différence de survie globale statistiquement significative entre les différents groupes d'expression de PD-L1 par les CT avec un test du log-rank retrouvant un  $p=0,2$  (figure 66).

La médiane de survie est de 9 mois pour le groupe CT0 et de 6 mois pour le groupe CT1-2. La médiane n'est pas franchie pour le groupe de statut PD-L1  $\geq 50\%$  (CT3).

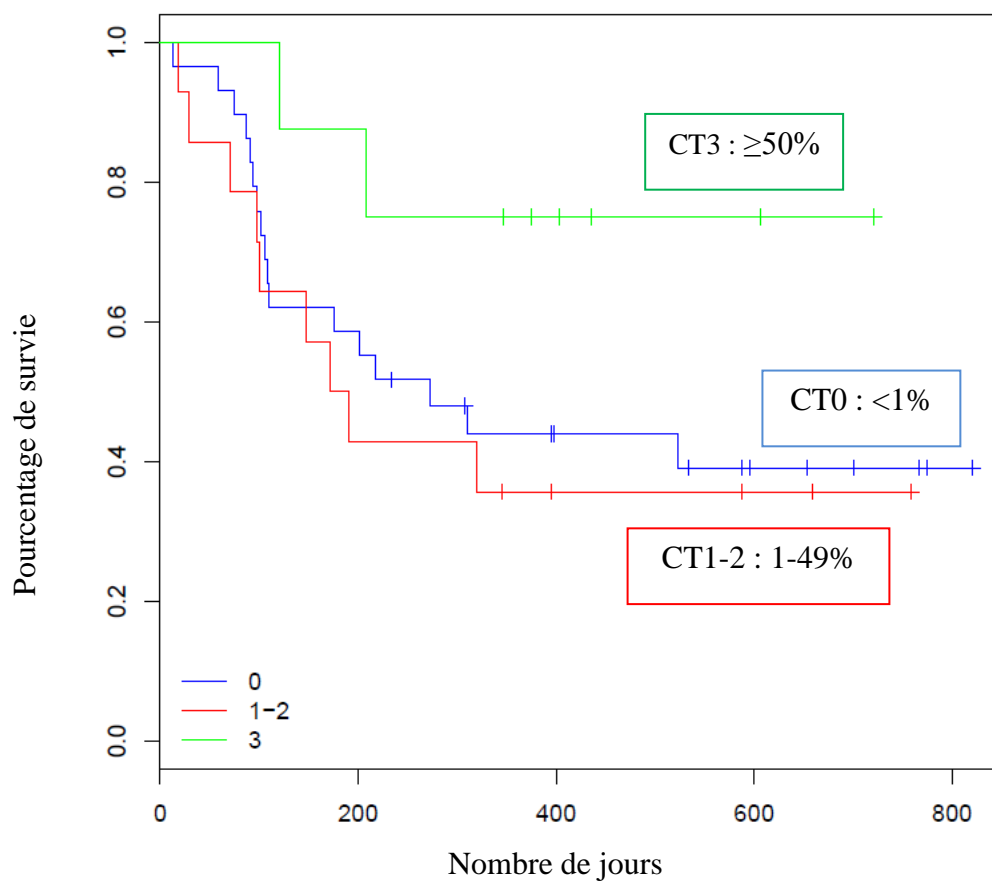


Figure 66 : Survie globale des patients en fonction du statut PD-L1 des CT (p=0,2).

Nous avons également évalué la survie globale en fonction de la présence de plus ou moins 50% de CT exprimant PD-L1. Nous n'observons pas de différence statistiquement significative ( $p=0,0854$ ) (figure 67).

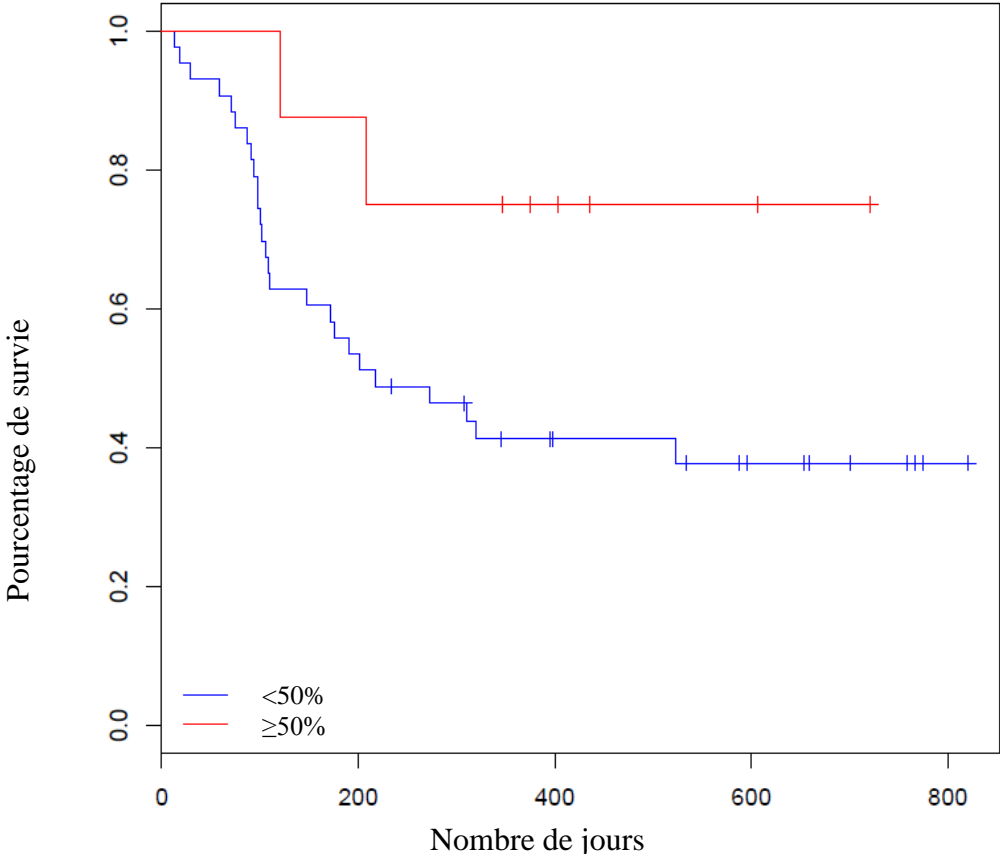


Figure 67 : Survie globale en fonction du statut PD-L1 des CT ( $p=0,0854$ ).

### 3.2 Survie globale en fonction du statut PD-L1 des CI

Il n'existe pas de différence de survie globale statistiquement significative entre les patients dont les CI exprimant PD-L1 sont <1% et ceux entre 1 et 4% ( $p=0,662$ ) (figure 68).

La médiane de survie est de 7 mois pour le groupe CI0 et de 17 mois pour le groupe CI1.

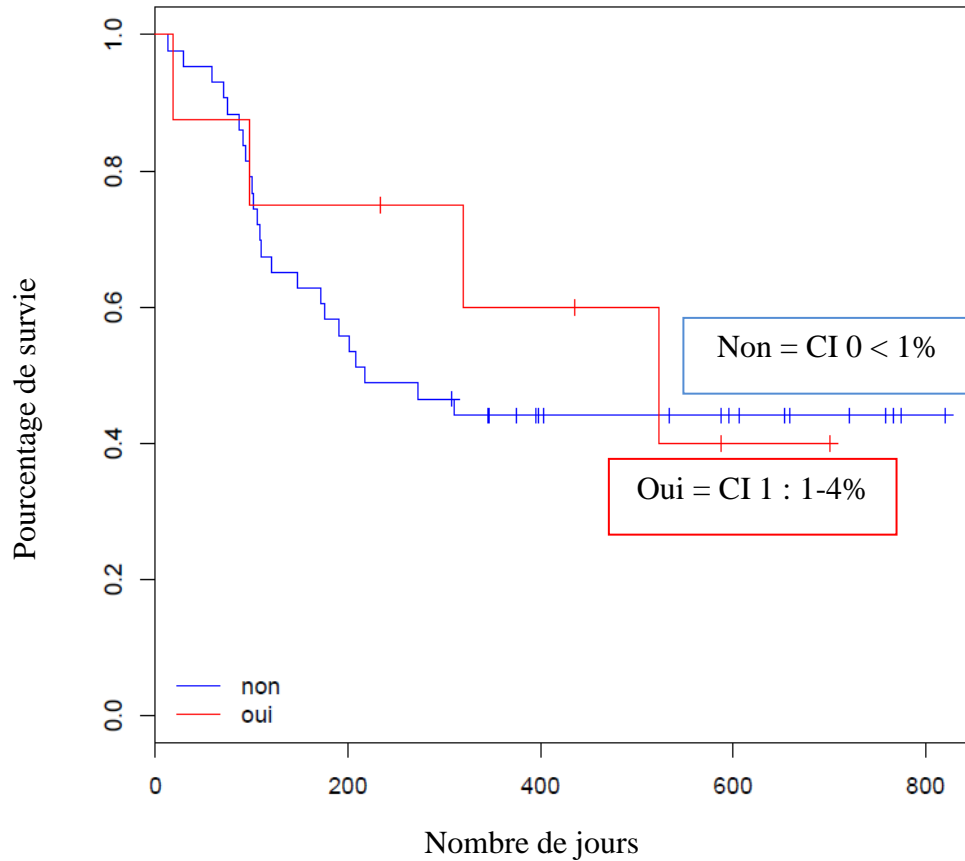


Figure 68 : Survie globale en fonction du statut PD-L1 des CI ( $p= 0,662$ ).

### 3.3 Survie globale en fonction du statut CD8 des CI intra-tumorales

Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les différents sous-groupes de statut CD8 ( $p=0,498$ ) (figure 69).

Les médianes de survie sont de 5, 9, 6 et 17 mois respectivement pour les groupes d'expression 1, 2, 3 et 4.

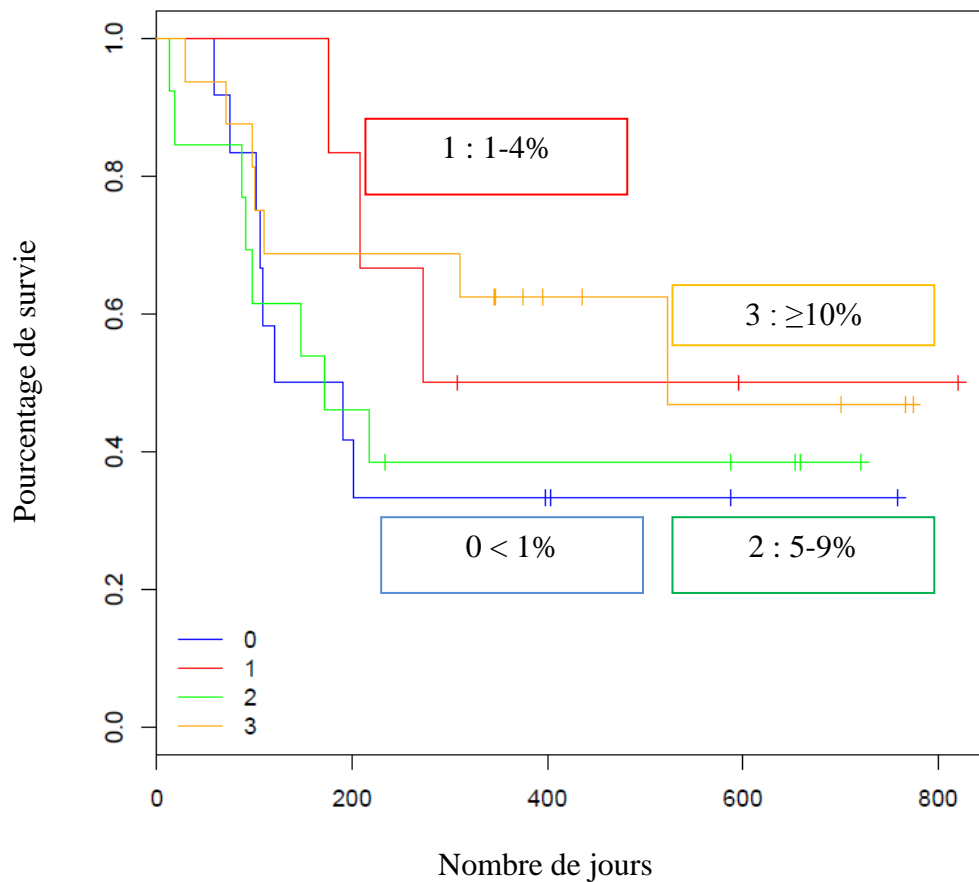


Figure 69 : Survie globale en fonction du statut CD8 des CI intra-tumorales ( $p=0,498$ ).

### 3.4 Survie globale en fonction du statut CD103 des CI intra-tumorales

La différence de survie globale observée n'est pas statistiquement significative entre les tumeurs présentant ou non des CI intra-tumorales CD103+ ( $p=0,336$ ) (figure 70). La médiane de survie du groupe sans CI intra-tumorales CD103+ est de 7 mois tandis qu'elle n'est pas franchie pour le groupe avec.

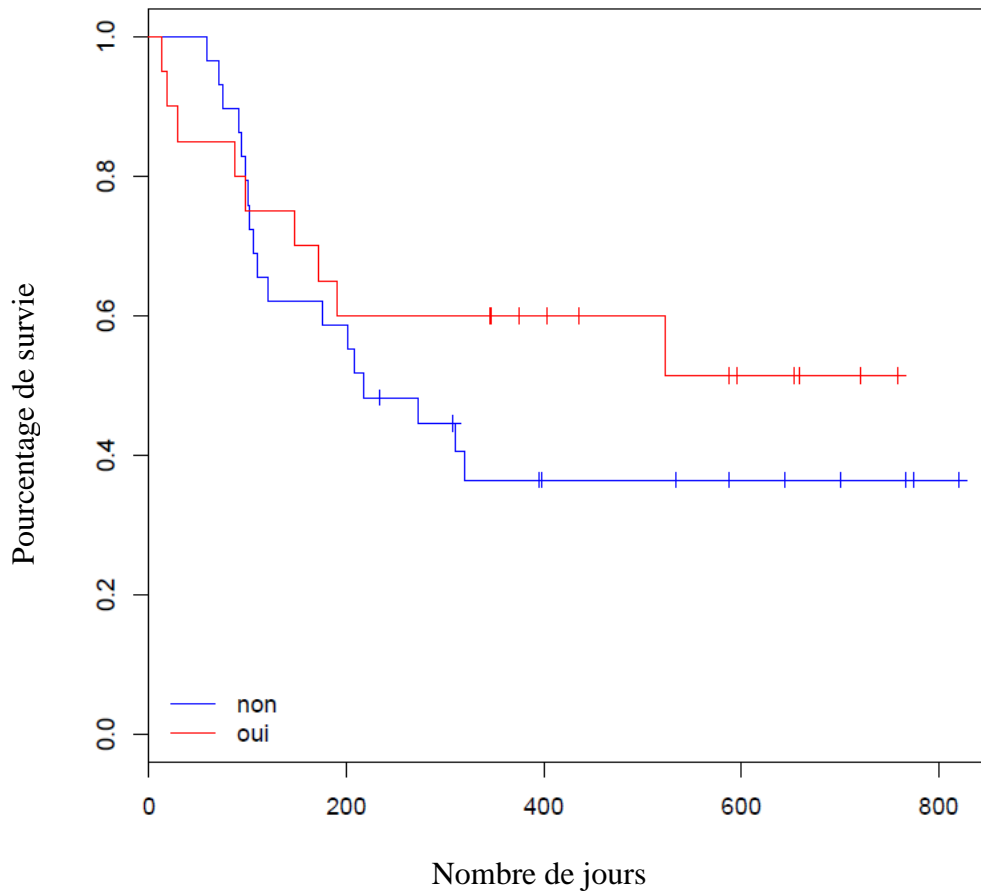


Figure 70 : Survie globale en fonction de la présence ou non (oui/non) de CI intra-tumorales CD103+ ( $p=0,336$ ).

## 4. Taux de réponse selon RECIST v1.1 et données immunohistochimiques

### 4.1 Taux de réponse et statut PD-L1 des CT

88 % des patients présentant un statut PD-L1 supérieur ou égal à 50% ont une maladie stable ou une réponse thérapeutique partielle contre 48 % lorsque le statut est inférieur à 1% et 36% lorsque le statut est entre 1% et 49%. Les patients de statut inconnu présentaient une réponse partielle ou complète dans 31,5% des cas (figure 71).

Il n'existe pas de différence statistiquement significative ( $p=0,069$ ). Cependant, dans le groupe CT3, la proportion de patients en SD ou PR selon RECIST est nettement supérieure (88%) à ce qui était attendu.

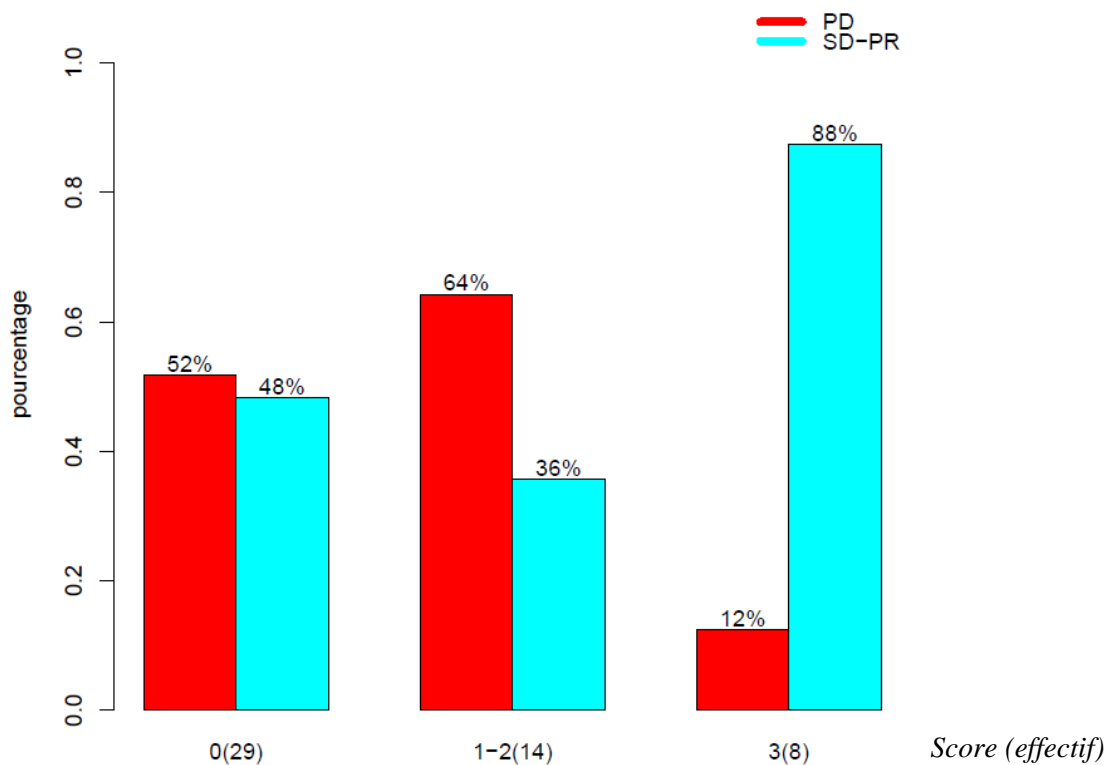


Figure 71 : Réponse RECIST en fonction de l'expression de PD-L1 par les CT ( $p=0,069$ ).

CT : score sur les cellules tumorales : 0 : <1% ; 1-2 : 1-49% ; 3 :  $\geq 50\%$ .

SD : Stable disease PD : Progressive disease PR : Partial Response.

### 4.2 Taux de réponse et statut PD-L1 des CI intra-tumorales

Aucune différence de réponse thérapeutique n'a été observée en fonction de la présence de CI exprimant PD-L1 avec un  $p=1$  (annexe 2).

### 4.3 Taux de réponse et statut CD8 et CD103 des CI intra-tumorales

Aucune différence de réponse thérapeutique, statistiquement significative, n'a été mise en évidence en fonction du statut CD8 ( $p=0,071$ ) ou CD103 des CI intra-tumorales ( $p=0,296$ ) (figures 72 et 73).

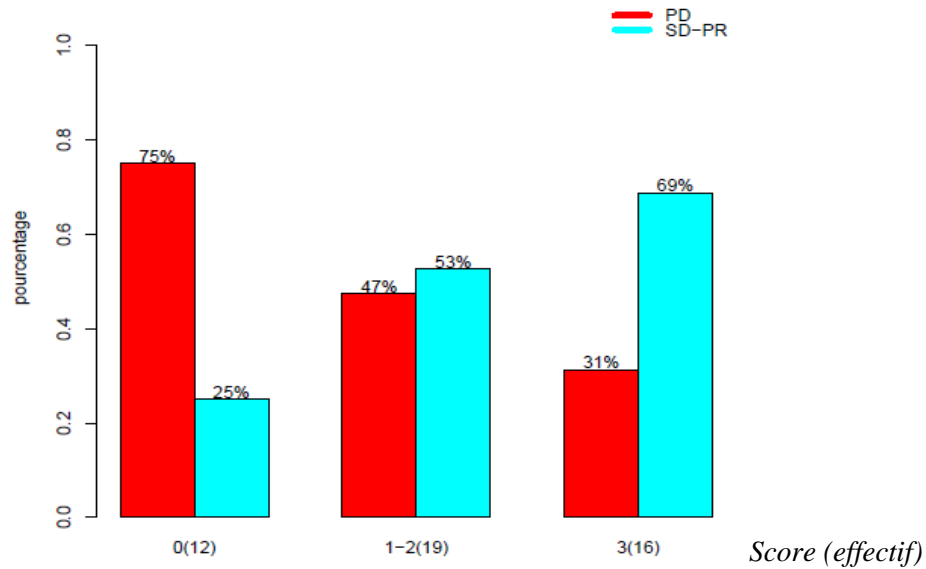


Figure 72 : Réponse RECIST en fonction du statut CD8 des CI intra-tumorales ( $p=0,071$ ).

0 < 1% ; 1 : 1- 4% ; 2 : 5-9% ; 3  $\geq$  10%.

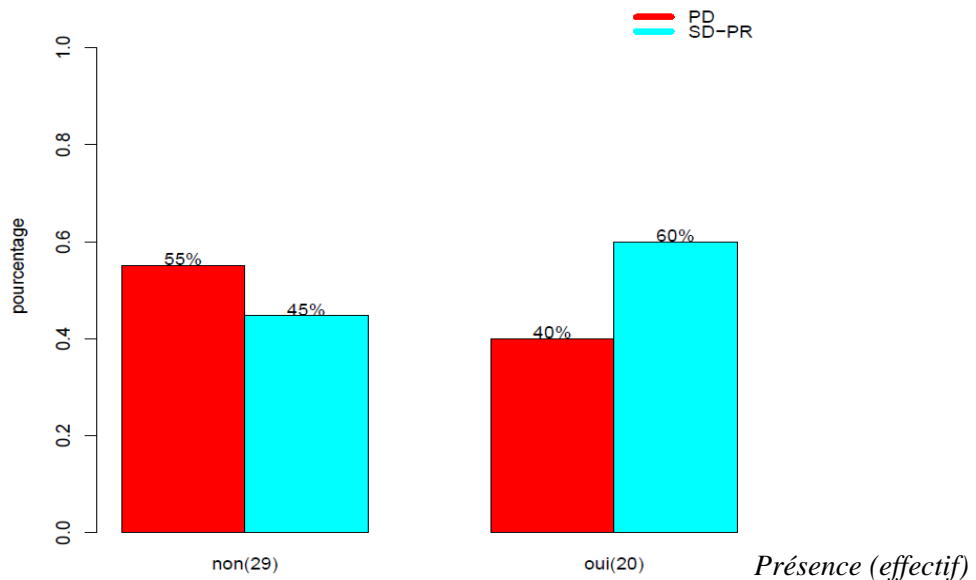


Figure 73 : Réponse RECIST en fonction de la présence ou non (oui/non) de CI intra-tumorales CD103+ ( $p=0,296$ ).

## 5. Taux de réponse et lymphocytose

---

Le taux normal de lymphocytes sanguins est décrit comme supérieur à 1000/mm<sup>3</sup> et inférieur à 4000/mm<sup>3</sup> selon le collège des enseignants d'hématologie (122). Aucun de nos patients ne présentait d'hyperlymphocytose et 16 de nos patients présentaient une lymphopénie (<1000/mm<sup>3</sup>).

Nous n'avons pas montré de différence de taux de réponse, statistiquement significative, en fonction de la présence ou non d'une lymphopénie (p=0,885) (annexe 3).



## 6. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et CI et l'expression de CD103 par les CI intra-tumorales

---

L'expression de PD-L1 ainsi que l'étude du microenvironnement tumoral sont deux axes dans la recherche de biomarqueurs prédictifs à la réponse aux immunothérapies anti-PD-1/PD-L1. Nous recherchons ici le lien entre ces deux axes et leurs avantages.

Il existe une relation statistiquement significative entre la présence de CI CD103+ intra-tumorales et l'expression de PD-L1 par les CT ( $p < 0,001$ ) (figure 74).

Afin d'éviter la présence de sous-groupes de faible effectif gênant une analyse statistique cohérente et la difficulté à mettre en évidence une proportionnalité, seulement deux groupes de patients sont comparés en fonction de la présence ou non (oui/non) de CT PD-L1+ et de CI intra-tumorales CD103+ (figure 75).

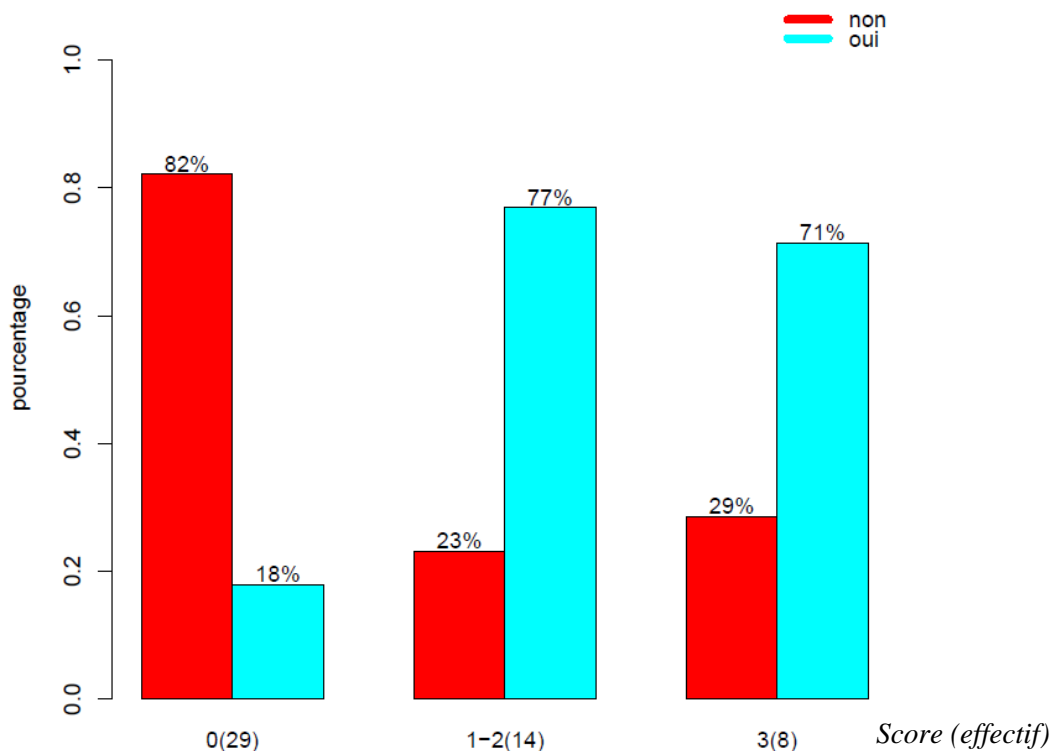
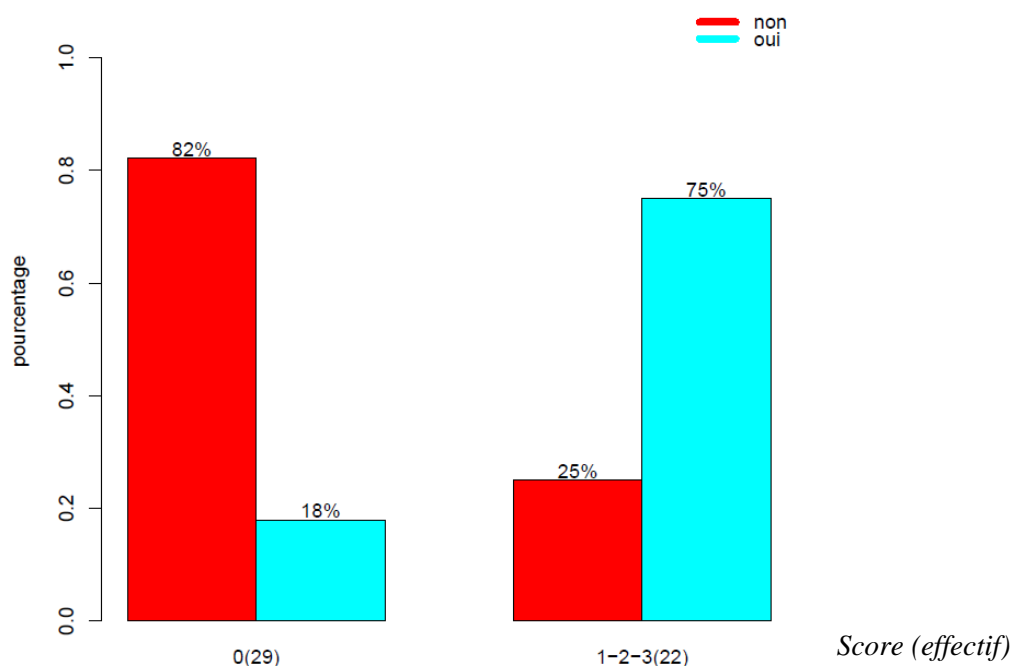


Figure 74 : Présence de CI CD103+ intra-tumorales (oui/non) en fonction du statut PD-L1 des CT.

*CT : score sur les cellules tumorales : 0 : <1% ; 1-2 : 1-49% ; 3 : ≥50%.*



**Figure 75 :** Présence de CI intra-tumorales CD103+ (oui/non) en fonction de la présence d'une expression de PD-L1 ( $\geq 1\%$ ) par les CT.

*CT : score sur les cellules tumorales : 0 :  $< 1\%$  ; 1-2-3 :  $\geq 1\%$ .*

Il existe ainsi une relation entre la présence de CT PD-L1+ ( $\geq 1\%$ ) et la présence de CI intra-tumorales CD103+ ( $p < 0,001$ ) (figure 75).

Cependant, il n'existe pas de relation statistiquement significative entre l'expression de PD-L1 par les CI et l'expression de CD103 par les CI intra-tumorales ( $p = 0,251$ ) (annexe 4).

## **7. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et l'expression de CD8 par les CI intra-tumorales**

---

Aucune relation statistiquement significative ( $p = 0,454$ ) n'a été mise en évidence entre l'expression de PD-L1 par les CT et la présence d'une population de CI intra-tumorales CD8+ (annexe 5).

## **8. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et l'apparition d'effets secondaires sous immunothérapie**

---

Dans notre étude, seulement 5 patients soit 7,1% ont présenté des effets secondaires de grade 3 (*sévère ou médicalement significatif mais sans mise en jeu immédiate du pronostic vital ; indication d'hospitalisation ou de prolongation d'hospitalisation ; invalidant ; interférant avec les activités élémentaires de la vie quotidienne*) dont trois hépatiques et une pneumopathie interstitielle.

Pour 4 de ces patients, la toxicité est survenue avant la 6<sup>ème</sup> cure de nivolumab et a abouti à l'arrêt du traitement.

Nous n'avons pas mis en évidence de relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et la survenue d'effets secondaires sous nivolumab ( $p=0,801$ ) (annexe 6).

## **PARTIE II**

---

## MATERIEL ET METHODES

---

### 1. Sélection initiale des cas

---

La sélection des cas a été faite de façon unicentrique et rétrospective (service d'Anatomopathologie, hôpital Haut-Lévêque). Nous avons recueilli les patients enregistrés dans le logiciel DIAMIC de l'année 2001 à l'année 2017 avec une répartition homogène du nombre de cas dans chaque sous-type histologique (acineux, lépidique, mucineux, papillaire et micropapillaire) et l'existence d'une analyse moléculaire.

### 2. Recueil des prélèvements et des données histologiques

---

Les lames HES et blocs d'inclusion ont été recueillis au sein des archives du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'hôpital Haut-Lévêque et au sein des archives centralisées chez Everial pour les cas antérieurs à 2008.

Notre travail a débuté par la relecture des lames HES afin de confirmer le sous-type histologique et, lorsque cela était nécessaire, de reclasser la tumeur (figure 38) en fonction de la nouvelle classification de l'OMS « *Lung, Pleura, Thymus and Heart* » 2015 (123). Nous avons ainsi pu sélectionner le bloc tumoral de référence des différents cas.

Nous avons sélectionné uniquement des formes histologiques pures afin d'exclure les formes mixtes associant plusieurs contingents.

Nous avons dû reclasser certaines tumeurs notamment dans la différenciation adénocarcinome lépidique versus acineux (4 cas), papillaire versus micro-papillaire (2 cas) et lépidique versus papillaire (1 cas) (figure 76).

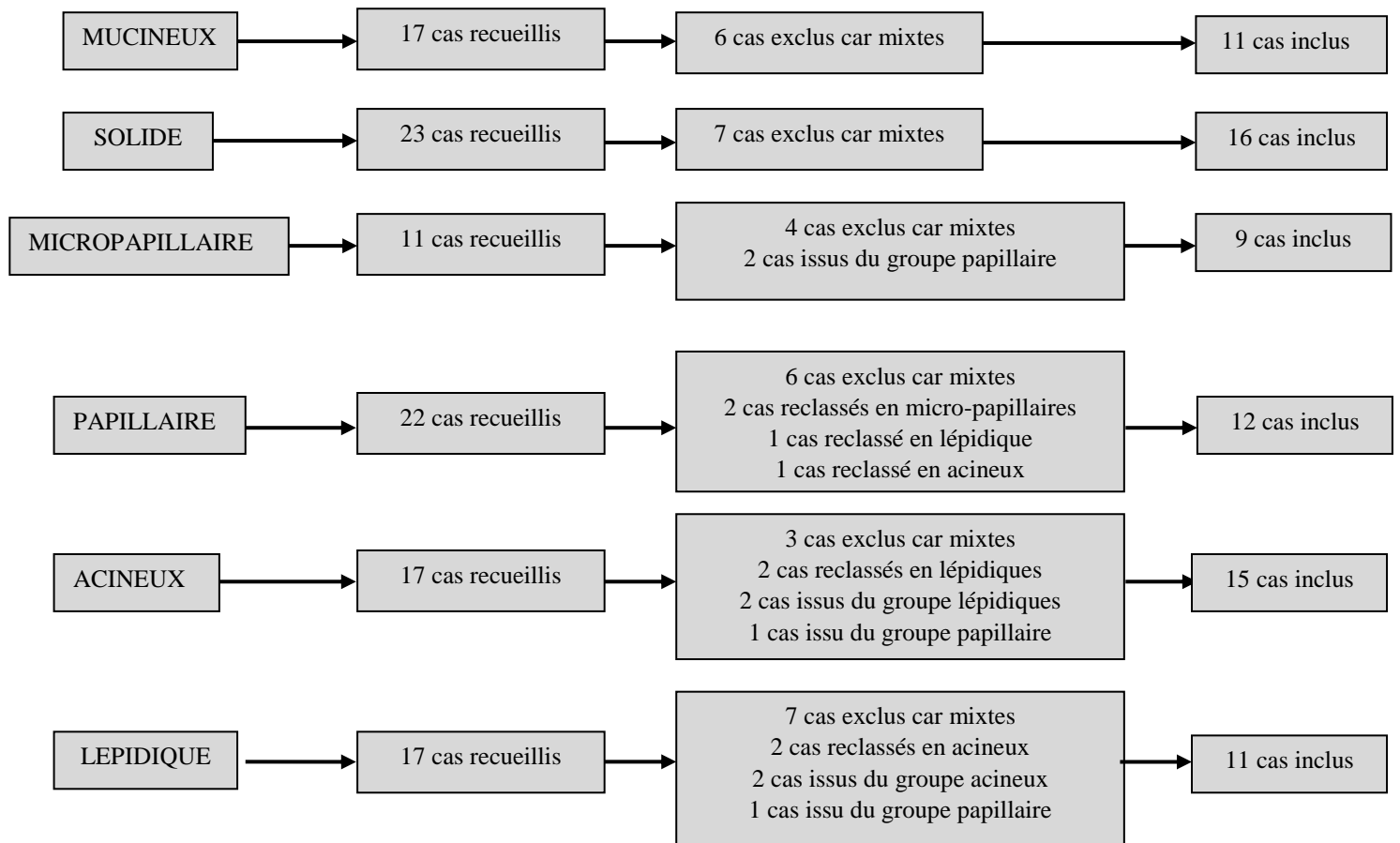


Figure 76 : Sélection histologique des cas.

Nous avons sélectionné cinq critères macroscopiques ou microscopiques pronostiques :

- la taille tumorale ;
- le compte mitotique sur 10 champs à fort grossissement x400 ; nous avons décidé, pour une bonne répartition et une faisabilité des tests statistiques, de créer deux groupes de patients :  
 $\leq 5$  mitoses et  $> 5$  mitoses / 10 FG.
- la présence ou non de nécrose tumorale ;
- la présence de TILs et leur densité avec le mode de grading décrit sur la figure 77 ;
- la classification pTNM.

Nous avons, au total, inclus 74 patients dans notre cohorte d'étude.

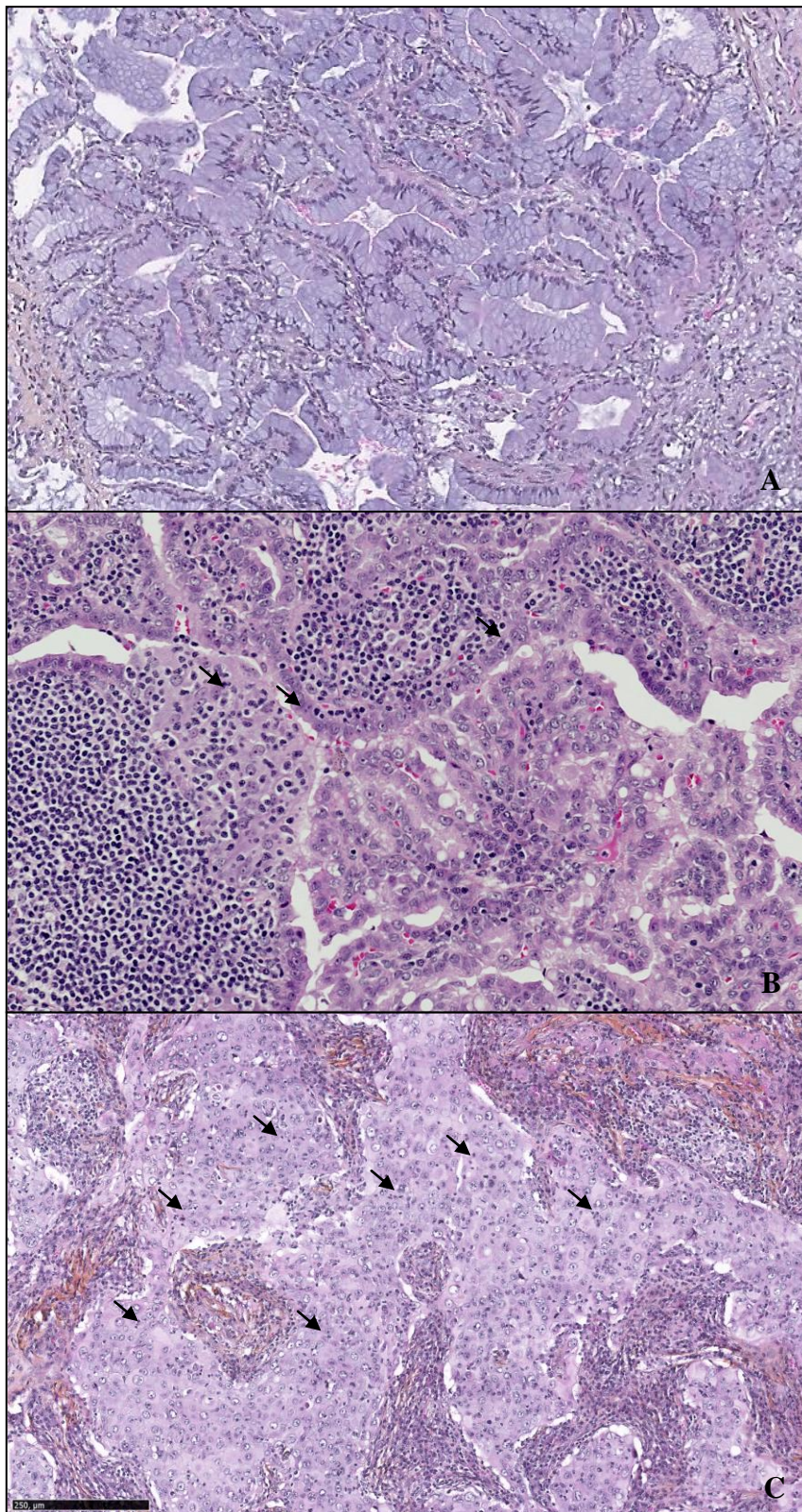


Figure 77 : Grading de l'intensité des TILs.

0 : absent ;

1 : léger : faible ou absent au grossissement x20 (A) ;

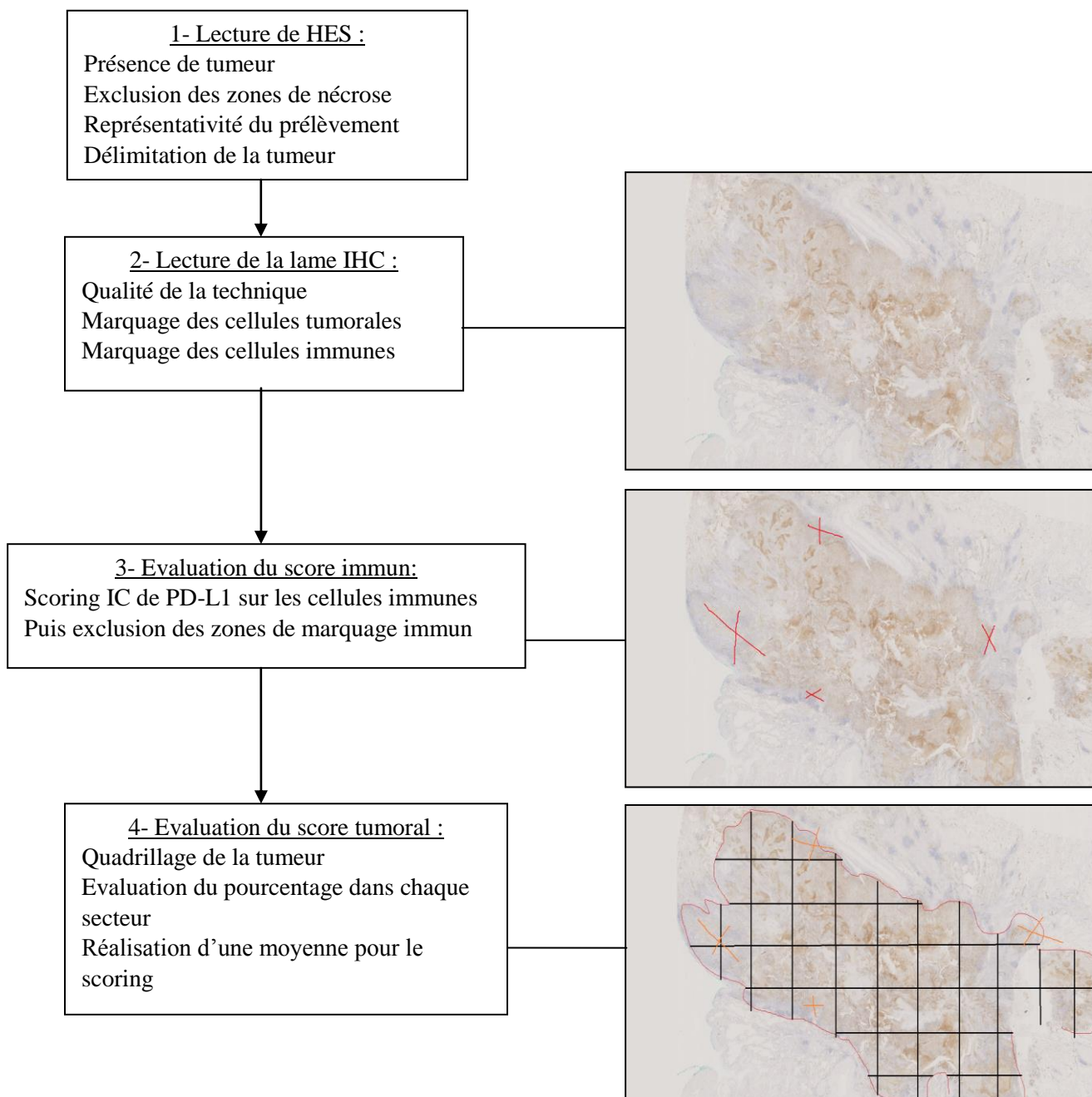
2 : modéré : présent au x20 (B) ;

3 : intense : présent au x10 (C).

### 3. Etude immunohistochimique

Les analyses immunohistochimiques réalisées avec les anticorps anti-PD-L1 E1L3N, anti-CD103 et anti-CD8 sont techniquement similaires à celles de notre 1<sup>ère</sup> partie où elles ont été détaillées. Nous détaillerons ici la méthode, proposée par *Roche Ventana* avec le clone SP142, que nous avons utilisée pour déterminer le pourcentage de cellules tumorales PD-L1+ sur pièce opératoire.

**Figure 78 :** Méthode d'évaluation du pourcentage de cellules PD-L1+ sur pièce opératoire.





#### 4. Recueil des données cliniques et de survie

---

Les données cliniques ont été recueillies, avec l'aide du D. Pierre HELLY DE TAURIERS, au sein du logiciel Dxcare mais également avec l'appel direct des médecins spécialistes référents ou traitants. Nous avons, notamment, recueillis la date des dernières nouvelles ou du décès du patient le cas échéant et la date de rechute. Seulement 3 patients sont décédés dans notre cohorte. Ceci ne nous a pas permis d'étudier la survie globale par manque d'événements. Nous avons ainsi évalué la survie sans progression de nos patients en définissant la rechute comme la récurrence de la tumeur primitive ou l'apparition d'une localisation secondaire.

#### 5. Recueil des données théranostiques et moléculaires

---

Pour l'ensemble de nos cas, nous avons recueilli les résultats dans le logiciel DIAMIC c'est-à-dire :

- l'étude de l'expression immunohistochimique des protéines ALK et ROS ;
- la recherche par NGS, depuis 2015, de mutations ciblables sur le panel de gènes *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *KRAS*, *MET*, *PIK3CA*. La technique utilisée est un Séquençage Haut Débit Torrent<sup>TM</sup> Ion S5, kit Ion Ampliseq custom. L'interprétation des résultats a été faite à l'aide des logiciels Torrent suite (Life technologie) et Alamut (Interactive Bio-Software). Le seuil de détection théorique des allèles mutés était de 5%. Les ADN utilisés dans ces techniques sont extraits à l'aide du Maxwell RSC DNA FFPE kit (Promega). Pour les cas antérieurs, les mutations *KRAS* étaient recherchées par technique HRM et les mutations *EGFR* par Séquençage Sanger.

#### 6. Analyses statistiques

---

Les analyses statistiques ont été réalisées, à l'aide du Dr. Sébastien COSSIN (AHU, service Information Médicale, unité IAM, CHU Pellegrin), sur le logiciel R version 3.3.2. Pour l'analyse de survie, des courbes de type Kaplan Meier ont été réalisées avec test du Log Rank et, pour les variables qualitatives, des tests de Fisher ou de Khi2.

## RESULTATS

---

### 1. Caractéristiques descriptives de la population

---

#### 1.1 Caractéristiques cliniques

Les caractéristiques cliniques des patients sont résumées dans le tableau 7.

Nous avons une répartition assez homogène de femmes et d'hommes soit 47,3% contre 52,7% avec un âge moyen de 67 ans (étendue : 43-80). La majeure partie des patients est tabagique (78,4%). Dans 26% des cas, des métastases sont présentes au diagnostic ou lors de récurrence. L'ensemble des patients a été traité par chirurgie. 29,2% des patients ont bénéficié d'un traitement adjuvant de type radiothérapie et/ou chimiothérapie. 31,1% des patients ont récidivé et 3 sont décédés.

		N=74	Pourcentage %
SEXE	Homme	35	47,3
	Femme	39	52,7
TABAC	Oui	58	78,4
	Non	16	21,6
STADE AU DIAGNOSTIC	IA	10	13,5
	IB	23	31
	IIA	7	9,5
	IIB	15	20,3
	IIIA	16	21,6
	IV	3	4,1
TRAITEMENT ADJUVANT	Oui	23	29,2
	Non	49	68,1
	Ne sais pas	2	2,7
METASTASE	Oui	19	26
	Non	55	74
RECIDIVE	Oui	23	31,1
	Non	51	68,9
DECES	Oui	3	4
	Non	71	96

Tableau 7 : Caractéristiques cliniques des patients inclus.

## 1.2 Caractéristiques histopathologiques

Sur l'ensemble de nos cas, les caractéristiques histopronostiques que nous avons recueillies sont résumées dans le tableau 8.

La taille moyenne des tumeurs était de 43,5 mm (étendue : 8-180) avec une médiane à 35 mm. Le nombre moyen de mitoses était de 9,6/10 champs à fort grossissement (étendue : 0-90) avec une médiane à 2.

		N=74	Pourcentage
SOUS-TYPE D'ADENOCARCINOME	Lépidique	11	14,9
	Acineux	15	20,3
	Solide	16	21,6
	Mucineux	11	14,9
	Papillaire	12	16,3
	Micropapillaire	9	12,3
NECROSE TUMORALE	Oui	29	39,2
	Non	45	60,8
INTENSITE TILs	0	0	0
	1	25	33,8
	2	44	59,5
	3	5	6,7
COMPTE MITOTIQUE sur 10 champs à FG	≤5	27	36,5
	>5	47	63,5

**Tableau 8** : Bilan des caractéristiques histopronostiques recueillies sur les lames colorées par HES des tumeurs.

### 1.3 Caractéristiques immunohistochimiques

Dans la majorité de nos cas (82,4%), les cellules tumorales exprimaient TTF1.

Les données concernant la répartition des résultats immunohistochimiques dans notre population sont résumées dans le tableau 9.

		N=74	Pourcentage
TTF1	Positif	61	82,4
	Négatif	13	17,6
PD-L1 sur les CT	CT 0	52	70,3
	CT 1	4	5,3
	CT 2	11	14,9
	CT 3	7	9,5
PD-L1 sur les CI	CI 0	41	55,4
	CI 1	30	40,5
	CI 2	3	4,1
	CI 3	0	0
CD8	0	3	4,1
	1	39	52,7
	2	25	33,8
	3	7	9,4
CD103	0	24	32,5
	1	34	45,9
	2	14	18,9
	3	2	2,7
CI intra-tumorales CD103+	Oui	21	28,4
	Non	53	71,6

Tableau 9 : Caractéristiques immunohistochimiques de la population étudiée.

*CT : score sur les cellules tumorales : 0 : <1% ; 1 : 1-4% ; 2 : 5-49% ; 3 : ≥50%.*

*Score CI, CD8 et CD103 : 0<1% ; 1 : 1-4% ; 2 : 5-9% ; 3 : ≥10%.*

## 1.4 Caractéristiques moléculaires

45% des patients présentaient une mutation : 17,6% de cas mutés *EGFR* et 39,2% de cas mutés *KRAS* (tableau 10).

		N=74	Pourcentage
Mutation	Oui	45	60,8
	Non	29	39,2
<i>EGFR</i> muté	Oui	13	17,6
	Non	61	82,4
<i>KRAS</i> Muté	Oui	29	39,2
	Non	45	60,8

Tableau 10 : Caractéristiques moléculaires des patients inclus.

Sur l'ensemble de nos 74 patients, aucun ne présentait de réarrangement d'*ALK* ou de *ROS1*.

Les mutations d'*EGFR* mises en évidence étaient les suivantes :

*Mutations sensibles aux TKI :*

- 4 mutations protéiques L858R dans l'exon 21;
- 2 mutations protéiques p.G746\_A750del dans l'exon 19 ;
- 2 mutations protéiques p.L747\_T751delinsP ;
- 1 mutation protéique L833V ;
- 1 mutation protéique p.A750\_I759delinsPT.

*Mutations de moindre sensibilité au TKI de première génération :*

- 1 mutation protéique T790M ;
- 1 mutation protéique p.S768\_D770dup ;
- 1 mutation protéique p.H773\_V774insAV.

Les mutations de *KRAS*, retrouvées dans nos cas, intéressaient essentiellement, sur l'exon 2, les codons 12 et 13 abritant des mutations de résistance aux anti-EGFR.

## 2. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et les critères histopronostiques des adénocarcinomes

Il existe une plus forte et fréquente expression de PD-L1 par les CT dans le sous-type solide d'adénocarcinome ( $p < 0,001$ ) (figure 79). Inversement, aucun des adénocarcinomes mucineux inclus n'exprimait PD-L1.

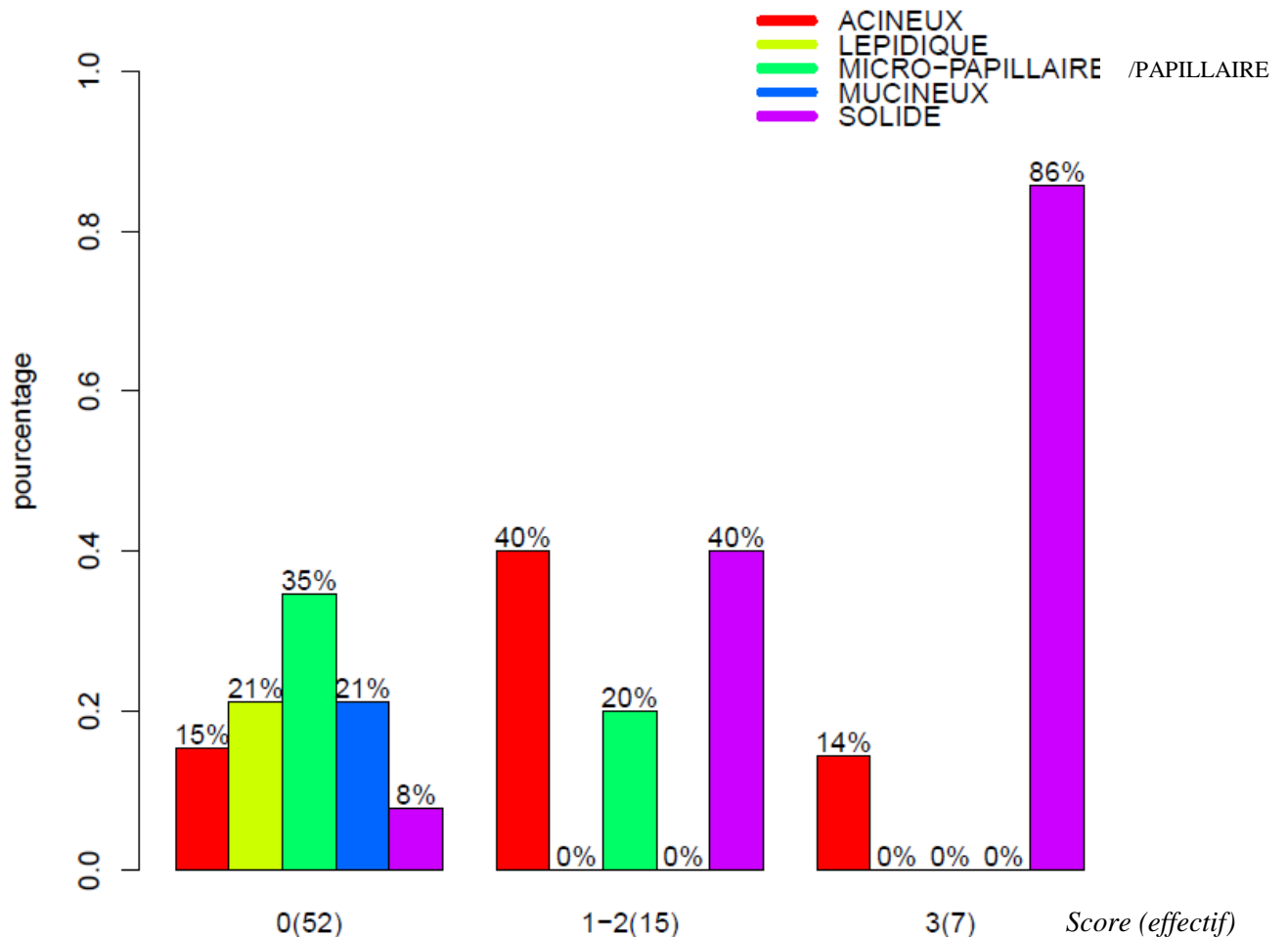
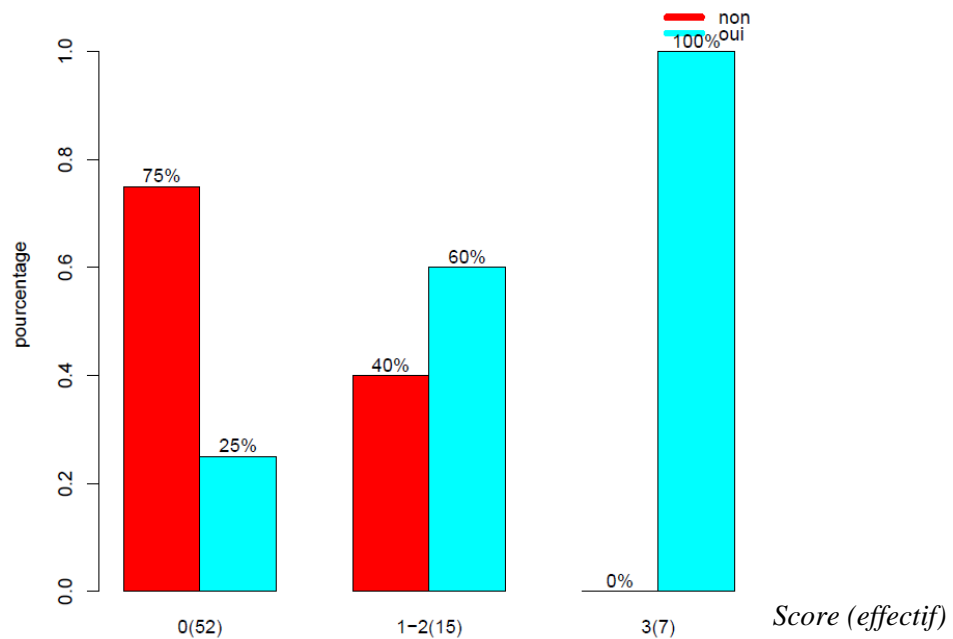


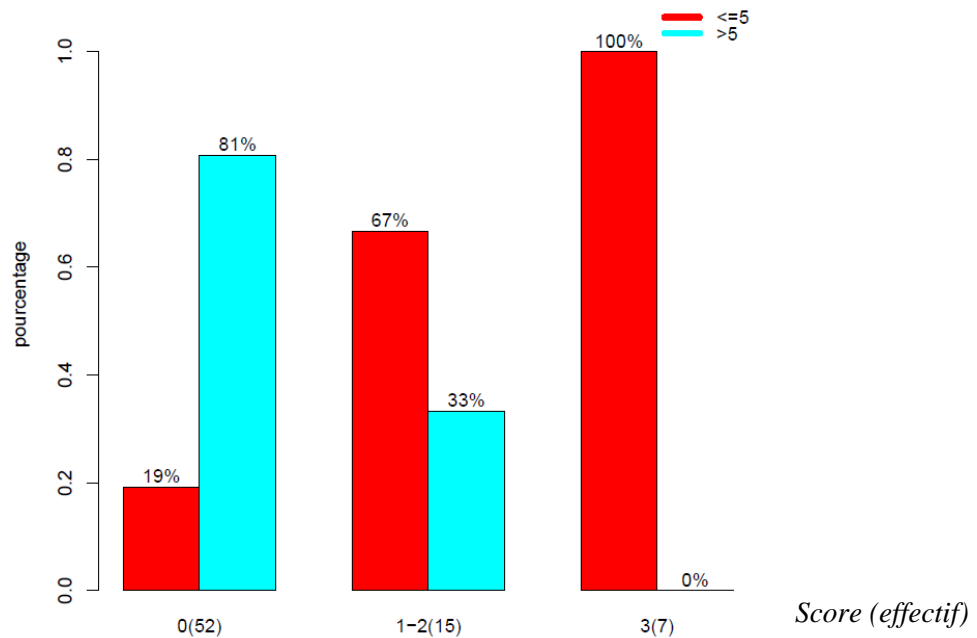
Figure 79 : Répartition des sous-types histologiques d'adénocarcinome en fonction du statut PD-L1 des CT ( $p < 0,001$ ).

*CT* : score sur les cellules tumorales : 0 :  $< 1\%$  ; 1-2 : 1-49% ; 3 :  $\geq 50\%$ .

Nous avons observé une relation entre la présence de facteurs histologiques péjoratifs et une augmentation de l'expression de PD-L1 par les CT. Ces facteurs histopronostiques sont la présence de nécrose tumorale ( $p < 0,001$ ) (figure 80) et le compte mitotique (supérieur à 5 mitoses pour 10 champs à fort grossissement) ( $p < 0,001$ ) (figure 81).



**Figure 80 :** Présence de nécrose tumorale (oui/non) en fonction du statut PD-L1 des CT ( $p < 0,001$ ).



**Figure 81 :** Compte mitotique en fonction du statut PD-L1 des CT ( $p < 0,001$ ).

*CT : score sur les cellules tumorales : 0 : <1% ; 1-2 : 1-49% ; 3 : ≥50%.*



De la même façon, nous avons recherché une relation entre le statut PD-L1 des CT et la densité de TILs visible en HES.

Il n'existe pas de différence statistiquement significative avec cependant une proportion plus importante, que celle attendue, de TILs de score 3 chez les patients dont les CT expriment PD-L1 ( $p=0,058$ ) (figure 82).

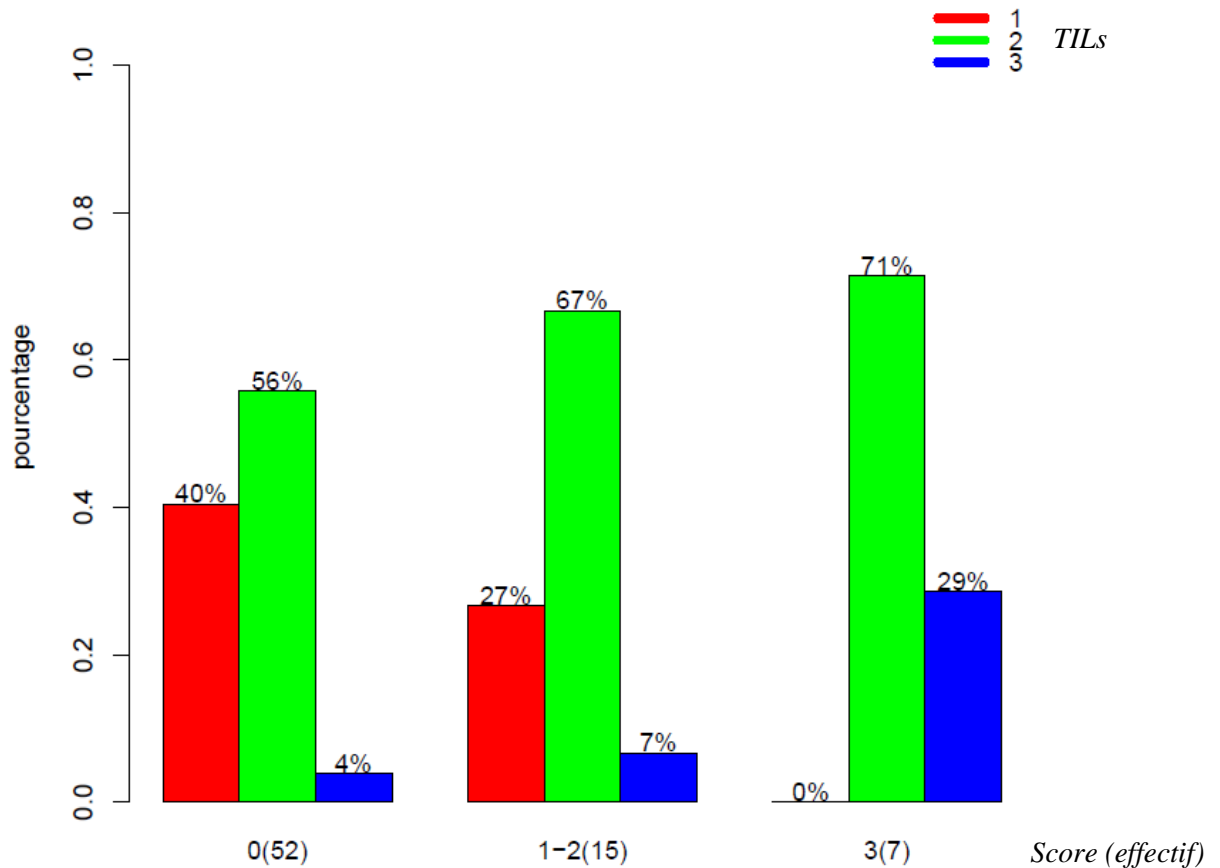
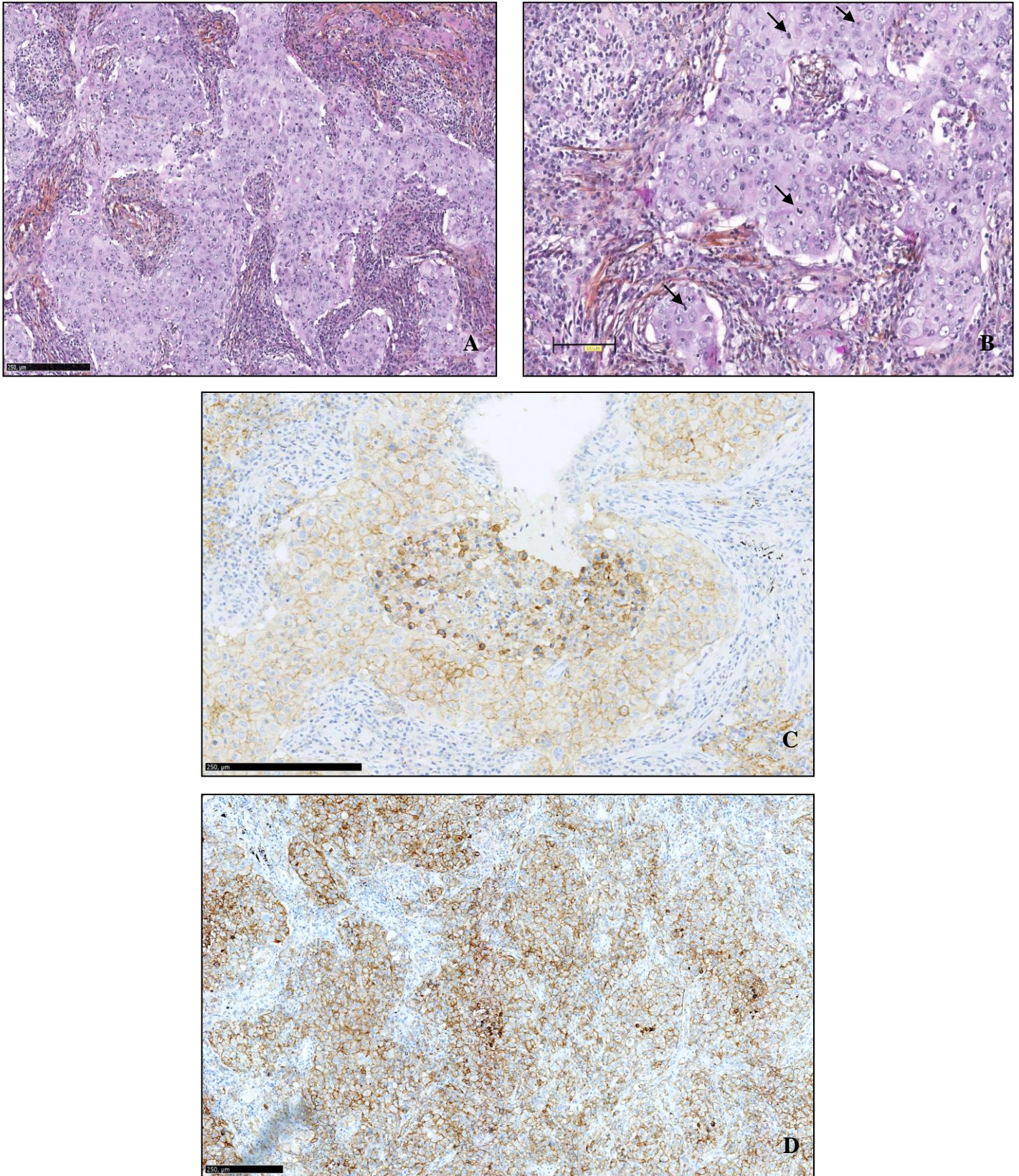


Figure 82 : Intensité des TILs sur HES en fonction du statut PD-L1 des CT ( $p=0,058$ ).

*CT : score sur les cellules tumorales : 0 : <1% ; 1-2 : 1-49% ; 3 :  $\geq 50\%$ .*

Aucune relation n'a été retrouvée entre l'expression de PD-L1 par les CT et le stade tumoral ( $p=0,852$ ) (annexe 7).



**Figure 83 :** Illustration de la relation entre l'intensité des TILs, le compte mitotique, la présence de nécrose et l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales.

*A : TILs score 3 ; B : compte mitotique élevé ;*

*C : nécrose PD-L1+ ; D : score PD-L1 CT3 ( $\geq 50\%$ ).*

### 3. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CI et les critères histopronostiques des adénocarcinomes

---

Nous avons réalisé les mêmes analyses que pour l'expression de PD-L1 par les CT mais sans résultat statistiquement significatif (annexes 8 et 9) à l'exception du compte mitotique ( $p=0,016$ ) (figure 84).

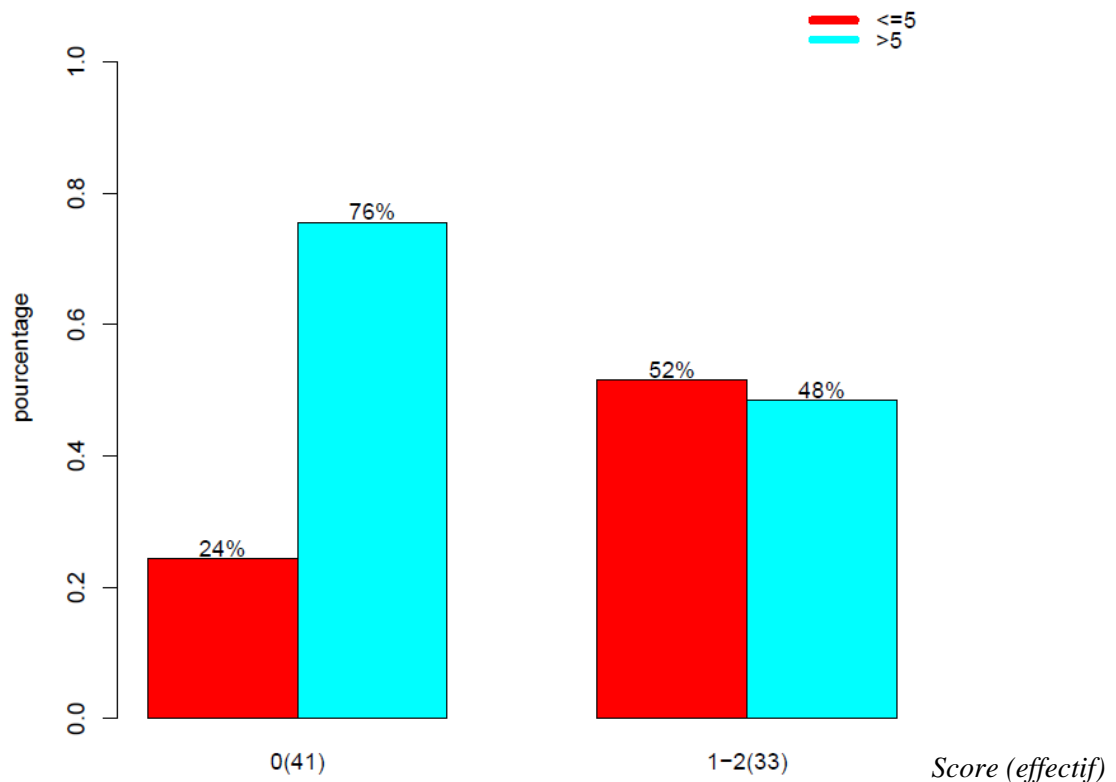
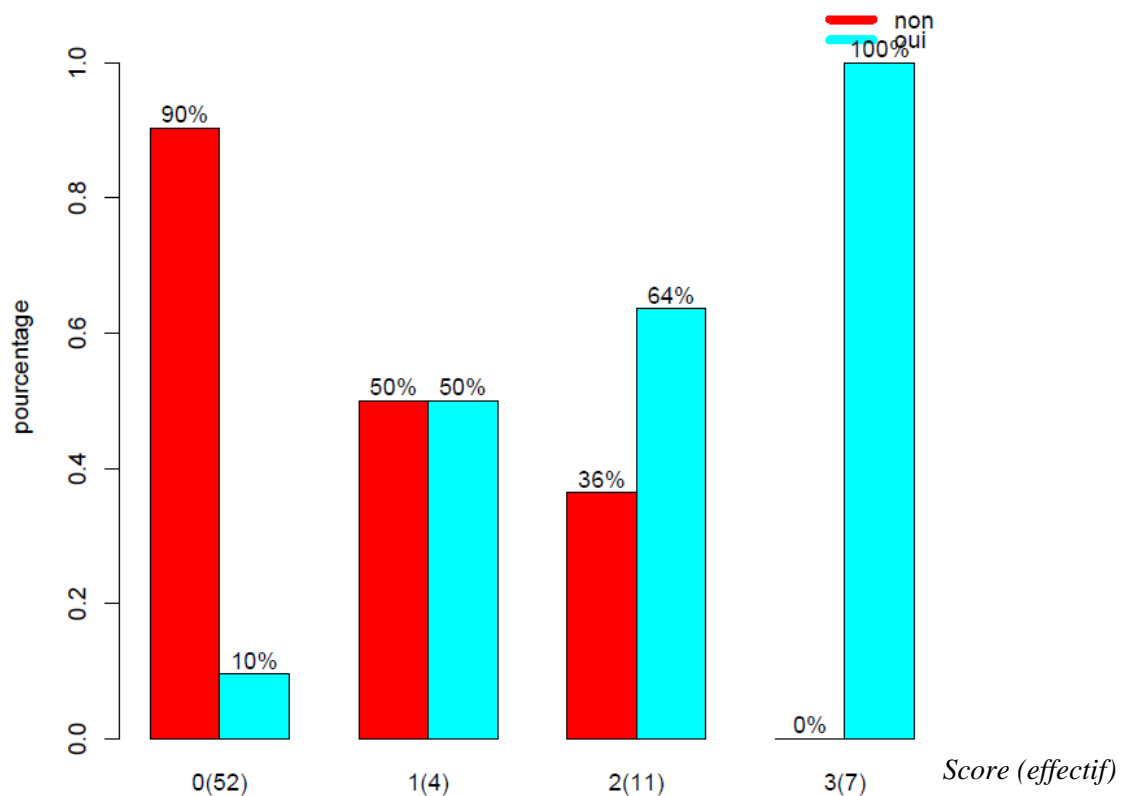


Figure 84 : Compte mitotique en fonction du statut PD-L1 des CI ( $p=0,016$ ).

$0 < 1\%$  ;  $1-2 : 1-9\%$  ;  $3 \geq 10\%$ .

#### 4. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et CI et l'expression de CD103 par les CI intra-tumorales

Il existe une relation statistiquement significative entre le pourcentage de CT PD-L1+ et la présence de CI intra-tumorales CD103+ avec une tendance visuelle à l'augmentation progressive ( $p < 0,001$ ) (figure 85).

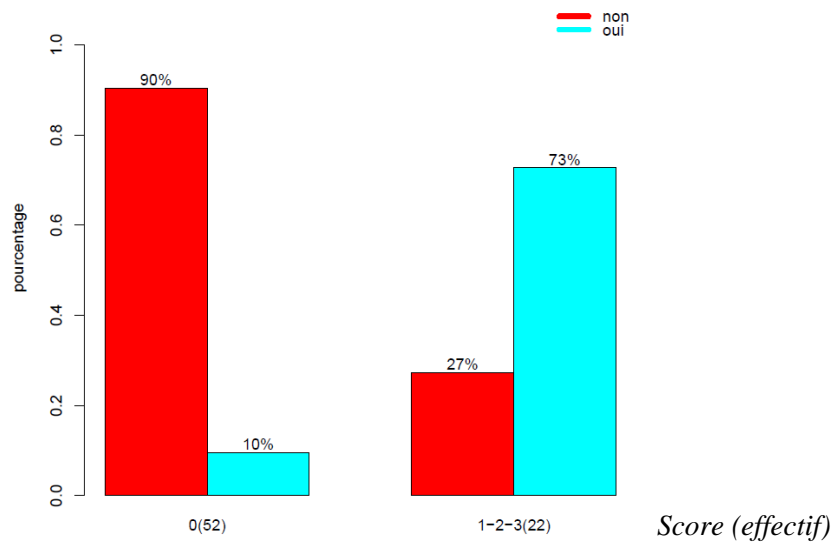


**Figure 85 :** Présence (oui/non) de CI intra-tumorales CD103+ en fonction du statut PD-L1 des CT ( $p < 0,001$ ).

*CT : score sur les cellules tumorales : 0 :  $< 1\%$  ; 1 :  $1-4\%$  ; 2 :  $5-49\%$  ; 3 :  $\geq 50\%$ .*

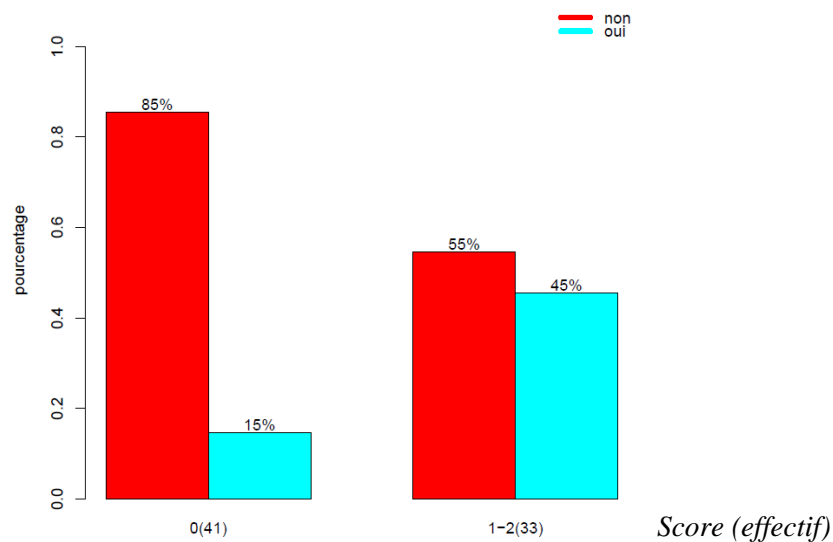
De la même façon que dans la première partie, afin d'éviter la présence de sous-groupes de faible effectif gênant l'analyse statistique, deux groupes de patients ont été comparés en fonction de la présence ou non (oui/non) de CT PD-L1+ et de CI intra-tumorales CD103+.

Une relation nette est retrouvée entre la présence d'une expression de PD-L1 par les CT et la présence de CI intra-tumorales CD103+ ( $p < 0,001$ ) (figure 86).



**Figure 86 :** Présence (oui/non) de CI CD103+ intra-tumorales en fonction de la présence (oui/non) de CT PD-L1+ ( $p < 0,001$ ). (CT : score sur les cellules tumorales : 0 :  $< 1\%$  ; 1-2-3 :  $\geq 1\%$ ).

La présence de CI intra- tumorales CD103+ est également reliée à la présence de CI PD-L1+ (figure 87) ( $p = 0,003$ ).



**Figure 87 :** Présence de CI intra-tumorales CD103+ en fonction de la présence de CI PD-L1+ ( $p = 0,003$ ). (0  $< 1\%$  ; 1- 2 : 1-9%).

La présence de CI intra-tumorales CD103+ est donc statistiquement liée à l'expression de PD-L1 tant par les CT que par les CI.

## 5. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et l'expression de CD8 par les CI intra-tumorales

Il existe une relation statistiquement significative entre l'expression de PD-L1 par les CT et la présence de CI intra-tumorales CD8+ ( $p < 0,001$ ) (figure 88). Cette relation n'était pas retrouvée dans notre 1<sup>ère</sup> partie réalisée sur prélèvements biopsiques.

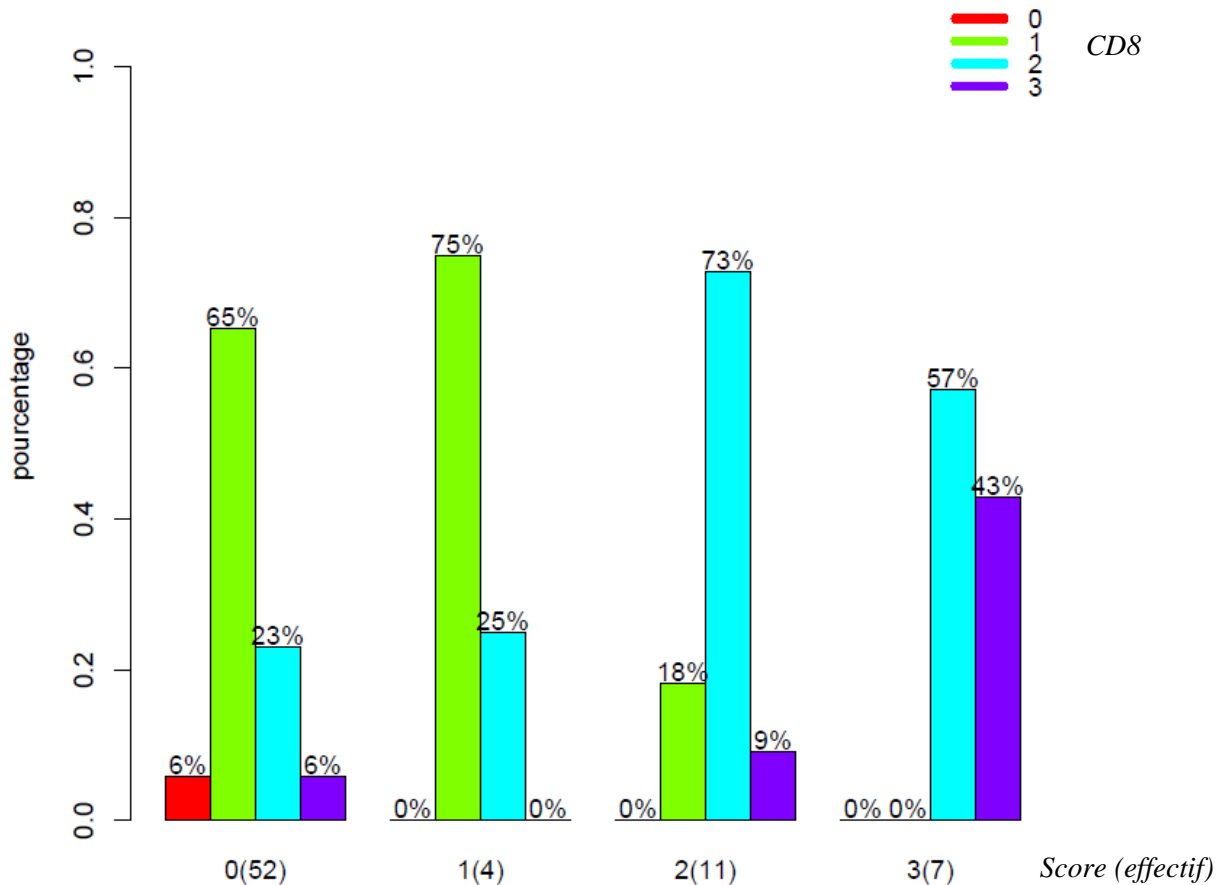
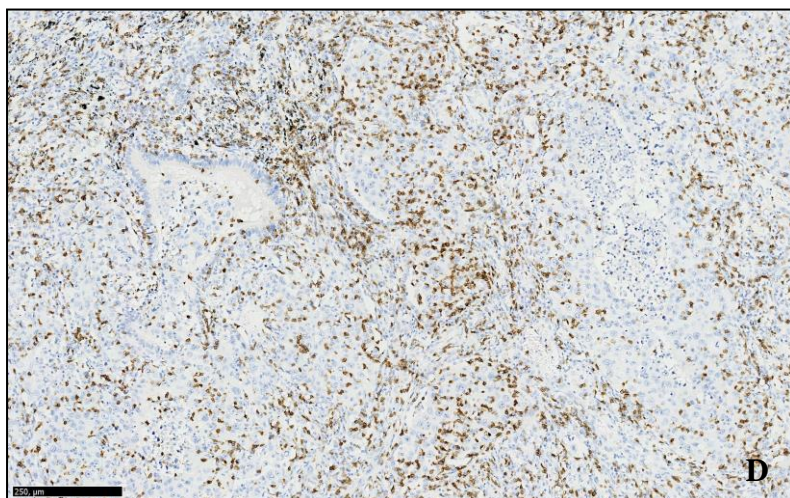
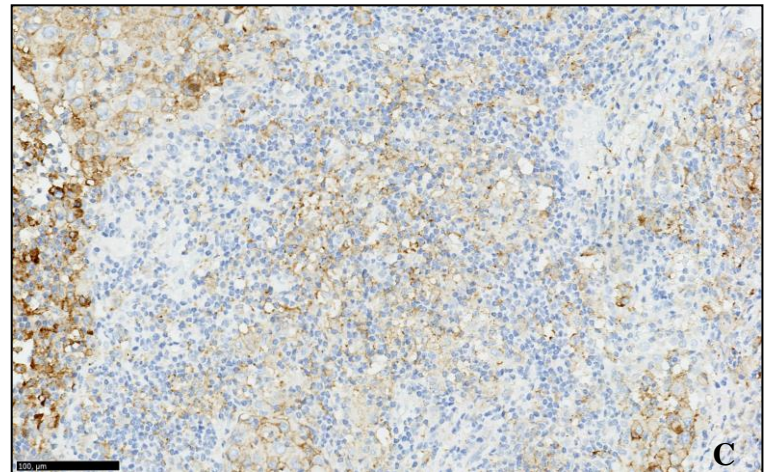
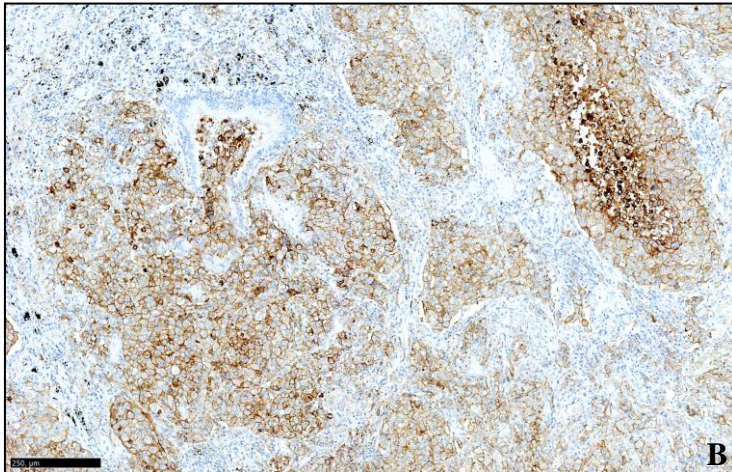
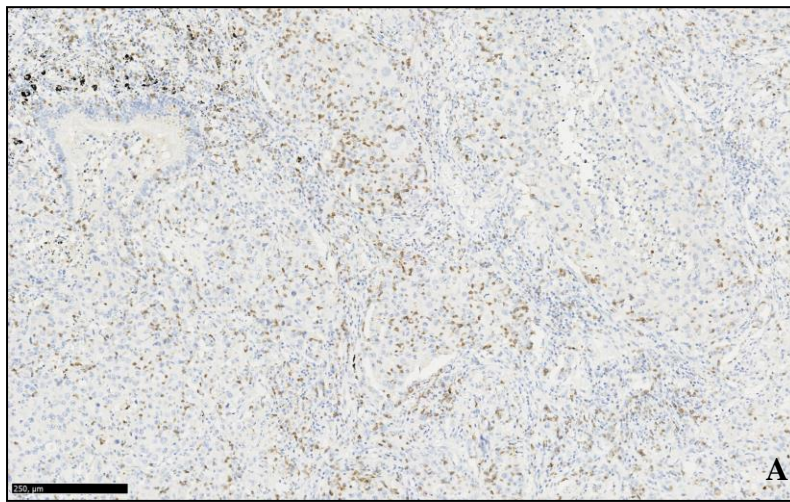


Figure 88 : Statut CD8 des CI intra-tumorales en fonction du statut PD-L1 des CT ( $p < 0,001$ ).

*CT* : score sur les cellules tumorales : 0 :  $< 1\%$  ; 1 : 1-4% ; 2 : 5-49% ; 3 :  $\geq 50\%$ .

*CD8* : 0  $< 1\%$  ; 1- 2 : 1-9% ; 3  $\geq 10\%$ .



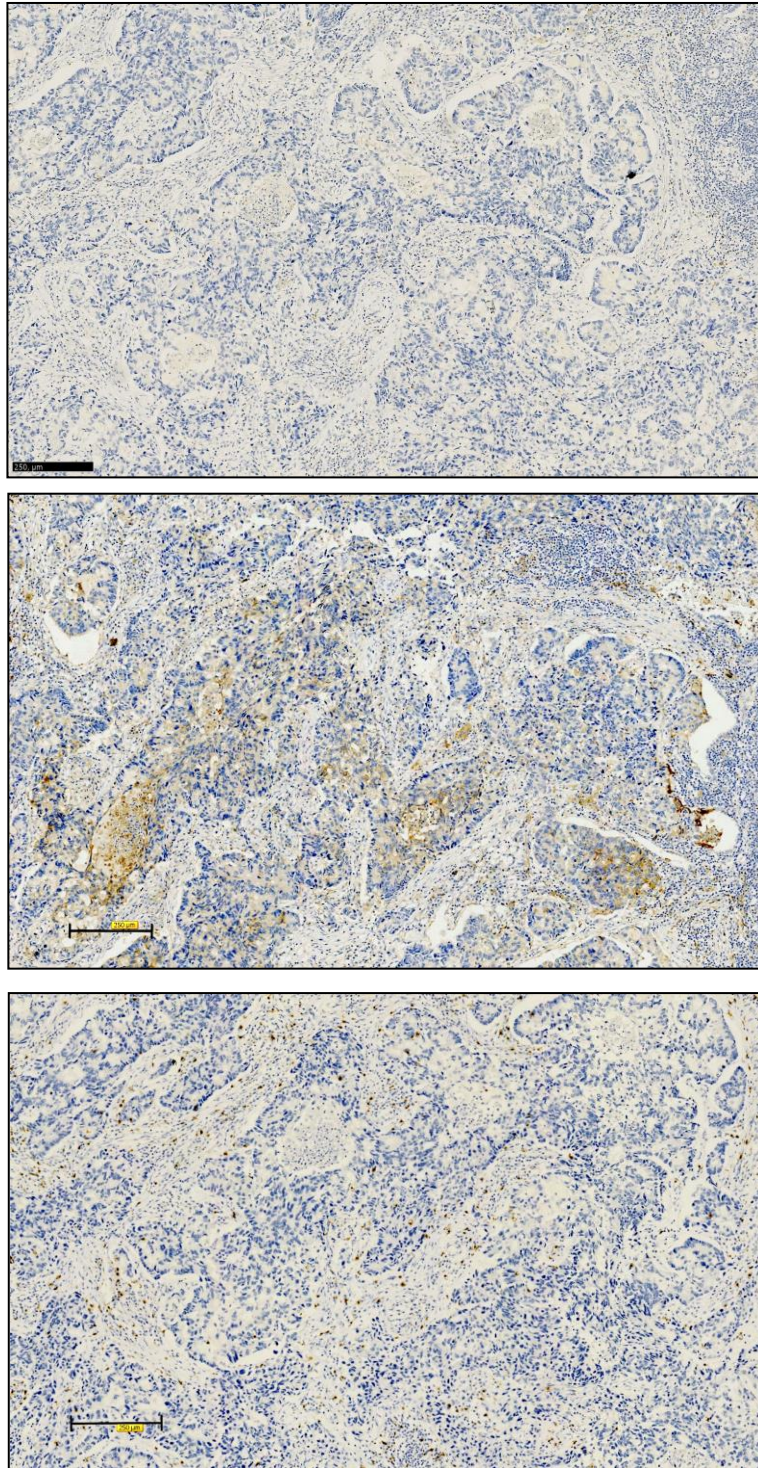
**Figure 89** : Illustration de la relation entre la présence de CI intra-tumorales CD103+, l'expression de PD-L1 par les CT et CI (score 3) et la présence de CI intra-tumorales CD8+ (score 3).

*A : CD103 fortement exprimé par les CI intra-tumorales ;*

*B : PD-L1 exprimé au score CT3 par les CT ;*

*C : PD-L1 exprimé au score CI3 par les CI ;*

*D : CI intra-tumorales CD8 + (score 3).*



**Figure 90 :** Illustration de la relation entre l'absence de CI intra-tumorales CD103+, l'absence d'expression de PD-L1 par les CT et CI et la faible proportion voire l'absence de CI intra-tumorales CD8+ (scoring 1).

*A : absence d'expression de CD103 par les CI intra-tumorales ;*

*B : absence d'expression de PD-L1 par les CT et CI (artéfacts : macrophages) ;*

*C : faible taux de CI intra-tumorales CD8 + (score 1).*



## 6. Relation entre l'expression de PD-L1 par les CT et les données moléculaires

Dans notre étude, comme décrit dans la littérature, le pourcentage de CT PD-L1+ tend à être plus important en l'absence de mutation driver sans que nous ne retrouvions de différence statistiquement significative ( $p=0,062$ ) (figure 91).

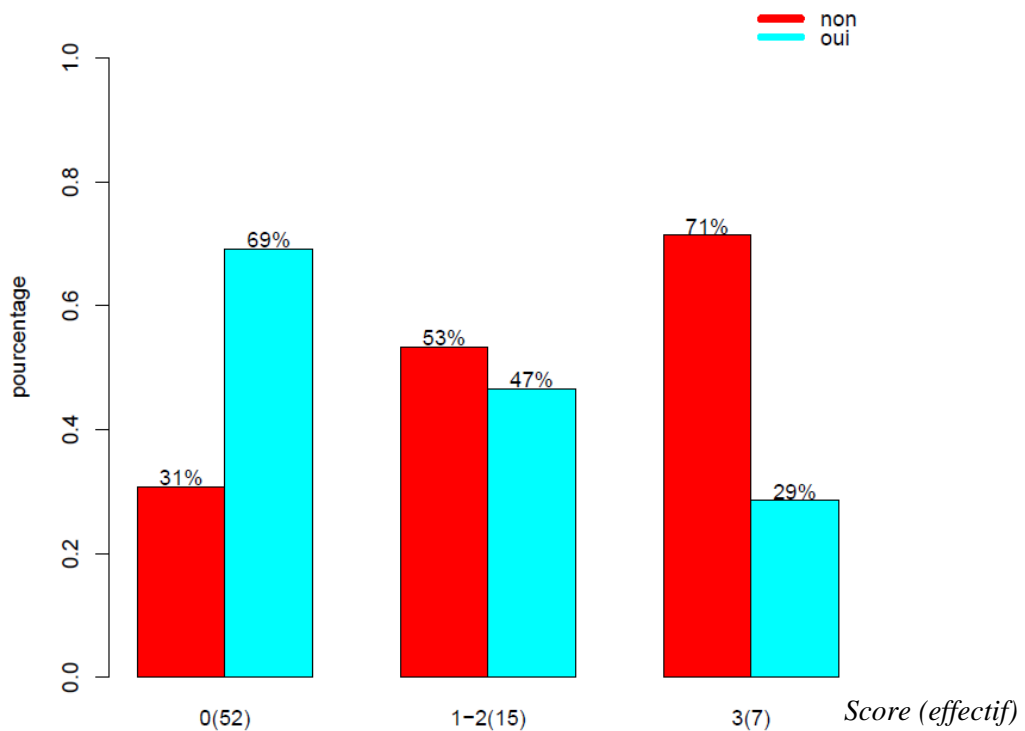


Figure 91 : Présence (oui/non) d'une mutation driver en fonction du statut PD-L1 des CT ( $p=0,062$ ).

*CT* : score sur les cellules tumorales : 0 : <1% ; 1-2 : 1-49% ; 3 :  $\geq 50\%$ .

Cette tendance n'est pas retrouvée pour l'expression de PD-L1 par les CI ( $p=0,322$ ) (annexe 10).

## 7. Relation entre l'expression de CD103 par les CI intra-tumorales et les critères histopronostiques des adénocarcinomes

De la même façon que pour le statut PD-L1 des CT, il existe une relation entre la présence de CI intra-tumorales CD103+ et la présence des facteurs histopronostiques péjoratifs que sont la nécrose tumorale (figure 92) ( $p < 0,001$ ) et le compte mitotique supérieur à 5/10 FG ( $p < 0,001$ ) (figure 93).

Figure 92 : Présence de nécrose tumorale en fonction de la présence (oui/non) de CI intra-tumorales CD103+ ( $p < 0,001$ ).

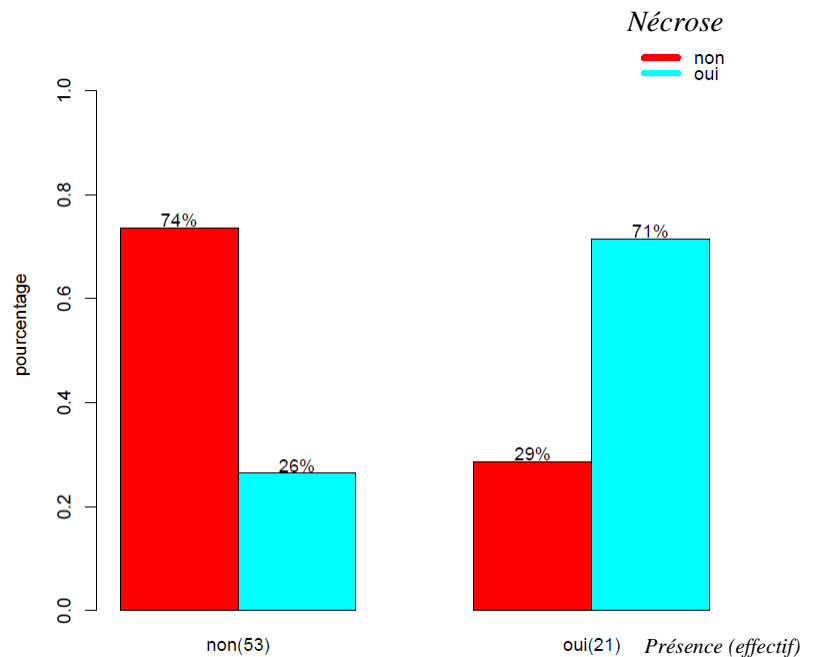
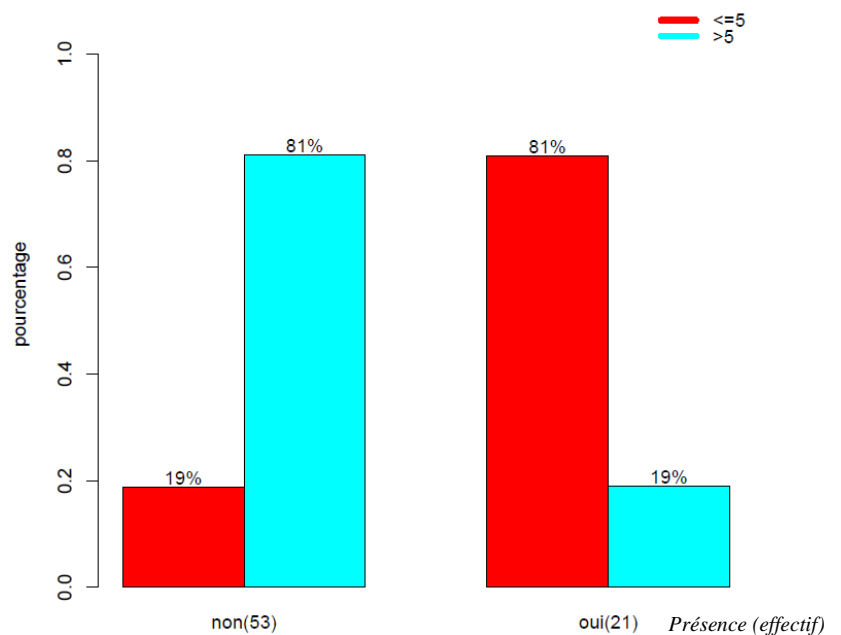
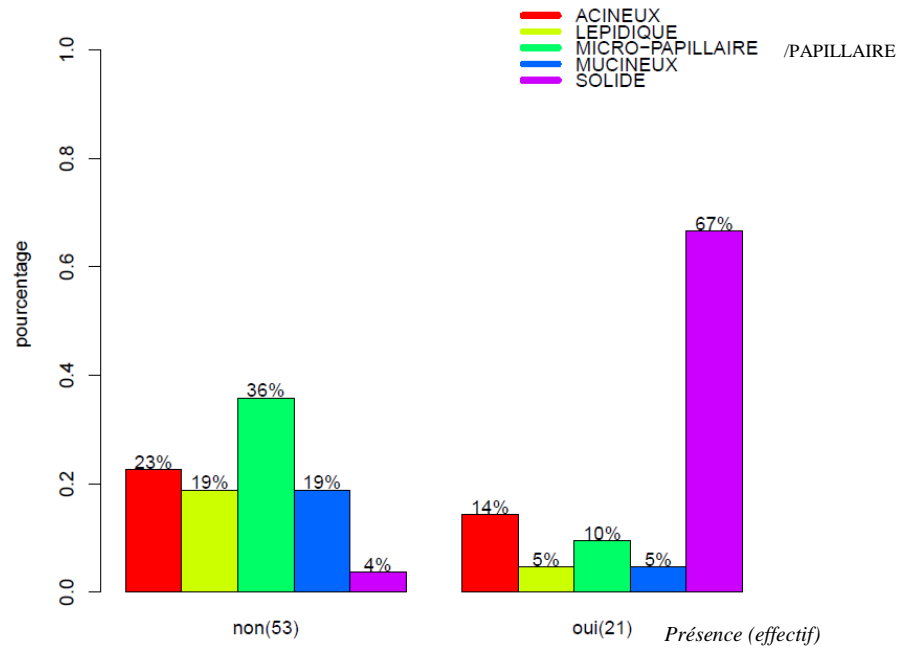


Figure 93 : Compte mitotique en fonction de la présence (oui/non) de CI intra-tumorales CD103+ ( $p < 0,001$ ).



Par ailleurs, la présence de CI intra-tumorales CD103+ est également plus importante dans le sous-type solide d'adénocarcinome ( $p < 0,001$ ) (figure 94).

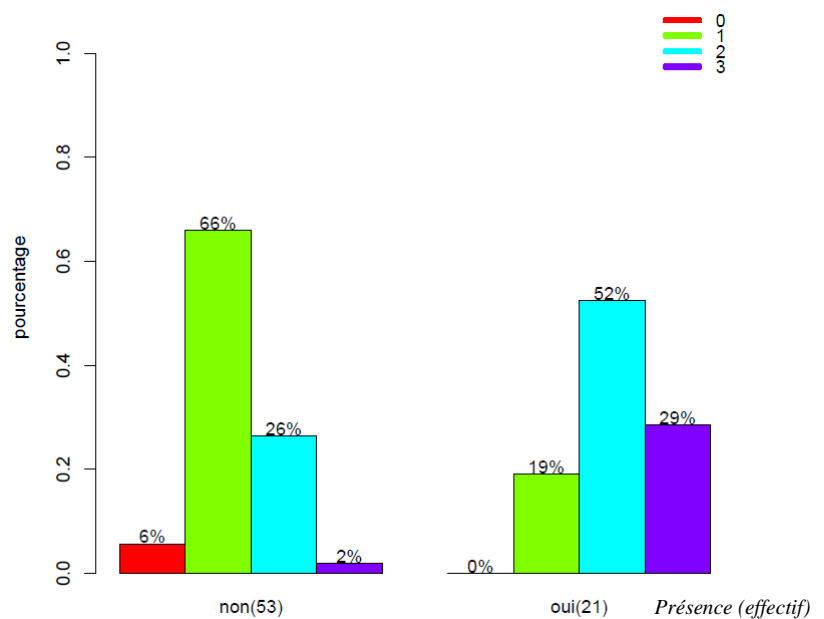
Figure 94 : Sous-type histologique d'adénocarcinome en fonction de la présence (oui/non) de CI intra-tumorales CD103+ ( $p < 0,001$ ).



## 8. Relation entre l'expression de CD103 et de CD8 par les CI intra-tumorales

Une relation statistiquement significative entre l'expression de CD103 et de CD8 par les CI intra-tumorales est retrouvée ( $p < 0,001$ ) (figure 95).

Figure 95 : Pourcentage de CI intra-tumorales CD8+ en fonction de la présence (oui/non) de CI intra-tumorales CD103+ ( $p < 0,001$ ).  
 0 < 1% ; 1 : 1-4% ; 2 : 5-9% ; 3  $\geq$  10%.



## 9. Relation entre l'expression de CD103 par les CI intra-tumorales et les données moléculaires

---

Il existe également une relation entre l'expression de CD103 par les CI intra-tumorales et l'absence de mutation driver au niveau des CT ( $p=0,046$ ) (figure 96).

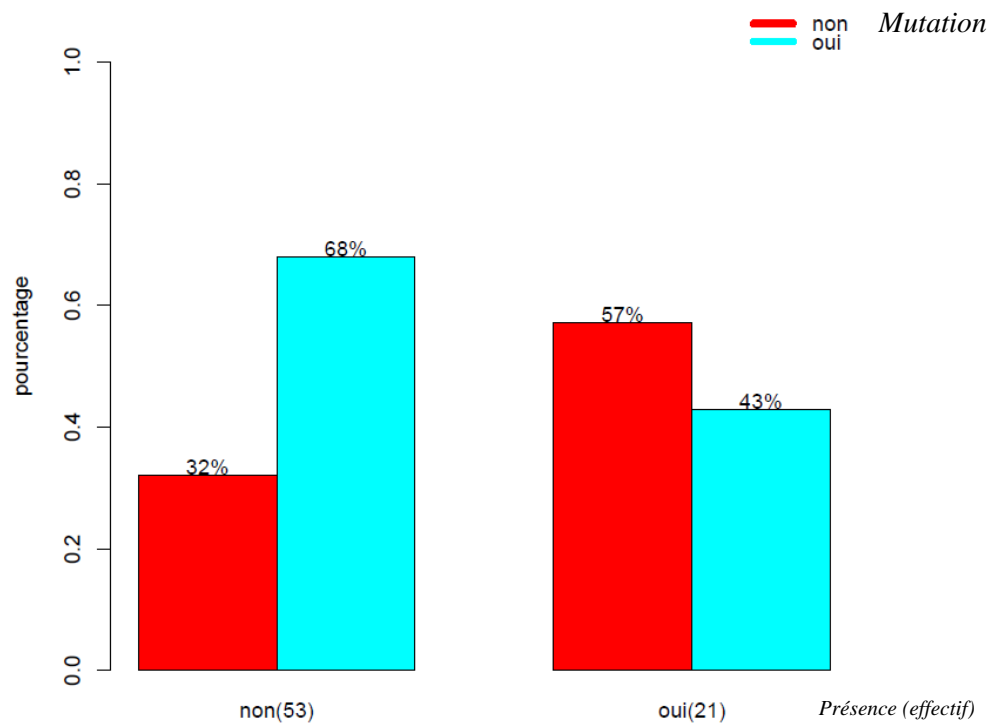


Figure 96 : Présence d'une mutation/addiction oncogénique en fonction du statut CD103 des CI intra-tumorales ( $p=0,046$ ).

# 10. Survie sans progression et données immunohistochimiques

---

Le suivi des patients a été en moyenne de 43,1 mois avec une survie sans progression médiane de 39,5 mois.

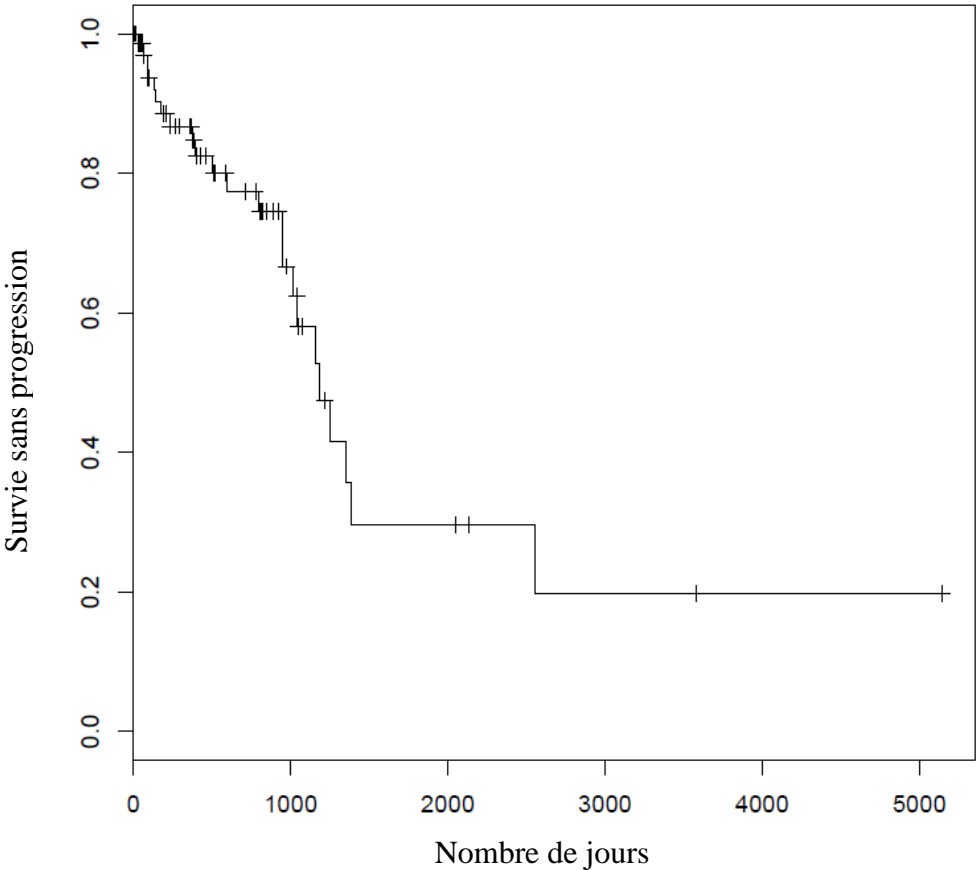


Figure 97 : Survie sans progression de la population étudiée.

## 10.1 Survie sans progression en fonction du statut PD-L1 des CT

Il semble exister, de manière statistiquement significative, une meilleure survie sans progression chez les patients n'exprimant pas PD-L1 ( $p=0,0189$ ) (figure 98). La survie médiane est de 41,8 mois pour le groupe CT0, de 16,7 mois pour le groupe CT1-2 et de 38,7 mois pour le groupe CT3. Le résultat du groupe CT3 est ici difficile d'interprétation devant le faible effectif de 7 patients.

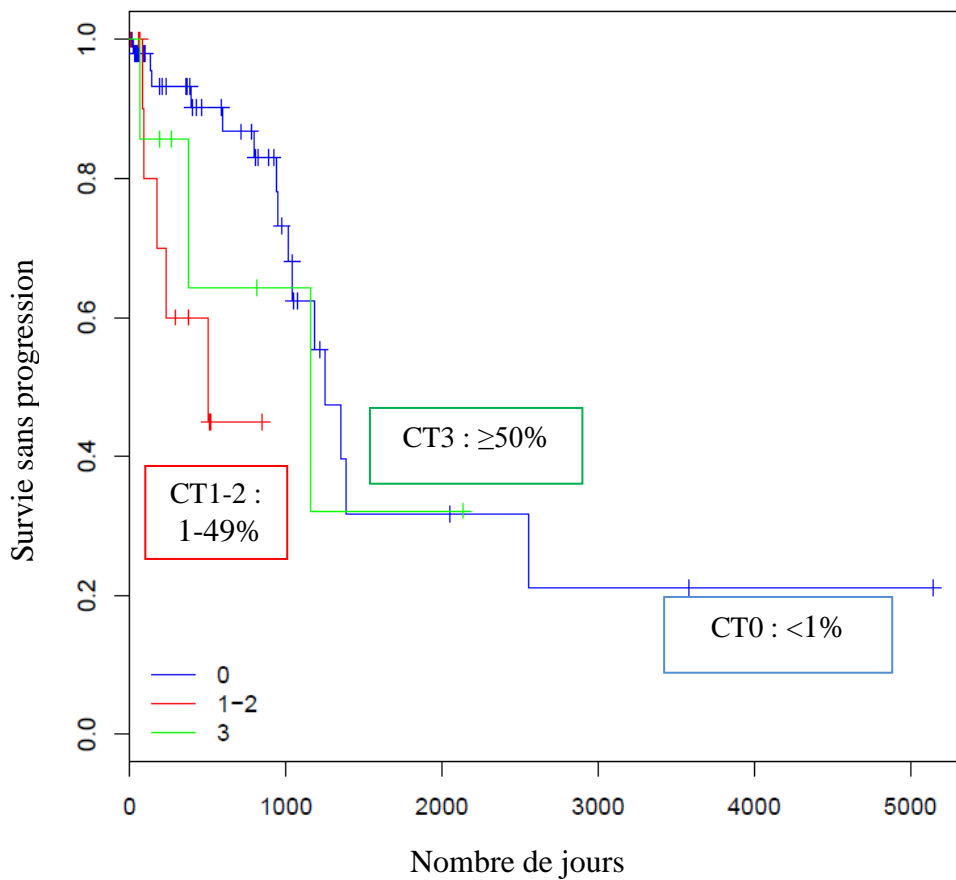


Figure 98 : Survie sans progression en fonction du statut PD-L1 des CT ( $p=0,0189$ ).

## 10.2 Survie sans progression en fonction du statut PD-L1 des CI

Il n'existe pas de différence de survie sans progression statistiquement significative entre les différents groupes d'expression de PD-L1 par les CI ( $p=0,565$ ) (figure 99).

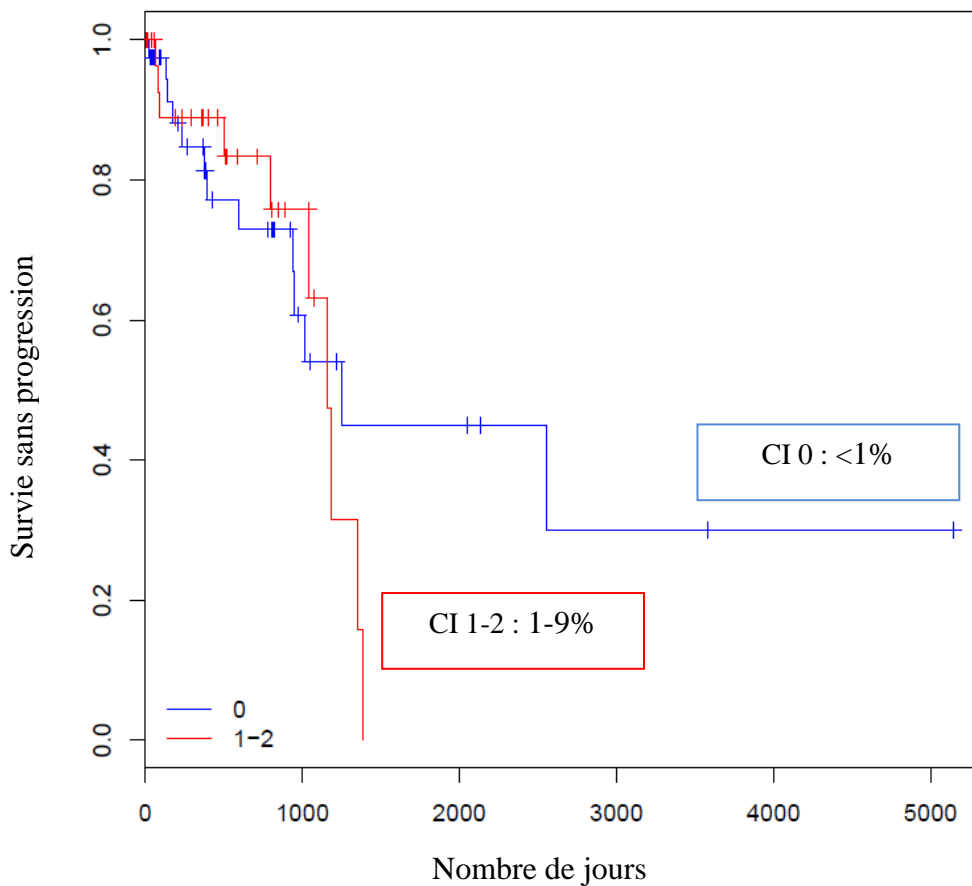


Figure 99 : Survie sans progression en fonction du statut PD-L1 des CI ( $p=0,565$ ).

## 10.3 Survie sans progression en fonction du statut CD8 et CD103 des CI intra-tumorales

Il n'existe pas de différence de survie sans progression statistiquement significative en fonction de la présence de CI intra-tumorales CD8+ ( $p=0,477$ ) (annexe 11) ou CD103+ ( $p=0,378$ ) (annexe 12).

## DISCUSSION

---

L'immunothérapie, qui se base sur les propriétés du système immunitaire pour lutter contre la prolifération tumorale, est une des dernières révolutions thérapeutiques dans la prise en charge des patients atteints de cancer même si le concept est ancien (19<sup>ème</sup> siècle) (124). Les inhibiteurs des points de contrôle de l'immunité que sont les anti-PD-1/PD-L1 sont au centre de multiples études. La problématique actuelle est de réussir à prédire la réponse au traitement à l'aide de biomarqueurs permettant d'identifier les patients forts répondeurs et les patients progresseurs sous immunothérapie. Dans la littérature, l'expression de PD-L1 par immunohistochimie, la charge mutationnelle et l'étude du microenvironnement tumoral semblent être les trois principaux axes de recherche. Actuellement, seule la prescription de pembrolizumab est conditionnée par l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales en immunohistochimie dans un concept de test compagnon. La multiplicité des clones et des protocoles rend l'utilisation de l'anticorps anti-PD-L1 difficile en routine.

Notre étude s'est divisée en deux parties.

### 1. Partie I

---

L'objectif principal de notre 1<sup>ère</sup> partie était d'étudier, sur une cohorte de 70 patients traités par nivolumab, la survie globale et le taux de réponse en fonction de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et immunes puis, en fonction de la densité de cellules immunes intra-tumorales CD8+ ou CD103+. Peu d'études ont exploré l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales et les cellules immunes notamment avec l'anticorps E1L3N.

Nos patients présentaient une survie médiane de 10,6 mois (IC95% 6,7- ) (figure 65). Dans les essais Checkmate 017 et 057, la survie globale médiane était, respectivement, de 9,2 mois (IC95% 7,2-13,3) et de 12,2 mois (IC95% 9,7-15).

Dans notre étude, 27,2% des patients (soit 19 patients) avaient un statut PD-L1 inconnu par manque de matériel. Comparativement, dans les essais Checkmate 017 et 057 (également réalisé sur prélèvements biopsiques), 21% et 13% des patients n'avaient pas de statut PD-L1 contre 18% pour l'étude Keynote 010. Notre taux est donc supérieur à ceux de la littérature. De plus, il est important de noter que 31,5% des patients ne présentant pas de statut PD-L1



obtenaient une réponse partielle ou complète ce qui est loin d'être négligeable. L'absence de statut PD-L1 disponible ne doit donc pas être un critère d'exclusion pour la prescription de nivolumab.

Le pourcentage de patients ayant un statut PD-L1 supérieur à 50% était de 11,4% dans notre étude. Ce taux était de 23% dans les études Keynote 010 et Checkmate 012.

Dans un premier temps, nous avons exploré la survie globale et le taux de réponse des patients traités par nivolumab. Nous n'avons pas retrouvé de différence de survie globale statistiquement significative en fonction du pourcentage de cellules tumorales ou immunes exprimant PD-L1 (figures 66 et 67). Les études Checkmate 017 et 057 n'ont également pas mis en évidence d'intérêt significatif à la réalisation du test PD-L1 en tant que test compagnon pour prédire la réponse au nivolumab. Dans l'étude Checkmate 057, même si les taux de réponse augmentent avec le statut PD-L1 des cellules tumorales, certains patients avec un statut PD-L1 inférieur à 1% vont tout de même présenter des réponses thérapeutiques non négligeables. De la même façon, des patients exprimant PD-L1 vont progresser sous traitement. Le test PD-L1 serait intéressant pour identifier les patients hyperprogressseurs sous immunothérapie. Ces patients se caractériseraient par des facteurs cliniques péjoratifs associés à une absence ou faible expression de PD-L1 (par exemple inférieur à 50%). Notre étude a très certainement manqué d'effectif de patients PD-L1 fortement exprimé avec seulement 8 patients l'exprimant à plus de 50% sur les cellules tumorales. Cependant, nos résultats renforcent le principe d'utilisation de PD-L1 comme test complémentaire et non comme test compagnon pour la prescription de nivolumab.

En ce qui concerne le marquage des cellules immunes, notre résultat est sûrement altéré par la faible proportion de cas présentant un infiltrat PD-L1 positif soit seulement 15,7% (figure 68).

Parallèlement, notre étude sur l'impact de la densité de cellules immunes intra-tumorales CD8+ ou CD103+ sur la survie globale n'a pas été décisive (figures 69 et 70). Ceci va à l'encontre de nombreuses études montrant qu'un infiltrat inflammatoire CD8 + ou CD103+ dense est un facteur de bon pronostic (17) (92) (93). Cette différence est très certainement liée à notre manque d'effectif ou alors à l'hétérogénéité de la répartition de l'infiltrat inflammatoire que nous ne pouvions pas voir sur matériel biopsique.

En ce qui concerne le taux de réponse, les patients, dont la tumeur exprime PD-L1 à plus de 50%, présentent un taux de réponse partielle/complète ou une maladie stable supérieur à ce

qui était attendu (figure 71). Nous n'avons pu montrer de différence statistiquement significative entre les différents groupes d'expression très certainement du fait de notre manque d'effectif de patient exprimant PD-L1 à un score 3 (soit 8 patients) ( $p=0,069$ ). 88% des patients exprimant PD-L1 à plus de 50 % avaient une réponse ou une maladie stable sous traitement, ce qui peut paraître élevé. Comparativement, l'étude Keynote 024 sur le pembrolizumab montre un taux de réponse complète de 44,8% pour les patients  $PD-L1 \geq 50\%$ .

Dans un second temps, en objectif secondaire, nous avons montré une relation entre l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et la présence de cellules immunes intra-tumorales CD103+ venant directement au contact des cellules cancéreuses ( $p < 0,001$ ) (figure 74). Cette relation, statistiquement significative, se situe entre la présence (oui/non) d'une expression de PD-L1 par les cellules tumorales et la présence (oui/non) de cellules immunes intra-tumorales CD103+ sans réelle proportionnalité (figure 75). L'absence de proportionnalité peut être liée à la sous-représentation de certains sous-groupes comme, par exemple, la présence de seulement 2 patients ayant un score CT1 (1-4%). Ceci soulève l'hypothèse qu'une expression de CD103 par les cellules immunes intra-tumorales pourrait être un nouveau biomarqueur prédictif de la réponse à l'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1.

L'hypothèse d'une utilité prédictive du CD103 et d'une équivalence ou complémentarité d'expression entre le CD103 et le PD-L1 a été étudiée sur une cohorte plus importante dans notre seconde partie.

Aucune relation statistiquement significative n'a été mise en évidence entre l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et la présence de cellules immunes intra-tumorales CD8+ (annexe 5).

Nous avons également exploré l'impact d'une lymphopénie (seuil  $< 1000/mm^3$ ) sur la réponse thérapeutique. Il n'existait pas de différence de répartition des réponses thérapeutiques en fonction de la présence ou non d'une lymphopénie (annexe 3). Dans la littérature, l'étude de *Ray-Coquard et al* montre que la lymphopénie est un facteur pronostique indépendant dans de nombreux cancer (125). L'étude de *Sun R et al* démontre également qu'il n'y a pas de lien entre le taux de lymphocytes et la réponse thérapeutique (selon RECIST) à l'immunothérapie ou la survie globale (126).

## 2. Partie II

---

L'objectif principal de notre 2<sup>ème</sup> partie était d'étudier, dans une cohorte de patients opérés d'un adénocarcinome pulmonaire, les facteurs histopronostiques liés à l'expression immunohistochimique de PD-L1 ainsi que l'intérêt de l'étude du microenvironnement tumoral CD8+ ou CD103+. Puis, dans un second temps, nous avons également exploré la survie sans progression de ces patients. Actuellement, peu d'études ont été réalisées sur des cohortes de patients opérés.

Nous avons montré, de façon statistiquement significative, une expression plus fréquente de PD-L1 dans le sous-type solide d'adénocarcinome pulmonaire ainsi que l'absence d'expression de PD-L1 par l'ensemble de nos cas d'adénocarcinome mucineux ( $p < 0,001$ ) (figure 79). Dans la littérature, les mêmes résultats ont été publiés (127) (128).

PD-L1 a été décrit comme un facteur de mauvais pronostic (105). Nous avons étudié certains facteurs histopronostiques que sont le compte mitotique, en choisissant le seuil de 5 mitoses pour 10 FG, et la présence de nécrose tumorale quel que soit son pourcentage. Nous avons observé une relation statistiquement significative ( $p < 0,001$ ) entre la présence de ces facteurs histopronostiques péjoratifs et l'augmentation du pourcentage de cellules tumorales exprimant PD-L1 (figures 80-81). Ces éléments pourraient faire douter d'un marquage négatif dans l'interprétation de l'hétérogénéité d'expression de PD-L1 sur une biopsie où la prolifération tumorale s'avère très mitotique et nécrotique.

La relation entre l'expression de PD-L1 et la présence de cellules immunes intra-tumorales CD8+ est controversée mais a été démontrée dans certaines études (77). Dans notre cohorte, nous avons mis en évidence une relation entre l'augmentation de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et la densité de cellules immunes intra-tumorales CD8+ ( $p < 0,001$ ) (figure 88). Ceci corrobore la différenciation entre les tumeurs « inflammatoires » exprimant PD-L1 et présentant un environnement tumoral inflammatoire CD8+ qui seraient plus sensibles aux immunothérapies et les tumeurs non « inflammatoires ». Cependant, cette relation n'était pas significative dans notre 1<sup>ère</sup> partie sur prélèvements biopsiques mais présente avec le CD103. C'est pourquoi nous avons étudié plus précisément le CD103 dans notre seconde partie afin qu'il soit applicable aux prélèvements biopsiques.

Tout d'abord, lors de notre recueil, nous avons évalué la présence de cellules immunes CD103+ intra et péri-tumorales en utilisant le même grading que celui utilisé pour le marquage de PD-L1 par les cellules immunes. Devant la sous-représentation de certains groupes, nous avons simplifié la démarche en notant la présence ou non de cellules immunes intra-tumorales CD103+.

Parallèlement à ce que nous avons trouvé dans notre première partie, nous avons observé une relation statistiquement significative entre la présence de cellules immunes intra-tumorales CD103+ et la présence d'une expression de PD-L1 par les cellules tumorales. Nous l'avons également démontrée avec l'expression de PD-L1 par les cellules immunes du microenvironnement ( $p < 0,001$ ) (figures 86 et 87). La relation de proportionnalité entre l'augmentation du pourcentage de cellules tumorales PD-L1+ et la présence de cellules immunes intra-tumorales CD103+ est ici plus évidente (figure 85).

Cette relation a été proposée dans l'étude de *Koh J et al* (129) pour les carcinomes épidermoïdes pulmonaires.

Par la suite, la difficulté consiste à essayer de mettre en place un véritable scoring et non une simple évaluation de la présence/absence de cellules immunes intra-tumorales CD103+. Ce scoring permettrait ainsi de compléter l'étude du statut PD-L1.

En effet, le CD103 est plus facile d'interprétation et ne présente pas d'hétérogénéité d'expression au sein d'une même coupe histologique de tumeur.

Nous avons étudié la répartition des différents scores de CD103 et de PD-L1 afin de trouver un seuil judicieux pour identifier les patients exprimant fortement PD-L1 notamment à plus de 50%. Le seuil de 10% nous paraissait judicieux mais n'était pas totalement satisfaisant et nécessite des explorations complémentaires et notamment un comptage plus précis des cellules marquées.

L'expression de CD103 étant liée à celle de PD-L1, nous avons observé une relation statistiquement significative entre les facteurs histopronostiques testés (présence de nécrose, compte mitotique plus élevé, densité de cellules immunes CD8+) et une expression de CD103 par les cellules immunes intra-tumorales ( $p < 0,001$ ) (figures 92, 93 et 95). L'anticorps anti-CD103 était également plus souvent exprimé dans le microenvironnement intra-tumoral des adénocarcinomes solides que dans celui des autres sous-types histologiques (figure 94).

L'étude de notre cohorte a montré une tendance à l'augmentation de cas avec mutation driver/addiction oncogénique (69%) chez les patients n'exprimant pas PD-L1 sur les cellules tumorales et une proportion plus faible (29%) chez les patients l'exprimant à plus de 50% ( $p=0,062$ ) (figure 91). Ces résultats sont comparables aux données de la littérature (79) (83). Parallèlement et de façon statistiquement significative le statut CD103 du microenvironnement intra-tumoral était plus souvent positif chez les patients ne présentant pas d'addiction oncogénique (68%) ( $p=0,046$ ) (figure 96). Ces résultats correspondent à ce qui définit la tumeur « inflammatoire » dite « chaude » immunogène qui répondrait mieux à l'immunothérapie (93).

Dans un second temps, en objectif secondaire, nous avons étudié la survie sans progression. Les patients de notre cohorte n'exprimant pas PD-L1 (<1%) avaient une meilleure survie sans progression (figure 98). Sachant que nous ne sommes pas dans un contexte de traitement par immunothérapie, ce résultat confirme ainsi l'hypothèse selon laquelle le statut PD-L1 est un facteur de mauvais pronostic (105) (106). Cependant, la courbe de survie du groupe CT3 est difficile d'interprétation du fait d'un manque d'effectif.

En ce qui concerne le CD103, des études ont montré la valeur pronostique positive d'un infiltrat inflammatoire CD103+ dans le carcinome séreux de l'ovaire (100), le carcinome urothélial (101) et le CBNPC (17) sans différencier les carcinomes épidermoïdes des adénocarcinomes. Une étude réalisée sur des carcinomes pulmonaires a montré l'absence de différence de survie en fonction de la densité de l'infiltrat CD103+ pour les adénocarcinomes, comparativement aux carcinomes épidermoïdes (129). Dans notre cohorte, il n'existait pas de différence de survie sans progression en fonction du statut CD103 des cellules immunes intra-tumorales ( $p=0,378$ ) (annexe 12).

### **3. L'anticorps E1L3N**

---

L'anticorps E1L3N est peu couteux et facile à mettre en place en routine dans un laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques. Ce clone a été comparé aux différents clones anti-PD-L1 utilisés dans les essais cliniques et montre une équivalence d'efficacité de marquage tant sur les cellules tumorales que sur les cellules immunes (111) (112).

La corrélation inter-observateur a été démontrée, dans différentes études, comme bonne en ce qui concerne l'évaluation de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales mais médiocre

pour celle des cellules immunes. En effet, l'expression de PD-L1 est difficile à évaluer du fait d'un marquage membranaire, hétérogène, dont l'intensité est variable avec des faux positifs, fréquents dans le poumon, liés notamment à la présence de nécrose, de macrophages alvéolaires et d'anthracose.

Les seuils et sous-groupes d'expression que nous avons utilisés sont ceux des études sur l'atézolizumab réalisées avec le SP142 (56) (57). Nous avons voulu tester ces seuils qui nous semblaient être précis mais nous avons été limités par notre manque d'effectif dans chaque sous-groupe ce qui nous a amené à faire des regroupements en accord avec les publications sur les seuils connus de 1% et de 50% (groupes CT0/CT1-2/CT3). Ces sous-groupes ont été constitués suite aux recueils de données.

L'anticorps E1L3N n'a pas été utilisé dans les essais cliniques et il ne s'agit pas d'un anticorps CEIVD. Dans notre seconde partie, la cohérence de nos résultats avec la littérature tend à faire valider l'utilisation de l'anticorps E1L3N, dans le cadre d'un LDT de routine, pour l'évaluation des cellules tumorales à des fins thérapeutiques. Cet anticorps a été longtemps utilisé en routine dans le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'hôpital Haut-Lévêque du CHU de Bordeaux.

#### **4. Limites principales de l'étude**

---

Notre principale limite dans la partie I est celle d'un manque d'effectif par manque de matériel entraînant un manque de puissance.

La seconde partie nécessiterait également une population plus importante par sous-groupes afin de préciser et d'améliorer le scoring de l'anticorps anti-CD103 sur les cellules immunes intra-tumorales.

De plus, ces deux parties constituent des études rétrospectives sujettes à des erreurs de recueil de données.

## CONCLUSION

---

L'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 constitue une avancée thérapeutique importante pour les patients atteints d'un CBNPC métastatique ou localement avancé.

Dans notre première partie, nous n'avons pas mis en évidence de différence de survie globale en fonction de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ou immunes, en fonction de la densité de l'infiltrat CD8+, ou en fonction de l'expression de CD103 par les cellules immunes intra-tumorales chez des patients traités par nivolumab. Ces résultats sont cohérents avec les essais cliniques *Checkmate* sur le nivolumab mais sont discordants avec les études faites sur le microenvironnement tumoral. Cette première partie souffre d'un manque de puissance par manque de matériel et reflète la difficulté de prise en charge des prélèvements micro-biopsiques. Elle nous a permis d'affiner nos objectifs de la seconde partie.

Au vu des indications de l'AMM, la place des tests théranostiques dans la prise en charge thérapeutique des CBNPC a évolué, modifiant ainsi l'exercice de l'anatomopathologiste (figure 100). Le test PD-L1 doit être réalisé de manière systématique dès le diagnostic de CBNPC métastatique ou localement avancé sans attendre la prescription du clinicien, afin de permettre une prise en charge rapide du patient. L'interprétation de l'expression de PD-L1 devient un exercice de routine pour l'anatomopathologiste et la décision de mise en place d'un traitement par immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 devient commune pour l'oncologue. La principale difficulté est l'identification des patients répondeurs et des patients progresseurs sous traitement afin de guider la prise en charge thérapeutique. L'interprétation de PD-L1 présente de nombreux points délicats tels que son hétérogénéité, ses faux positifs, et la multiplicité des clones existants.

Dans notre seconde partie, le résultat principal est la relation entre l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et de CD103 par les cellules immunes intra-tumorales. Le CD103 est facile à mettre en place dans un service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques et ne présente pas d'hétérogénéité d'expression contrairement à PD-L1. Cependant, un scoring précis de son expression est nécessaire afin d'identifier formellement les patients forts expresseurs.

Enfin, la cohérence de nos résultats (facteurs histopronostiques, infiltrat CD8+, addiction oncogénique et expression de PD-L1) avec la littérature permet de confirmer la fiabilité de l'anticorps E1L3N.

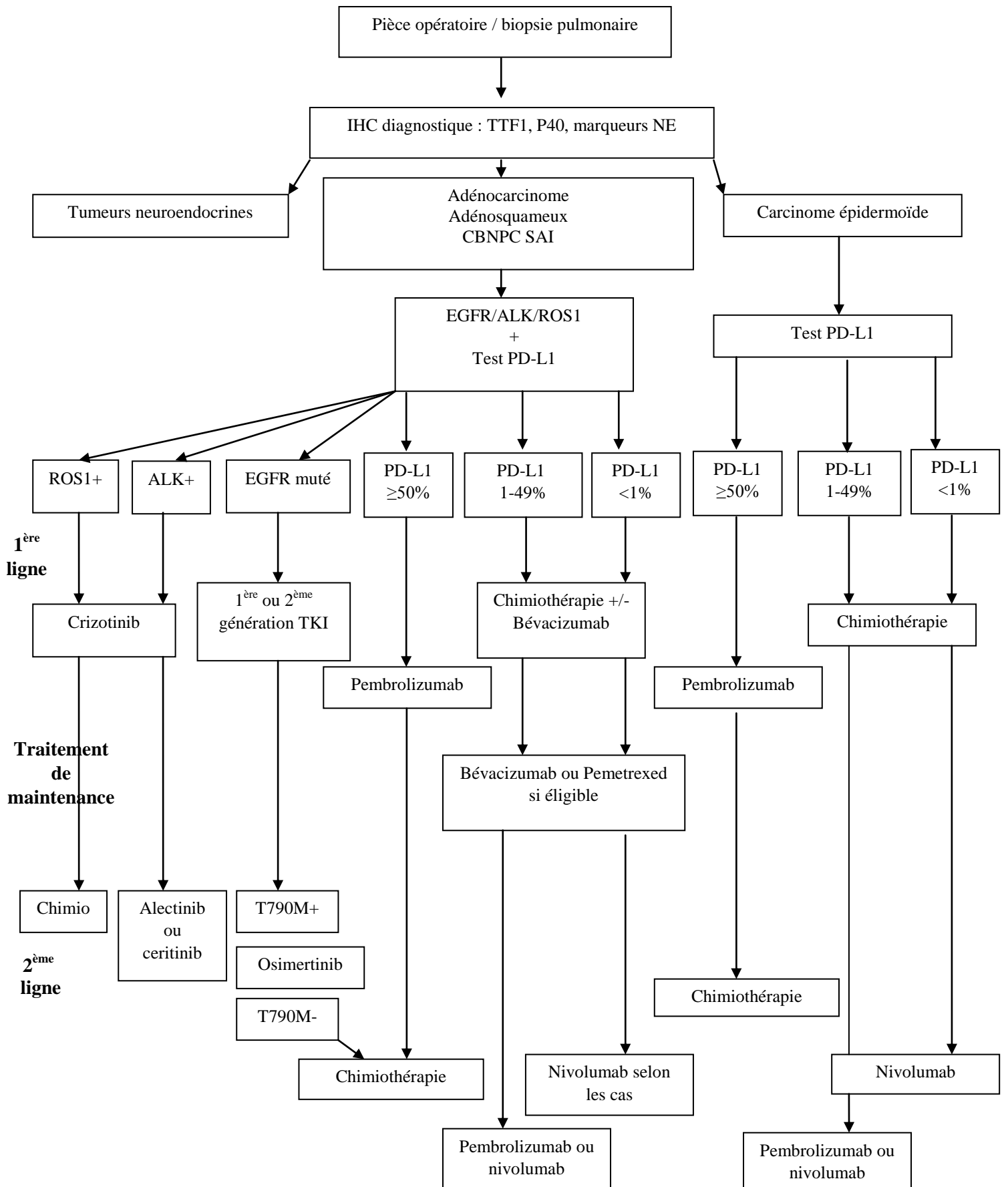


Figure 100 : Proposition d’algorithme récapitulatif de la place des tests théranostiques dans la prise en charge thérapeutique des CBNPC.



## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 4 janv 2018;
2. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular pathways: next-generation immunotherapy--inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 déc 2012;18(24):6580-7.
3. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet Lond Engl.* 2 avr 2016;387(10026):1415-26.
4. Sharma P, Allison JP. Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential. *Cell.* 9 avr 2015;161(2):205-14.
5. Définition immunothérapie | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 12 janv 2018]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Dictionnaire/I/immunotherapie>
6. Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity.* 25 juill 2013;39(1):1-10.
7. 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.* 19 août 2010;363(8):711-23.
8. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 25 mars 2011;331(6024):1565-70.
9. 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.* 22 oct 2015;373(17):1627-39.
10. 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.* 9 juill 2015;373(2):123-35.
11. 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. *The Lancet.* 9 avr 2016;387(10027):1540-50.
12. Brahmer JR, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Health-related quality-of-life results for pembrolizumab versus chemotherapy in advanced, PD-L1-positive NSCLC (KEYNOTE-024): a multicentre, international, randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol.* déc 2017;18(12):1600-9.
13. Hofman P, Ilié M, Lassalle S, Long E, Bence C, Butori C, et al. Immunohistochimie PD-1/PD-L1 en oncologie thoracique : où en sommes-nous ? *Ann Pathol.* 1 févr 2017;37(1):39-45.

14. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 8 oct 2016;
15. Zeng D-Q, Yu Y-F, Ou Q-Y, Li X-Y, Zhong R-Z, Xie C-M, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 22 mars 2016;7(12):13765-81.
16. Feng W, Li Y, Shen L, Cai X-W, Zhu Z-F, Chang J-H, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with completely resected stage IIIA(N2) non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 9 févr 2016;7(6):7227-40.
17. Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, de Montpréville V, et al. CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 avr 2015;194(7):3475-86.
18. Becht E, Giraldo NA, Dieu-Nosjean M-C, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Cancer immune contexture and immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* avr 2016;39:7-13.
19. Semeraro M, Adam J, Stoll G, Louvet E, Chaba K, Poirier-Colame V, et al. The ratio of CD8(+)/FOXP3 T lymphocytes infiltrating breast tissues predicts the relapse of ductal carcinoma in situ. *Oncoimmunology.* 2016;5(10):e1218106.
20. Vanpouille-Box C, Galluzzi L. CD103+ cells at the forefront of anticancer immunity. *Oncoimmunology.* 2017;6(11):e1356154.
21. Koh J, Kim S, Kim M-Y, Go H, Jeon YK, Chung DH. Prognostic implications of intratumoral CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes in pulmonary squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 21 févr 2017;8(8):13762-9.
22. 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.* 3 avr 2015;348(6230):124-8.
23. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001;410(6832):1107-11.
24. Oliveira Cobucci RN, Saconato H, Lima PH, Rodrigues HM, Prudêncio TL, Junior JE, et al. Comparative incidence of cancer in HIV-AIDS patients and transplant recipients. *Cancer Epidemiol.* avr 2012;36(2):e69-73.
25. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* nov 2002;3(11):991-8.
26. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 29 sept 2006;313(5795):1960-4.

27. Smyth MJ, Thia KYT, Street SEA, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, et al. Differential Tumor Surveillance by Natural Killer (Nk) and Nkt Cells. *J Exp Med*. 21 févr 2000;191(4):661-8.
28. Roder JC, Haliotis T, Klein M, Korec S, Jett JR, Ortaldo J, et al. A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells. *Nature*. 10 avr 1980;284(5756):553-5.
29. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *The Lancet*. 25 nov 2000;356(9244):1795-9.
30. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*. janv 2016;16(1):7-19.
31. Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol*. févr 2011;11(2):131-42.
32. Pahl J, Cerwenka A. Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity. *Immunobiology*. janv 2017;222(1):11-20.
33. Tesone AJ, Svoronos N, Allegranza MJ, Conejo-Garcia JR. Pathological mobilization and activities of dendritic cells in tumor-bearing hosts: challenges and opportunities for immunotherapy of cancer. *Front Immunol*. 10 déc 2013;4:435.
34. Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology*. 1 mai 2014;59(5):2034-42.
35. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*. avr 2010;22(2):231-7.
36. Bourgeois C, Tanchot C. Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. *Eur J Immunol*. déc 2003;33(12):3225-31.
37. Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, Paulos CM. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Front Immunol*. 2014;5:276.
38. Snyder A, Chan TA. Immunogenic peptide discovery in cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev*. févr 2015;30:7-16.
39. Granier C, Soumelis V, Mandavit M, Gibault L, Belazzoug R, de Guillebon E, et al. Les « immune checkpoints », comment ça marche. *Ann Pathol*. 1 févr 2017;37(1):18-28.
40. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 22 mars 2012;12(4):252-64.
41. Abbas AK. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. 5ème édition. Elsevier Masson; 2016. (Campus référence).

42. Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Dalton WS. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood*. 1 déc 1997;90(11):4266-70.
43. Hersey P, Zhang XD. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer*. nov 2001;1(2):142-50.
44. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 10 juill 1997;388(6638):190-5.
45. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gibrilovich DI. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends Immunol*. mars 2016;37(3):208-20.
46. Tanchot C, Terme M, Pere H, Tran T, Benhamouda N, Strioga M, et al. Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells: Phenotype, Role, Mechanism of Expansion In Situ and Clinical Significance. *Cancer Microenviron*. 27 oct 2012;6(2):147-57.
47. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 13 avr 2015;27(4):450-61.
48. Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M, Ibañez-Vea M, Breckpot K, Kochan G, et al. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget*. 1 août 2017;8(31):51936-45.
49. Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levra MG, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. sept 2016;27(suppl 5):v1-27.
50. Sandler BJ, Wang Z, Hancock JG, Boffa DJ, Detterbeck FC, Kim AW. Gender, Age, and Comorbidity Status Predict Improved Survival with Adjuvant Chemotherapy Following Lobectomy for Non-small Cell Lung Cancers Larger than 4 cm. *Ann Surg Oncol*. févr 2016;23(2):638-45.
51. Horn L, Spigel DR, Vokes EE, Holgado E, Ready N, Steins M, et al. Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Two-Year Outcomes From Two Randomized, Open-Label, Phase III Trials (CheckMate 017 and CheckMate 057). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 déc 2017;35(35):3924-33.
52. Duruisseaux M, Rouquette I, Adam J, Cortot A, Cazes A, Gibault L, et al. Efficacité des inhibiteurs du checkpoint immunitaire PD-1/PD-L1 et testing PD-L1 dans les cancers thoraciques. *Ann Pathol*. 1 févr 2017;37(1):61-78.
53. Rizvi NA, Hellmann MD, Brahmer JR, Juergens RA, Borghaei H, Gettinger S, et al. Nivolumab in Combination With Platinum-Based Doublet Chemotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 sept 2016;34(25):2969-79.

54. Gettinger S, Rizvi NA, Chow LQ, Borghaei H, Brahmer J, Ready N, et al. Nivolumab Monotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 sept 2016;34(25):2980-7.
55. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, Creelan B, Horn L, Steins M, et al. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 22 2017;376(25):2415-26.
56. 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. *The Lancet*. 6 mai 2016;387(10030):1837-46.
57. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 21 janv 2017;389(10066):255-65.
58. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 16 nov 2017;377(20):1919-29.
59. Rizvi N, Barlesi F, Brahmer J, Felip E, Forde P, Garassino M, et al. Phase III, randomized, open-label study of durvalumab (MEDI4736) in combination with tremelimumab or durvalumab alone versus platinum-based chemotherapy in first-line treatment of patients with advanced/metastatic NSCLC: MYSTIC. *J Immunother Cancer*. 4 nov 2015;3(Suppl 2):P171.
60. Gulley JL, Rajan A, Spigel DR, Iannotti N, Chandler J, Wong DJL, et al. Avelumab for patients with previously treated metastatic or recurrent non-small-cell lung cancer (JAVELIN Solid Tumor): dose-expansion cohort of a multicentre, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. mai 2017;18(5):599-610.
61. Marciscano AE, Gulley JL. Avelumab demonstrates promise in advanced NSCLC. *Oncotarget*. 13 nov 2017;8(61):102767-8.
62. Weber JS, Hodi FS, Wolchok JD, Topalian SL, Schadendorf D, Larkin J, et al. Safety Profile of Nivolumab Monotherapy: A Pooled Analysis of Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. mars 2017;35(7):785- 92.
63. Weber JS, Yang JC, Atkins MB, Disis ML. Toxicities of Immunotherapy for the Practitioner. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 juin 2015;33(18):2092- 9.
64. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 avr 2014;32(10):1020- 30.
65. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med*. 11 2018;378(2):158- 68.

66. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 25 juin 2015;372(26):2521- 32.
67. Khoja L, Day D, Wei-Wu Chen T, Siu LL, Hansen AR. Tumour- and class-specific patterns of immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1 oct 2017;28(10):2377- 85.
68. Haanen JB a. G, Carbonnel F, Robert C, Kerr KM, Peters S, Larkin J, et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1 juill 2017;28(suppl\_4):iv119-iv142.
69. Horvat TZ, Adel NG, Dang T-O, Momtaz P, Postow MA, Callahan MK, et al. Immune-Related Adverse Events, Need for Systemic Immunosuppression, and Effects on Survival and Time to Treatment Failure in Patients With Melanoma Treated With Ipilimumab at Memorial Sloan Kettering Cancer Center. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 oct 2015;33(28):3193- 8.
70. Hua C, Boussemart L, Mateus C, Routier E, Boutros C, Cazenave H, et al. Association of Vitiligo With Tumor Response in Patients With Metastatic Melanoma Treated With Pembrolizumab. *JAMA Dermatol.* janv 2016;152(1):45- 51.
71. Schadendorf D, Wolchok JD, Hodi FS, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, et al. Efficacy and Safety Outcomes in Patients With Advanced Melanoma Who Discontinued Treatment With Nivolumab and Ipilimumab Because of Adverse Events: A Pooled Analysis of Randomized Phase II and III Trials. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 déc 2017;35(34):3807- 14.
72. O'Donnell JS, Long GV, Scolyer RA, Teng MWL, Smyth MJ. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treat Rev.* janv 2017;52:71- 81.
73. Cartron G, Viens P. Les cibles de l'immunité. JOHN LIBBEY EUROTTEXT. (Thérapie ciblée des cancers; vol. 8).
74. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med.* 1 sept 2016;375(9):819- 29.
75. D'Urso CM, Wang ZG, Cao Y, Tataka R, Zeff RA, Ferrone S. Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *J Clin Invest.* janv 1991;87(1):284- 92.
76. Gainor JF, Shaw AT, Sequist LV, Fu X, Azzoli CG, Piotrowska Z, et al. EGFR Mutations and ALK Rearrangements Are Associated with Low Response Rates to PD-1 Pathway Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 sept 2016;22(18):4585- 93.
77. Jiang L, Su X, Zhang T, Yin X, Zhang M, Fu H, et al. PD-L1 expression and its relationship with oncogenic drivers in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Oncotarget.* 18 avr 2017;8(16):26845- 57.

78. Rangachari D, VanderLaan PA, Shea M, Le X, Huberman MS, Kobayashi SS, et al. Correlation between Classic Driver Oncogene Mutations in EGFR, ALK, or ROS1 and 22C3-PD-L1  $\geq 50\%$  Expression in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. mai 2017;12(5):878- 83.
79. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med*. 21 déc 2017;377(25):2500- 1.
80. Chan TA, Wolchok JD, Snyder A. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med*. 12 nov 2015;373(20):1984- 1984.
81. 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*. 9 oct 2015;350(6257):207- 11.
82. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 26 2017;168(3):542.
83. 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*. 3 avr 2015;348(6230):124- 8.
84. Jha P. Deaths and taxes: stronger global tobacco control by 2025. *Lancet Lond Engl*. 14 mars 2015;385(9972):918- 20.
85. Oberg M, Jaakkola MS, Woodward A, Peruga A, Prüss-Ustün A. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *Lancet Lond Engl*. 8 janv 2011;377(9760):139- 46.
86. Wiencke JK. DNA adduct burden and tobacco carcinogenesis. *Oncogene*. 21 oct 2002;21(48):7376- 91.
87. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Lond Engl*. 17 févr 2001;357(9255):539- 45.
88. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 29 sept 2006;313(5795):1960- 4.
89. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 15 2012;12(4):298- 306.
90. Teng MWL, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 1 juin 2015;75(11):2139- 45.
91. Mihm MC, Mulé JJ. Reflections on the Histopathology of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Melanoma and the Host Immune Response. *Cancer Immunol Res*. août 2015;3(8):827- 35.

92. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med.* 28 août 2013;5(200):200ra116.
93. Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 Pathway Blockade for Cancer Therapy: Mechanisms, Response Biomarkers and Combinations. *Sci Transl Med.* 2 mars 2016;8(328):328rv4.
94. Al-Shibli KI, Donnem T, Al-Saad S, Persson M, Bremnes RM, Busund L-T. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 août 2008;14(16):5220- 7.
95. Teng F, Meng X, Wang X, Yuan J, Liu S, Mu D, et al. Expressions of CD8+TILs, PD-L1 and Foxp3+TILs in stage I NSCLC guiding adjuvant chemotherapy decisions. *Oncotarget.* 27 sept 2016;7(39):64318- 29.
96. Ilie M, Falk AT, Butori C, Chamorey E, Bonnetaud C, Long E, et al. PD-L1 expression in basaloid squamous cell lung carcinoma: Relationship to PD-1(+) and CD8(+) tumor-infiltrating T cells and outcome. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* déc 2016;29(12):1552- 64.
97. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 27 nov 2014;515(7528):568- 71.
98. 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.* 27 nov 2014;515(7528):563- 7.
99. Le Floc'h A, Jalil A, Vergnon I, Le Maux Chansac B, Lazar V, Bismuth G, et al. Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *J Exp Med.* 19 mars 2007;204(3):559- 70.
100. Webb JR, Milne K, Watson P, Deleeuw RJ, Nelson BH. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 janv 2014;20(2):434- 44.
101. Wang B, Wu S, Zeng H, Liu Z, Dong W, He W, et al. CD103+ Tumor Infiltrating Lymphocytes Predict a Favorable Prognosis in Urothelial Cell Carcinoma of the Bladder. *J Urol.* août 2015;194(2):556- 62.
102. Webb JR, Milne K, Nelson BH. Location, location, location. *Oncoimmunology [Internet].* 10 janv 2014 [cité 11 janv 2018];3. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4121334/>
103. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(5):275- 87.



104. Duruisseaux M, Lize-Dufranc C, Badoual C, Bibeau F. [Predictive biomarkers of efficacy of checkpoint blockade inhibitors in cancer treatment]. *Ann Pathol.* févr 2017;37(1):46- 54.
105. Rashed HE, Abdelrahman AE, Abdelgawad M, Balata S, Shabrawy ME. Prognostic Significance of Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1), CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and p53 in Non-Small Cell Lung Cancer: An Immunohistochemical Study. *Turk Patoloji Derg.* 2017;1(1):211- 22.
106. Sznol M, Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 mars 2013;19(5):1021- 34.
107. opdivo\_cbnpc\_non\_epidermoide\_21092016\_transcription.pdf [Internet]. [cité 20 janv 2018]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-03/opdivo\\_cbnpc\\_non\\_epidermoide\\_21092016\\_transcription.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-03/opdivo_cbnpc_non_epidermoide_21092016_transcription.pdf)
108. Efficacité des inhibiteurs du checkpoint immunitaire PD-1/PD-L1 et testing PD-L1 dans les cancers thoraciques - ScienceDirect [Internet]. [cité 10 nov 2017]. Disponible sur: <https://www-sciencedirect-com.docelec.u-bordeaux.fr/science/article/pii/S0242649816301766#fig0030>
109. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* févr 2017;12(2):208- 22.
110. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, Jöhrens K, Kirchner T, Reu S, et al. Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* oct 2016;29(10):1165- 72.
111. Cogswell J, Inzunza HD, Wu Q, Feder JN, Mintier G, Novotny J, et al. An Analytical Comparison of Dako 28-8 PharmDx Assay and an E1L3N Laboratory-Developed Test in the Immunohistochemical Detection of Programmed Death-Ligand 1. *Mol Diagn Ther.* févr 2017;21(1):85- 93.
112. Rimm DL, Han G, Taube JM, Yi ES, Bridge JA, Flieder DB, et al. A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 9 mars 2017;
113. Adam J, Le Stang N, Rouquette I, Cazes A, Badoual C, Pinot-Roussel H, et al. Multicenter French harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 16 janv 2018;
114. Heymann JJ, Bulman WA, Swinarski D, Pagan CA, Crapanzano JP, Haghghi M, et al. PD-L1 expression in non-small cell lung carcinoma: Comparison among cytology, small biopsy, and surgical resection specimens. *Cancer.* déc 2017;125(12):896- 907.
115. Stoy SP, Rosen L, Mueller J, Murgu S. Programmed death-ligand 1 testing of lung cancer cytology specimens obtained with bronchoscopy. *Cancer.* 20 oct 2017;

116. Adam J, Planchard D, Marabelle A, Soria J-C, Scazec J-Y, Lantuéjoul S. Évaluation de l'expression de PD-L1 en immunohistochimie : un biomarqueur émergent dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules. *Ann Pathol.* janv 2016;36(1):94- 102.
117. 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.* 21 mai 2015;372(21):2018- 28.
118. Uruga H, Bozkurtlar E, Huynh TG, Muzikansky A, Goto Y, Gomez-Caraballo M, et al. Programmed Cell Death Ligand (PD-L1) Expression in Stage II and III Lung Adenocarcinomas and Nodal Metastases. *J Thorac Oncol.* 1 mars 2017;12(3):458- 66.
119. Ilie M, Long-Mira E, Bence C, Butori C, Lassalle S, Bouhleb 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 Off J Eur Soc Med Oncol.* janv 2016;27(1):147- 53.
120. Kao C-J, Wurz GT, Lin Y-C, Vang DP, Griffey SM, Wolf M, et al. Assessing the Effects of Concurrent versus Sequential Cisplatin/Radiotherapy on Immune Status in Lung Tumor-Bearing C57BL/6 Mice. *Cancer Immunol Res.* juill 2015;3(7):741 - 50.
121. Roche. VENTANA PD-L1 (SP142) IHC Assay. Staining of Non-small Cell Lung Cancer Universal Training. Assessment guide.
122. Hématologie | Polycopié national du collège des enseignants <br> Cours de Médecine en Ligne [Internet]. [cité 19 janv 2018]. Disponible sur: <http://www.fascicules.fr/polycopies-hematologie-7.html>
123. Travis W, Brambilla E, Burke A, Marx A, Nicholson A. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4ème édition. 2015. (International Agency for Research on Cancer).
124. Fridman WH. Historique de l'immunothérapie. Changement de paradigme ? *Bull Cancer (Paris).* 1 nov 2016;103:S122- 6.
125. Ray-Coquard I, Cropet C, Van Glabbeke M, Sebban C, Le Cesne A, Judson I, et al. Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res.* 1 juill 2009;69(13):5383- 91.
126. Sun R, Champiat S, Dercle L, Aspeslagh S, Castanon E, Limkin EJ, et al. Baseline lymphopenia should not be used as exclusion criteria in early clinical trials investigating immune checkpoint blockers (PD-1/PD-L1 inhibitors). *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2017;84:202- 11.
127. Koh J, Go H, Keam B, Kim M-Y, Nam SJ, Kim TM, et al. Clinicopathologic analysis of programmed cell death-1 and programmed cell death-ligand 1 and 2 expressions in pulmonary adenocarcinoma: comparison with histology and driver oncogenic alteration status. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* sept 2015;28(9):1154- 66.

128. Ng Kee Kwong F, Laggner U, Mc Kinney O, Croud J, Rice A, Nicholson AG. Expression of PD-L1 correlates with pleomorphic morphology and histological patterns of non-small cell lung carcinomas. *Histopathology*. 11 janv 2018;
129. Koh J, Kim S, Kim M-Y, Go H, Jeon YK, Chung DH. Prognostic implications of intratumoral CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes in pulmonary squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 21 févr 2017;8(8):13762- 9.

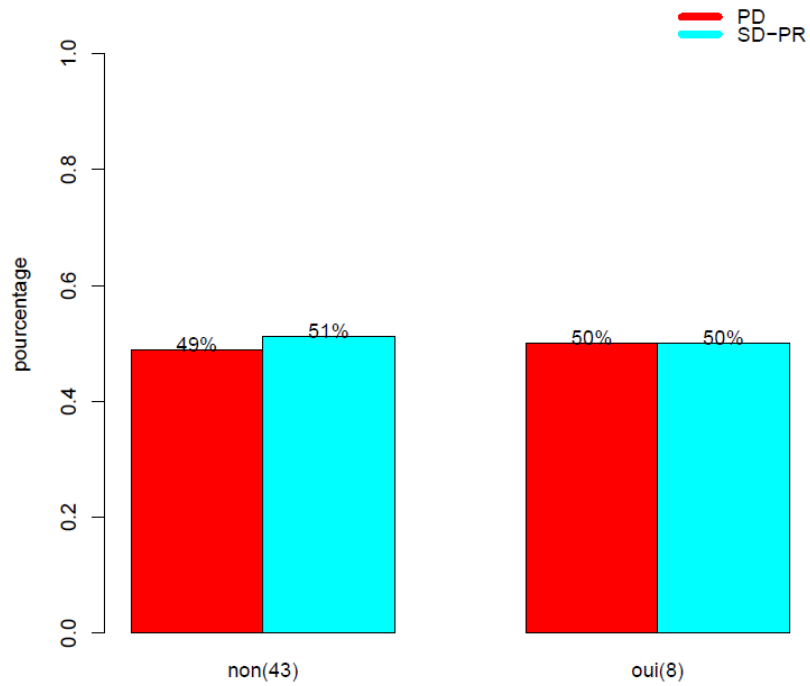
## **ANNEXES**

---

Etudes	Histologie	Objectif principal	Ligne de traitement, critères d'inclusion et statut PD-L1	Clone utilisé	Thérapeutiques comparées	Taux de réponse objective (%)	Durée de réponse médiane (médiane, mois)	Survie sans progression (médiane, mois)	Survie globale (médiane, mois)
<b>CHECKMATE 017</b> <i>D'après Brahmer et al.</i>	Epidermoïde	Survie globale	2 <sup>ème</sup> ligne Absence de sélection sur le statut PD-L1 des CT	28.8 Agilent Dako	Nivolumab (n=135)	20	Non atteinte	3,5 HR 0,62 ; IC95%, 0,47 à 0,81 ; p<0,001	9,2 HR 0,59 ; IC95%, 0,44 à 0,79 ; p<0,001
					Docétaxel (n=137)	9	8,4	2,8	6,0
<b>CHECKMATE 057</b> <i>D'après Borghaei et al.</i>	Non-épidermoïdes	Survie globale	2 <sup>ème</sup> ligne EGFR/ALK positifs incluables si prétraités par ITK Absence de sélection sur le statut PD-L1 des CT	28.8 Agilent Dako	Nivolumab (n=292)	19	17,2	2,3	12,2 HR 0,73 ; IC95%, 0,59 à 0,89 ; P=0,002
					Docétaxel (n=290)	12	5,6	4,2	9,4
<b>CHECKMATE 026</b> <i>D'après Carbone et al.</i>	CBNPC	Survie sans progression	1 <sup>ère</sup> ligne Statut PD-L1 des CT≥5%	28.8 Agilent Dako	Nivolumab (n=211)	26	2,8	4,2 HR 1,15 ; IC95%, 0,91 à 1,45 ; p=0,25	14,4 HR 1,02 ; IC95%, 0,80 à 1,30
					Doublet à base de platine (n= 212)	33	2,6	5,9	13,2
<b>KEYNOTE-010</b> <i>D'après Herbst et al.</i>	CBNPC	Survie globale Survie sans progression	Echec d'une 1 <sup>ère</sup> ligne EGFR/ALK positifs incluables si prétraités par ITK Statut PD-L1 des CT≥1%	22C3 Agilent Dako	Pembrolizumab 2 mg/kg (n=345)	18	Non atteinte	3,9 HR 0,88 ; IC95%, 0,74 à 1,05 ; p=0,07	10,4 HR 0,71 ; IC95%, 0,58 à 0,88 ; p=0,0008
					Pembrolizumab 10 mg/kg (n=346)	18	Non atteinte	4,0 HR 0,79 ; IC95%, 0,66 à 0,94 ; p=0,004	12,7 HR 0,61 ; IC95%, 0,49 à 0,75 ; p<0,0001
					Docétaxel (n=343)	9	6	4,0	8,5
<b>KEYNOTE-024</b> <i>D'après Reck et al.</i>	CBNPC	Survie sans progression	1 <sup>ère</sup> ligne Statut PD-L1 des CT≥50%	22C3 Agilent Dako	Pembrolizumab 200 mg/3 semaines (n=154)	44,8	Non atteinte	10,3 HR 0,50 IC95%, 0,37 à 0,68 ; p<0,001	HR 0,60; IC 95% 0,41 à 0,89; p=0,005
					Doublet à base de platine (n=151)	27,8	6,3	6	
<b>OAK</b> <i>D'après Rittmeyer et al.</i>	CBNPC	Survie globale	2 <sup>ème</sup> et 3 <sup>ème</sup> ligne EGFR/ALK positifs incluables si prétraités par ITK Absence de sélection sur le statut PD-L1 des CT	SP142 Roche	Atézolizumab (n=425)	14	16,3	2,8 HR 0,95 IC95%, 0,82 à 1,10	13,8 HR 0,73 IC95%, 0,62 à 0,87 ; p=0,0003
					Docétaxel (n=425)	13	6,2	4,0	9,6

CT : cellules tumorales HR= Hazard ratio ; IC= Intervalle de confiance

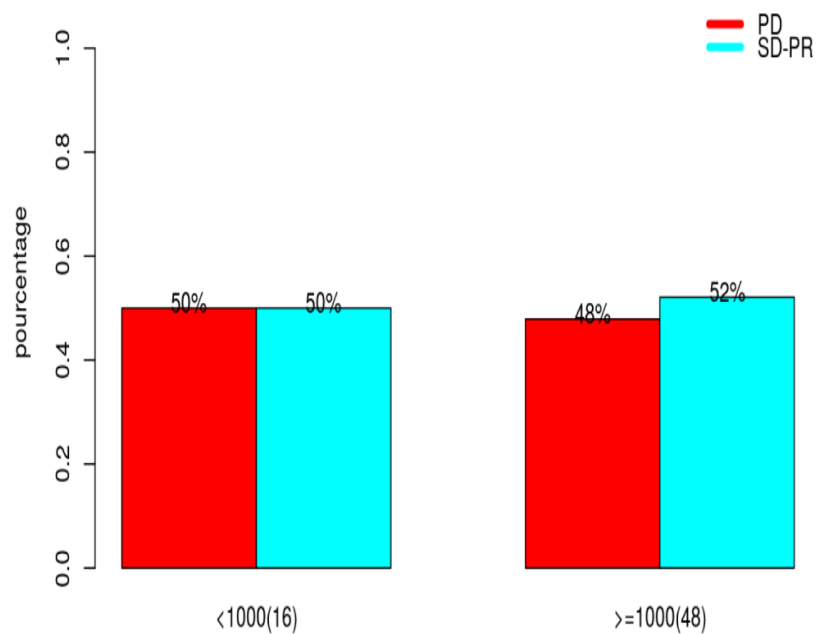
Annexe 1 : Essais thérapeutiques randomisés de phase III comparant une immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 et un bras contrôle de chimiothérapie standard dans les CBNPC.



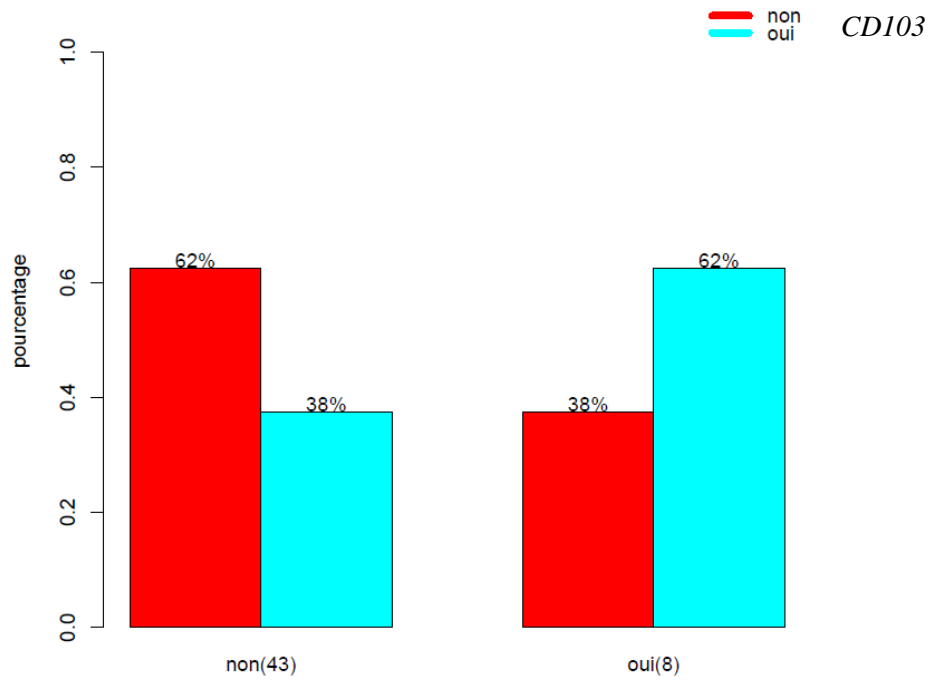
Annexe 2 : Réponse RECIST en fonction de l'expression de PD-L1 par les CI (p=1).

Non : 0<1% ; Oui : 1 : 1-4%.

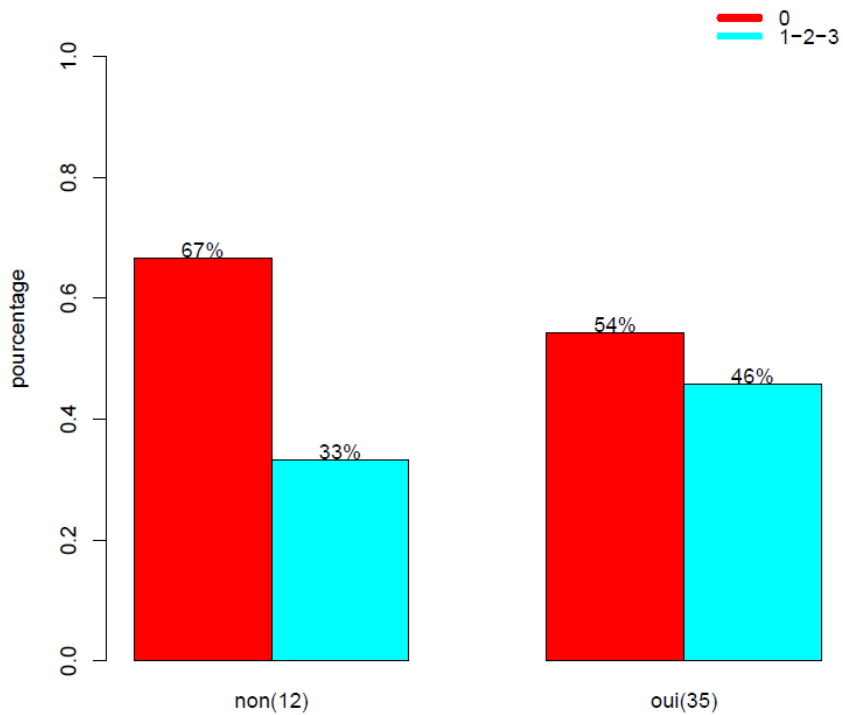
*SD : Stable disease PD : Progressive disease PR : Partial Response.*



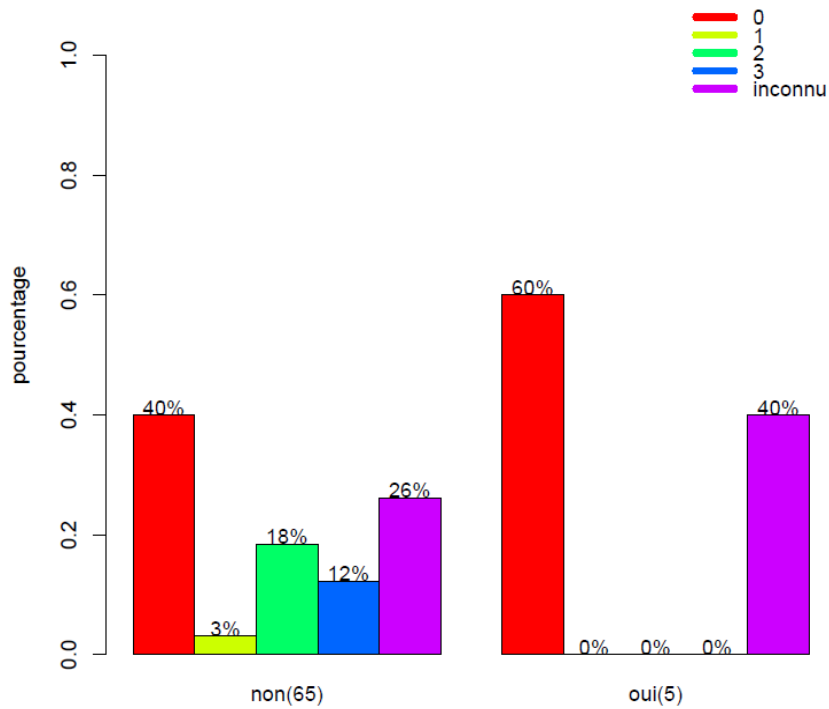
Annexe 3 : Réponse RECIST en fonction de la présence ou non d'une lymphopénie (p=0,885).



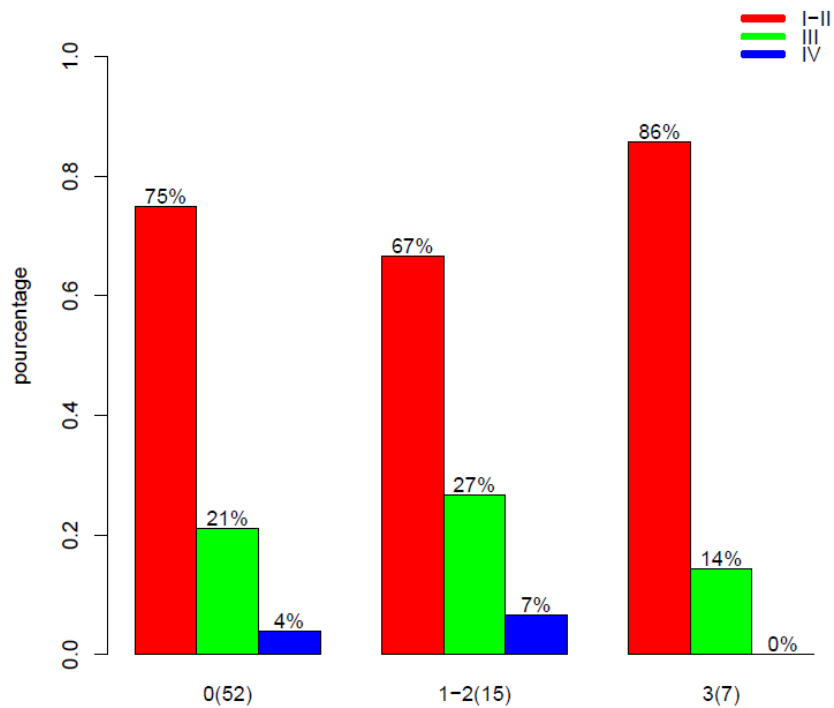
Annexe 4 : Présence de CI intra-tumorales CD103+ (oui/non) en fonction du statut PD-L1 des CI (p=0,251). Non : 0<1% ; Oui : 1 : 1-4%.



Annexe 5 : Statut PD-L1 des CT en fonction de la présence de CI intra-tumorales CD8+ (oui/non) (p=0,454). CT : score sur les cellules tumorales : 0 : <1% ; 1-2-3 : ≥1%.



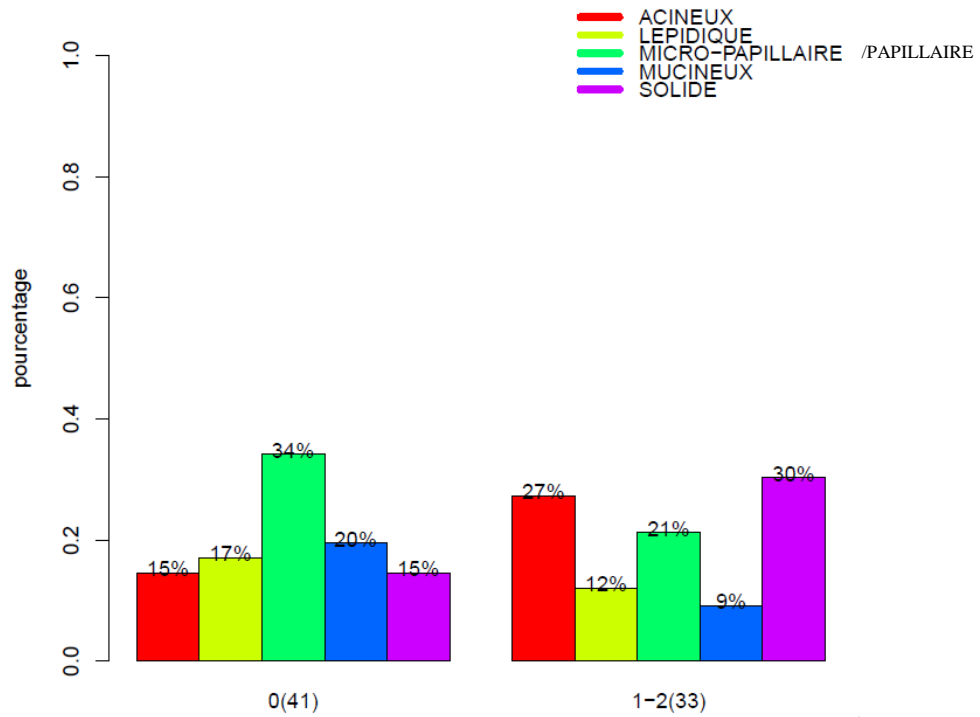
Annexe 6: Statut PD-L1 des CT en fonction de l'apparition d'effets secondaires sous immunothérapie (p=0,801). *CT : score sur les cellules tumorales : 0 : <1% ; 1: 1-4% ; 2 : 5-49% ; 3 : ≥50%.*



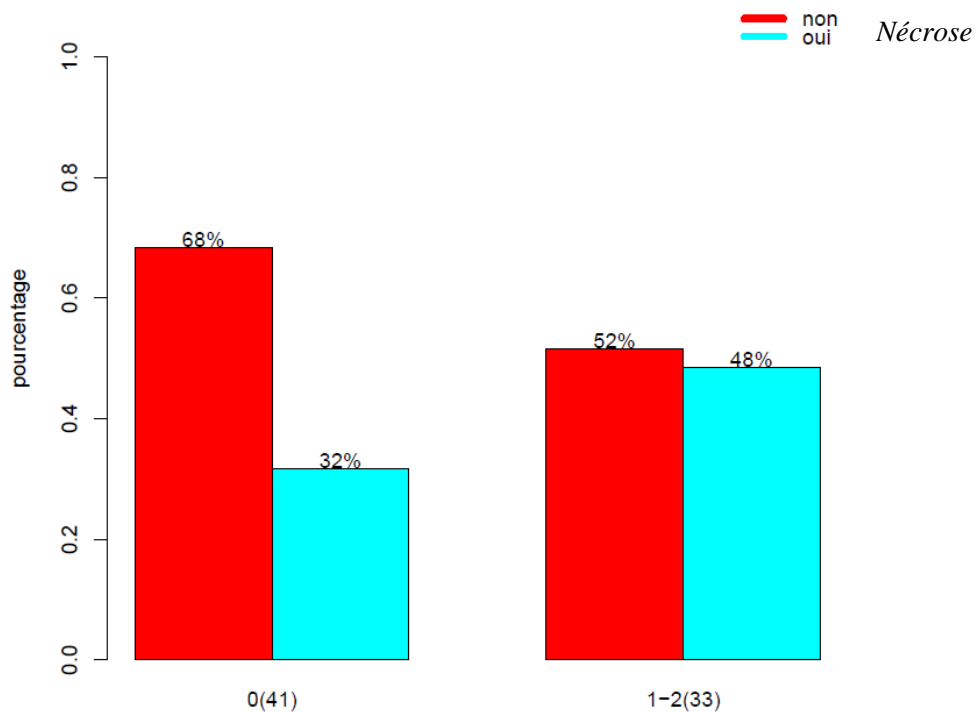
Annexe 7 : Stade tumoral au diagnostic en fonction du statut PD-L1 des CT (p=0,852).

*CT : score sur les cellules tumorales : 0 : <1% ; 1-2 : 1-49% ; 3 : ≥1%.*

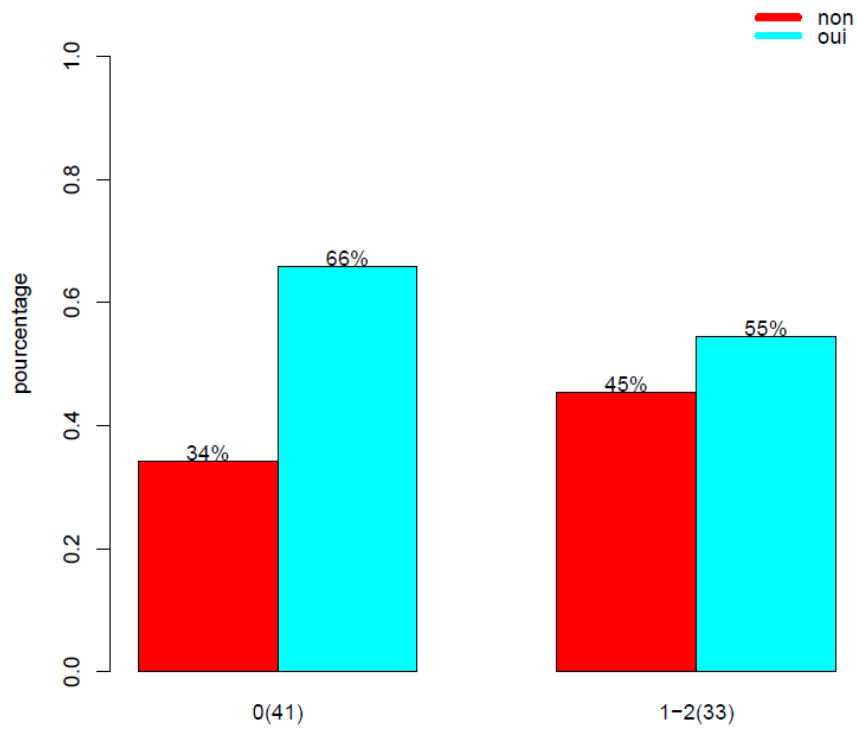




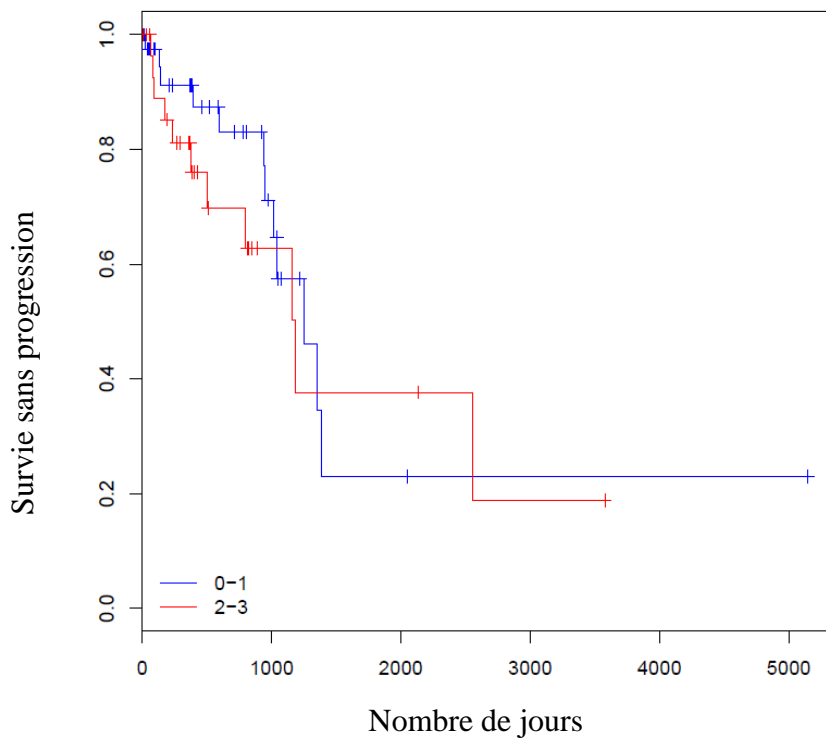
Annexe 8 : Répartition des sous-types d'adénocarcinome en fonction du statut PD-L1 des CI (p=0,195). 0 < 1% ; 1- 2 : 1-9%.



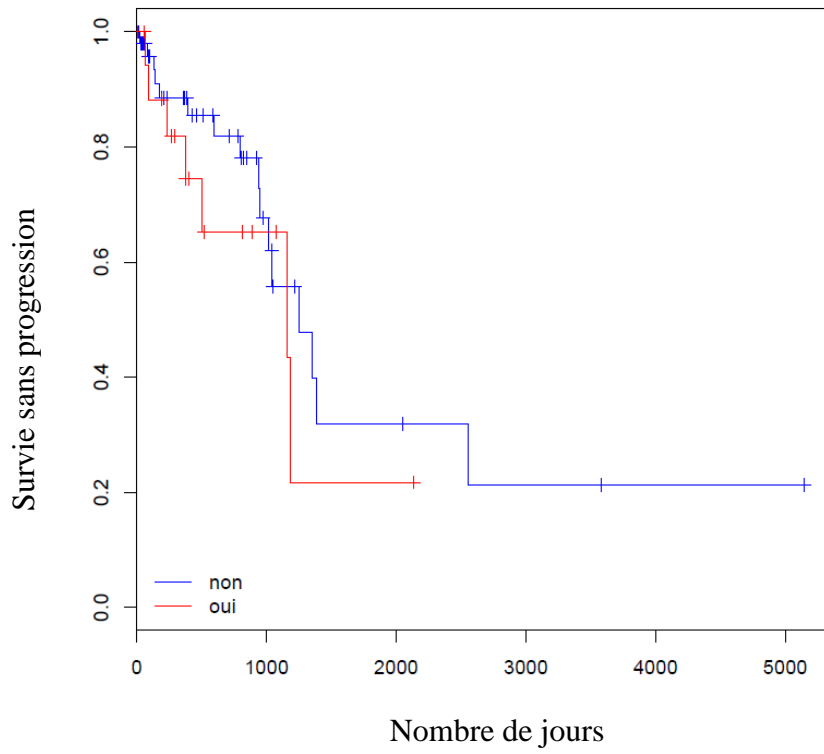
Annexe 9 : Présence de nécrose tumorale en fonction du statut PD-L1 des CI (p=0,142).



Annexe 10 : Présence d'une mutation en fonction du statut PD-L1 des CI ( $p=0,322$ ).  $0 < 1\%$  ;  $1-2 : 1-9\%$ .



Annexe 11 : Survie sans progression en fonction du statut CD8 des CI intra-tumorales ( $p=0,477$ ).  $0-1 : 1-4\%$  ;  $2-3 : 5-10\%$ .



Annexe 12: Survie sans progression en fonction de la présence de CI intra-tumorales CD103+ (p=0,378).

## SERMENT D'HIPPOCRATE

---

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

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

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

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

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

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

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

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

## SUMMARY FIRST PART

### AIMS

PD-L1 expression is the only biomarker currently used to predict efficiency of immune checkpoint inhibitors but it is an imperfect and variable biomarker. Nivolumab demonstrated improved survival over docetaxel in patients who experience failure with platinum doublet therapy independently of PD-L1 expression. In the present study, we evaluated overall survival and response rate of patients who had advanced NSCLC treated with nivolumab in second line according to PD-L1 expression.

### METHODS

PD-L1 expression was evaluated retrospectively in 70 pretreatment tumor-biopsy specimens, independently of histological type, with the SP142 scoring on tumor cells and immun cells (TC0 : PD-L1<1% ; TC1 1-4% ; TC2 : 5-49% ; TC3  $\geq$ 50% et IC0 : PD-L1<1% ; IC1 1-4% ; IC2 : 5-10% ; IC3  $\geq$ 10%).

The antibody used is a monoclonal antibody anti-PD-L1 (E1L3N, *Cell Signaling*) with a Leica Bond III automat. Tumor microenvironment was also evaluated with antibodies anti-CD8 and anti-CD103.

### RESULTS

PD-L1 was tested over 72,8% of patients with 41,4% TC0, 2,9% TC1, 17,1% TC2 et 11,4% TC3. Overall survival was not significantly different according to PD-L1 expression by tumor cells ( $p=0,203$ ) or immun cells ( $p=0,662$ ). The response rate was 88% with PD-L1 expression  $\geq$ 50%, 48% with PD-L1= 1-49% and 36% with PD-L1<1% but they were not significantly different ( $p=0,069$ ). Intratumoral immun cells CD103+ or CD8+ did not demonstrate improved survival or better response but CD103 was associated with PD-L1 expression.

### CONCLUSION:

PD-L1 expression by tumor cells or immune cells don't seem to influence overall survival or therapeutic response with nivolumab.

## SECOND PART

### AIMS

PD-L1 was an imperfect biomarker. Therefore, biomarkers such as tumor mutation burden or tumor microenvironment were developed. In this second part, we evaluated histopronostic factors associated with PD-L1 expression and the value of intratumoral immun cells CD103+ or CD8+ as biomarkers.

### METHODS

PD-L1, CD8 and CD103 expressions were evaluated retrospectively in 74 pretreatment tumor-surgical specimens of pulmonary adenocarcinoma. Histological type and realization of molecular analysis were selection criteria. We used the same scoring as the first part.

### RESULTS

Solid adenocarcinoma, tumor necrosis, mitosis and immune cells CD8+ were histopronostic factors associated with PD-L1 expression by tumor cells ( $p<0,001$ ). A driver mutation seems to decrease PD-L1 expression. CD103+ immun cells were associated with PD-L1 expression by tumor cells ( $p=0,001$ ) and immun cells ( $p=0,003$ ) with a progressive increase. There isn't CD103 heterogeneity expression and CD103 was easier to use in practice. Free-progression survival seems to be longer when PD-L1 expression decreases ( $p=0,0189$ ). There is not significant difference according to CD103 or CD8 expression of intratumoral immun cells.

### CONCLUSION

Intratumoral immun cells CD103+ is a promising biomarker. A larger study is needed to confirm this hypothesis and to find specific cut-offs.