

Détermination du PD-L1 sur cellules tumorales circulantes : une nouvelle variable pronostique dans le carcinome bronchique non à petites cellules

Léa Sinoquet

▶ **To cite this version:**

Léa Sinoquet. Détermination du PD-L1 sur cellules tumorales circulantes : une nouvelle variable pronostique dans le carcinome bronchique non à petites cellules. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03345245

HAL Id: dumas-03345245

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03345245

Submitted on 15 Sep 2021

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

UNIVERSITE DE MONTPELLIER

FACULTE DE MEDECINE MONTPELLIER – NIMES

THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Léa SINOQUET

Le 12 février 2021

Détermination du PD-L1 sur cellules tumorales circulantes : Une nouvelle variable pronostique dans le carcinome bronchique non à petites cellules

Directeur de thèse : Professeur Xavier QUANTIN

JURY

Président :	Professeur Marc YCHOU
Assesseurs :	Professeur William JACOT
	Docteur Catherine ALIX-PANABIERES
Docteur en médecine :	Professeur Xavier QUANTIN

UNIVERSITE DE MONTPELLIER

FACULTE DE MEDECINE MONTPELLIER – NIMES

THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Léa SINOQUET

Le 12 février 2021

Détermination du PD-L1 sur cellules tumorales circulantes : Une nouvelle variable pronostique dans le carcinome bronchique non à petites cellules

Directeur de thèse : Professeur Xavier QUANTIN

JURY

Président :	Professeur Marc YCHOU
Assesseurs :	Professeur William JACOT
	Docteur Catherine ALIX-PANABIERES
Docteur en médecine :	Professeur Xavier QUANTIN

Université de Montpellier
FACULTÉ de MÉDECINE
Montpellier-Nîmes

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs Honoraires

ALBAT Bernard	BRUNEL Michel	HUMEAU Claude	MIRO Luis
ALLIEU Yves	CANAUD Bernard	JAFFIOL Claude	NAVARRO Maurice
ALRIC Robert	CHAPTAL Paul-André	JANBON Charles	NAVRATIL Henri
ARNAUD Bernard	CIURANA Albert-Jean	JANBON François	OTHONIEL Jacques
ASENCIO Gérard	CLOT Jacques	JARRY Daniel	PAGES Michel
ASTRUC Jacques	COSTA Pierre	JOURDAN Jacques	PEGURET Claude
AUSSILLOUX Charles	D'ATHIS Françoise	KLEIN Bernard	PELISSIER Jacques
AVEROUS Michel	DEMAILLE Jacques	LAFFARGUE François	PETIT Pierre
AYRAL Guy	DESCOMPS Bernard	LALLEMANT Jean Gabriel	POUGET Régis
BAILLAT Xavier	DIMEGLIO Alain	LAMARQUE Jean-Louis	PUJOL Henri
BALDET Pierre	DUBOIS Jean Bernard	LAPEYRIE Henri	RABISCHONG Pierre
BALDY-MOULINIER Michel	DUJOLS Pierre	LEROUX Jean-Louis	RAMUZ Michel
BALMES Jean-Louis	DUMAS Robert	LESBROS Daniel	REBOUL Jean
BANSARD Nicole	DUMAZER Romain	LOPEZ François Michel	RIEU Daniel
BAYLET René	ECHENNE Bernard	LORIOT Jean	ROCHEFORT Henri
BILLIARD Michel	FABRE Serge	LOUBATIERES Marie Madeleine	ROUANET DE VIGNE LAVIT Jean Pierre
BLARD Jean-Marie	FREREBEAU Philippe	MAGNAN DE BORNIER Bernard	SAINT AUBERT Bernard
BLAYAC Jean Pierre	GALIFER René Benoît	MARTY ANE Charles	SANCHO-GARNIER Hélène
BLOTMAN Francis	GODLEWSKI Guilhem	MARY Henri	SANY Jacques
BONNEL François	GRASSET Daniel	MATHIEU-DAUDE Pierre	SEGNARBIEUX François
BOURGEOIS Jean-Marie	GUILHOU Jean-Jacques	MEYNADIER Jean	SENAC Jean-Paul
BOUSQUET Jean	GUITER Pierre	MICHEL François-Bernard	SERRE Arlette
BRUEL Jean Michel	HEDON berbard	MION Charles	SOLASSOL Claude
BUREAU Jean-Paul	HERTAULT Jean	MION Henri	VIDAL Jacques
			VISIER Jean Pierre

Université de Montpellier
FACULTÉ de MÉDECINE
Montpellier-Nîmes

Professeurs Emérites

ARTUS Jean-Claude	LE QUELLEC Alain
BLANC François	MARES Pierre
BONAFE Alain	MAUDELONDE Thierry
BOULENGER Jean-Philippe	MAURY Michèle
BOURREL Gérard	MESSNER Patrick
BRINGER Jacques	MILLAT Bertrand
CLAUSTRES Mireille	MONNIER Louis
DAURES Jean-Pierre	MOURAD Georges
DAUZAT Michel	PREFAUT Christian
DAVY Jean-Marc	PUJOL Rémy
DEDET Jean-Pierre	RIBSTEIN Jean
ELEDJAM Jean-Jacques	SCHVED Jean-François
GROLLEAU RAOUX Robert	SULTAN Charles
GUERRIER Bernard	TOUCHON Jacques
GUILLOT Bernard	UZIEL Alain
JONQUET Olivuer	VOISIN Michel
LANDAIS Paul	ZANCA Michel
LARREY Dominique	

Docteurs Emérites

PRAT Dominique

PUJOL Joseph

Université de Montpellier
FACULTÉ DE MÉDECINE
Montpellier-Nîmes

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

PU-PH de classe exceptionnelle

ALRIC Pierre	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option chirurgie vasculaire)
BACCINO Eric	Médecine légale et droit de la santé
BASTIEN Patrick	Parasitologie et mycologie
BEREGI Jean-Paul	Radiologie et imagerie médicale
BLAIN Hubert	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
BOULOT Pierre	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
CAPDEVILA Xavier	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
CHAMMAS Michel	Chirurgie orthopédique et traumatologique
COLSON Pascal	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
COMBE Bernard	Rhumatologie
COSTES Valérie	Anatomie et cytologie pathologiques
COTTALORDA Jérôme	Chirurgie infantile
COUBES Philippe	Neurochirurgie
COURTET Philippe	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
CRAMPETTE Louis	Oto-rhino-laryngologie
CRISTOL Jean Paul	Biochimie et biologie moléculaire
CYTEVAL Catherine	Radiologie et imagerie médicale
DE LA COUSSAYE Jean Emmanuel	Médecine d'urgence
DE WAZIERES Benoît	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
DELAPORTE Eric	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
DEMOLY Pascal	Pneumologie ; addictologie
DOMERGUE Jacques	Chirurgie viscérale et digestive

DUFFAU Hugues	Neurochirurgie
ELIAOU Jean François	Immunologie
FABRE Jean Michel	Chirurgie viscérale et digestive
FRAPIER Jean-Marc	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
HAMAMAH Samir	Biologie et Médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
HERISSON Christian	Médecine physique et de réadaptation
JABER Samir	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
JEANDEL Claude	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
JORGENSEN Christian	Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie
KOTZKI Pierre Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
LABAUGE Pierre	Neurologie
LEFRANT Jean-Yves	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
LEHMANN Sylvain	Biochimie et biologie moléculaire
LUMBROSO Serge	Biochimie et Biologie moléculaire
MERCIER Jacques	Physiologie
MEUNIER Laurent	Dermato-vénéréologie
MONDAIN Michel	Oto-rhino-laryngologie
MORIN Denis	Pédiatrie
PAGEAUX Georges-Philippe	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PUJOL Pascal	Biologie cellulaire
QUERE Isabelle	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option médecine vasculaire)
RENARD Eric	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale
REYNES Jacques	Maladies infectieuses, maladies tropicales
RIPART Jacques	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
ROUANET Philippe	Cancérologie ; radiothérapie
SOTTO Albert	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
TAOUREL Patrice	Radiologie et imagerie médicale

TOUITOU Isabelle	Génétique
VANDE PERRE Philippe	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
YCHOU Marc	Cancérologie ; radiothérapie

PU-PH de 1re classe

AGUILAR MARTINEZ Patricia	Hématologie ; transfusion
ASSENAT Éric	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
AVIGNON Antoine	Nutrition
AZRIA David	Cancérologie ; radiothérapie
BAGHDADLI Amaria	Pédopsychiatrie ; addictologie
BLANC Pierre	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
BORIE Frédéric	Chirurgie viscérale et digestive
BOURDIN Arnaud	Pneumologie ; addictologie
CAMBONIE Gilles	Pédiatrie
CAMU William	Neurologie
CANOVAS François	Anatomie
CAPTIER Guillaume	Anatomie
CARTRON Guillaume	Hématologie ; transfusion
CAYLA Guillaume	Cardiologie
CHANQUES Gérald	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
CORBEAU Pierre	Immunologie
COULET Bertrand	Chirurgie orthopédique et traumatologique
CUVILLON Philippe	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
DADURE Christophe	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
DAUVILLIERS Yves	Physiologie
DE TAYRAC Renaud	Gynécologie-obstétrique, gynécologie médicale
DE VOS John	Histologie, embryologie et cytogénétique

Université de Montpellier
FACULTÉ MÉDECINE
Montpellier-Nîmes

DEMARIA Roland	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
DEREURE Olivier	Dermatologie - vénéréologie
DROUPY Stéphane	Urologie
DUCROS Anne	Neurologie
DUPEYRON Arnaud	Médecine physique et de réadaptation
FESLER Pierre	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
GARREL Renaud	Oto-rhino-laryngologie
GENEVIEVE David	Génétique
GUILLAUME Sébastien	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
GUIU Boris	Radiologie et imagerie médicale
HAYOT Maurice	Physiologie
HOUEDE Nadine	Cancérologie ; radiothérapie
KLOUCHE Kada	Médecine intensive-réanimation
KOENIG Michel	Génétique
KOUYOUMDJIAN Pascal	Chirurgie orthopédique et traumatologique
LAFFONT Isabelle	Médecine physique et de réadaptation
LAVABRE-BERTRAND Thierry	Histologie, embryologie et cytogénétique
LAVIGNE Jean-Philippe	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
LE MOING Vincent	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
LECLERCQ Florence	Cardiologie
MARIANO-GOULART Denis	Biophysique et médecine nucléaire
MATECKI Stéfan	Physiologie
MORANNE Olivier	Néphrologie
MOREL Jacques	Rhumatologie
NAVARRO Francis	Chirurgie viscérale et digestive
NOCCA David	Chirurgie viscérale et digestive
PASQUIE Jean-Luc	Cardiologie

PERNEY Pascal	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
PRUDHOMME Michel	Anatomie
PUJOL Jean Louis	Pneumologie ; addictologie
PURPER-OUAKIL Diane	Pédopsychiatrie ; addictologie
ROGER Pascal	Anatomie et cytologie pathologiques
TRAN Tu-Anh	Pédiatrie
VERNHET Hélène	Radiologie et imagerie médicale

PU-PH de 2ème classe

BOURGIER Céline	Cancérologie; radiothérapie
CANAUD Ludovic	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option chirurgie vasculaire)
CAPDEVIELLE Delphine	Psychiatrie d'Adultes ; addictologie
CLARET Pierre-Géraud	Médecine d'urgence
COLOMBO Pierre-Emmanuel	Cancérologie ; radiothérapie
COSTALAT Vincent	Radiologie et imagerie médicale
DAIEN Vincent	Ophtalmologie
DORANDEU Anne	Médecine légale et droit de la santé
FAILLIE Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
FUCHS Florent	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
GABELLE DELOUSTAL Audrey	Neurologie
GAUJOUX Viala Cécile	Rhumatologie
GODREUIL Sylvain	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
GUILPAIN Philippe	Médecine Interne, gériatrie et biologie du vieillissement; addictologie
HERLIN Christian	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brulologie
IMMEDIATO DAIEN Claire	Rhumatologie
JACOT William	Cancérologie ; Radiothérapie
JEZIORSKI Eric	Pédiatrie

JUNG Boris	Médecine intensive-réanimation
KALFA Nicolas	Chirurgie infantile
LACHAUD Laurence	Parasitologie et mycologie
LALLEMANT Benjamin	Oto-rhino-laryngologie
LE QUINTREC DONNETTE Moglie	Néphrologie
LETOUZEY Vincent	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
LONJON Nicolas	Neurochirurgie
LOPEZ CASTROMAN Jorge	Psychiatrie d'Adultes ; addictologie
LUKAS Cédric	Rhumatologie
MENJOT de CHAMPFLEUR Nicolas	Radiologie et imagerie médicale
MILLET Ingrid	Radiologie et imagerie médicale
MURA Thibault	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication
NAGOT Nicolas	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication
OLIE Emilie	Psychiatrie d'adultes; addictologie
PANARO Fabrizio	Chirurgie viscérale et digestive
PARIS Françoise	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PELLESTOR Franck	Histologie, embryologie et cytogénétique
PEREZ MARTIN Antonia	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option médecine vasculaire)
POUDEROUX Philippe	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
RIGAU Valérie	Anatomie et cytologie pathologiques
RIVIER François	Pédiatrie
ROSSI Jean François	Hématologie ; transfusion
ROUBILLE François	Cardiologie
SEBBANE Mustapha	Médecine d'urgence
SIRVENT Nicolas	Pédiatrie
SOLASSOL Jérôme	Biologie cellulaire
STOEBNER Pierre	Dermato-vénéréologie

SULTAN Ariane	Nutrition
THOUVENOT Éric	Neurologie
THURET Rodolphe	Urologie
TUAILLON Edouard	Bactériologie-virologie; hygiène hospitalière
VENAIL Frédéric	Oto-rhino-laryngologie
VILLAIN Max	Ophtalmologie
VINCENT Denis	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
VINCENT Thierry	Immunologie
WOJTUSCISZYN Anne	Endocrinologie-diabétologie-nutrition

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

1re classe :

COLINGE Jacques (Cancérologie, Signalisation cellulaire et systèmes complexes)

LAOUDJ CHENIVESSE Dalila (Biochimie et biologie moléculaire)

VISIER Laurent (Sociologie, démographie)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - Médecine générale

1re classe :

LAMBERT Philippe

AMOUYAL Michel

PROFESSEURS ASSOCIES - Médecine Générale

CLARY Bernard

DAVID Michel

GARCIA Marc

Université de Montpellier
FACULTÉ de MÉDECINE
Montpellier-Nîmes

PROFESSEURS ASSOCIES - Médecine

BESSIS Didier (Dermato-vénéréologie)

MEUNIER Isabelle (Ophtalmologie)

MULLER Laurent (Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire)

PERRIGAULT Pierre-François (Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire)

QUANTIN Xavier (Pneumologie)

ROUBERTIE Agathe (Pédiatrie)

VIEL Eric (Soins palliatifs et traitement de la douleur)

Université de Montpellier
FACULTÉ de MÉDECINE
Montpellier-Nîmes

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

PERSONNEL ENSEIGNANT

Maîtres de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers

MCU-PH Hors classe - Echelon Exceptionnel

RICHARD Bruno	Médecine palliative
SEGONDY Michel	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

MCU-PH Hors classe

BADIOU Stéphanie	Biochimie et biologie moléculaire
BOULLE Nathalie	Biologie cellulaire
CACHEUX-RATABOUL Valère	Génétique
CARRIERE Christian	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
CHARACHON Sylvie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
FABBRO-PERAY Pascale	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
GIANSILY-BLAIZOT Muriel	Hématologie ; transfusion

MCU-PH de 1re classe

BERTRAND Martin	Anatomie
BOUDOUSQ Vincent	Biophysique et médecine nucléaire
BRET Caroline	Hématologie biologique
BROUILLET Sophie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
COSSEE Mireille	Génétique
GIRARDET-BESSIS Anne	Biochimie et biologie moléculaire
LAVIGNE Géraldine	Hématologie ; transfusion
LESAGE François-Xavier	Médecine et Santé au Travail
MARTRILLE Laurent	Médecine légale et droit de la santé
MATHIEU Olivier	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie

MOUZAT Kévin	Biochimie et biologie moléculaire
PANABIERES Catherine	Biologie cellulaire
RAVEL Christophe	Parasitologie et mycologie
SCHUSTER-BECK Iris	Physiologie
STERKERS Yvon	Parasitologie et mycologie
THEVENIN-RENECéline	Immunologie

MCU-PH de 2ème classe

BERGOUGNOUX Anne	Génétique
CHIRIAC Anca	Immunologie
DE JONG Audrey	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
DU THANH Aurélie	Dermato-vénéréologie
FITENI Frédéric	Cancérologie ; radiothérapie
GOUZI Farès	Physiologie
HERRERO Astrid	Chirurgie viscérale et digestive
HUBERLANT Stéphanie	Gynécologie-obstétrique ; Gynécologie médicale
KUSTER Nils	Biochimie et biologie moléculaire
MAKINSON Alain	Maladies infectieuses, Maladies tropicales
PANTEL Alix	Bactérologie-virologie ; hygiène hospitalière
PERS Yves-Marie	Thérapeutique; addictologie
ROUBILLE Camille	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
SZABLEWSKY	Anatomie et cytologie pathologiques

Université de Montpellier
FACULTÉ de MÉDECINE
Montpellier-Nîmes

Maîtres de Conférences des Universités - Médecine Générale

MCU-MG de 1re classe

COSTA David

OUDE ENGBERINK Agnès

MCU-MG de 2ème classe

FOLCO-LOGNOS Béatrice

CARBONNEL François

Maîtres de Conférences associés - Médecine Générale

CAMPAGNAC Jérômes

LOPEZ Antonio

MILLION Elodie

PAVAGEAU Sylvain

REBOUL Marie-Catherine

SERAYET Philippe

Université de Montpellier
FACULTÉ de MÉDECINE
Montpellier-Nîmes

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

PERSONNEL ENSEIGNANT

Maitres de Conférences des Universités

Maîtres de Conférences hors classe

BADIA Eric	Sciences biologiques fondamentales et cliniques
CHAZAL Nathalie	Biologie cellulaire

Maîtres de Conférences de classe normale

BECAMEL Carine	Neurosciences
BERNEX Florence	Physiologie
CHAUMONT-DUBEL Séverine	Sciences du médicament et des autres produits de santé
DELABY Constance	Biochimie et biologie moléculaire
GUGLIELMI Laurence	Sciences biologiques fondamentales et cliniques
HENRY Laurent	Sciences biologiques fondamentales et cliniques
HERBET Guillaume	Neurosciences
LADRET Véronique	Mathématiques appliquées et applications des mathématiques
LAINE Sébastien	Sciences du Médicament et autres produits de santé
LE GALLIC Lionel	Sciences du médicament et autres produits de santé
LOZZA Catherine	Sciences physico-chimiques et technologies pharmaceutiques
MAIMOUN Laurent	Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé
MOREAUX Jérôme	Science biologiques, fondamentales et cliniques
MORITZ-GASSER Sylvie	Neurosciences
MOUTOT Gilles	Philosophie
PASSERIEUX Emilie	Physiologie
RAMIREZ Jean-Marie	Histologie
RAYNAUD Fabrice	Sciences du Médicament et autres produits de santé
TAULAN Magali	Biologie Cellulaire

Université de Montpellier
FACULTÉ de MÉDECINE
Montpellier-Nîmes

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

PERSONNEL ENSEIGNANT

PH chargés d'enseignements

ABOUKRAT Patrick	BLANCHET Catherine	COROIAN Flavia-Oana	GINIES Patrick
AKKARI Mohamed	BLATIERE Véronique	COUDRAY Sarah	GRECO Frédéric
ALRIC Jérôme	BOBBIA Xavier	CRANSAC Frédéric	GUEDJ Anne Marie
AMEDRO Pascal	BOGE Gudrun	CUNTZ Danielle	GUYON Gaël
AMOUROUX Cyril	BOURRAIN Jean Luc	DARDALHON Brigitte	HENRY Vincent
ANTOINE Valéry	BOUYABRINE Hassan	DAVID Aurore	JAMMET Patrick
ARQUIZAN Caroline	BRINGER-DEUTSCH Sophie	DE BOUTRAY Marie	JEDRYKA François
ATTALIN Vincent	BRINGUIER BRANCHEREAU Sophie	DE LA TRIBONNIÈRE Xavier	JREIGE Riad
AYRIGNAC Xavier	BRISOT Dominique	DEBIEN Blaise	KINNE Mélanie
BADR Maliha	BRONER Jonathan	DELPONT Marion	LABARIAS Coralie
BAIS Céline	CADE Stéphane	DENIS Hélène	LACAMBRE Mathieu
BARBAR Saber Davide	CAIMMI Davide Paolo	DEVILLE de PERIERE Gilles	LANG Philippe
BASSET Didier	CARR Julie	DJANIKIAN Flora	LAZERGES Cyril
BATIFOL Dominique	CARTIER César	DONNADIEU-RIGOLE Hélène	LE GUILLOU Cédric
BATTISTELLA Pascal	CASPER Thierry	FAIDHERBE Jacques	LEGLISE Marie Suzanne
BAUCHET Luc	CASSINOTTO Christophe	FATTON Brigitte	LOPEZ Régis
BENEZECH Jean-Pierre	CATHALA Philippe	FAUCHERRE Vincent	LUQUIENS Amandine
BENNYS Karim	CAZABAN Michel	FILLERON Anne	MANZANERA Cyril
BERNARD Nathalie	CHARBIT Jonathan	FITENI Frédéric	MARGUERITTE Emmanuel
BERTCHANSKY Ivan	CHEVALLIER Thierry	FOURNIER Philippe	MARTIN Lucile
BIBOULET Philippe	CHEVALLIER-MICHAUD Josyane	GAILLARD Nicolas	MATTATIA Laurent
BIRON-ANDREANI Christine	COLIN Olivier	GALMICHE Sophie	MEROUEH Fadi
BLANC Brigitte	CONSEIL Mathieu	GENY Christian	MEYER Pierre
BLANCHARD Sylvie	CORBEAU Catherine	GERONIMI Laetitia	MILESI Christophe

Université de Montpellier
FACULTÉ
MÉDECINE
Montpellier-Nîmes

MORAU Estelle	SEGURET Fabienne
MOSER Camille	SENESSE Pierre
MOUSTY Eve	SKALLI El Medhi
MOUTERDE Gaël	SOLA Christelle
PANSARD Nicole	SOULLIER Camille
PERNIN Vincent	STOEBNER DELBARRE Anne
PERRIGAULT Pierre François	TEOT Luc
PEYRON Pierre-Antoine	THIRION Marina
PICARD Eric	VACHIERY-LAHAYE Florence
PICOT Marie Christine	VERNES Eric
PIERONI Laurence	VINCENT Laure
POQUET Hélène	WAGNER Laurent
PUJOL Sarah-Lise	ZERKOWSKI Laetitia
PUPIER Florence	
QUANTIN Xavier	
RAFFARD Laurence	
RAPIDO Francesca	
RIBRAULT Alice	
RICHAUD-MOREL Brigitte	
RIDOLFO Jérôme	
RIPART Sylvie	
RONGIERES Michel	
ROULET Agnès	
RUBENOVITCH Josh	
SANTONI Fannie	
SASSO Milène	
SCHULDINER Sophie	

Université de Montpellier
FACULTÉ DE MÉDECINE
Montpellier-Nîmes

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

PERSONNEL ENSEIGNANT

Praticiens Hospitaliers Universitaires

BARATEAU Lucie	Physiologie
BASTIDE Sophie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
CAZAUBON Yoann	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
DAGNEAUX Louis	Chirurgie orthopédique et traumatologique
DUFLOS Claire	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication
GOULABCHAND Radjiv	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
LATTUCA Benoit	Cardiologie
MARIA Alexandre	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
MIOT Stéphanie	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
SARRABAY Guillaume	Génétique
SOUCHE François-Régis	Chirurgie viscérale et digestive

REMERCIEMENTS

A mon jury :

A Monsieur le Professeur Marc Ychou. Vous me faites l'honneur de présider ce jury et je vous remercie pour votre sincère implication, tout au long de mon internat.

A Monsieur le Professeur Xavier Quantin. Merci pour tout le temps consacré à l'encadrement de ce travail, depuis bientôt 3 ans déjà, pour votre disponibilité et vos nombreux encouragements.

A Madame le Docteur Catherine Alix-Panabières. Je vous remercie tout d'abord de m'avoir accueillie dans votre laboratoire en 2018, ce qui m'a énormément servi pour la suite de mes recherches, mais également pour avoir répondu à mes nombreuses questions, et ce avec autant de réactivité.

A Monsieur le Professeur William Jacot. Merci pour votre précieuse participation à ce travail et la rigueur que vous lui avez apportée, ainsi que pour votre soutien tout au long de ce projet.

Aux autres personnes ayant contribué à ce travail. Je pense tout particulièrement à Julien Fraisse et Ludovic Gauthier, pour leur gentillesse et leur disponibilité.

A ma famille :

Au noyau dur,

Je dédicace ce travail à mon papa Hervé, qui m'inspire au quotidien et me donne le sentiment que rien n'est insurmontable.

A ma maman Catherine, qui m'apporte un soutien infaillible depuis bien trop longtemps. Merci pour ta joie de vivre et ta force de vivre. Merci de m'avoir appris la persévérance (voire l'obstination !), parmi d'innombrables autres choses.

A ma sœur Céline, sans qui je ne serais probablement pas arrivée jusqu'ici. Merci d'avoir été à mes côtés dans absolument toutes les étapes de ma (courte) vie.

A mon frère Adrien, pour cette complicité hors-norme. Merci pour ta sagesse, ton intégrité et ton amour à toute épreuve.

A mes grands-parents, Maurice et Janine, pour toute la tendresse et la sérénité que vous m'apportez. A mamie Jacqueline pour sa force de caractère, et à papy Yves pour avoir été un modèle de générosité.

A la famille de cœur,

A Gabriela, parce que rien que de savoir que je peux compter sur toi après toutes ces années me réconforte.

A Fabien, pour ta bienveillance légendaire.

A la famille Bourdassol. Corinne et Jean-Paul, parce que si j'avais pu choisir mes beaux-parents, ce serait vous et mille fois vous. A Morgane et Guillaume pour votre enthousiasme permanent et votre authenticité. A Léonard, mon petit bout d'chouette.

A mon cher et tendre Arnaud,

Tu m'as soutenue tout au long de ce « périple », commencé il y a 10 ans déjà. Quand je vois ce qu'on est ensemble, aujourd'hui, je crois qu'on peut dire sans trop se tromper, qu'on forme une bonne équipe. Merci de partager ma vie et de l'embellir au quotidien.

A mes amis :

Aux copains du collège et du lycée, les bougnats, merci d'avoir su maintenir le lien depuis tout ce temps. Merci Anna, ma bichourk, car je pense que notre amitié survivra à tout.

Aux meilleurs amis de la terre :

Ronron : une amie en or tout simplement, tu sais que quelques mots ne suffiront jamais à décrire tout le bonheur que tu m'apportes

Anne-so : pour tout ce qu'on a partagé depuis fort-fort longtemps, mon « précieux » !

Raphou : parce ce qu'avec cet oiseau de Nîmes, je ne pensais pas vivre une aussi belle histoire d'amitié, pourvu que tu ne restes pas trop loin de moi encore quelques années

Julietta : pour le rayon de soleil que tu es, pour ta joie de vivre et ta sincérité

Gaugau : pour ton grand cœur et ton sens de la fête

Marinou : mon modèle de force tranquille à toute épreuve

Juju des jujus : pour ta gentillesse et tes talents de danseur sur table…

Flo-Flo : pour ton sourire légendaire, et ton goût de l'aventure

Aux nouvelles recrues : Chrissou, Joelle, Pau-pau, hâte de vous découvrir encore plus !

Aux co-internes d'onco et d'ailleurs pour tous ces bons moments partagés et le soutien que vous m'avez apporté depuis le début de l'internat : Marie V., Elodie C., Laeticia, Marie D., Alexis M., Sophie (que dis-je, jeunes chefs !), Yoav, Angélique, Jérémy, Aurélie, Sou-sou, Quentin, Manon, Ali, Karl, Marion G.

De façon plus générale, je tiens à remercier tous ceux que j'ai pu rencontrer depuis mes premiers pas en tant qu'interne, qui m'ont fait grandir, qui m'ont fait et donné confiance. Parmi eux, des médecins qui, sans le savoir, m'ont fait comprendre que j'avais fait le bon choix. Je pense tout particulièrement au Pr Eric Assenat, au Dr Nelly Firmin, au Dr Patrice Ray et au Dr Carole Exbrayat, mais pas uniquement. Des équipes infirmières et aides-soignantes bienveillantes, avec une mention spéciale pour l'équipe du service de médecine B2 de l'ICM et celle d'oncologie hospit complète au CHU de Montpellier.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS 23
INTRODUCTION 26
I. Carcinome bronchique non à petites cellules 26
A. Epidémiologie 26
1) En France d'après l'Institut National du Cancer : 26
2) Dans le monde 26
3) Classification des cancers broncho-pulmonaires 27
B. Pronostic 28
1) Qu'est-ce que le TNM ? 28
2) Le pronostic du carcinome bronchique non à petites cellules en chiffres 28
3) Les facteurs pronostiques du carcinome bronchique non à petites cellules 28
C. Stratégie thérapeutique au stade métastatique 32
1) En cas d'addiction oncogénique 32
2) En l'absence d'addiction oncogénique 34
II. Valeurs pronostique et prédictive de réponse à l'immunothérapie du PD-L1 sur tissu tumoral dans le carcinome bronchique non à petites cellules 42
A. Valeur pronostique de l'expression de PD-L1 et caractéristiques clinico-pathologiques associées 42
B. Valeur prédictive d'efficacité de l'immunothérapie de l'expression de PD-L1 43
III. Détermination du PD-L1 sur cellules tumorales circulantes 44
A. Généralités sur les cellules tumorales circulantes 44
1) Le processus métastatique 44
2) Méthodes de détection des cellules tumorales circulantes 47
3) Pertinence clinique des cellules tumorales circulantes avec un focus sur le carcinome bronchique non à petites cellules 50
B. Objectifs de l'étude 52
IV. Bibliographie 52
ARTICLE SCIENTIFIQUE 62
SERMENT 100

ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ALK : anaplastic lymphoma kinase

AMM : autorisation de mise sur le marché

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

ARN : acide ribonucléique

BRAF : B-Raf proto-oncogene

CBNPC : carcinome bronchique non à petites cellules

CBP : cancer broncho-pulmonaire

CAFs : cancer-associated fibroblasts (*fibroblastes associés au cancer*)

CK : cytokératine

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CNA : copy number alterations (*altérations du nombre de copies*)

CRP : C-reactive protein (*protéine C réactive*)

CSV : vimentin surface cell

CTL : cytotoxic T lymphocyte (lymphocyte T cytotoxique)

CTLA4 : cytotoxic T-lymphocyte protein 4

CTC : cellule tumorale circulante

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DEP : dielectrophoresis (*diélectrophorèse*)

DTCs : disseminated tumor cells (*cellules tumorales disséminées*)

EGFR : epidermal growth factor receptor

EML4 : echinoderm microtubule-associated protein like 4

EMT : epithelial-to-mesenchymal transition (*transition épithélio-mésenchymateuse*)

EpCAM : epithelial cell adhesion molecule

FAPα : fibroblast activation protein alpha

FDA : food and drug administration (*agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux*)

FISH : fluorescence in situ hybridization (*hybridation in situ fluorescente*)

GEDI chip : geometrically enhanced differential immunocapture chip

HER2 : human epidermal growth factor receptor 2

IASLC : international association for the study of lung cancer (*association internationale pour l'étude du cancer du poumon*)

INF-ɣ : interféron gamma

ISET : isolation by size of epithelial tumor cells

ITK : inhibiteur de tyrosine kinase

KRAS : KRAS proto-oncogene

LDH : lactate déshydrogénase

LDT : laboratory developed tests

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MEK : mitogen-activated protein kinase kinase

MET : MET proto-oncogene / mesenchymal-to-epithelial transition

MRD : minimal residual disease (*maladie résiduelle minimale*)

NGS : next-generation sequencing (*séquençage nouvelle génération*)

NOS : not otherwise specified

NTRK : neurotrophic tyrosine receptor kinase

PD-1 : programmed cell death 1

PD-L1 : programmed cell death ligand 1

PDX : xenografts derived-patient

PI3K-AKT : phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B

PS : performance status

PSA : prostate-specific antigen

RET : RET proto-oncogene

ROS1 : ROS proto-oncogene 1

RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction

SG : survie globale

SSP : survie sans progression

SUV : standardized uptake value

TAMs : tumor-associated macrophages (*macrophages associés aux tumeurs*)

TCR : T-cell receptor

TEP : tomographie par émission de positions

TGFβ : tumor growth factor beta

TIL : tumor infiltrating lymphocytes (*lymphocytes infiltrant la tumeur*)

TNM : tumor-node-metastasis

VEGF : vascular endothelial growth factor

WGA : whole-genome analysis (*analyse du génome entier*)

INTRODUCTION

I. Carcinome bronchique non à petites cellules

A. Epidémiologie

1) En France d'après l'Institut National du Cancer :

On estime à 46 363 le nombre de nouveaux cas de cancers broncho-pulmonaires (CBPs) en France métropolitaine en 2018, dont 67% chez l'homme (1).

Avec 33 117 décès estimés en 2018, le CBP est la première cause de décès par cancer chez l'homme et la deuxième cause de décès par cancer chez la femme, après le cancer du sein (1).

Alors que l'incidence et la mortalité diminuent chez l'homme, elles sont en forte augmentation chez la femme depuis 1990.

2) Dans le monde

A l'échelle mondiale, on estime à environ 2,1 millions le nombre de nouveaux cas et à 1.8 million le nombre de décès en 2018 (2).

Le CBP est donc au premier rang en termes d'incidence et de mortalité chez l'homme (**figure 1A**).

Chez la femme, il se place au troisième rang en termes d'incidence (après le cancer du sein et le cancer colorectal) et au deuxième rang en termes de mortalité (après le cancer du sein) (**figure 1B**).

Les évolutions d'incidence et de mortalité au cours du temps suivent l'évolution de l'épidémie de tabac de chaque pays, plus de 80% des cas étant attribués à ce facteur de risque.

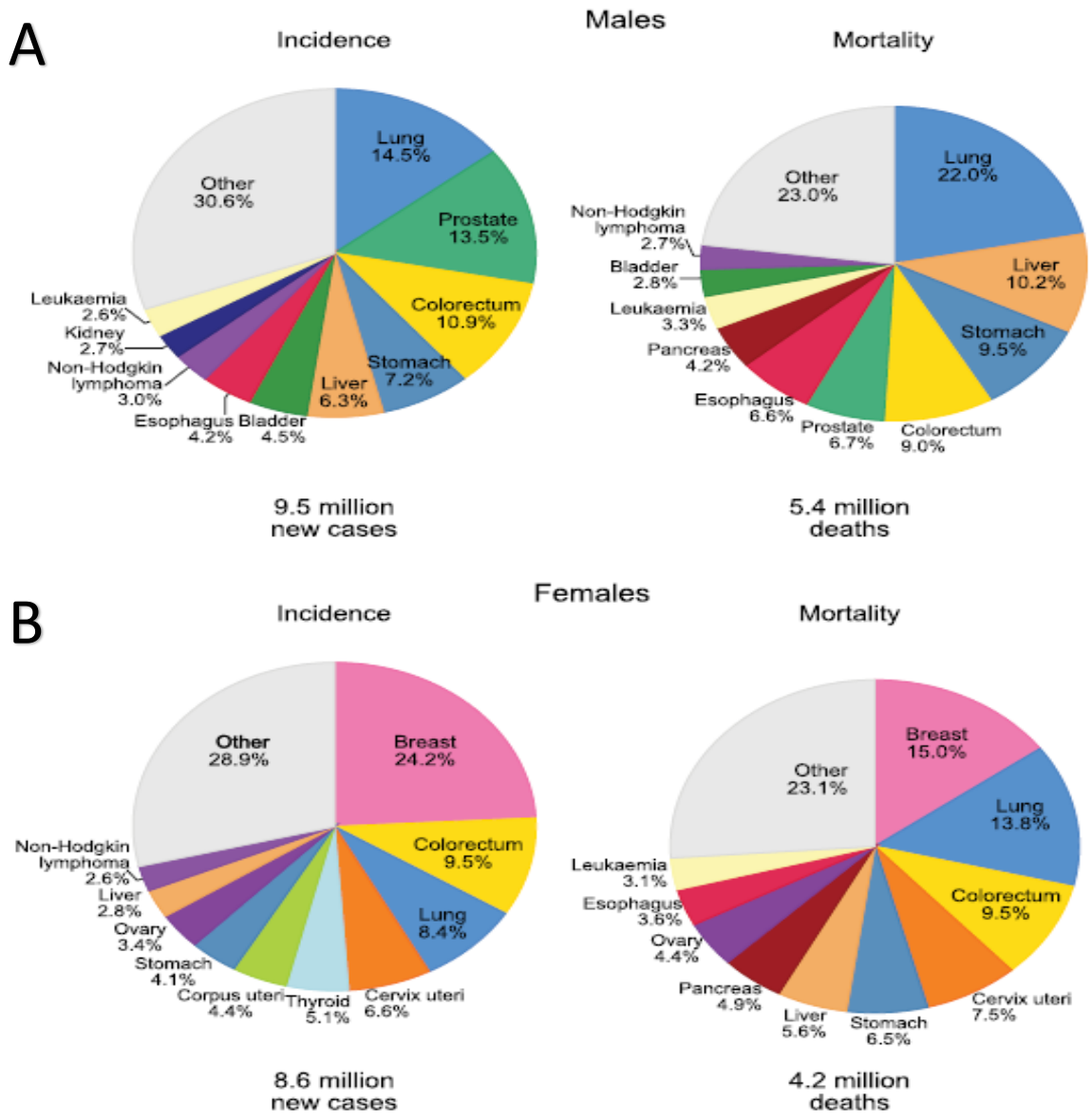


Figure 1 : Distribution des cas incidents et des décès chez les hommes (A) et chez les femmes (B), pour les 10 cancers les plus fréquents dans le monde en 2018 (2).

3) <u>Classification des cancers broncho-pulmonaires</u>

Les CBPs se répartissent selon la dernière classification de l'Organisation Mondiale de la Santé, publiée en 2015 (3).

Le carcinome bronchique représente la quasi-totalité de ces cancers.

Il se subdivise en carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPCs) et en carcinome bronchique à petites cellules.

Les trois types histologiques les plus fréquents de CBNPCs sont l'adénocarcinome, le carcinome épidermoïde et le carcinome sans spécification ou de type « NOS » pour « not otherwise specified ».

Le carcinome bronchique à petites cellules, qui représente 13% des nouveaux cas de CBPs dans le monde, est une entité clinique et histologique à part entière. Son histoire naturelle, son pronostic et la stratégie thérapeutique qui en découle diffèrent totalement du CBNPC (4).

De ce fait, afin de rendre la population étudiée plus homogène et les résultats plus pertinents, ce travail a porté exclusivement sur les CBNPCs.

B. Pronostic

Le pronostic du CBNPC est étroitement lié à son extension anatomique évaluée par le « TNM ».

1) Qu'est-ce que le TNM ?

La détermination de l'extension anatomique du CBNPC se fait grâce à l'utilisation d'une classification internationale nommée le « TNM » pour Tumor-Node-Metastasis.

Au sein de cette classification, le « T » évalue l'extension locale de la tumeur primitive, le « N » l'envahissement ganglionnaire locorégional et le « M » l'extension métastatique. L'ensemble est ensuite regroupé en stades guidant la prise en charge thérapeutique, allant de I à IV.

Cette classification a été régulièrement modifiée, depuis sa création en 1968, de sorte que les différents stades soient le plus précisément corrélés au pronostic (5).

2) Le pronostic du carcinome bronchique non à petites cellules en chiffres

Selon les données de survie issues de l'élaboration de la 8ème et dernière version du TNM, le pronostic du CBNPC reste sombre.

La survie globale (SG) à 5 ans se situe entre 53 à 92% pour les stades localisés (I et II), 13 à 36% pour les stades localement avancés (III) et est inférieure à 10% au stade métastatique (IV) (6).

3) Les facteurs pronostiques du carcinome bronchique non à petites cellules

Pour qu'un facteur soit considéré comme pronostique dans une pathologie donnée, il faut qu'il ait été testé dans plusieurs grandes études et retrouvé au moins une fois comme significativement associé à la survie mais de façon indépendante, ce qui implique la réalisation d'analyses multivariées avec ajustement sur les facteurs pronostiques reproductibles déjà connus.

Une des études les plus importantes ayant permis d'établir un consensus sur les facteurs pronostiques du CBP est l'étude de l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) publiée en 2008 (7).

Cette étude rétrospective multicentrique et internationale, menée par un comité dédié, le « Lung Cancer Staging Project », a également servi à l'élaboration de la 7ème version de la classification TNM parue en 2009.

Parmi plus de 80 000 patients inclus avec un diagnostic de CBP entre 1990 et 2000, 12 426 patients avec un CBNPC ont été retenus pour l'analyse des facteurs pronostiques suivant : stade TNM (selon la 7ème version), état général selon le performance status (PS), âge, sexe, et type histologique.

En analyse multivariée, un stade TNM avancé était le facteur le plus fortement associé à une diminution de la survie globale. Les autres facteurs de mauvais pronostic retrouvés étaient un PS élevé, c'est-à-dire un état général altéré, puis le sexe masculin et enfin l'âge avancé.

Enfin, 7280 patients de stades avancés (IIIB et IV) ont été évalués pour les variables biologiques suivantes : taux d'hémoglobine, taux de globules blancs, albuminémie, calcémie et natrémie. Anémie, hyperleucocytose, hypoalbuminémie, hypercalcémie et hyponatrémie étaient retrouvés comme facteurs pronostiques indépendamment de l'état général, de l'âge et du sexe. Cependant parmi les 537 patients chez qui les 5 variables étaient disponibles, seules l'hyperleucocytose et l'hypercalcémie ont été identifiées comme facteurs pronostiques défavorables en analyse multivariée.

Sur la base de cette étude et d'une revue de la littérature, nous pouvons retenir :

a. Des facteurs pronostiques liés à l'hôte :

- L'**état général** qu'il soit mesuré selon le PS ou selon l'indice de Karnofsky (7,8).

- Le **sexe** avec un impact pronostic favorable du sexe féminin (7,8).

- L'**âge** avancé avec un impact pronostic défavorable en particulier pour les CBNPCs non résécables (7,9).

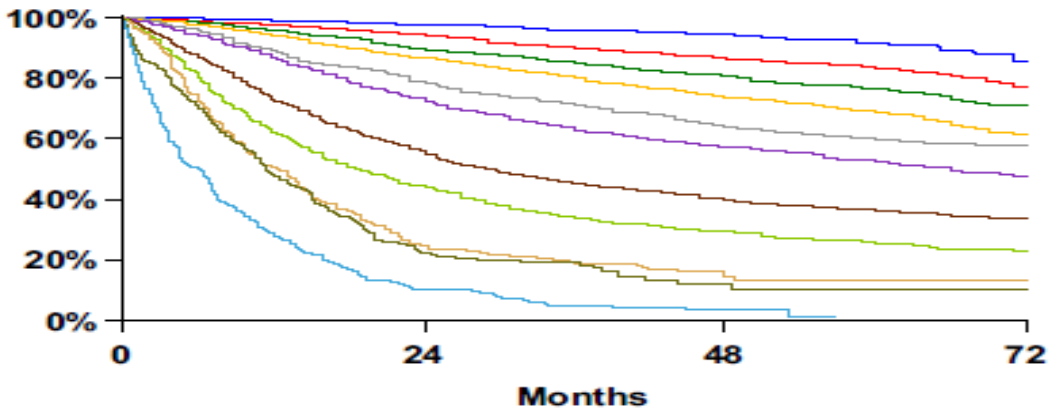
- L'origine ethnique **asiatique** : Plusieurs études rétrospectives de grande taille démontrent sa valeur pronostique favorable, indépendamment du statut tabagique (10–12).

- L'**état nutritionnel** au diagnostic : Une perte de poids dans les trois mois précédant le diagnostic de carcinome bronchique est retrouvée comme facteur pronostique défavorable avec une survie qui diminue avec l'importance de la perte de poids (13). A l'inverse, le surpoids et l'obésité pré-morbide évalués par l'indice de masse corporelle (IMC) sont associés à un pronostic favorable, indépendamment de la perte de poids (14,15).

- Comorbidités et **tabagisme** : La présence de comorbidités qui a fait l'objet de scores prédictifs de survie (16) n'est pas toujours retrouvée comme facteur pronostique indépendant (17,18). En revanche, le fait d'être ou d'avoir été fumeur est toujours associé à une diminution de la survie (19,20).

b. Des facteurs pronostiques liés à la tumeur :

- Le **stade TNM**. C'est le facteur pronostique le plus important du CBNPC (**figure 2**). Au stade métastatique, la présence de métastases uniquement intrathoraciques ou la présence d'un seul site métastatique extra-thoracique est associée à un meilleur pronostic (6–8).



Proposed	Events / N	MST	24 Month	60 Month
IA1	68 / 781	NR	97%	92%
IA2	505 / 3105	NR	94%	83%
IA3	546 / 2417	NR	90%	77%
IB	560 / 1928	NR	87%	68%
IIA	215 / 585	NR	79%	60%
IIB	605 / 1453	66.0	72%	53%
IIIA	2052 / 3200	29.3	55%	36%
IIIB	1551 / 2140	19.0	44%	26%
IIIC	831 / 986	12.6	24%	13%
IVA	336 / 484	11.5	23%	10%
IVB	328 / 398	6.0	10%	0%

Figure 2: Survie globale, en fonction des stades TNM issus de la 8ème édition (6): médiane de survie en mois (« MST » pour median survival time), taux de survie à 24 et à 60 mois.

- Le **degré en fixation en TEP scan** (tomographie par émission de positons) : Le « SUV » pour standardized uptake value est l'index le plus communément utilisé pour mesurer l'activité métabolique au sein d'une tumeur après l'injection d'un traceur faiblement radioactif couplé au glucose. Le SUV max correspond à la valeur de SUV la plus élevée au sein d'une lésion donnée.

Une méta-analyse de l'IASLC publiée en 2008, dont les résultats actualisés en 2010 portent sur 21 essais, montre en analyse univariée, qu'un SUV max élevé au sein la tumeur primitive confère un pronostic péjoratif par rapport à un SUV faible (21). Plus

récemment, une méta-analyse sur les données individuelles issues de ces essais, ne retrouve ce facteur pronostique de façon indépendante que dans les stades I à III (22).

- Des **critères histologiques** : Le type histologique parmi les CBNPCs est un facteur pronostique débattu.

Il est admis que les carcinomes à grandes cellules regroupant les carcinomes sans spécification de type NOS et les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules sont de moins bon pronostic que les adénocarcinomes ou les carcinomes épidermoïdes, quel que soit le stade (19,23).

Parmi les stades localisés ou localement avancés, certaines études confèrent un rôle pronostique favorable au carcinome épidermoïde (24,25) tandis que d'autres sont en faveur de l'adénocarcinome (26).

Parmi les adénocarcinomes opérés, les sous types d'architecture lépidique (adénocarcinome in situ, adénocarcinome avec invasion minime et adénocarcinome invasif d'architecture lépidique) ont une survie à 5 ans s'approchant des 100% tandis que les sous types micropapillaire et solide ont le pronostic le plus péjoratif (27).

Au stade métastatique, l'adénocarcinome semble associé à un meilleur pronostic que le carcinome épidermoïde (28,29). De façon générale, il est admis que les patients présentant un carcinome épidermoïde métastatique sont plus difficiles à traiter (30) :

° ce sont des patients plus âgés et le plus souvent fumeurs ce qui implique plus de comorbidités impactant la prise en charge thérapeutique.

° l'arsenal thérapeutique est plus limité pour ce type histologique (cf paragraphe C/ « Stratégie thérapeutique »).

Enfin, le caractère bien différencié de la tumeur (31) et une proportion importante de lymphocytes infiltrants la tumeur (« TIL » pour tumor infiltrating lymphocytes) (32) sont des facteurs de bon pronostic, partagés avec d'autres cancers.

- Certaines **altérations moléculaires** au niveau somatique :

° Les mutations activatrices de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) semblent avoir un impact pronostique favorable au stade métastatique (33–35), mais leur présence est essentiellement un facteur prédictif de réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs) (cf paragraphe C/ « Stratégie thérapeutique »).

° La présence d'une mutation dans l'oncogène KRAS concerne 20 à 30% des adénocarcinomes en population caucasienne. Son impact pronostique historiquement péjoratif est actuellement controversé (36).

c. Des facteurs pronostiques en biologie standard :

Des variables biologiques simples, dont des valeurs normales sont associées à un pronostic favorable, sont bien reconnues notamment dans les stades avancés : Taux d'hémoglobine, de globules blancs, de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes, mais aussi calcémie, albuminémie et taux de LDH (7,8).

Des marqueurs d'inflammation, moins spécifiques du cancer bronchique, sont également mis en avant. Ainsi une CRP augmentée et un ratio polynucléaires neutrophiles sur lymphocytes élevé sont associés à un pronostic défavorable (37,38).

d. Des facteurs pronostiques liés au traitement :

La réponse au traitement systémique et la durée de la réponse sont des facteurs pronostiques reconnus au stade métastatique (39). Dans la stratégie thérapeutique, plus le patient avance dans les lignes de traitement, moins son pronostic est favorable (40).

C. Stratégie thérapeutique au stade métastatique

1) En cas d'addiction oncogénique

Au stade métastatique, la stratégie thérapeutique est conditionnée par la recherche d'altérations moléculaires ciblables qui donnent accès à une thérapie ciblée de type ITK, ce qui répond au principe d'addiction oncogénique (41).

Ce modèle est caractérisé par la présence d'une anomalie moléculaire, dans un oncogène le plus souvent, qui active de façon permanente une voie de signalisation majeure dans la cellule. Cette activation se fait par l'intermédiaire d'un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase comme pour EGFR, ALK et ROS1 ou d'une protéine kinase située sur cette voie comme pour BRAF.

Cette activation stimulant la prolifération et la survie cellulaire au détriment des autres voies confère à la cellule son phénotype cancéreux.

Ainsi, l'inhibition spécifique de cette voie suffit pour provoquer la mort cellulaire.

Quatre altérations moléculaires doivent être recherchées chez tous les patients présentant un CBNPC de type non-épidermoïde (42). Chez les patients présentant un carcinome épidermoïde, cette recherche s'effectue uniquement pour les patients non-fumeurs. En effet, le carcinome épidermoïde du fumeur est très peu susceptible de comporter des altérations moléculaires ciblables.

Il s'agit des mutations activatrices de l'EGFR, des réarrangements ALK et ROS1 et de la mutation BRAF V600E. Ces anomalies ont pour caractéristiques communes d'être préférentiellement retrouvées en cas d'adénocarcinome et chez les patients non-fumeurs.

a. Les mutations activatrices de l'EGFR

Elles sont présentes dans 10 à 12% des CBNPCs en population caucasienne, mais ce taux monte à 50% chez les non-fumeurs. Elles sont également plus fréquentes chez les femmes et les patients d'origine asiatique.

Les altérations retrouvées dans 90% des cas sont la mutation faux sens L858R dans l'exon 21 et des délétions dans l'exon 19 qui conduisent à l'activation de l'EGFR, indépendamment de son ligand.

Leur présence donne accès aux ITKs de l'EGFR que sont : le gefitinib et l'erlotinib (molécules de 1ère génération), l'afatinib (molécule de 2e génération) et l'osimertinib (molécule de 3e génération), ce dernier étant actuellement recommandé de façon préférentielle en 1ère ligne (43).

b. Les réarrangements ALK

Ils concernent 4 à 7% des CBNPCs et plus fréquemment des patients jeunes.

Il s'agit d'une inversion au sein du chromosome 2 qui aboutit à la fusion du gène ALK avec un autre gène et à la traduction d'une protéine chimérique, comprenant le domaine kinase d'ALK, activée de façon « constitutive ». Le partenaire de fusion du gène ALK le plus fréquent est EML4 mais il en existe d'autres.

La présence de ce type de réarrangement est prédictive d'efficacité des ITKs anti-ALK que sont : le crizotinib (molécule de 1ère génération), le ceritinib, l'alectinib, le brigatinib et l'ensartinib (molécules de 2ème génération) et enfin le lorlatinib (molécule de 3e génération). Quatre molécules ont l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1ère ligne (crizotinib, ceritinib, alectinib et brigatinib) et selon les données de la littérature actuelles, l'alectinib et le brigatinib doivent être favorisés (44,45).

c. Les réarrangements ROS1

Ces réarrangements se retrouvent dans 1 à 2% des CBNPCs, là aussi préférentiellement chez des patients jeunes. Plusieurs inhibiteurs de ALK sont également efficaces contre ROS1 du fait d'une homologie structurale entre les deux kinases et c'est le crizotinib qui est actuellement le traitement de choix en 1ère ligne (46).

d. La mutation BRAF V600E

Elle représente 2% des CBNPCs.

La mutation BRAF entraine une activation permanente de la voie des MAPK, comprenant également la protéine kinase MEK, située en aval de BRAF. Ainsi le blocage de la voie est renforcé par une double inhibition de BRAF et de MEK. Cette altération donne lieu à la prescription de l'association dabrafenib (inhibiteur de BRAF) - trametinib (inhibiteur de MEK), à partir de la 2ème ligne uniquement soit après échec d'une chimiothérapie et/ou d'une immunothérapie (47).

D'autres altérations moléculaires existent (mutations et amplifications de MET, fusions NTRK, réarrangements de RET, mutations HER2, etc.) mais ne disposent pas encore de thérapie ciblée bénéficiant d'une AMM.

2) En l'absence d'addiction oncogénique

Dans 80% des cas, ces anomalies génétiques ne sont pas retrouvées (ou non recherchées dans le cadre du carcinome épidermoïde du sujet fumeur) et la stratégie thérapeutique se base alors sur l'état général du patient, son âge, le type histologique et le statut PD-L1 (programmed cell death ligand 1) de la tumeur (48).

a. La chimiothérapie

- Le doublet à base de platine comme pierre angulaire

La chimiothérapie de référence des CBNPCs est basée sur la combinaison d'un sel de platine, cisplatine ou carboplatine et d'un cytotoxique dit de 3ème génération car présentant un profil de toxicité favorable (vinorelbine, paclitaxel, docetaxel, gemcitabine). En effet, les associations comportant un sel de platine apportent un gain en survie par rapport à celles qui n'en contiennent pas (49). D'autre part, le cisplatine montre une légère supériorité sur le carboplatine en termes de SG lorsque la molécule associée est un agent de 3ème génération (50).

- Davantage de possibilités thérapeutiques pour les carcinomes non-épidermoïdes

L'adjonction de bévacizumab, qui est un anti-angiogénique entrainant un risque hémorragique pulmonaire, n'est possible qu'en cas de carcinome non-épidermoïde du fait de la localisation le plus souvent proximale de la tumeur primitive dans ce type histologique. Sur le même principe, la présence d'une hémoptysie ou d'une tumeur envahissant les gros vaisseaux contre-indiquent son utilisation. L'ajout du bévacizumab à un doublet à base de platine avec son maintien à l'issue de la chimiothérapie a montré une augmentation de la survie sans progression (SSP) mais un bénéfice en SG qu'à la dose de 15 mg/kg et en association avec le schéma carboplatine-paclitaxel (51).

Le pemetrexed, un antimétabolite de type anti-folate, en association avec le cisplatine s'est montré plus efficace que l'association cisplatine-gemcitabine en cas de carcinome non-épidermoïde uniquement (29). Son profil de tolérance plus favorable (absence d'alopécie, meilleure tolérance hématologique et digestive), en comparaison avec les autres doublets, fait qu'il est devenu un standard en cas de carcinome non-épidermoïde.

- La stratégie de maintenance

Il s'agit de la poursuite d'un traitement d'entretien chez les patients dont la maladie est contrôlée (en réponse ou stable) après 4 cycles d'une bi-chimiothérapie à base de platine, ce qui permet un allongement de la survie (52). Les principaux agents utilisés en maintenance sont le pemetrexed et le bévacizumab. Le pemetrexed peut s'utiliser en maintenance de continuation s'il est poursuivi après l'utilisation d'un doublet platine-pemetrexed ou en switch maintenance s'il est introduit à l'issu de 4 cycles d'un doublet ne comprenant pas de pemetrexed. L'entretien par bévacizumab ne s'envisage que dans le cadre d'une maintenance de continuation.

b. L'immunothérapie

- Principe de blocage de l'axe PD-L1/PD-1

La réponse immunitaire antitumorale est physiologiquement contrôlée par différents signaux inhibiteurs dont fait partie le couple PD-L1 / PD-1 (programmed cell death 1).

Ce sont les lymphocytes T cytotoxiques qui permettent, en grande partie, de générer cette réponse antitumorale.

Dans le cycle de l'immunité anti-cancéreuse (53), les cellules présentatrices d'antigènes internalisent les antigènes tumoraux libérés par les cellules cancéreuses détruites et les intègrent au sein de molécules de surface appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (étapes 1 et 2, **figure 3**). Elles vont ensuite migrer vers le premier ganglion de drainage pour y activer les lymphocytes T dits « naïfs ». Cette activation ou « priming » passe par l'interaction spécifique du T-cell receptor (TCR) du lymphocyte avec le complexe peptide tumoral/CMH de la cellule présentatrice d'antigène (étape 3, **figure 3**). Les lymphocytes CD8 activés, dits « effecteurs », se dirigent ensuite dans le tissu tumoral (étapes 4 et 5, **figure 3**) puis, via la reconnaissance spécifique TCR-antigène tumoral, acquièrent leurs fonctions cytotoxiques et entrainent la lyse des cellules tumorales (étapes 6 et 7, **figure 3**).

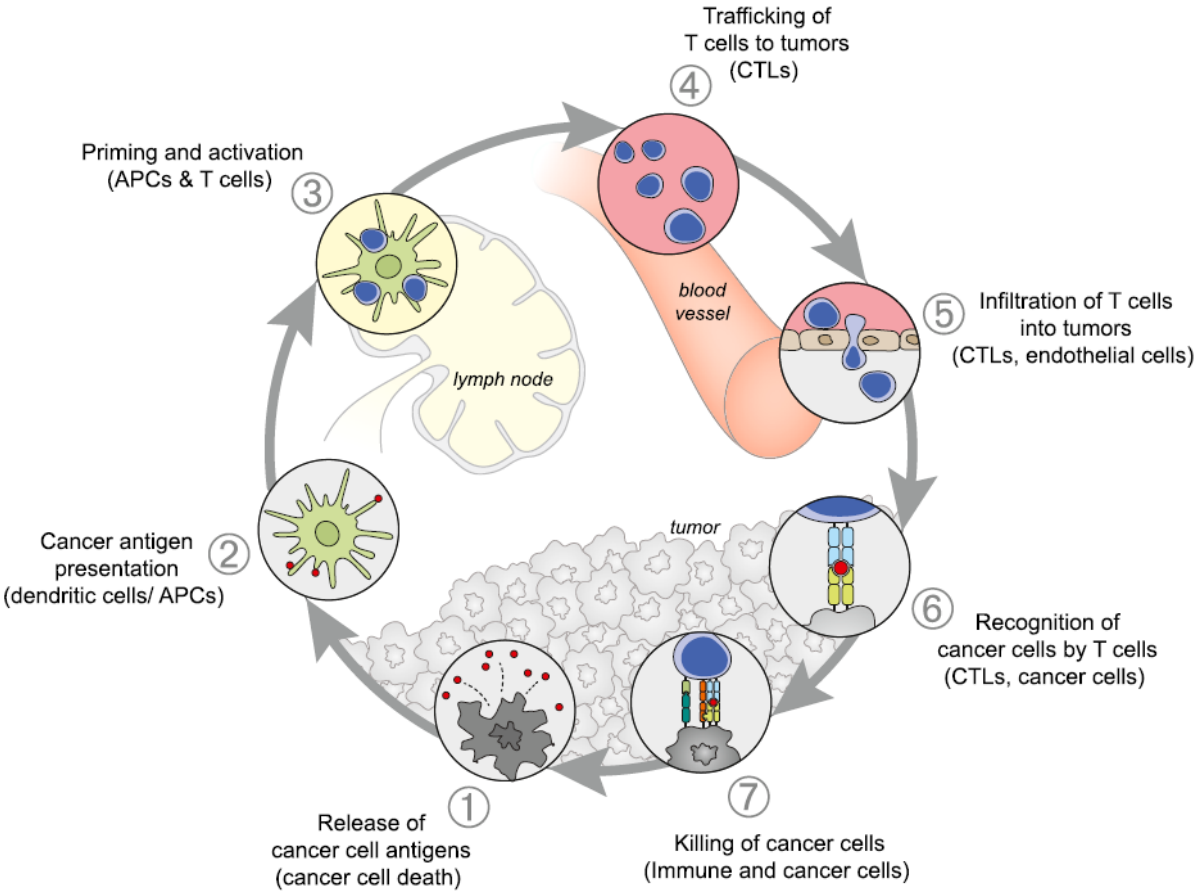


Figure 3 : Cycle de l'immunité anti-tumorale (53).

APCs: antigen presenting cells (cellules présentatrices d'antigènes); CTLs: cytotoxic T lymphocytes (lymphocytes T cytotoxiques).

Le bon déroulement de ces étapes est permis par la mise en jeu de signaux activateurs et inhibiteurs de la réponse immunitaire (54).

L'interaction entre le récepteur PD-1 et son principal ligand le PD-L1 est un de ces points de contrôle immunitaire (« immune checkpoints ») qui va avoir un effet freinateur sur l'activation lymphocytaire (étape 3, **figure 3**) mais surtout sur l'étape de reconnaissance de la cellule tumorale (étape 6, **figure 3**) aboutissant à l'effet cytotoxique.

Le récepteur PD-1 est présent à l'état basal en faible quantité sur les lymphocytes T naïfs et certains thymocytes. Son expression est surtout induite de façon transitoire sur différentes cellules immunitaires -notamment les lymphocytes T mais également les lymphocytes B, des cellules dendritiques et des macrophages- suite à un stimulus immunogène.

Son principal ligand, le PD-L1 est exprimé à bas bruit à la surface des cellules cancéreuses, de nombreuses cellules immunitaires mais aussi de cellules non hématopoïétiques dans différents organes.

En situation de cancer, pour échapper au système immunitaire, la cellule tumorale peut surexprimer le PD-L1 soit de façon constitutive via l'activation de voies de signalisation oncogéniques (telles que la voie MAPK ou PI3K-AKT) soit de façon adaptative (55). En effet, la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron gamma (INF-ɣ) au cours de la réponse immunitaire entretient l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales. Ainsi, l'action inhibitrice de l'interaction PD-1/PD-L1 devient prépondérante et le système immunitaire n'exerce plus son rôle protecteur (**figure 4**).

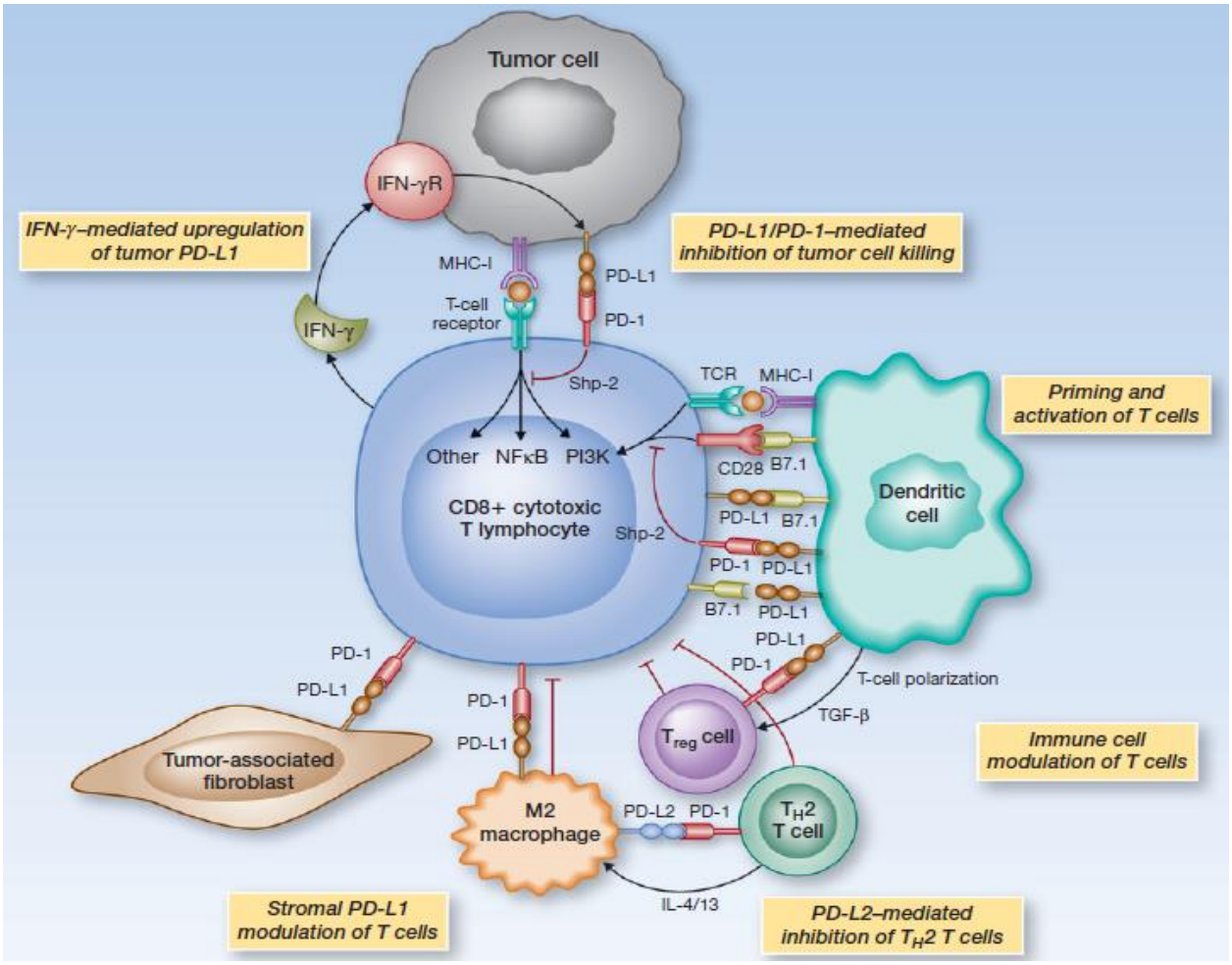


Figure 4 : Immunologie tumorale et axe PD-1/PD-L1 (54).

L'interaction entre PD-1 et son ligand PD-L1, via le recrutement de la phosphatase Shp-2, entraine une diminution des voies de signalisation situées en aval du complexe CMH-1/TCR et de ses signaux co-activateurs, ce qui inhibe l'activation du lymphocyte T et protège la cellule tumorale de la lyse cytotoxique. PD-L1 peut également lier B7-1 (=CD80) et inhiber l'activation cellulaire T en bloquant le signal de co-stimulation positif CD28-CD80. D'autres cellules du microenvironnement tumoral participent à l'inhibition de la réponse immunitaire T. Les cellules dendritiques via la surexpression de PD-L1 et la production de TGFβ sont capables d'induire des lymphocytes T régulateurs aux fonctions immunosupressives. Les cellules stromales telles que les fibroblastes associés au cancer (« CAFs » pour cancer-associated fibroblasts) et les macrophages associés aux tumeurs (« TAMs » pour tumor-associated macrophages) exercent également un rôle immunosuppresseur, notamment via la surexpression de PD-L1 et l'induction d'une réponse immunitaire Th2. INF-γ: interferon gamma; TGFβ: tumor growth factor beta.

Le développement des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire s'intègre donc dans une stratégie d'immunothérapie active, qui vise à restaurer une immunité efficiente.

Dans le CBNPC métastatique, ils sont représentés essentiellement par le pembrolizumab et le nivolumab qui sont des inhibiteurs de PD-1 et par l'atézolizumab qui est un anti-PD-L1 (42). Ces molécules sont des anticorps monoclonaux humains ou humanisés.

Leur utilisation est pour certaines indications conditionnée par l'expression du PDL-1 sur les cellules tumorales qui est le facteur prédictif de réponse à l'immunothérapie le plus reconnu (cf paragraphe II. « Valeurs pronostique et prédictive de réponse à l'immunothérapie du PD-L1 »).

Cette expression est recherchée en immunohistochimie sur tissu tumoral frais ou archivé et est exprimée en pourcentage de cellules marquant le PD-L1 (56).

Il est important de souligner que l'on parle communément « d'expression » de PD-L1 par la tumeur pour plus de simplicité, mais il s'agit bien d'une « surexpression » comme nous venons de le voir.

Les anticorps, les réactifs et les automates utilisés dans les essais cliniques varient en fonction du laboratoire promoteur. Il en va de même du type de marquage et du seuil de positivité retenu (**tableau 1**).

En France, il est recommandé d'utiliser ces tests standardisés (sous forme de kits prêts à l'emploi) dans la mesure du possible. Le test SP263 (Ventana PD-L1 SP263 Assay, Ventana Medical Systems Inc), le test 28-8 pharmDx (Agilent Technologies/Dako) et le test 22C3 pharmDx (Agilent Technologies/Dako) semblent interchangeables en raison de leur très bonne concordance pour le marquage PD-L1 des cellules tumorales. Cependant, les tests développés dans les laboratoires (« LDT » pour laboratory developed tests en anglais) appelés encore « tests maison » peuvent aussi être utilisés à condition que leur concordance ait été validée en comparaison à un test de référence (56).

Molécule	Nivolumab (Anti-PD-1)	Pembrolizumab	(Anti-PD-1)	Atezolizumab (Anti-PD-L1)	Durvalumab (Anti-PD-L1)
Anticorps	Clone 28 8, anticorps lapin	Clone 22C3, anticorps souris	Clone SP263	Clone SP142, anticorps lapin	Clone SP263
Fabriquant Automate	Dako Autostainer Link 48	Dako Autostainer Link 48	Ventana BenchMark	Ventana BenchMark ULTRA	Ventana BenchMark
Epitope Compartiment tumoral analysé	Extracellulaire Expression membra-naire dans les cellules tumorales Au moins 100 cellules analysables	Extracellulaire Expression membra-naire dans les cellules tumorales	Intracellulaire Expression membra-naire dans les cellules tumorales	Intracellulaire Expression membra-naire dans les cellules tumorales (TC) et immuni-taires (IC)	Intracellulaire Expression membra-naire dans les cellules tumorales
Seuils utilisés dans les essais cliniques	< 1 % ≥ 1 % ; ≥ 5 % ≥ 10 % ; ≥ 50 %	< 1 % 1–49 % ≥ 50–100 %		TC0 ou IC0 TC1/2/3 ou IC1/2/3 TC2/3 ou IC2/3 TC3 ou IC3	≥ 1 % ≥ 25 %
Pertinence clinique en septembre 2017	Pas de sélection des patients sur l'expression de PD-L1	Sélection des patients ≥ 1 % : seconde ligne ≥ 50 % : première ligne	Sélection des patients ≥ 1 % : seconde ligne ≥ 50 % : première ligne	Non disponible Pas de sélection des patients sur l'expression de PD-L1	Non disponible Données non disponibles

Tableau 1 : Description et caractéristiques des tests diagnostiques compagnons des anti-PD-1/PD-L1 (56).

- Immunothérapies en pratique

Le développement initial des anti-PD-1 et anti-PD-L1 s'est fait chez des patients antérieurement traités par chimiothérapie, démontrant dans 4 essais publiés entre 2015 et 2017 un doublement de la survie à 2 ans en comparaison avec le docétaxel, la chimiothérapie de référence à partir de la 2ème ligne. Alors que le nivolumab et l'atézolizumab ont montré un bénéfice en survie quel que soit le PD-L1, la prescription du pembrolizumab est réservée aux patients dont la tumeur exprime à plus de 1% le PD-L1 (57–60).

Au vu de leur efficacité en 2ème ligne et plus, associé à un taux de réponse restant limité, de l'ordre de 20%, ces immunothérapies ont été testées en 1ère ligne chez des patients présentant une probabilité plus forte de réponse.

La valeur prédictive de l'expression de PD-L1 avec un seuil à 50% a été établie en phase I pour le pembrolizumab (61) et a constitué la base de l'essai Keynote 024 (62). Cet essai a démontré un bénéfice majeur en termes de SG pour le pembrolizumab par rapport à la chimiothérapie de 1ère ligne (médiane passant de 14,2 mois à 26,3 mois) chez 305 patients dont la tumeur exprimait PD-L1 dans plus de 50 % des cellules tumorales, ceci malgré un « cross-over » vers l'immunothérapie pour plus de 60 % des patients du bras contrôle (63). C'est actuellement en France la seule immunothérapie disposant d'une AMM en monothérapie en 1ère ligne de traitement.

D'autres molécules ont été testées en 1ère ligne chez des patients sélectionnés sur l'expression du PD-L1 à différents seuils mais celles-ci n'ont pas démontré leur supériorité par rapport à la chimiothérapie (64,65). Plus récemment, l'atézolizumab a démontré sa supériorité en termes de SG par rapport à la chimiothérapie chez des patients dont la tumeur exprime PD-L1 dans plus de 50% des cellules tumorales ou dans plus de 10 % des cellules immunitaires du micro-environnement (66). Il bénéficie d'une AMM aux Etats-Unis dans cette indication.

Enfin, en 2018, sont arrivées les associations chimiothérapie-immunothérapie. Le rationnel de l'association chimiothérapie-inhibiteur de checkpoint immunitaire repose sur la capacité de certains agents cytotoxiques à générer une réponse immunitaire en déclenchant une mort cellulaire immunogène d'une part, et à modifier le microenvironnement immunitaire tumoral d'autre part, en éliminant les cellules immunosuppressives (lymphocytes T régulateurs et cellules myéloïdes suppressives) et en augmentant la proportion de lymphocytes T cytotoxiques (67). Ces associations ont fait la preuve de leur efficacité par rapport à la chimiothérapie seule dans une population non sélectionnée, quel que soit le PD-L1 (67–71). En France, deux associations sont actuellement remboursées : cisplatine (ou carboplatine)-pemetrexed-pembrolizumab avec maintenance par pemprolizumab-pemetrexed pour les carcinomes non-épidermoïdes et carboplatine-paclitaxel-pembrolizumab avec maintenance par pembrolizumab pour les carcinomes épidermoïdes. La maintenance est poursuivie jusqu'à progression ou toxicité.

D'autres associations ont été testées parmi lesquelles les doubles immunothérapies associant un anti-PD-1 à un anti-CTLA4, CTLA4 étant un autre point de contrôle immunitaire exerçant un effet inhibiteur au niveau de la phase d'activation du lymphocyte T. L'association nivolumab-ipilimumab a montré une supériorité en termes de SG par rapport à la chimiothérapie seule (72) mais l'absence de facteur prédictif d'efficacité de cette association fait que sa place n'est pas encore définie dans la stratégie thérapeutique. Cette combinaison n'a été approuvée que par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis chez des patients dont la tumeur exprime à plus de 1% le PD-L1.

c. Le nouvel algorithme de prise en charge en 2020

➢ Chez le patient de moins de 70 ans, PS 0 ou 1 (**figure 5**) :

- En cas de CBNPC de type non-épidermoïde, on peut utiliser :
  - L'association sel de platine-pemetrexed-pembrolizumab avec maintenance par pemetrexed-pembrolizumab.
  - Le pembrolizumab seul si le PD-L1 est exprimé sur plus de 50% des cellules tumorales.

- En cas de carcinome épidermoïde, on peut utiliser de façon similaire :
  - L'association carboplatine-paclitaxel-pembrolizumab avec maintenance par pembrolizumab.
  - Le pembrolizumab seul si le taux de PD-L1 est supérieur à 50%.

L'adjonction de la chimiothérapie à l'immunothérapie pourrait diminuer le nombre de progressions précoces, qui sont de l'ordre de 5 à 15% sous immunothérapie seule (73). A noter toutefois qu'il n'y a pas eu de comparaison directe de l'association chimiothérapie-immunothérapie versus immunothérapie seule chez les patients avec une tumeur exprimant le PD-L1 à plus de 50%.

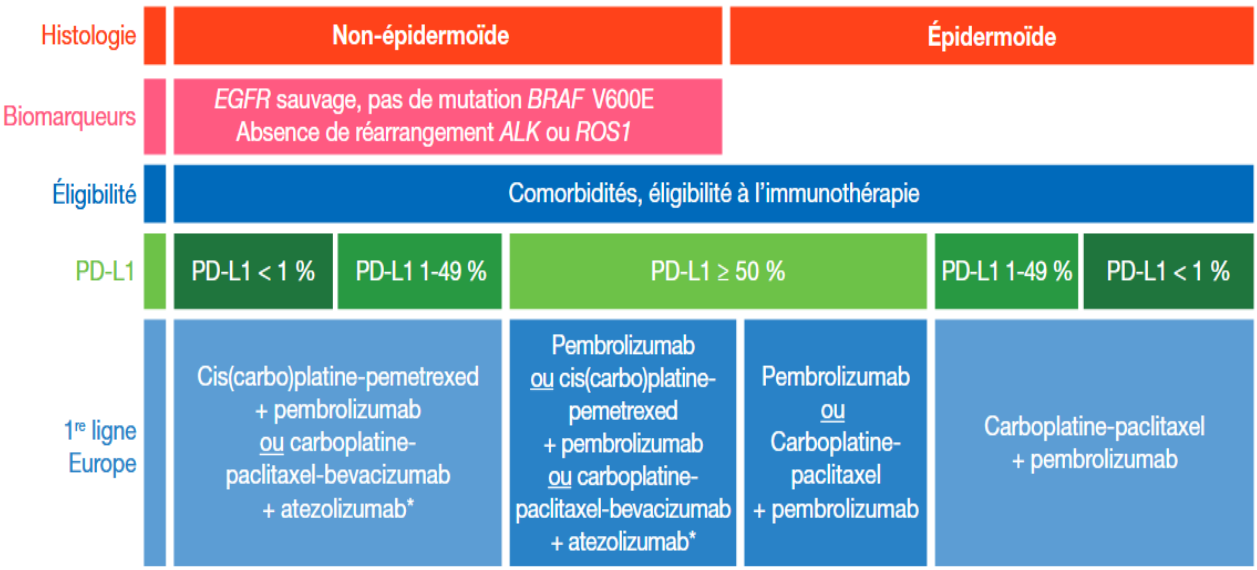


Figure 5 : Algorithme de traitement de 1ère ligne des CBNPCs sans addiction oncogénique au stade métastatique, chez des patients < 70 ans, éligibles à l'immunothérapie et ayant un PS 0 ou 1 (48).

- Chez le patient de plus de 70 ans, PS 0 ou 1 :

Le standard thérapeutique est le pembrolizumab en cas de PD-L1>50% et une bi-chimiothérapie par carboplatine-paclitaxel dans les autres cas.

- Chez le patient PS 2 :

Il est fortement recommandé de se baser sur un doublet à base de carboplatine, adapté à l'histologie (carboplatine-paclitaxel, carboplatine-gemcitabine, carboplatine-pemetrexed uniquement en cas de carcinome non-épidermoïde).

Ce nouvel algorithme de prise en charge complexifie la stratégie de seconde ligne (42).

Après une 1ère ligne de chimiothérapie, une mono-immunothérapie par pembrolizumab, nivolumab ou atézolizumab est recommandée et à l'inverse, après administration du pembrolizumab seul en 1ère ligne, un doublet de chimiothérapie à base de platine reste indiqué.

Seulement, après une association chimiothérapie-immunothérapie, les possibilités sont plus limitées avec le docétaxel, l'association paclitaxel-bévacizumab uniquement pour les carcinomes non-épidermoïdes, et enfin les monothérapies par gemcitabine, vinorelbine et paclitaxel.

L'expression de PD-L1 sur tissu est souvent au cœur de ces nouveaux essais d'immunothérapies en tant que facteur prédictif de réponse mais sa valeur pronostique mal connue pourrait être un facteur confondant.

II. Valeurs pronostique et prédictive de réponse à l'immunothérapie du PD-L1 sur tissu tumoral dans le carcinome bronchique non à petites cellules

Plus de deux tiers des patients présentant un CBNPC métastatique, ont une expression de PD-L1 sur au moins 1% des cellules tumorales et 23 à 32% des patients sont considérés comme à haut niveau d'expression du fait d'une expression sur plus de 50% des cellules tumorales (59,61,67).

A. Valeur pronostique de l'expression de PD-L1 et caractéristiques clinico-pathologiques associées

Dans le CBNPC, la signification pronostique de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales est controversée. Certaines études ne retrouvent pas d'impact pronostique à la surexpression du PD-L1 dans la tumeur (74,75), d'autres lui confèrent un rôle favorable (76,77) et certaines lui attribuent un rôle pronostique péjoratif (78–80).

Cette discordance peut être expliquée en partie par l'hétérogénéité des méthodes de détection et des critères d'interprétation utilisés dans l'évaluation du PD-L1 (81).

Plusieurs méta-analyses de revue systématique de la littérature se sont intéressées à la question et retrouvent un impact pronostique négatif de l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales, pour la plupart en analyse univariée (82–85). Cependant, celles présentant les effectifs les plus importants ne retrouvent pas d'impact pronostique du PD-L1 dans le sous-groupe des études n'ayant inclus que des stades métastatiques (84,85).

Par ailleurs, dans les études de phase III testant immunothérapie versus chimiothérapie ou immuno-chimiothérapie versus chimiothérapie ne comportant que des stades métastatiques, l'expression de PD-L1 sur la tumeur ne semble pas avoir d'impact purement pronostique (57,60,67).

Certaines caractéristiques clinico-pathologiques, globalement de mauvais pronostic, pourraient être associées à l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales :

- Une tumeur peu différenciée dont les sous types micropapillaire et solide en cas d'adénocarcinome (79,80,85).
- Le statut fumeur (79,84,85).
- Et enfin de façon moins reproductible : le sexe masculin (84,85), la taille de la tumeur primitive (84,85), l'envahissement ganglionnaire (78,84,85) et plus globalement un stade TNM avancé (75,84), mais également un statut EGFR sauvage (79,84,85) et à l'inverse un statut KRAS muté (74,85).

B. <u>Valeur prédictive d'efficacité de l'immunothérapie de l'expression de PD-L1</u>

Le niveau d'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales est corrélé à la probabilité de réponse aux anti-PD-1/PD-L1 et à l'amplitude du bénéfice de survie de ces immunothérapies en monothérapie comparativement à la chimiothérapie en 2ème ligne (58–60) et en 1ère ligne (86). Cependant, cette corrélation n'est pas retrouvée dans toutes les études (57,64).

On peut donc qualifier le PD-L1 de facteur prédictif de réponse aux anti-PD-1/PD-L1 mais l'on sait que ce biomarqueur est imparfait.

Plus de 50% des patients avec une tumeur à haut niveau d'expression de PD-L1 ne répondent pas au pembrolizumab en 1ère ligne (62).

A l'inverse, environ 10% des patients dont la tumeur n'exprime pas le PD-L1 répondent à l'immunothérapie en 2ème ligne (58,60).

Ceci pourrait être expliqué en partie par l'hétérogénéité intra-tumorale de l'expression de PD-L1 au sein de la tumeur primitive et entre la tumeur primitive et les métastases (87), mais également par sa variabilité temporelle, en fonction des traitements reçus (55).

D'autre part, la recherche de l'expression du PD-L1 n'est pas toujours faisable sur le prélèvement initial du fait d'une quantité insuffisante de matériel tumoral et la réalisation d'une nouvelle biopsie n'est pas toujours possible du fait du risque de saignement.

C’est dans ce contexte que la recherche du PD-L1 sur cellules tumorales circulantes (CTCs) à l’aide d’une simple prise de sang semble intéressante.

III. Détermination du PD-L1 sur cellules tumorales circulantes

A. Généralités sur les cellules tumorales circulantes

Les CTCs ont été mises en évidence pour la première fois en 1869, par le pathologiste Thomas Ashworth, dans le sang d’un patient présentant un cancer métastatique (88).

Cependant, leur rôle dans le processus métastatique et leur potentielle utilité clinique n’ont été explorés qu’au cours de ces vingt dernières années, en parallèle du développement d’outils de détection plus fiables et plus sophistiqués.

Il faut souligner que la détection de CTCs s’intègre dans le cadre du concept plus global de « biopsie liquide » en temps réel (89). Initialement dédié aux CTCs, le principe de biopsie liquide comprend aujourd’hui la détection dans le sang de différents biomarqueurs, dont l’analyse moléculaire va apporter des informations complémentaires, permettant de refléter au mieux les caractéristiques du cancer du patient, à un instant T. Dans ce contexte, les CTCs mais aussi l’ADN tumoral circulant, les exosomes et les plaquettes éduquées par la tumeur ont démontré leur pertinence clinique (90).

1) Le processus métastatique

Les CTCs sont à la base du processus métastatique qui comprend plusieurs étapes (91). Les étapes précoces, comprenant le détachement des cellules tumorales de la tumeur primitive et leur passage dans la circulation sanguine, sont les plus rapides (de l’ordre de quelques minutes à quelques jours), alors que les étapes ultérieures aboutissant au développement d’un site métastatique manifeste peuvent prendre plusieurs années (92).

a. Détachement de la tumeur primitive, migration à travers le stroma ou « invasion » puis intravasation :

Certaines cellules tumorales grâce à la perte de l’adhésion intercellulaire, à la modification de leur polarité et à des réarrangements du cytosquelette vont pouvoir se détacher de la tumeur primitive. Leur migration à travers le stroma va être facilitée par un remodelage de la matrice extracellulaire par les macrophages associés aux tumeurs (« TAMs » pour tumor-associated macrophages) et par l’action des fibroblastes associés au cancer (« CAFs » pour cancer-associated fibroblasts). Enfin, ce stroma « activé » entraine la production de nombreux facteurs de croissance dont le VEGF (vascular endothelial growth factor) qui, en augmentant la perméabilité de l’endothélium, va permettre l’intravasation des cellules tumorales devenant alors des cellules tumorales circulantes (CTCs).

L'acquisition par les cellules tumorales de ces propriétés d'invasion pourrait être en lien avec une modification transitoire de leur phénotype appelée transition épithélio-mésenchymateuse (« EMT » pour epithelial-to-mesenchymal transition) (93). Au cours de cette transition, les cellules tumorales acquièrent de façon partielle ou totale, un phénotype mésenchymateux (avec schématiquement la perte d'expression de l'E-cadhérine et de EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), et l'expression de la vimentine et de la N-cadhérine) leur conférant un gain en mobilité et en capacité d'invasion. De plus, ce processus permettrait aux cellules tumorales de résister à l'anoïkis (mort cellulaire programmée à la suite de la perte de contact avec la membrane basale) et d'échapper au système immunitaire, mais aussi d'acquérir des caractéristiques de cellule souche, tel que l'auto-renouvellement nécessaire à l'initiation d'une nouvelle tumeur dans un site à distance (**figure 6**). Il a été démontré que les cellules tumorales ayant subi une transition épithélio-mésenchymateuse sont impliquées dans la résistance à la chimiothérapie (94).

Enfin, les cellules tumorales peuvent franchir ces différentes étapes en groupes appelés « clusters » au sein desquels une partie des cellules garde un phénotype épithélial. Ces clusters ou « micro-emboles » ont un potentiel de dissémination métastatique plus important et sont associés à un plus mauvais pronostic (95).

b. Circulation dans le sang puis extravasation

Une fois dans la circulation sanguine, les CTCs sont exposées à de nombreuses contraintes : forces de cisaillement, stress oxydatif, attaques du système immunitaire. La circulation sous forme de clusters ou encore l'association de CTCs isolées aux plaquettes leur permettent d'y résister.

D'autres mécanismes d'échappement au système immunitaire sont décrits (96) et notamment là encore la surexpression de PD-L1 qui pourrait agir en coordination avec le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (97).

Les cellules tumorales vont pouvoir se fixer au niveau de la paroi d'un vaisseau au sein d'un nouvel organe soit du fait de contraintes anatomiques, si bloquées dans un capillaire de petit calibre, soit du fait de leur tropisme pour un organe spécifique par l'intermédiaire d'exosomes sécrétés par la tumeur primitive. Enfin, les métalloprotéases ainsi que le VEGF secrétés par les cellules tumorales et les cellules immunitaires vont augmenter la perméabilité de l'endothélium et permettre l'extravasation.

c. Colonisation d'un organe à distance

Les cellules tumorales ayant colonisé un nouvel organe vont devoir s'adapter à leur nouveau micro-environnement. Ces cellules, appelées cellules tumorales disséminées (« DTCs » pour disseminated tumor cells), vont soit entrer en dormance, où elles sont bloquées de façon réversible en phase G0/G1 du cycle cellulaire, soit aboutir au développement de métastases après réacquisition de leur phénotype épithélial (transition mésenchymo-épithéliale (« MET » en anglais pour mesenchymal-to-epithelial transition) en miroir de la transition épithélio-mésenchymateuse, **figure 6**). On sait également

qu'elles peuvent circuler à nouveau dans le sang pour aller coloniser d'autres organes voire réensemencer le site primitif (98).

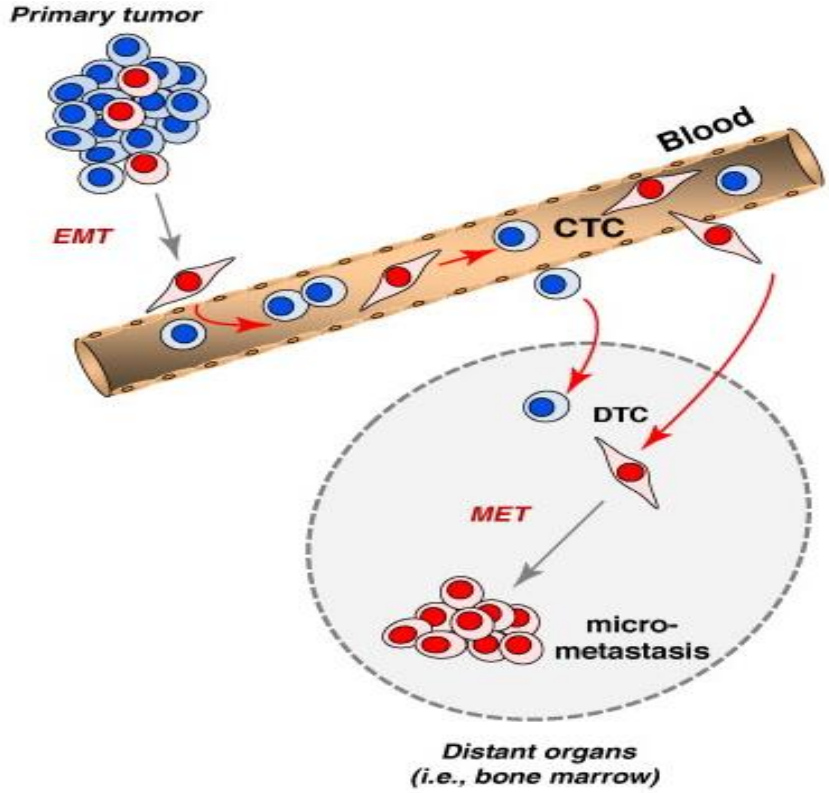


Figure 6 : Transition épithélio-mésenchymateuse réversible et dissémination tumorale (89).

Certaines cellules tumorales se détachent de la tumeur primitive et atteignent la circulation sanguine grâce au processus de transition épithélio-mésenchymateuse (représentées en rouge sur le schéma). Après extravasation, ce sont ces cellules, de par leurs caractéristiques de cellules souches, qui vont préférentiellement donner lieu à des micro-métastases, après réacquisition d'un phénotype épithélial. EMT: epithelial-to-mesenchymal transition; DTC: disseminated tumor cell; MET: mesenchymal-to-epithelial transition.

En conclusion, les CTCs sont de façon théorique un reflet de la tumeur primitive mais également de l'ensemble des sites colonisés à distance. D'autre part, leur demi-vie dans le sang étant très courte (inférieure à 2 heures), leur détection permet de saisir cette hétérogénéité tumorale en temps réel.

Cependant leur détection est un véritable challenge étant donné leur faible concentration dans le sang quand elles sont présentes (89).

2) Méthodes de détection des cellules tumorales circulantes

Pour pouvoir distinguer une CTC parmi les millions de cellules hématopoïétiques qui l'entourent, il faut tout d'abord procéder à une étape d'**enrichissement** qui va augmenter la proportion de cellules tumorales dans l'échantillon.

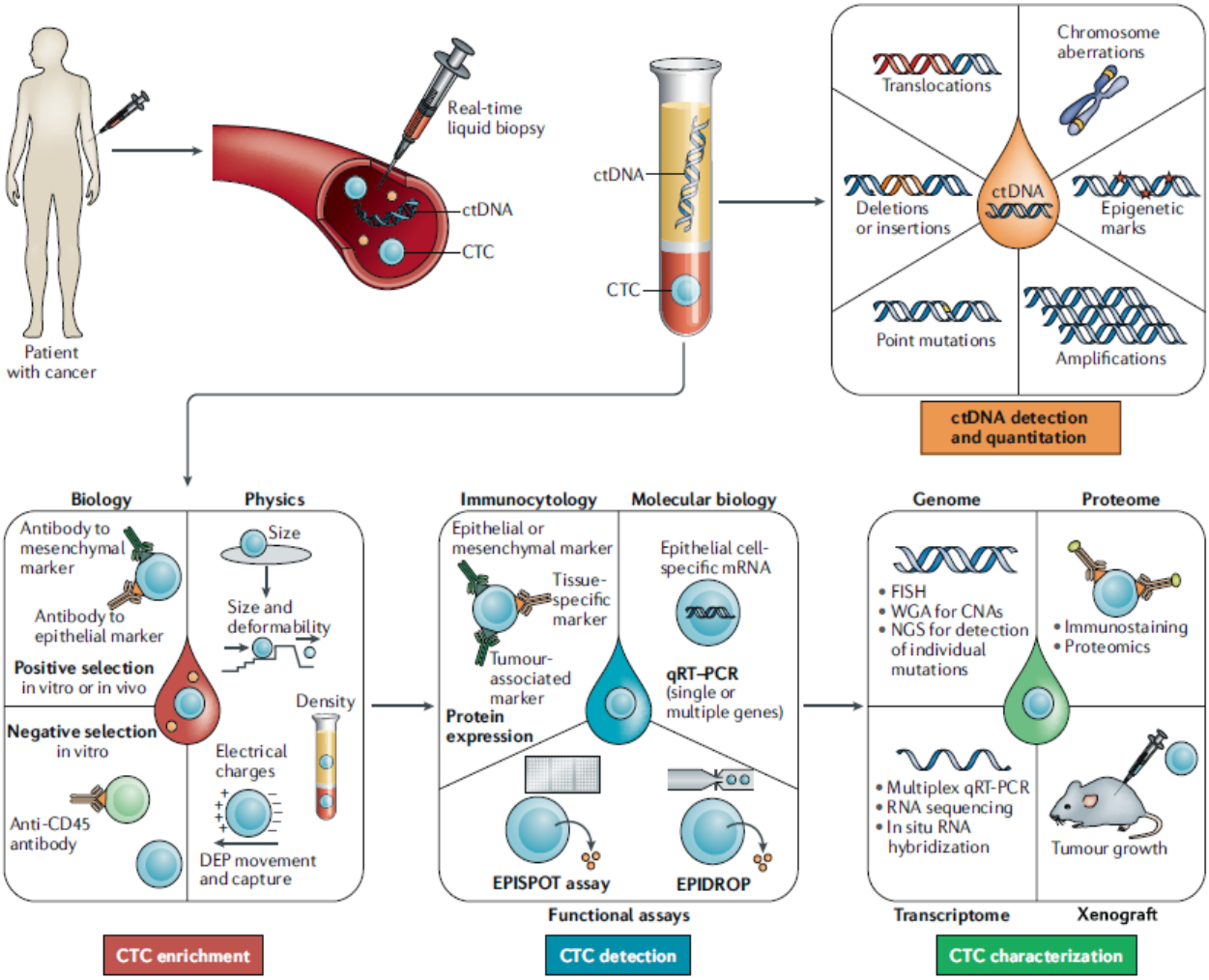


Figure 7 : Différentes méthodes d'enrichissement, de détection et de caractérisation des CTCs (99).

L'ADN tumoral circulant et les CTCs peuvent être détectés à partir du même échantillon de sang. L'enrichissement des CTCs est basé sur leurs propriétés biologiques et/ou physiques. La détection des CTCs se base le plus souvent sur l'immunohistochimie avec la détection de marqueurs spécifiques aux cellules tumorales recherchées. Enfin, les CTCs peuvent être caractérisées sur le plan génomique, transcriptomique et protéomique, et leurs propriétés fonctionnelles peuvent être analysées in vivo dans des modèles de xénogreffes. ctDNA: circulating tumor DNA; DEP: dielectrophoresis; mRNA: messenger RNA; qRT-PCR: quantitative reverse transcription-PCR; FISH: fluorescence in situ hybridization; WGA: whole-genome analysis; CNAs: copy number alterations; NGS: next-generation sequencing.

Différentes méthodes d'enrichissement existent, avec deux axes : celles basées sur les propriétés biologiques des CTCs d'une part, et celles basées sur leurs caractéristiques physiques (96).

- Méthodes d'enrichissement basées sur les propriétés biologiques des CTCs (**figure 7**)

Ce type d'enrichissement peut se faire soit par sélection positive soit par sélection négative. La sélection positive vise à capturer les CTCs à l'aide d'anticorps dirigés contre des antigènes présents à la surface des cellules tumorales, alors que la sélection négative vise à éliminer les leucocytes et les plaquettes avec des anticorps dirigés contre l'antigène CD45 et l'antigène CD61 respectivement. Afin de pouvoir capturer ces cellules, les anticorps utilisés dans ces approches sont couplés à des billes magnétiques. L'exposition du prélèvement à un aimant permet la capture des complexes antigènes-anticorps couplés aux billes magnétiques et l'isolement des cellules (exemples : CellSearch® et AdnaTest pour la sélection positive, Easystep pour la sélection négative). D'autres techniques utilisent des puces micro fluidiques sur lesquelles sont fixées les anticorps (CTC-chip par exemple).

La sélection positive est très souvent effectuée avec un anticorps anti-EpCAM, mais la combinaison d'anticorps ciblant des marqueurs mésenchymateux (comme le FAPα pour fibroblast activation protein alpha ou le CSV pour vimentin surface cell) ou de cellule souche (comme le CD133) permettrait d'augmenter la proportion de cellules tumorales dans l'échantillon. En effet les cellules tumorales ayant subi une transition épithélio-mésenchymateuse sont susceptibles de perdre l'expression de EpCAM et de ne pas être capturées par les techniques basées sur la détection de ce seul marqueur.

- Méthodes d'enrichissement basées sur les caractéristiques physiques des CTCs (**figure 7**)

Il s'agit de techniques basées sur la taille et/ou la déformabilité des cellules tumorales (ISET, Parsortix), leur densité (Ficoll-paque, Oncoquick) ou leurs propriétés électriques (DEPArray). En effet, les CTCs sont généralement plus volumineuses (12 à 25 microns), moins déformables et moins denses que les cellules hématopoïétiques et migrent de façon différente après application d'un champ électrique.

- Enfin certaines techniques sont basées à la fois sur les propriétés biologiques et physiques des cellules tumorales circulantes : immuno- sélection et densité (RosetteSep), immuno- sélection et taille (GEDI chip, CTC-iCHIP).

L'étape suivante concerne la **détection** à proprement dite des CTCs par des techniques d'immunohistochimie (comme avec le système CellSearch® présenté ci-après), moléculaires ou fonctionnelles (**figure 7**) (99).

Les techniques moléculaires se basent sur la détection des ARN messagers des CTCs par RT-PCR (par exemple, le transcrit codant pour la cytokératine 19 dans le cancer du sein) et les techniques fonctionnelles EPISPOT et EPIDROP permettent la détection de

leurs produits de sécrétion (par exemple, le PSA dans le cancer de la prostate). Ces deux types de techniques permettent déjà la **caractérisation** des CTCs (**figure 7**).

En effet, une fois isolées, les cellules tumorales offrent la possibilité d'analyse de leur génome et leur transcriptome (caractérisation moléculaire, au mieux sur cellule unique après une méthode de tri cellulaire comme le DEPArray), leur protéome (caractérisation phénotypique) et leur sécrétome (caractérisation fonctionnelle).

Enfin, la détection de CTCs viables permet le développement de modèles de xénogreffes in vivo (« PDX » pour xenografts derived-patient) et la **mise en culture** in vitro (100) pour une caractérisation la plus complète possible.

La technologie CellSearch® est actuellement l'unique méthode approuvée par la FDA pour détecter les CTCs (101). Son AMM est restreinte à la détection des CTCs dans trois types de cancers à des fins pronostiques : le cancer du sein métastatique, le cancer de la prostate métastatique résistant à la castration et le cancer colorectal métastatique. Cette technique semi-automatisée associe un enrichissement par immuno-sélection positive grâce au marqueur épithélial EpCAM puis une étape de détection par immunohistochimie. Plus précisément, les cellules sont capturées à l'aide de billes magnétiques recouvertes d'un anticorps spécifique du marqueur épithélial EpCAM. Elles sont ensuite marquées avec des anticorps anti-cytokératines (CKs) 8, 18, 19 et anti-CD45 couplés à des fluorochromes, ainsi qu'avec le DAPI, un marqueur nucléaire. Les cellules DAPI+/CD45-/CK+ sont comptabilisées par un automate, le CellTracks Analyzer II. Une cellule doit alors répondre à plusieurs critères pour être retenue comme étant une CTC :

- la cellule doit être intacte avec une morphologie ronde ou ovale et de taille supérieure à 4 µm ;

- avoir un noyau à l'intérieur du cytoplasme et une aire nucléaire inférieure à l'aire cytoplasmique ;

- être marquée positivement par les CKs et négativement par le CD45.

Cette méthode ne s'adapte donc qu'à la détection de CTCs de phénotype épithélial, mais elle est reproductible et standardisée. De plus, l'utilisation de tubes CellSave® avec fixateur spécifique permet de conserver les échantillons jusqu'à quatre jours avant leur analyse.

Enfin, un quatrième canal autorise le marquage par un autre anticorps permettant une caractérisation phénotypique des CTCs, avec par exemple l'utilisation d'anticorps anti-HER2 dans le cancer du sein ou anti-PD-L1.

De nombreuses applications cliniques découlent de la mise en évidence et de la caractérisation de ces CTCs.

3) Pertinence clinique des cellules tumorales circulantes avec un focus sur le carcinome bronchique non à petites cellules

a. Tous cancers confondus

Les CTCs ont plusieurs applications cliniques potentielles dans la prise en charge des cancers solides, que l'on peut distinguer en fonction du stade de la maladie.

Au stade localisé, la présence de CTCs au diagnostic est retrouvée comme facteur pronostique défavorable sur la SSP et la SG dans plusieurs localisations tumorales telles que le cancer du sein (102), du poumon non à petites cellules (103), du colon (104) et du pancréas (105). D'autre part, la présence de CTCs après chirurgie curative est associée à une diminution de la survie sans récidive (106). Ceci a permis d'introduire le concept de maladie résiduelle minimale (« MRD » pour minimal residual disease) qui suppose la présence de cellules tumorales disséminées en dormance et qui précède la récidive « clinique » (99). Chez un patient donné, la surveillance de l'apparition de CTCs après chirurgie pourrait alors permettre de détecter une éventuelle rechute plus précocement qu'avec des examens d'imagerie classiques.

Au stade métastatique, la valeur pronostique indépendante du nombre de CTCs avant traitement a été établie pour différents cancers avec une valeur seuil déterminée par la technologie CellSearch® qui varie en fonction de la localisation tumorale. Ainsi un taux de CTCs supérieur à 5 par 7.5ml de sang impacte négativement la SSP et la SG dans le CBNPC (107), le cancer du sein (108) et le cancer de la prostate résistant à castration (109). Cependant, pour le cancer colo-rectal, ce seuil est fixé à 3 CTCs par 7.5ml de sang (110) tandis que pour le carcinome bronchique à petites cellules, il est de 50 CTCs par 7.5ml de sang (111).

Cette valeur pronostique pourrait permettre la stratification des patients avant traitement et ainsi impacter la prise en charge en attribuant un traitement plus agressif aux patients présentant un taux significatif de CTCs (112).

D'autre part, les CTCs pourraient avoir un rôle dans la prédiction de l'efficacité d'un traitement ciblé. Avant traitement, la recherche de cible thérapeutique sur CTCs (altération génomique ou surexpression protéique) viendrait alors en complément de la biopsie classique afin de refléter au mieux l'hétérogénéité tumorale (113).

Enfin, le monitoring des CTCs en cours de traitement est susceptible d'apporter deux types d'informations précieuses. L'absence de diminution du nombre de CTCs en dessous du seuil pronostique en cours de traitement est associée à une diminution de la SSP et de la SG dans plusieurs localisations tumorales (109,110,114) dont le CBNPC (107,115). Ceci suggère que la persistance ou l'augmentation des CTCs sont associées à une résistance au traitement et qu'une modification précoce de la stratégie thérapeutique pourrait retarder la progression « clinique ». De plus, la caractérisation moléculaire et/ou phénotypique des CTCs à ce moment précis permettrait l'identification d'éventuels mécanismes de résistance (116).

L'utilité clinique des CTCs, c'est-à-dire leur capacité à influencer la décision thérapeutique, a très récemment été démontrée dans le cancer du sein métastatique (117) et ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour l'utilisation des CTCs en routine clinique.

b. Dans le carcinome bronchique non à petites cellules métastatique

Bien que les taux de détection soient extrêmement variables en fonction de la méthode utilisée, la présence de CTCs reste un évènement particulièrement rare dans le CBNPC, y compris au stade métastatique. De plus, lorsqu'elles sont détectées, les CTCs sont alors présentes en faible nombre, ce qui est en totale opposition avec le carcinome bronchique à petites cellules (118).

Au-delà de la valeur pronostique déjà évoquée du nombre de CTCs avant traitement et de sa variation en cours de traitement, les CTCs se sont montrées être de bons outils, non invasifs, pour la détection d'altérations moléculaires ciblables telles que les mutations de l'EGFR, les réarrangements ALK ou ROS1 (119).

En effet, plusieurs études ont démontré la faisabilité de la détection des mutations activatrices de l'EGFR sur CTCs avec une bonne concordance par rapport au statut mutationnel sur la tumeur primitive (120,121). Ceci implique également la possibilité de détection de certains mécanismes de résistance aux ITKs. En particulier, l'apparition de la mutation T790M dans l'exon 20 qui correspond au mécanisme de résistance le plus fréquent après ITK de 1ère ou 2ème génération peut être identifiée sur CTCs (120). Cependant, l'utilisation de l'ADN tumoral circulant qui est plus sensible pour la détection de ces mutations (122), reste la référence en pratique clinique, en complément ou à la place de la biopsie tissulaire quand celle-ci n'est pas faisable.

De la même façon, les réarrangements ALK et ROS1 peuvent être détectés sur CTCs (123). La caractérisation moléculaire des CTCs à l'échelle de cellule unique permet d'identifier différents mécanismes de résistance au crizotinib chez des patients présentant un CBNPC avec réarrangement ALK (124).

Plus récemment, plusieurs études se sont intéressées à la détection du PD-L1 sur CTCs, essentiellement dans le but d'améliorer la valeur prédictive de réponse à l'immunothérapie de ce biomarqueur, avec comme argument majeur son hétérogénéité intra-tumorale (125).

Cependant, leurs résultats ne sont pas uniformes, tant sur le plan de la concordance entre le statut PD-L1 sur tissu et sur CTCs, qu'en termes de valeur pronostique de la présence de CTCs exprimant le PD-L1.

B. Objectifs de l'étude

Le but de notre étude était en premier lieu de confirmer la faisabilité de la détection du PD-L1 sur CTCs dans une cohorte de 54 patients présentant un CBNPC avancé, au moyen de la seule technique actuellement validée pour la détection de CTCs à savoir le système CellSearch®.

Les objectifs en termes de pertinence clinique se déclinaient en 2 parties :

° Evaluation de la concordance entre l'expression de PD-L1 sur tissu tumoral et sur CTCs afin de déterminer dans quelle mesure l'utilisation des CTCs permettrait de mieux refléter l'hétérogénéité intra-tumorale du PD-L1.

° Détermination de la valeur pronostique de la présence de CTCs exprimant le PD-L1 et corrélation aux autres caractéristiques clinico-pathologiques.

IV. Bibliographie

1. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Colonna M, Dantony E, *et al*. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 - Tumeurs solides. Saint-Maurice (Fra) : Sante publique France, 2019. 372 p. Disponible à partir de l'URL : http://www.santepubliquefrance.fr.

2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. nov 2018;68(6):394-424.

3. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. J Thorac Oncol. 1 sept 2015;10(9):1243-60.

4. Van Meerbeeck JP, Fennell DA, De Ruysscher DK. Small-cell lung cancer. The Lancet. nov 2011;378(9804):1741-55.

5. Berghmans T, Grigoriu B, Giroux-Leprieur E, Revel M-P. La classification TNM en pratique : The TNM classification in practice. Rev Mal Respir Actual. 1 oct 2020;12(2, Supplement):2S53-60.

6. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. J Thorac Oncol. 1 janv 2016;11(1):39-51.

7. Sculier J-P, Chansky K, Crowley JJ, Van Meerbeeck J, Goldstraw P. The Impact of Additional Prognostic Factors on Survival and their Relationship with the Anatomical Extent of Disease Expressed by the 6th Edition of the TNM Classification of Malignant Tumors and the Proposals for the 7th Edition. J Thorac Oncol. 1 mai 2008;3(5):457-66.

8. Paesmans M. Les facteurs pronostiques. Rev Mal Respir. 1 oct 2008;25(8, Part 2):3S99-106.

9. Paesmans M. Prognostic and predictive factors for lung cancer. Breathe. 1 déc 2012;9(2):112-21.

10. Ahn M-J, Lee J, Park Y-H, Ahn J-S, Ziogas A, Zell JA, et al. Korean Ethnicity as Compared with White Ethnicity Is an Independent Favorable Prognostic Factor for Overall Survival in Non-small Cell Lung Cancer before and after the Oral Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Era. J Thorac Oncol. 1 août 2010;5(8):1185-96.

11. Kawaguchi T, Matsumura A, Fukai S, Tamura A, Saito R, Zell JA, et al. Japanese Ethnicity Compared with Caucasian Ethnicity and Never-Smoking Status Are Independent Favorable Prognostic Factors for Overall Survival in Non-small Cell Lung Cancer: A Collaborative Epidemiologic Study of the National Hospital Organization Study Group for Lung Cancer (NHSGLC) in Japan and a Southern California Regional Cancer Registry Databases. J Thorac Oncol. 1 juill 2010;5(7):1001-10.

12. Ou S-HI, Ziogas A, Zell JA. Asian Ethnicity Is a Favorable Prognostic Factor for Overall Survival in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) and Is Independent of Smoking Status. J Thorac Oncol. 1 sept 2009;4(9):1083-93.

13. Morel H, Raynard B, d'Arlhac M, Hauss P-A, Lecuyer E, Oliviero G, et al. Prediagnosis weight loss, a stronger factor than BMI, to predict survival in patients with lung cancer. Lung Cancer. 1 déc 2018;126:55-63.

14. Yang R, Cheung MC, Pedroso FE, Byrne MM, Koniaris LG, Zimmers TA. Obesity and weight loss at presentation of lung cancer are associated with opposite effects on survival. J Surg Res. sept 2011;170(1):e75-83.

15. Martin L, Senesse P, Gioulbasanis I, Antoun S, Bozzetti F, Deans C, et al. Diagnostic Criteria for the Classification of Cancer-Associated Weight Loss. J Clin Oncol. 24 nov 2014, 33, 90-99.

16. Colinet B, Jacot W, Bertrand D, Lacombe S, Bozonnat M-C, Daurès J-P, et al. A new simplified comorbidity score as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer patients: description and comparison with the Charlson's index. Br J Cancer. 14 nov 2005;93(10):1098-105.

17. Ball D, Thursfield V, Irving L, Mitchell P, Richardson G, Torn-Broers Y, et al. Evaluation of the Simplified Comorbidity Score (Colinet) as a prognostic indicator for patients with lung cancer: A cancer registry study. Lung Cancer. 1 nov 2013;82(2):358-61.

18. Alexander M, Evans SM, Stirling RG, Wolfe R, Officer A, MacManus M, et al. The Influence of Comorbidity and the Simplified Comorbidity Score on Overall Survival in Non-Small Cell Lung Cancer-A Prospective Cohort Study. J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer. 2016;11(5):748-57.

19. Alexander M, Wolfe R, Ball D, Conron M, Stirling RG, Solomon B, et al. Lung cancer prognostic index: a risk score to predict overall survival after the diagnosis of non-small-cell lung cancer. Br J Cancer. août 2017;117(5):744-51.

20. Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, Matsumura A, Fukai S, Tamura A, et al. Performance Status and Smoking Status Are Independent Favorable Prognostic Factors for Survival in Non-small Cell Lung Cancer: A Comprehensive Analysis of 26,957 Patients with NSCLC. J Thorac Oncol. 1 mai 2010;5(5):620-30.

21. Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, Garcia C, Hossein-Foucher C, Lafitte J-J, et al. Primary Tumor Standardized Uptake Value Measured on Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Is of Prognostic Value for Survival in Non-small Cell Lung Cancer: Update of a Systematic Review and Meta-Analysis by the European Lung Cancer Working Party for the International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project. J Thorac Oncol. mai 2010;5(5):612-9.

22. Paesmans M, Garcia C, Wong C-YO, Jr EFP, Komaki R, Eschmann S, et al. Primary tumour standardised uptake value is prognostic in nonsmall cell lung cancer: a multivariate pooled analysis of individual data. Eur Respir J. 1 déc 2015;46(6):1751-61.

23. Deng. Lung Large Cell Neuroendocrine Carcinoma: An Analysis of Patients from the Surveillance, Epidemiology, and End-Results (SEER) Database. Medical Science Monitor. 2019, 25, 3636-46.

24. Strand T-E, Rostad H, Møller B, Norstein J. Survival after resection for primary lung cancer: a population based study of 3211 resected patients. Thorax. 1 août 2006;61(8):710-5.

25. Chansky K, Sculier J-P, Crowley JJ, Giroux D, Van Meerbeeck J, Goldstraw P. The International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project: Prognostic Factors and Pathologic TNM Stage in Surgically Managed Non-small Cell Lung Cancer. J Thorac Oncol. juill 2009;4(7):792-801.

26. Zhang J, Gold KA, Lin HY, Swisher SG, Xing Y, Lee JJ, et al. Relationship between tumor size and survival in non-small cell lung cancer (NSCLC): an analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) registry. J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer. avr 2015;10(4):682-90.

27. Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. Does Lung Adenocarcinoma Subtype Predict Patient Survival?: A Clinicopathologic Study Based on the New International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Lung Adenocarcinoma Classification. J Thorac Oncol. sept 2011;6(9):1496-504.

28. Wang. The comparison between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in lung cancer patients. J Cancer Res Clin Oncol. 2020, 146, 43-52.

29. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. Phase III Study Comparing Cisplatin Plus Gemcitabine With Cisplatin Plus Pemetrexed in Chemotherapy-Naive Patients With Advanced-Stage Non–Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol. 20 juill 2008;26(21):3543-51.

30. Langer CJ, Obasaju C, Bunn P, Bonomi P, Gandara D, Hirsch FR, et al. Incremental Innovation and Progress in Advanced Squamous Cell Lung Cancer: Current Status and Future Impact of Treatment. J Thorac Oncol. 1 déc 2016;11(12):2066-81.

31. Sun Z, Aubry M-C, Deschamps C, Marks RS, Okuno SH, Williams BA, et al. Histologic grade is an independent prognostic factor for survival in non–small cell lung cancer: An analysis of 5018 hospital- and 712 population-based cases. J Thorac Cardiovasc Surg. 1 mai 2006;131(5):1014-20.

32. Carbone DP, Gandara DR, Antonia SJ, Zielinski C, Paz-Ares L. Non–Small-Cell Lung Cancer: Role of the Immune System and Potential for Immunotherapy. J Thorac Oncol. 1 juill 2015;10(7):974-84.

33. Bell DW, Lynch TJ, Haserlat SM, Harris PL, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Mutations and Gene Amplification in Non–Small-Cell Lung Cancer: Molecular Analysis of the IDEAL/INTACT Gefitinib Trials. J Clin Oncol. 1 nov 2005;23(31):8081-92.

34. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, et al. Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor and in KRAS Are Predictive and Prognostic Indicators in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer Treated With Chemotherapy Alone and in Combination With Erlotinib. J Clin Oncol. 1 sept 2005;23(25):5900-9.

35. Kim YT, Seong YW, Jung YJ, Jeon YK, Park IK, Kang CH, et al. The Presence of Mutations in Epidermal Growth Factor Receptor Gene Is Not a Prognostic Factor for Long-Term Outcome after Surgical Resection of Non–Small-Cell Lung Cancer. J Thorac Oncol. 1 févr 2013;8(2):171-8.

36. Guibert N, Ilie M, Léna H, Didier A, Hofman P, Mazieres J. KRAS et adénocarcinome bronchique. Entre déceptions et espoirs. Rev Mal Respir. 1 févr 2016;33(2):156-64.

37. Simmons CP, Koinis F, Fallon MT, Fearon KC, Bowden J, Solheim TS, et al. Prognosis in advanced lung cancer – A prospective study examining key clinicopathological factors. Lung Cancer. 1 juin 2015;88(3):304-9.

38. Gu X-B, Tian T, Tian X-J, Zhang X-J. Prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. Sci Rep. 24 juill 2015;5:12493.

39. Johnson KR, Ringland C, Stokes BJ, Anthony DM, Freemantle N, Irs A, et al. Response rate or time to progression as predictors of survival in trials of metastatic colorectal cancer or non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. Lancet Oncol. 1 sept 2006;7(9):741-6.

40. Lang D, Huemer F, Rinnerthaler G, Horner A, Wass R, Brehm E, et al. Therapy Line and Associated Predictors of Response to PD-1/PD-L1-Inhibitor Monotherapy in Advanced Non-small-Cell Lung Cancer: A Retrospective Bi-centric Cohort Study. Target Oncol. 2019;14(6):707-17.

41. Baldacci S, Mascaux C, Cortot A. Oncogenèse pulmonaire : mécanismes généraux et addictions oncogéniques: Pulmonary oncogenesis: General mechanisms and oncogenic addictions. Rev Mal Respir Actual. 1 oct 2020;12(2, Supplement):2S22-30.

42. Couraud PS. Référentiels Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique. 2020;73.

43. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, Cho BC, Gray JE, Ohe Y, et al. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. N Engl J Med. 2020, 382(1), 41-50.

44. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim D-W, et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2017, 377(9), 829-38.

45. Camidge DR, Kim HR, Ahn M-J, Yang JC-H, Han J-Y, Lee J-S, et al. Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2018, 379(21), 2027-39.

46. Mazières. Crizotinib Therapy for Advanced Lung Adenocarcinoma and a ROS1 Rearrangement: Results From the EUROS1 Cohort. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol, 2015, 33(9), 992-9.

47. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland Å, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol. 1 oct 2017;18(10):1307-16.

48. Pérol M, Swalduz A, Avrillon V, Gounant V, Brosseau S, Zalcman G. Traitements systémiques de première ligne dans les CBNPC avancés en l'absence d'addiction oncogénique: Frontline systemic treatment of advanced NSCLC without oncogenic addiction. Rev Mal Respir Actual. 1 oct 2020;12(2, Supplement):2S173-84.

49. Pujol J-L, Barlesi F, Daurès J-P. Should chemotherapy combinations for advanced non-small cell lung cancer be platinum-based? A meta-analysis of phase III randomized trials. Lung Cancer Amst Neth. mars 2006;51(3):335-45.

50. Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M, Fossella FV, Schiller JH, Paesmans M, et al. Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. J Natl Cancer Inst. 6 juin 2007;99(11):847-57.

51. Soria J-C, Mauguen A, Reck M, Sandler AB, Saijo N, Johnson DH, et al. Systematic review and meta-analysis of randomised, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. Ann Oncol. 1 janv 2013;24(1):20-30.

52. Pérol M, Arpin D. Traitement de maintenance dans les cancers bronchiques non à petites cellules métastatiques : une révolution conceptuelle ? Presse Médicale. 1 avr 2011;40(4, Part 1):404-14.

53. Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. Immunity. 25 juill 2013;39(1):1-10.

54. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular Pathways: Next-Generation Immunotherapy—Inhibiting Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-1. Clin Cancer Res. 15 déc 2012;18(24):6580-7.

55. Chen J, Jiang CC, Jin L, Zhang XD. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. Ann Oncol. 1 mars 2016;27(3):409-16.

56. Lantuejoul S, Adam J, Girard N, Duruisseaux M, Mansuet-Lupo A, Cazes A, et al. Tests immunohistochimiques PD-L1 dans les cancers du poumon non à petites cellules : recommandations par le groupe PATTERN de pathologistes thoraciques. Ann Pathol. 1 avr 2018;38(2):110-25.

57. 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.

58. 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.

59. 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.

60. 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. The Lancet. 21 janv 2017;389(10066):255-65.

61. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2015, 372, 2018-28.

62. 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. 10 2016;375(19):1823-33.

63. Reck M, Rodríguez–Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater. J Clin Oncol. 8 janv 2019;37(7):537-46.

64. 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. 2017, 376, 2415-26.

65. Rizvi NA, Cho BC, Reinmuth N, Lee KH, Luft A, Ahn M-J, et al. Durvalumab With or Without Tremelimumab vs Standard Chemotherapy in First-line Treatment of Metastatic Non–Small Cell Lung Cancer. JAMA Oncol. mai 2020;6(5):661-74.

66. Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, Reinmuth N, Vergnenegre A, Barrios CH, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC. N Engl J Med. 01 2020;383(14):1328-39.

67. Gandhi L. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2018, 378, 2078-92.

68. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. N Engl J Med. 4 juin 2018, 378, 2288-2301.

69. West H, McCleod M, Hussein M, Morabito A, Rittmeyer A, Conter HJ, et al. Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol. 1 juill 2019;20(7):924-37.

70. Paz-Ares L. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non–Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2018, 379, 2040-2051.

71. Jotte R, Cappuzzo F, Vynnychenko I, Stroyakovskiy D, Rodríguez-Abreu D, Hussein M, et al. Atezolizumab in Combination With Carboplatin and Nab-Paclitaxel in Advanced Squamous NSCLC (IMpower131): Results From a Randomized Phase III Trial. J Thorac Oncol. 1 août 2020;15(8):1351-60.

72. Hellmann MD, Paz-Ares L, Caro RB, Zurawski B, Kim S-W, Costa EC, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 28 sept 2019, 381, 2020-2031.

73. Ferrara R, Mezquita L, Texier M, Lahmar J, Audigier-Valette C, Tessonnier L, et al. Hyperprogressive Disease in Patients With Advanced Non–Small Cell Lung Cancer Treated With PD-1/PD-L1 Inhibitors or With Single-Agent Chemotherapy. JAMA Oncol. nov 2018;4(11):1543-52.

74. Scheel AH, Ansén S, Schultheis AM, Scheffler M, Fischer RN, Michels S, et al. PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Correlations with genetic alterations. Oncoimmunology. 16 mars 2016, 5(5), e1131379.

75. Cha YJ, Kim HR, Lee CY, Cho BC, Shim HS. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand-1 expression in lung adenocarcinoma and its relationship with p53 status. Lung Cancer. 1 juill 2016;97:73-80.

76. Cooper WA, Tran T, Vilain RE, Madore J, Selinger CI, Kohonen-Corish M, et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. Lung Cancer. 1 août 2015;89(2):181-8.

77. Yang C-Y, Lin M-W, Chang Y-L, Wu C-T, Yang P-C. Programmed cell death-ligand 1 expression is associated with a favourable immune microenvironment and better overall survival in stage I pulmonary squamous cell carcinoma. Eur J Cancer. 1 avr 2016;57:91-103.

78. Chen Y, Mu C-Y, Huang J-A. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. Tumori. nov 2012;98(6):751-5.

79. Takada K, Okamoto T, Shoji F, Shimokawa M, Akamine T, Takamori S, et al. Clinical Significance of PD-L1 Protein Expression in Surgically Resected Primary Lung Adenocarcinoma. J Thorac Oncol. 1 nov 2016;11(11):1879-90.

80. Kim H, Kwon HJ, Park SY, Park Y, Park E, Chung J-H. Clinicopathological analysis and prognostic significance of programmed cell death-ligand 1 protein and mRNA expression in non-small cell lung cancer. PloS One. 2018;13(6):e0198634.

81. Takada K, Toyokawa G, Shoji F, Okamoto T, Maehara Y. The Significance of the PD-L1 Expression in Non–Small-Cell Lung Cancer: Trenchant Double Swords as Predictive and Prognostic Markers. Clin Lung Cancer. 1 mars 2018;19(2):120-9.

82. Pan Z-K, Ye F, Wu X, An H-X, Wu J-X. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand1 (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. J Thorac Dis. mars 2015;7(3):462-70.

83. Wang A, Wang HY, Liu Y, Zhao MC, Zhang HJ, Lu ZY, et al. The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: A meta-analysis. Eur J Surg Oncol EJSO. 1 avr 2015;41(4):450-6.

84. Zhang M, Li G, Wang Y, Wang Y, Zhao S, Haihong P, et al. PD-L1 expression in lung cancer and its correlation with driver mutations: a meta-analysis. Sci Rep. 31 août 2017;7(1):10255.

85. Li H, Xu Y, Wan B, Song Y, Zhan P, et al. The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression assessed by immunohistochemistry in lung cancer: a meta-analysis of 50 studies with 11,383 patients. Transl Lung Cancer Res. août 2019;8(4):429-49.

86. Mok TSK, Wu Y-L, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. The Lancet. 4 mai 2019;393(10183):1819-30.

87. Wang Y, Wang H, Yao H, Li C, Fang J-Y, Xu J. Regulation of PD-L1: Emerging Routes for Targeting Tumor Immune Evasion. Front Pharmacol. 22 mai 2018, 9, 536.

88. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. The medical journal of australia. 1869, 14, 146-147.

89. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. Trends Mol Med. 1 sept 2010;16(9):398-406.

90. Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Cayrefourcq L, Alix-Panabières C. The Different Facets of Liquid Biopsy: A Kaleidoscopic View. Cold Spring Harb Perspect Med. 01 2020;10(6), a037333.

91. Pascussi J-M, Giraud J, Samalin E, Grillet F, Pannequin J. Bases fondamentales du processus métastatique. Bull Cancer (Paris). juin 2016;103(6):S39-47.

92. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic Colonization. Nature. 21 janv 2016;529(7586):298-306.

93. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. Cell. 25 nov 2009;139(5):871-90.

94. Fischer. EMT is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. Nature. 2015, 527(7579):472-6.

95. Cheung KJ, Ewald AJ. A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. Science. 8 avr 2016;352(6282):167-9.

96. Dianat-Moghadam H, Azizi M, Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Heidarifard M, Nouri M, et al. The Role of Circulating Tumor Cells in the Metastatic Cascade: Biology, Technical Challenges, and Clinical Relevance. Cancers. 3 avr 2020, 12(4):867.

97. Raimondi C, Carpino G, Nicolazzo C, Gradilone A, Gianni W, Gelibter A, et al. PD-L1 and epithelial-mesenchymal transition in circulating tumor cells from non-small cell lung cancer patients: A molecular shield to evade immune system? OncoImmunology. 2 déc 2017;6(12):e1315488.

98. Kim M-Y, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH-F, Norton L, et al. Tumor Self-Seeding by Circulating Cancer Cells. Cell. 24 déc 2009;139(7):1315-26.

99. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. Nat Rev Clin Oncol. juill 2019;16(7):409-24.

100. Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, Solassol J, Ramos J, Assenat E, et al. Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. Cancer Res. 1 mars 2015;75(5):892-901.

101. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 oct 2004;10(20):6897-904.

102. Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. J Natl Cancer Inst. 15 mai 2014; 106(5):dju066.

103. Zhu W-F, Li J, Yu L-C, Wu Y, Tang X-P, Hu Y-M, et al. Prognostic value of EpCAM/MUC1 mRNA-positive cells in non-small cell lung cancer patients. Tumor Biol. 1 févr 2014;35(2):1211-9.

104. Bork U, Rahbari NN, Schölch S, Reissfelder C, Kahlert C, Büchler MW, et al. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study. Br J Cancer. 14 avr 2015;112(8):1306-13.

105. Effenberger KE, Schroeder C, Hanssen A, Wolter S, Eulenburg C, Tachezy M, et al. Improved Risk Stratification by Circulating Tumor Cell Counts in Pancreatic Cancer. Clin Cancer Res. 15 juin 2018;24(12):2844-50.

106. Trapp E, Janni W, Schindlbeck C, Jückstock J, Andergassen U, de Gregorio A, et al. Presence of Circulating Tumor Cells in High-Risk Early Breast Cancer During Follow-Up and Prognosis. J Natl Cancer Inst. 01 2019;111(4):380-7.

107. Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou J-M, Greystoke A, et al. Evaluation and Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol. 21 mars 2011;29(12):1556-63.

108. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer, N Engl J Med, 2004, 351, 781-91.

109. Bono JS de, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. Clin Cancer Res. 1 oct 2008;14(19):6302-9.

110. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. J Clin Oncol. 1 juill 2008;26(19):3213-21.

111. Hou J-M. Clinical Significance and Molecular Characteristics of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Patients With Small-Cell Lung Cancer. Journal of Clinical Oncology. 2012, 30, 525-532.

112. Krebs MG, Renehan AG, Backen A, Gollins S, Chau I, Hasan J, et al. Circulating Tumor Cell Enumeration in a Phase II Trial of a Four-Drug Regimen in Advanced Colorectal Cancer. Clin Colorectal Cancer. 1 juin 2015;14(2):115-122.e2.

113. Aktas B, Kasimir-Bauer S, Müller V, Janni W, Fehm T, Wallwiener D, et al. Comparison of the HER2, estrogen and progesterone receptor expression profile of primary tumor, metastases and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. BMC Cancer. 25 juill 2016;16(1):522.

114. Bidard F-C, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. Lancet Oncol. 1 avr 2014;15(4):406-14.

115. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, Raja R, Fine BM, Hughes BGM, et al. Evaluation of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Non–Small Cell Lung Cancer: Association with Clinical Endpoints in a Phase II Clinical Trial of Pertuzumab and Erlotinib. Clin Cancer Res. 15 avr 2012;18(8):2391-401.

116. Armstrong AJ, Halabi S, Luo J, Nanus DM, Giannakakou P, Szmulewitz RZ, et al. Prospective Multicenter Validation of Androgen Receptor Splice Variant 7 and Hormone Therapy Resistance in High-Risk Castration-Resistant Prostate Cancer: The PROPHECY Study. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 01 2019;37(13):1120-9.

117. Bidard F-C, Jacot W, Kiavue N, Dureau S, Kadi A, Brain E, et al. Efficacy of Circulating Tumor Cell Count–Driven vs Clinician-Driven First-line Therapy Choice in Hormone Receptor–Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: The STIC CTC Randomized Clinical Trial. JAMA Oncol. 5 nov 2020, e205660.

118. Kapeleris J, Kulasinghe A, Warkiani ME, Vela I, Kenny L, O'Byrne K, et al. The Prognostic Role of Circulating Tumor Cells (CTCs) in Lung Cancer. Front Oncol. 14 août 2018, 8, 311.

119. Tong B, Wang M. Circulating tumor cells in patients with lung cancer: developments and applications for precision medicine. Future Oncol Lond Engl. juill 2019;15(21):2531-42.

120. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, et al. Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells. N Engl J Med. 2008, 359(4), 366-77.

121. Marchetti, L F, S M, G F, I C, T DP, et al. Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: toward a real-time liquid biopsy for treatment. Vol. 9, PloS one. PLoS One; 2014, 9(8):e103883.

122. Zhang Y, Zheng H, Zhan Y, Long M, Liu S, Lu J, et al. Detection and application of circulating tumor cell and circulating tumor DNA in the non-small cell lung cancer. Am J Cancer Res. 2018;8(12):2377.

123. Ross K, Pailler E, Faugeroux V, Taylor M, Oulhen M, Auger N, et al. The potential diagnostic power of circulating tumor cell analysis for non-small-cell lung cancer. Expert Rev Mol Diagn. 2 déc 2015;15(12):1605-29.

124. Pailler E, Faugeroux V, Oulhen M, Mezquita L, Laporte M, Honoré A, Lecluse Y, Queffelec P, NgoCamus M, Nicotra C, Remon J, Lacroix L, Planchard D, Friboulet L, Besse B, Farace F. Acquired Resistance Mutations to ALK Inhibitors Identified by Single Circulating Tumor Cell Sequencing in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res; 2019, 25(22):6671-6682.

125. Kloten V, Lampignano R, Krahn T, Schlange T. Circulating Tumor Cell PD-L1 Expression as Biomarker for Therapeutic Efficacy of Immune Checkpoint Inhibition in NSCLC. Cells. août 2019;8(8):809.

ARTICLE SCIENTIFIQUE

La partie expérimentale de ce travail est rédigée en anglais, sous la forme d'un article scientifique en vue d'une publication dans une revue indexée, de langue anglaise.

Title

PD-L1-expressing circulating tumor cells: a new prognostic biomarker in non-small cell lung cancer.

Authors

Léa Sinoquet,[a] William Jacot,[a,b] Ludovic Gauthier,[c] Stéphane Pouderoux,[a] Marie Viala,[a] Laure Cayrefourcq,[d,e] Xavier Quantin,[a,b] Catherine Alix-Panabières[d,e]

[a] Department of Medical Oncology, Institut du Cancer Montpellier (ICM), Montpellier University, Montpellier, France

[b] Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), INSERM U1194, Montpellier University, Montpellier, France

[c] Biometrics Unit, Institut du Cancer Montpellier (ICM), Montpellier University, Montpellier, France

[d] Laboratory of Rare Human Circulating Cells (LCCRH), University Medical Centre of Montpellier, Montpellier, France

[e] CREEC/CANECEV, MIVEGEC (CREES), University of Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France

Abstract

Introduction: In non-small cell lung cancer (NSCLC), analysis of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression in circulating tumor cells (CTCs) is a potential alternative to overcome the problems linked to the tumor biopsy spatiotemporal heterogeneity. However, the prognostic significance of PD-L1-positive (PD-L1$^{(+)}$) CTCs remains controversial.

Methods: We prospectively evaluated the correlation with clinicopathological variables and prognostic value of PD-L1$^{(+)}$ CTCs, detected with the FDA-cleared CellSearch® system, in 54 patients with advanced NSCLC.

Results: We detected CTCs and PD-L1$^{(+)}$ CTCs in 43.4% and 9.4% of patients with NSCLC. PD-L1 expression concordance between tumor tissue and CTCs was low (54%). PD-L1$^{(+)}$ CTC presence was correlated with the absence of gene alterations in tumor tissue and with poor prognosis-related biological variables (anemia, hyponatremia, increased LDH level). In univariate analysis, absence of gene alterations, number of metastatic sites, prior systemic therapies, and presence of CTCs and PD-L1$^{(+)}$ CTCs were associated with worse overall survival (OS), whereas PD-L1 expression in tumor tissue was not. In multivariate analysis, squamous cell carcinoma histology, number of prior systemic treatments, and CTC presence were significantly associated with OS. Survival was worse in patients with PD-L1$^{(+)}$ CTCs than in patients with PD-L1-negative CTC or without any CTC.

Conclusions: Our study suggests that the presence of PD-L1$^{(+)}$ CTCs is associated with poor prognosis in patients with advanced NSCLC. Studies with larger samples are needed to confirm our results and to determine how PD-L1$^{(+)}$ CTC detection could help to predict the response or resistance to anti-PD-1/PD-L1 therapies.

Keywords

Non-small cell lung cancer (NSCLC); programmed cell death ligand 1 (PD-L1); circulating tumor cells (CTCs); CellSearch® system; prognostic value.

Introduction

Lung cancer, mainly represented by non-small cell lung cancer (NSCLC), is the leading cause of cancer death worldwide (1). Blockade of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) interaction with its receptor programmed cell death 1 (PD-1) has revolutionized the treatment of NSCLC without oncogenic addiction, such as epidermal growth factor receptor (EGFR) alterations or anaplastic lymphoma kinase rearrangements. Nowadays, in patients with NSCLC, these immune checkpoint inhibitors (ICIs) are used alone as first and second-line treatments (2,3), and also in association with chemotherapy in first line-settings (4,5).

PD-L1 expression in the tumor is one of the most established predictive biomarkers of response to anti-PD-1/PD-L1 therapies, and is currently the only predictive biomarker used in clinical practice (6). However, more than 50% of patients with high PD-L1 expression in tumor do not benefit from first-line pembrolizumab (anti-PD-1 antibody) (2). Conversely, 10% of patients with a PD-L1-negative tumor respond to second-line anti-PD-1/PD-L1 agents (3,7). These findings may be explained by the spatiotemporal heterogeneity of PD-L1 expression in the tumor, and also by technical differences in the methods used for its detection (8).

Circulating tumor cells (CTCs) might better reflect the tumor heterogeneity than tissue biopsies because they arise from different tumor sites (9). Furthermore, as they are collected using a minimally invasive method (blood sampling), they can be analyzed longitudinally as liquid biopsies (10), and might provide information on the different mechanisms of treatment resistance. Several groups have assessed PD-L1 expression on CTCs from patients with NSCLC using different methods, including the CellSearch® system (the only FDA-cleared CTC detection method) (11–14). However, their findings, in terms of concordance between PD-L1 expression in tumor tissue and in CTCs, are contradictory. Moreover, the presence of PD-L1-positive CTCs (PD-L1$^{(+)}$ CTCs) at baseline was not predictive of the response to ICIs (15), but was associated with poorer prognosis (16–18).

The aim of this study was to confirm the feasibility of PD-L1 assessment in CTCs detected with the CellSearch® system, in a cohort of patients with advanced NSCLC,

and to determine the concordance with PD-L1 expression status in tumor tissue biopsies. Moreover, the clinicopathological correlations and prognostic value of PD-L1$^{(+)}$ CTCs were prospectively investigated.

Materials and methods

Patients

This study is part of the ALCINA trial that assesses circulating biomarkers in different cancer types (NCT02866149). Patients older than 18 years of age with histologically confirmed stage III or IV NSCLC treated at the Montpellier Cancer Institute (ICM) were prospectively enrolled between June 2016 and June 2018. All patients signed a written informed consent.

Patients were prospectively followed to determine progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). The patients' characteristics at inclusion were extracted from their electronic health record.

Blood samples and CTC detection

Blood was drawn from the arm vein of each patient in specific CellSave® tubes (Menarini, 10 mL) for CTC detection. Blood samples were then kept at room temperature and sent to the "Detection of Rare Human Circulating Cells – LCCRH" Laboratory at Montpellier University Medical Center, France, where they were processed immediately with the CellSearch® system.

For all experiments, we used the CellSearch CTC Kit (#7900001) that contains a ferrofluid-based capture reagent and immunofluorescent reagents. The ferrofluid reagent is made of nanoparticles with a magnetic core surrounded by a polymeric layer coated with anti-Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) antibodies for CTC capture. After immunomagnetic capture and enrichment, the following fluorescent reagents were added for detection: anti-cytokeratin (CK)-phycoerythrin, and anti-CD45-allophycocyanin antibodies and 4′-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

The CellSearch CTC Kit leaves a fourth channel open for assessing an additional marker (PD-L1 in this study). PD-L1 expression on CTCs was evaluated with the anti-human B7-H1/PD-L1 fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody from R&D System the sensitivity and specificity of which were demonstrated in a previous study (19). An event was defined as a CTC with the EpCAM-positive, CK-positive, DAPI-positive, CD45-negative phenotype that expresses or not PD-L1.

Statistical analysis

Data were described using frequencies and percentages for qualitative variables and means, medians and ranges for continuous variables. For qualitative variables, percentages were calculated relative to the total population, excluding missing data. Data were compared with the Chi-square test or the Fischer's exact test for qualitative variables, and the Kruskal-Wallis test for quantitative variables.

Concordance between PD-L1 expression in the matched tumor tissue and CTCs was determined by calculating the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, using the PD-L1 evaluation on tumor tissue as the gold standard.

The primary endpoints of the outcome analysis were PFS and OS. All survival times were calculated from the inclusion date and estimated with the Kaplan-Meier method and 95% confidence intervals (95% CI).

Univariate analysis was performed using the log rank test for qualitative variables and a Cox proportional hazards model for continuous variables. For the multivariate Cox models, variables were selected using a backward selection process, checking for cofounding effects at each step.

All statistical tests were bilateral and a $p < 0.05$ was considered statistically significant. All statistical analyses were performed with STATA, v16.0.

Results

Descriptive analysis

Patients' characteristics at inclusion

Fifty-four patients with stage III - IV NSCLC were prospectively enrolled between June 2016 and June 2018. Their main characteristics are summarized in **Table 1**.

Table 1: Patients' characteristics at inclusion (N = 54)

Characteristics	N (%)
Age (mean, range)	64.5 (34 - 84)
Sex	
Male	31 (57.4)
Female	23 (42.6)
Smoking status	
Never smoker	7 (13.5)
Former smoker	37 (71.1)
Current smoker	8 (15.4)
NA	2
Performance status*	
0	11 (22)
1	29 (58)
2	9 (18)
3	1 (2)
NA	4
Histological type	
Adenocarcinoma	39 (72.2)
SCC	11 (20.4)
Others	4 (7.4)
Molecular alteration (if applicable**, N = 42)	
Targetable (EGFR / ROS1)	8 (19.1)
Not targetable	15 (35.7)
No	19 (45.2)
Stage	
III	3 (5.6)
IV	51 (94.4)
Number of metastatic sites (mean, range)	2.7 (0 - 6)
Prior treatment	
No	9 (16.7)
Yes	45 (83.3)
Surgery	14 (25.9)
Radiotherapy or radio-chemotherapy	17 (31.5)
Systemic treatment	37 (68.5)
1 line	23 (42.6)
2 lines	7 (13)
3 lines	6 (11.1)
>3 lines	1 (1.9)

NA: not available; SCC: squamous cell carcinoma.

*: Eastern Cooperative Oncology Group performance-status score (on 5-point scale, with higher scores indicating increasing disability) (20); **: not applicable for SCC in smoker patients and neuroendocrine carcinoma

Their mean age was 64.5 years, 57.4% were men and 86% were smokers. Most patients were in good general condition (performance status score = 0 or 1 in 80% of patients). Most patients had stage IV NSCLC (94.4%); adenocarcinoma was the most frequent histological type (72.2%). Among the non-squamous carcinomas (and squamous carcinomas in non-smokers), 23 tumors (54.8%) had molecular alterations, including 8 targetable alterations (*EGFR* mutations and *ROS1* rearrangements).

The median time from diagnosis to inclusion was 18 months. Most patients (83.3%) had already had one or more treatment before inclusion: surgery (25.9%), radio-chemotherapy (7.4%), radiotherapy alone (24.1%), and at least one systemic treatment (68.5%).

CTC detection, PD-L1 expression in tumor tissue samples and in CTCs

Information on PD-L1 expression in tumor biopsies was available for 42/54 patients (77.8%). PD-L1 expression was detected in at least 1% of tumor cells in 19/42 tumor biopsies (45.2%). PD-L1 expression in biopsies was assessed on average 5 months before inclusion. The most frequently used antibody was the clone E1L3N.

Among the 54 blood samples, one was not interpretable because of intensity saturation causing a reading problem in the CellTrack Analyzer. CTCs were detected in 23 of the 53 remaining samples (43.4%). The median CTC number per 7.5ml of blood was 3 (range, 1 to 205). PD-L1$^{(+)}$ CTCs were detected in five blood samples (9.4%) (median number = 3; range, 1 - 4). In these five samples, the PD-L1$^{(+)}$ CTC subset represented 1.5 to 100% of the whole number of detected CTCs.

PD-L1 expression concordance between tumor biopsies and CTCs

Concordance between PD-L1 expression in tumor biopsies (≥1% of tumor cells) and in CTCs could be analyzed in 41 patients (**Table 2**).

Only 10.5% of patients with PD-L1-positive tumor biopsy had PD-L1$^{(+)}$ CTCs in the blood sample. On the other hand, PD-L1$^{(+)}$ CTCs were detected in the blood sample of 9.1% of patients with PD-L1-negative biopsy.

These results indicate a very low agreement between detection methods, with a concordance rate of 53.7%.

Table 2: Concordance between PD-L1 expression in tumor biopsy and CTCs (N = 41)

	PD-L1 expression in tumor biopsy (≥1% of tumor cells)		Total
	No	Yes	
	N=22	N=19	N=41
Presence of PD-L1$^{(+)}$ CTCs			
No	20 (90.9%)	17 (89.5%)	37 (90.2%)
Yes	2 (9.1%)	2 (10.5%)	4 (9.8%)

Concordance rate = 53.7%,

Sensitivity = 10.5%, Specificity = 90.9%,

Positive predictive value = 50.0%, Negative predictive value = 54.0%

Correlations of CTC and PD-L1$^{(+)}$ CTC presence with clinicopathological variables

CTC presence was significantly correlated with lower body mass index (BMI) (22.5 *versus* 25.5, p = 0.019), higher number of metastatic sites (3.2 *versus* 2, p = 0.003) and lower level of lymphocytes (1.2 *versus* 1.6 G/L, p = 0.037) (**Supplementary Table 1**).

PD-L1$^{(+)}$ CTC detection was significantly correlated with the absence of molecular alterations (no tumor in the PD-L1$^{(+)}$ CTC patient subgroup displayed molecular alterations compared with 23 tumors in the other 37 patients; 0% *versus* 62.2%, p = 0.030), lower levels of hemoglobin (11.1 *versus* 12.5 g/dL, p = 0.028) and sodium (136.4 *versus* 140.1 mmol/L, p = 0.021), and higher LDH concentration (667.5 *versus* 294.2 IU/L, p = 0.048) (**Supplementary Table 2**).

All clinicopathological variables that showed a weak correlation (p <0.25) with CTC and PD-L1$^{(+)}$ CTC presence are reported in **Supplementary Table 1** and **Supplementary Table 2**, respectively.

The mean number of CTCs tended to be higher in patients with detectable PD-L1$^{(+)}$ CTCs compared with those without PD-L1$^{(+)}$ CTCs (52.2 *versus* 9.9, p = 0.150) (**Supplementary Table 3**). A logistic regression analysis found a positive, but not significant correlation between CTC number and PD-L1$^{(+)}$ CTC presence (Odds Ratio

= 1.30 (0.82 - 2.05), p = 0.267), possibly due to the low sample size (**Supplementary Table 4**).

Correlation of CTCs and PD-L1$^{(+)}$ CTCs with clinical outcomes

At the cut-off date of December, 15, 2020, the median follow-up was 44.9 months (95% CI: 33.0 - 52.4).

CTC presence correlates with progression-free survival

In univariate analysis, CTC presence was significantly associated with worse PFS (median PFS: 2.6 *versus* 8.3 months, Hazard Ratio, HR = 2.27 [1.28 - 4.04], p = 0.006, **Figure 1A**).

Considering the PD-L1 status of CTCs (**Figure 2A**), the presence of PD-L1$^{(+)}$ CTCs did not significantly change PFS (HR = 1.89 [0.72 - 4.95], p = 0.200). Conversely, PFS was shorter in patients with PD-L1-negative CTCs compared with patients without CTC (HR = 2.43 [1.30 - 4.55], p = 0.005). PD-L1 expression in tumor biopsies was not correlated with PFS (HR = 0.67 [0.36 - 1.25], p = 0.204) (**Supplementary Table 5**). Clinicopathological features showing a weak correlation with PFS (p <0.25) are summarized in **Supplementary Table 5**. Among them, molecular alterations, particularly presence of a targetable alteration, were significantly associated with longer PFS (HR = 0.50 [0.26 - 0.95], p = 0.004 and HR = 0.31 [0.12 - 0.81], p = 0.006, respectively). Conversely, PFS was significantly worse in former smokers than in patients without smoking history (HR = 3.22 [1.31 - 7.92], p = 0.017).

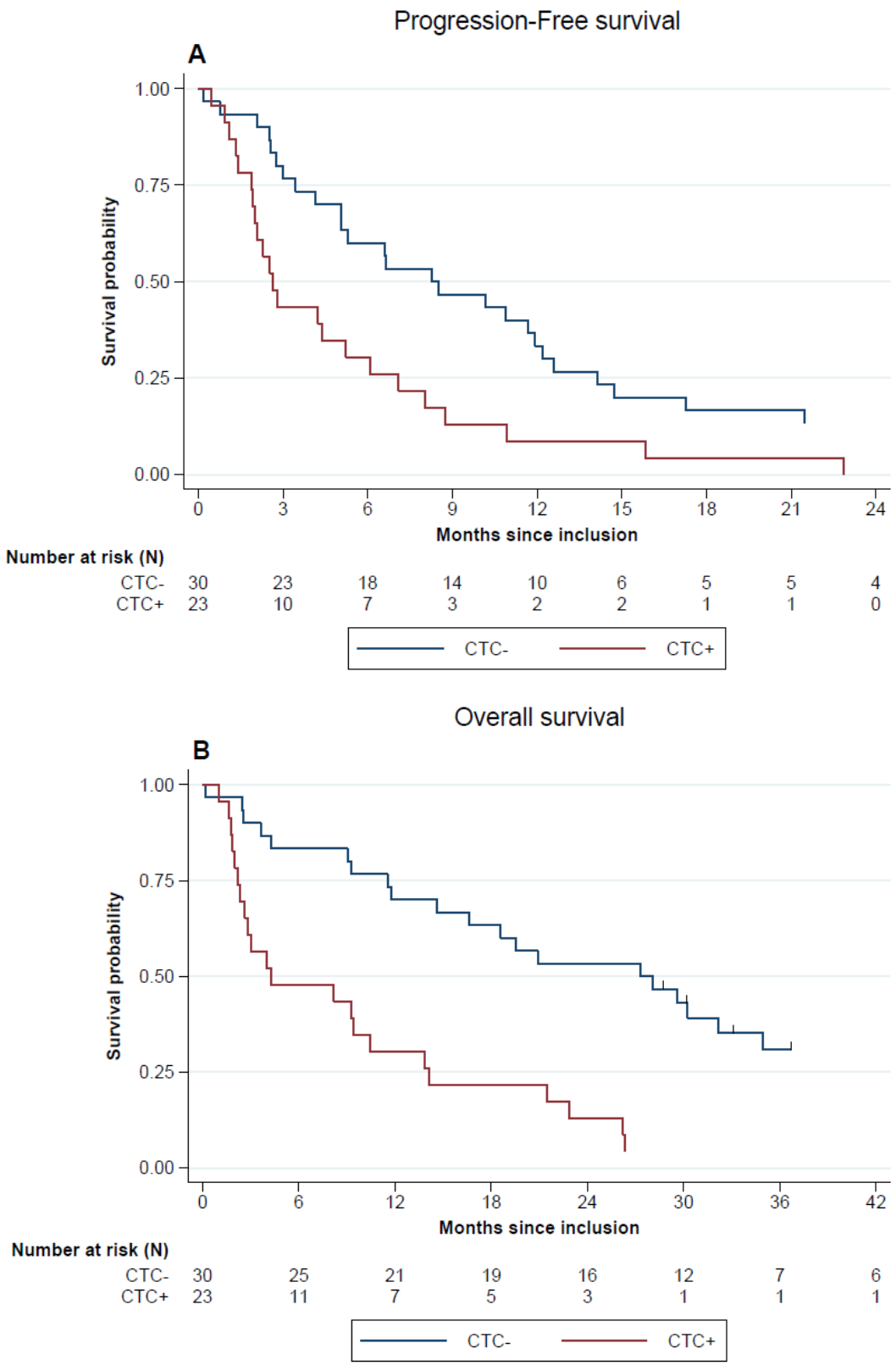


Figure 1. PFS (A) and OS (B) in patients with and without CTCs. A: PFS is shorter in patients harboring at least one CTC compared with patients without CTCs (HR = 2.27 [1.28 - 4.04], p = 0.006). **B**: CTC presence is also associated with shorter OS (HR = 3.06 [1.65 - 5.70], p < 0.001).

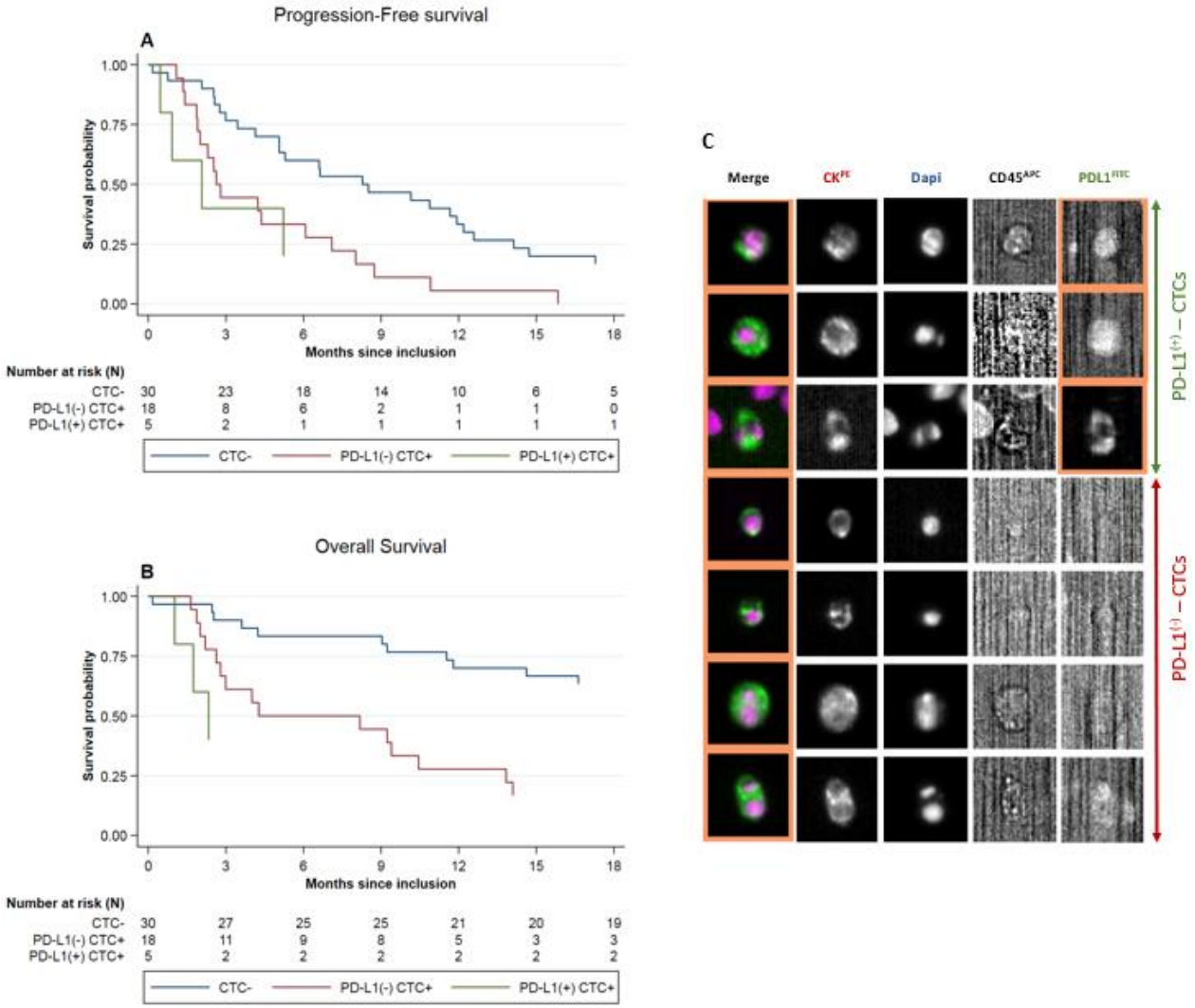


Figure 2. PFS (A) and OS (B) according to the CTC PD-L1 status (C). A: PFS is shorter in patients harboring PD-L1$^{(-)}$ CTCs compared with patients without any CTCs (HR = 2.43 [1.30 - 4.55], p = 0.005), whereas the presence of PD-L1$^{(+)}$ CTCs does not significantly impact PFS (HR = 1.89 [0.72 - 4.95], p = 0.200). **B**: OS is significantly worse in patients with PD-L1$^{(-)}$ CTCs and with PD-L1$^{(+)}$ CTCs than in patients without CTCs (HR = 2.93 [1.51 - 5.68] and 3.63 [1.33 - 9.91] respectively, p = 0.002). **C**: Representative images of PD-L1$^{(+)}$ CTCs and PD-L1$^{(-)}$ CTCs detected in blood samples from patients with metastatic NSCLC using the CellSearch® system. CTCs are identified as EpCAM$^{(+)}$CK$^{(+)}$DAPI$^{(+)}$CD45$^{(-)}$ cells. The antibody used in the 4th channel is the anti-human B7-H1/PD-L1 FITC-conjugated monoclonal antibody (final concentration of 20 µg/mL).

To assess the prognostic value (PFS) of CTCs and PD-L1$^{(+)}$ CTC presence, three multivariate models were built: i) *Model 1* (patients with PD-L1$^{(-)}$ CTCs and PD-L1$^{(+)}$ CTCs *versus* patients without CTC; ii) *Model 2* (all patients with at least one CTC *versus* patients without CTC; and iii) *Model 3* (patients with PD-L1$^{(+)}$ CTC *versus* all the other patients).

All variables that were significantly correlated with CTC or PD-L1$^{(+)}$ CTC presence in the correlation analysis and those that showed a moderate association with PFS in univariate analysis ($p < 0.25$) were tested in each model. Although the presence of molecular alterations was positively correlated with PFS in univariate analysis, this variable was not included in the multivariate models because it concerned only a subset of the target population. At the end of this selection process, each model included hemoglobin level (continuous variable).

These models showed that PFS was shorter in patients with at least one CTC than in those without CTC (Model 2: HR = 2.03 [1.12 - 3.69], p = 0.022). Conversely, PD-L1$^{(+)}$ CTC presence did not influence PFS in models 1 and 3 (**Table 3)**.

Table 3: Adjusted hazards ratios for the variables associated with progression-free survival. Multivariate Cox model.

Variable	Model 1 (N=51)		Model 2 (N=51)		Model 3 (N=51)	
	HR	**95% CI**	**HR**	**95%CI**	**HR**	**95%CI**
PD-L1 status in CTCs		**P=0.032**				
CTC$^{(-)}$	1.00	Ref				
PD-L1$^{(-)}$ CTC	2.48	[1.28 ; 4.79]				
PD-L1$^{(+)}$ CTC	1.24	[0.44 ; 3.45]				
CTC presence				**P=0.022**		
No			1.00	Ref		
Yes			2.03	[1.12 ; 3.69]		
PD-L1$^{(+)}$ CTC presence						**P=0.974**
No					1.00	Ref
Yes					0.98	[0.37 ; 2.65]
Hemoglobin (g/dL)		**P=0.017**		**P=0.040**		**P=0.020**
Increase of 1 unit	0.78	[0.63 ; 0.96]	0.81	[0.66 ; 1.00]	0.78	[0.63 ; 0.96]

Overall survival is worse in patients with PD-L1$^{(+)}$ CTCs

CTC presence was significantly associated with shorter OS compared with no CTC detection (median OS: 4.3 *versus* 27.3 months respectively, HR = 3.06 [1.65 - 5.70], p < 0.001) (**Figure 1B**). Furthermore, OS was significantly worse in patients with PD-L1$^{(-)}$ CTCs and particularly in patients with PD-L1$^{(+)}$ CTCs compared with patients without CTCs (HR = 2.93 [1.51 - 5.68] and 3.63 [1.33 - 9.91], respectively, p = 0.002) (**Figure 2B**). Conversely, PD-L1 expression in the tumor biopsy was not associated with OS (HR = 0.75 [0.38 - 1.48], p = 0.407).

Four other variables significantly affected OS in univariate analysis: presence of a molecular alteration (HR = 0.41 [0.21 - 0.81], p = 0.011), number of metastatic sites (HR = 1.25 [1.02 - 1.54], p = 0.037), more than two lines of previous systemic therapy (HR = 4.8 [1.73 - 13.3], p = 0.044), and previous platinum-based doublet chemotherapy (HR = 2.07 [1.10 - 3.91], p = 0.020) (**Supplementary Table 6**).

Three multivariate models were built using the same method as for the PFS analysis. All models finally included the number of prior systemic therapy lines and tumor histological type. Results are reported in **Table 4**. CTC presence was significantly associated with worse OS (Model 2: HR = 4.11 [1.99 - 8.50], p = 0.001). Unlike the PFS results, OS was significantly worse in patients with PD-L1$^{(+)}$ CTCs compared with patients with PD-L1$^{(-)}$ CTCs and without CTCs in model 1 (HR of PD-L1$^{(+)}$ CTC presence *versus* CTC absence = 5.51 [1.93 - 15.73] and HR of PD-L1$^{(-)}$ CTC presence *versus* CTC absence = 3.70 [1.67 - 8.17], p = 0.001), and when compared with patients without PD-L1$^{(+)}$ CTCs in model 3 (HR = 3.69 [1.36 - 9.99], p = 0.024).

Finally, high number of previous systemic treatments and squamous cell carcinoma histological type were significantly correlated with worse OS in all models.

Table 4: Adjusted hazards ratios for the variables associated with overall survival. Multivariate Cox model.

Variable	Model 1 (N=53)		Model 2 (N=53)		Model 3 (N=53)	
	HR	95% CI	HR	95% CI	HR	95% CI
PD-L1 status in CTCs		**P=0.001**				
$CTC^{(-)}$	1.00	Ref				
$PD\text{-}L1^{(-)}$ $CTC^{(+)}$	3.70	[1.67 ; 8.17]				
$PD\text{-}L1^{(+)}$ $CTC^{(+)}$	5.51	[1.93 ; 15.73]				
CTC presence				**P=0.001**		
No			1.00	Ref		
Yes			4.11	[1.99 ; 8.50]		
$PD\text{-}L1^{(+)}$ CTC presence						**P=0.024**
No					1.00	Ref
Yes					3.69	[1.36 ; 9.98]
Number of previous systemic therapy lines		**P=0.016**		**P=0.016**		**P=0.003**
0	1.00	Ref	1.00	Ref	1.00	Ref
1-2	2.44	[1.12 ; 5.33]	2.48	[1.14 ; 5.42]	2.07	[0.94 ; 4.55]
>2	4.33	[1.38 ; 13.62]	3.97	[1.30 ; 12.10]	7.30	[2.40 ; 22.24]
Histological type		**P=0.007**		**P=0.007**		**P=0.021**
Adenocarcinoma	1.00	Ref	1.00	Ref	1.00	Ref
SCC	3.62	[1.66 ; 7.91]	3.63	[1.66 ; 7.94]	2.89	[1.37 ; 6.09]
Others	2.74	[0.73 ; 10.26]	2.59	[0.70 ; 9.59]	2.90	[0.76 ; 11.13]

SCC: squamous cell carcinoma

Although the presence of molecular alterations was positively correlated with PFS and OS in univariate analysis, this variable was not included in the multivariate models because it concerned only a subset of the target population.

Discussion

CTC immunocytological characterization, as a *liquid biopsy*, might better reflect NSCLC heterogeneity than tumor biopsy analysis (13). In this study, we confirmed that PD-L1 expression status can be investigated in CTCs from patients with advanced NSCLC using the FDA-cleared CellSearch® system. We detected CTCs and PD-L1$^{(+)}$ CTCs in 43.4% and 9.4% of patients, respectively. The concordance rate of PD-L1 expression in matched tumor biopsy and CTCs was only 53.7%. The presence of CTCs (CTC ≥1) was significantly associated with worse PFS and OS. Despite the low number of patients with PD-L1$^{(+)}$ CTCs, their detection was significantly correlated with worse OS, and tended to be associated with shorter PFS. Conversely, PD-L1 expression in the tumor biopsy did not have any prognostic impact.

We found that 43.4% of patients had at least one detectable CTC, which is in line with other studies using the CellSearch® technology. Indeed, CTC detection rate in advanced NSCLC ranges from 40 to 60% of patients (21–23). The negative prognostic value of CTC count in advanced NSCLC has been demonstrated by different studies using the CellSearch® system, with a threshold of 5 (22,24) or 2 CTCs per 7.5 ml of blood (23). Here, we found that the presence of one CTC had a prognostic impact, which is relevant considering CTC scarcity in NSCLC. The correlation between CTC detection and number of metastatic sites has been well described (21,23,24), whereas its association with lower level of circulating lymphocytes and lower BMI has been less frequently reported.

In 2017, Ye *et al.* reported that CTC presence is correlated with lower levels of T lymphocytes and natural killer cells in peripheral blood of patients with NSCLC (25). These and our results suggest a close relationship between altered immune surveillance and CTC presence. For example, in breast cancer, CTC presence has been associated with an increase of peripheral CD95(FAS)-positive T-helper cells (26). Similarly, Wang *et al.* recently demonstrated that CTC detection in NSCLC is linked to upregulation of several inhibitory checkpoint receptors (TIM-3, PD-1, CTLA-4, and LAG-3) on tumor-infiltrating lymphocytes (27). Finally, CTC association with lower BMI has been observed also in metastatic breast cancer (28). However, we cannot exclude a confounding effect, because cachexia is more likely to occur in patients with NSCLC and high tumor burden (29).

Some studies reported a positive correlation between presence of EGFR alterations and CTC detection (22,30). In our study, CTC detection rate was not different in the subgroup of patients with targetable alterations (seven EGFR alterations and one ROS1 rearrangement), in agreement with a recent meta-analysis (31). However, the low number of patients in this subgroup precludes any definitive conclusion in our population.

In 2015, our group was the first to detect PD-L1 expression on CTCs from patients with metastatic breast cancer (32). In 2016, Schehr *et al.* assessed PD-L1 expression on CTCs from 19 patients with metastatic NSCLC, highlighting the challenge of detecting PD-L1 on CTCs, because many immune cells express this marker (33). Shortly thereafter, many studies investigated the feasibility and clinical significance of PD-L1 detection on CTCs in NSCLC (11). Here, we detected at least one PD-L1$^{(+)}$ CTC in 9.4% of patients. Considering all previously published studies, the detection rate ranges from 7.5% (34) to 100% (35). This large variability may be mainly related to differences in terms of detection methods, such as CTC enrichment technique (antigen-dependent (14,36) or antigen-independent methods (37)), antibodies against PD-L1, and analytical thresholds for single-cell PD-L1 positivity. Only Nicolazzo *et al.* used the CellSearch® system for CTC detection in 24 patients with metastatic NSCLC, and found CTCs and PD-L1$^{(+)}$ CTCs in 83% and 79% of samples, respectively (14). The high detection rate in this study, compared with our findings, could be explained by the fact that all patients were heavily pretreated (100% received at least one prior line of systemic therapy *versus* 68.5% in our study). Additional studies are needed to better explain these discrepancies and to determine PD-L1$^{(+)}$ CTC rate in advanced NSCLC. Mostly, it will be crucial to assess their clinical relevance, and not just their number.

We found a significant correlation between PD-L1$^{(+)}$ CTC detection and absence of molecular alterations. Especially, none of the patients in the PD-L1$^{(+)}$ CTC group had targetable alterations in the tumor tissue. Similarly, Koh *et al.* reported that the number of PD-L1$^{(+)}$ CTCs is significantly higher in patients with adenocarcinoma without EGFR mutation than with EGFR mutation (n=67 patients in total) (38). This is in line with the observation that PD-L1 positivity on tissue is more frequent in NSCLC with wild type EGFR (39), probably because tumors with oncogene addiction, associated with low rate of tobacco-induced carcinogenesis, show a weak immunogenicity (40). On the

other hand, the correlation with several biological variables related to poor prognosis and advanced disease (anemia, hyponatremia, high level of LDH) is not surprising because PD-L1$^{(+)}$ CTC detection is associated with higher NSCLC stage (35).

To our knowledge, this is the first study to assess the prognostic value (OS/PFS) of PD-L1$^{(+)}$ CTC detection in advanced NSCLC using the FDA-cleared CellSearch® technology. PFS tended to be shorter in patients with PD-L1$^{(+)}$ CTCs, but did not reach significance, probably due to small sample size. Conversely, PD-L1 expression on tumor tissue, which is a very debated prognostic factor in NSCLC, was not associated with PFS and OS. Some publications also found a negative prognostic impact of PD-L1$^{(+)}$ CTCs in NSCLC (16–18), whereas other studies did not report any significant prognostic value of this CTC subpopulation (41–43). Again, these discrepancies may be related to differences in CTC enrichment and detection methods as well in the choice of the anti-PD-L1 antibodies.

PD-L1 upregulation is one of the mechanisms through which tumor cells escape the immune system (44). In different cancer types, including lung cancer (45), PD-L1 upregulation has been associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). Nicolazzo *et al.* found that most PD-L1$^{(+)}$ CTCs display an unusual elongated morphology, suggesting partial EMT (14). Furthermore, mesenchymal markers and PD-L1 are frequently co-expressed in CTCs from patients with NSCLC (35,46,47). It has been hypothesized that tumor cells that undergo EMT gain migratory properties and stem cell-like features, and consequently, could become more aggressive (48). Interestingly, these CTCs can still express EpCAM, which is crucial for metastasis-competent CTCs (49). Indeed, EpCAM may not be completely lost during EMT, and in our study, this marker was used for CTC capture. We can hypothesize that EMT and PD-L1 upregulation on EpCAM$^{(+)}$ CTCs are two mechanisms that cooperate to promote tumor cell dissemination. However, we found a trend to higher CTC count in patients with PD-L1$^{(+)}$ CTCs. We could not assess the independent prognostic value of PD-L1$^{(+)}$ CTCs in model 1 due to the small sample size (n=5 patients with detectable PD-L1$^{(+)}$ CTCs). Thus, we cannot rule out that the prognostic impact of PD-L1$^{(+)}$ CTC detection could be linked to the overall higher number of detected CTCs, a feature frequently associated with worse prognosis (31).

The concordance analysis may have been skewed by the temporal heterogeneity of PD-L1 expression analysis because the mean time interval between tissue and blood

sampling was 5 months. However, in line with our results, many studies showed the absence of correlation between PD-L1 expression on tumor tissue and on CTCs (35,38,50,51), even when blood and tumor sampling were done at the same time (35,51). Our group recently published similar data on patients with breast cancer where only PD-L1 detection in CTCs, but not in the tumor, had a clinical relevance (19). These findings suggest that CTCs are a complementary tool for PD-L1 expression detection with a clear clinical relevance in NSCLC.

Finally, several studies suggest that the persistence or increase of PD-L1$^{(+)}$ CTCs during immunotherapy may mirror a mechanism of therapy escape (14,51). This could not be evaluated in this work because ICIs had only restricted indications when the project was started. Our ongoing study (NCT04025541), in which PD-L1$^{(+)}$ CTCs are monitored during anti-PD-1/PD-L1 therapy, will help to determine whether this CTC subpopulation can predict the response or resistance to these immunotherapies.

Conclusion

Our data confirm the feasibility of PD-L1 detection on CTCs in patients with advanced NSCLC, using the CellSearch® technology, and suggest a negative prognostic impact of the PD-L1$^{(+)}$ CTC subpopulation. The weak concordance between PD-L1 expression on the tumor tissue and CTCs, as well as the fact that only PD-L1 expression on CTCs predicted the clinical outcome (OS/PFS), suggest that tissue biopsy and CTCs are two complementary tools. Larger studies are needed to confirm our findings and to determine how PD-L1$^{(+)}$ CTCs, as *liquid biopsy,* could help to predict the response or resistance to anti-PD-1/PD-L1 therapies with the aim of proposing personalized treatments to patients with NSCLC.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394-424.

2. 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. 2016;375(19):1823-33.

3. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2015;373(17):1627-39.

4. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, Angelis FD, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2018;2(5):258-85.

5. Paz-Ares L, Ciuleanu T-E, Cobo M, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2021;22(2):198-211.

6. Davis AA, Patel VG. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis of all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. J Immunother Cancer. 2019;7(1):278.

7. 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. The Lancet. 2017;389(10066):255-65.

8. Wang M, Wang S, Trapani JA, Neeson PJ. Challenges of PD-L1 testing in non-small cell lung cancer and beyond. J Thorac Dis. 2020;12(8):4541-8.

9. Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Cayrefourcq L, Alix-Panabières C. The Different Facets of Liquid Biopsy: A Kaleidoscopic View. Cold Spring Harb Perspect Med. 2020;10(6): a037333.

10. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. Nat Rev Clin Oncol. 2019;16(7):409-24.

11. Acheampong E, Spencer I, Lin W, Ziman M, Millward M, Gray E. Is the Blood an Alternative for Programmed Cell Death Ligand 1 Assessment in Non-Small Cell Lung Cancer?. Cancers. 2019;11(7):920.

12. Alix-Panabières Catherine & Pantel Klaus. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. Cancer Discov. ARTICLE IN PRESS.

13. Hofman P, Heeke S, Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid biopsy in the era of immuno-oncology: is it ready for prime-time use for cancer patients?. Ann Oncol. 2019;30(9):1448-59.

14. Nicolazzo C, Raimondi C, Mancini M, Caponnetto S, Gradilone A, Gandini O, et al. Monitoring PD-L1 positive circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients treated with the PD-1 inhibitor Nivolumab. Sci Rep. 2016;6:31726.

15. Papadaki MA, Sotiriou AI, Vasilopoulou C, Filika M, Aggouraki D, Tsoulfas PG, et al. Optimization of the Enrichment of Circulating Tumor Cells for Downstream Phenotypic Analysis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Anti-PD-1 Immunotherapy. Cancers. 2020;12(6):1556.

16. Boffa DJ, Graf RP, Salazar MC, Hoag J, Lu D, Krupa R, et al. Cellular Expression of PD-L1 in the Peripheral Blood of Lung Cancer Patients is Associated with Worse Survival. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2017;26(7):1139-45.

17. Wang Y, Kim TH, Fouladdel S, Zhang Z, Soni P, Qin A, et al. PD-L1 Expression in Circulating Tumor Cells Increases during Radio(chemo)therapy and Indicates Poor Prognosis in Non-small Cell Lung Cancer. Sci Rep. 2019;9(1):1-9.

18. Kotsakis A, Kallergi G, Aggouraki D, Lyristi Z, Koinis F, Lagoudaki E, et al. CD8+ PD-1+ T-cells and PD-L1+ circulating tumor cells in chemotherapy-naïve non-small cell lung cancer: towards their clinical relevance?. Ther Adv Med Oncol. 2019;11:1-14.

19. Jacot W, Mazel M, Mollevi C, Pouderoux S, D'Hondt V, Cayrefourcq L, et al. Clinical Correlations of Programmed Cell Death Ligand 1 Status in Liquid and Standard Biopsies in Breast Cancer. Clin Chem. 2020;66(8):1093-101.

20. Oken M, Creech R, Tormey D, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol. 1982;5:649-55.

21. Muinelo-Romay L, Vieito M, Abalo A, Alonso Nocelo M, Barón F, Anido U, et al. Evaluation of Circulating Tumor Cells and Related Events as Prognostic Factors and Surrogate Biomarkers in Advanced NSCLC Patients Receiving First-Line Systemic Treatment. Cancers. 2014;6(1):153-65.

22. Lindsay CR, Faugeroux V, Michiels S, Pailler E, Facchinetti F, Ou D, et al. A prospective examination of circulating tumor cell profiles in non-small-cell lung cancer molecular subgroups. Ann Oncol. 2017;28(7):1523-31.

23. Zhou J, Dong F, Cui F, Xu R, Tang X. The role of circulating tumor cells in evaluation of prognosis and treatment response in advanced non-small-cell lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2017;79(4):825-33.

24. Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou J-M, Greystoke A, et al. Evaluation and Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol. 2011;29(12):1556-63.

25. Ye L, Zhang F, Li H, Yang L, Lv T, Gu W, et al. Circulating Tumor Cells Were Associated with the Number of T Lymphocyte Subsets and NK Cells in Peripheral Blood in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. Dis Markers. 2017;2017:5727815.

26. Gruber I, Landenberger N, Staebler A, Hahn M, Wallwiener D, Fehm T. Relationship Between Circulating Tumor Cells and Peripheral T-Cells in Patients with Primary Breast Cancer. Anticancer Res. 2013;33(5):2233-8.

27. Wang X, Jaimes M, Gu H, Shults K, Putta S, Sharma V, et al. Cell by cell immuno- and cancer marker profiling of non-small cell lung cancer tissue: Checkpoint marker expression on CD103+, CD4+ T-cells predicts circulating tumor cells. Transl Oncol. 2021;14(1):100953.

28. Lohmann AE, Dowling RJO, Ennis M, Amir E, Elser C, Brezden-Masley C, et al. Association of Metabolic, Inflammatory, and Tumor Markers With Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. JNCI Cancer Spectr. 2018;2(2):pky028.

29. Morel H, Raynard B, d'Arlhac M, Hauss P-A, Lecuyer E, Oliviero G, et al. Prediagnosis weight loss, a stronger factor than BMI, to predict survival in patients with lung cancer. Lung Cancer. 2018;126:55-63.

30. Hanssen A, Wagner J, Gorges TM, Taenzer A, Uzunoglu FG, Driemel C, et al. Characterization of different CTC subpopulations in non-small cell lung cancer. Sci Rep. 2016;6:28010.

31. Lindsay CR, Blackhall FH, Carmel A, Fernandez-Gutierrez F, Gazzaniga P, Groen HJM, et al. EPAC-lung: pooled analysis of circulating tumour cells in advanced non-small cell lung cancer. Eur J Cancer. 2019;117:60-8.

32. Mazel M, Jacot W, Pantel K, Bartkowiak K, Topart D, Cayrefourcq L, et al. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells. Mol Oncol. 2015;9(9):1773-82.

33. Schehr JL, Schultz ZD, Warrick JW, Guckenberger DJ, Pezzi HM, Sperger JM, et al. High Specificity in Circulating Tumor Cell Identification Is Required for Accurate Evaluation of Programmed Death-Ligand 1. PLoS ONE. 2016;11(7):e0159397.

34. Ilié M, Szafer-Glusman E, Hofman V, Chamorey E, Lalvée S, Selva E, et al. Detection of PD-L1 in circulating tumor cells and white blood cells from patients with advanced non-small-cell lung cancer. Ann Oncol. 2018;29(1):193-9.

35. Manjunath Y, Upparahalli SV, Avella DM, Deroche CB, Kimchi ET, Staveley-O'Carroll KF, et al. PD-L1 Expression with Epithelial Mesenchymal Transition of Circulating Tumor Cells Is Associated with Poor Survival in Curatively Resected Non-Small Cell Lung Cancer. Cancers. 2019;11(6):806.

36. Zhang L, Zhang X, Liu Y, Zhang T, Wang Z, Gu M, et al. PD-L1+ aneuploid circulating tumor endothelial cells (CTECs) exhibit resistance to the checkpoint blockade immunotherapy in advanced NSCLC patients. Cancer Lett. 2020;469:355-66.

37. Kallergi G, Vetsika E-K, Aggouraki D, Lagoudaki E, Koutsopoulos A, Koinis F, et al. Evaluation of PD-L1/PD-1 on circulating tumor cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. Ther Adv Med Oncol. 2018;10:1758834017750121.

38. Koh Y, Yagi S, Akamatsu H, Kanai K, Hayata A, Tokudome N, et al. Heterogeneous Expression of Programmed Death Receptor-ligand 1 on Circulating Tumor Cells in Patients With Lung Cancer. Clin Lung Cancer. 2019;20(4):270-277.e1.

39. Zhang M, Li G, Wang Y, Wang Y, Zhao S, Haihong P, et al. PD-L1 expression in lung cancer and its correlation with driver mutations: a meta-analysis. Sci Rep. 2017;7(1):10255.

40. Dong Z-Y, Zhang J-T, Liu S-Y, Su J, Zhang C, Xie Z, et al. EGFR mutation correlates with uninflamed phenotype and weak immunogenicity, causing impaired response to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Oncoimmunology. 2017;6(11):e1356145.

41. Adams DL, Adams DK, He J, Kalhor N, Zhang M, Xu T, et al. Sequential Tracking of PD-L1 Expression and RAD50 Induction in Circulating Tumor and Stromal Cells of Lung Cancer Patients Undergoing Radiotherapy. Clin Cancer Res. 2017;23(19):5948-58.

42. Kulasinghe A, Kapeleris J, Kimberley R, Mattarollo SR, Thompson EW, Thiery J, et al. The prognostic significance of circulating tumor cells in head and neck and non-small-cell lung cancer. Cancer Med. 2018;7(12):5910-9.

43. Cheng Y, Wang T, Lv X, Li R, Yuan L, Shen J, et al. Detection of PD-L1 Expression and Its Clinical Significance in Circulating Tumor Cells from Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer. Cancer Manag Res. 2020;12:2069-78.

44. Dianat-Moghadam H, Azizi M, Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Heidarifard M, Nouri M, et al. The Role of Circulating Tumor Cells in the Metastatic Cascade: Biology, Technical Challenges, and Clinical Relevance. Cancers. 2020;12(4):867.

45. Lou Y, Diao L, Cuentas ERP, Denning WL, Chen L, Fan Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition is associated with a distinct tumor microenvironment including elevation of inflammatory signals and multiple immune checkpoints in lung adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2016;22(14):3630-42.

46. Raimondi C, Carpino G, Nicolazzo C, Gradilone A, Gianni W, Gelibter A, et al. PD-L1 and epithelial-mesenchymal transition in circulating tumor cells from non-small cell lung cancer patients: A molecular shield to evade immune system?. Oncoimmunology. 2017;6(12):e1315488.

47. Ntzifa A, Strati A, Kallergi G, Kotsakis A, Georgoulias V, Lianidou E. Gene expression in circulating tumor cells reveals a dynamic role of EMT and PD-L1 during osimertinib treatment in NSCLC patients. Sci Rep. 2021;11(1):2313.

48. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong S, et al. EMT is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. Nature. 2015;527(7579):472-6.

49. Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Alix-Panabières C. Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells. Cells. 2020;9(8):1836.

50. Guibert N, Delaunay M, Lusque A, Boubekeur N, Rouquette I, Clermont E, et al. PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. Lung Cancer. 2018;120:108-12.

51. Janning M, Kobus F, Babayan A, Wikman H, Velthaus J-L, Bergmann S, et al. Determination of PD-L1 Expression in Circulating Tumor Cells of NSCLC Patients and Correlation with Response to PD-1/PD-L1 Inhibitors. Cancers. 2019;11(6):835.

Footnote

PD-L1 programmed cell death ligand 1

NSCLC non-small cell lung cancer

CTC circulating tumor cell

OS overall survival

PD-1 programmed cell death 1

EGFR epidermal growth factor receptor

ICI immune checkpoint inhibitor

PFS progression free survival

EpCAM epithelial cell adhesion molecule

CK cytokeratin

DAPI 4′-6-diamidino-2-phenylindole

BMI body mass index

CTLA-4 cytotoxic T-lymphocyte antigen-4

Supplementary materials

Table S1: Correlations between CTC presence and clinicopathological features in patients with advanced NSCLC (N = 53)

	CTC presence		
	No	**Yes**	**P value**
	N=30	N=23	
Sociodemographic and clinical data			
Age (years)			P = 0.062
N	30	23	
Mean (SD)	62.4 (11.4)	67.9 (11.7)	
Smoking status			P = 0.114
Never smoker	5 (16.7%)	2 (9.5%)	
Former smoker	18 (60.0%)	18 (85.7%)	
Current smoker	7 (23.3%)	1 (4.8%)	
NA	0	2	
Body mass index (kg/m²)			**P = 0.019**
N	27	22	
Mean (SD)	22.5 (3.2)	25.5 (4.8)	
NA	3	1	
Tumor data			
Distant metastases (M)			P = 0.216
0	3 (10.0%)	0 (0.0%)	
1a	8 (26.7%)	3 (13.0%)	
1b	1 (3.3%)	1 (4.3%)	
1c	18 (60.0%)	19 (82.6%)	
Presence of distant metastases			P = 0.249
No	3 (10.0%)	0 (0.0%)	
Yes	27 (90.0%)	23 (100.0%)	
Number of metastatic sites			**P = 0.003**

Table S1: Correlations between CTC presence and clinicopathological features in patients with advanced NSCLC (N = 53)			
	CTC presence		
	No	**Yes**	**P value**
	N=30	N=23	
N	30	23	
Mean (SD)	2.0 (1.4)	3.2 (1.4)	
Laboratory variables			
Hemoglobin (g/dL)			P = 0.066
N	29	22	
Mean (SD)	12.7 (1.4)	12.0 (1.5)	
NA	1	1	
White blood cells (G/L)			P = 0.200
N	28	22	
Mean (SD)	8.1 (3.7)	6.6 (1.5)	
NA	2	1	
Lymphocytes (G/L)			**P = 0.037**
N	28	22	
Mean (SD)	1.6 (0.8)	1.2 (0.6)	
NA	2	1	
Lactate dehydrogenase (IU/L)			P = 0.063
N	7	6	
Mean (SD)	252.0 (55.6)	467.8 (249.1)	
NA	23	17	
Sodium (mmol/L)			P = 0.074
N	17	15	
Mean (SD)	140.5 (2.6)	138.5 (3.2)	
NA	13	8	
Albumin (g/L)			P = 0.189
N	13	14	

Table S1: Correlations between CTC presence and clinicopathological features in patients with advanced NSCLC (N = 53)

	CTC presence		
	No	**Yes**	**P value**
	N=30	N=23	
Mean (SD)	39.2 (4.1)	35.8 (6.1)	
NA	17	9	
Treatments before inclusion			
Radio-chemotherapy			P = 0.124
No	26 (86.7%)	23 (100.0%)	
Yes	4 (13.3%)	0 (0.0%)	
Platinum-based doublet chemotherapy			P = 0.194
No	13 (43.3%)	6 (26.1%)	
Yes	17 (56.7%)	17 (73.9%)	

Abbreviations: SD: standard deviation; NA: not available.

Table S2: Correlations between PD-L1$^{(+)}$ CTC presence and clinicopathological features in patients with advanced NSCLC (N = 53)

	PD-L1$^{(+)}$ CTC presence		
	No	**Yes**	**P value**
	N=48	N=5	
Sociodemographic and clinical data			
Age (years)			P = 0.128
N	48	5	
Mean (SD)	64.1 (11.6)	71.8 (11.3)	
Body mass index (kg/m²)			P = 0.176
N	44	5	
Mean (SD)	23.6 (4.4)	25.5 (1.2)	
NA	4	0	

Table S2: Correlations between PD-L1$^{(+)}$ CTC presence and clinicopathological features in patients with advanced NSCLC (N = 53)

	PD-L1$^{(+)}$ CTC presence		P value
	No	**Yes**	
	N=48	N=5	
Time after diagnosis (months)			P=0.213
<6	15 (31.3%)	3 (60.0%)	
[6-18]	14 (29.2%)	2 (40.0%)	
>18	19 (39.6%)	0 (0.0%)	
Tumor data			
Presence of molecular alterations	**N=37**	**N=4**	**P = 0.030**
No	14 (37.8%)	4 (100.0%)	
Yes	23 (62.2%)	0 (0.0%)	
Type of molecular alteration			P=0.092
No molecular alteration	14 (37.8%)	4 (100.0%)	
Targetable alteration (EGFR/ROS1)	8 (21.6%)	0 (0.0%)	
Non-targetable alteration*	15 (40.6%)	0 (0.0%)	
Clinical tumor extension (T)			P = 0.145
1	3 (8.1%)	0 (0.0%)	
2	7 (18.9%)	0 (0.0%)	
3	9 (24.3%)	4 (80.0%)	
4	18 (48.6%)	1 (20.0%)	
NA	11	0	
Number of metastatic sites			P = 0.059
N	48	5	
Mean (SD)	2.4 (1.6)	3.6 (1.1)	
Laboratory variables			
Hemoglobin (g/dL)			**P = 0.028**
N	46	5	
Mean (SD)	12.5 (1.5)	11.1 (1.0)	

Table S2: Correlations between PD-L1$^{(+)}$ CTC presence and clinicopathological features in patients with advanced NSCLC (N = 53)

	PD-L1$^{(+)}$ CTC presence		P value
	No	**Yes**	
	N=48	N=5	
NA	2	0	
Lymphocytes (G/L)			P = 0.063
N	45	5	
Mean (SD)	1.5 (0.7)	0.9 (0.4)	
NA	3	0	
Lactate dehydrogenase (IU/L)			**P = 0.048**
N	11	2	
Mean (SD)	294.2 (136.4)	667.5 (239.7)	
NA	37	3	
Sodium (mmol/L)			**P = 0.021**
N	27	5	
Mean (SD)	140.1 (2.7)	136.4 (2.7)	
NA	21	0	
Albumin (g/L)			P = 0.060
N	23	4	
Mean (SD)	38.0 (5.6)	33.8 (2.5)	
NA	25	1	

Abbreviations: SD: standard deviation; NA: not available.

* non-targetable alteration = 13 KRAS mutations, 1 MET amplification, 1 MET mutation.

Table S3: Correlation between PD-L1$^{(+)}$ CTC presence and CTC count (Kruskal-Wallis test).

	PD-L1$^{(+)}$ CTC presence		P value
	No	Yes	
CTC count			P=0.150
N	18	5	
Mean (SD)	9.9 (15.1)	52.2 (85.8)	
Median (Q1 ; Q3)	1.5 (1.0 ; 19.0)	17.0 (14.0 ; 24.0)	

Abbreviations: SD: standard deviation; Q1: first quartile; Q3: third quartile.

Table S4: Logistic regression analysis between PD-L1$^{(+)}$ CTC presence and CTC count (Wald test).

Number of CTCs	PD-L1$^{(+)}$ CTCs/N	OR	95% CI	P value
Increase by 10 CTCs	5/23	1.30	[0.82 ; 2.05]	P=0.267

Abbreviations: OR: odds ratio; CI: confidence interval.

Table S5: Univariate analysis for progression-free survival in patients with advanced NSCLC (N = 54)				
	Nb of events / N	**HR**	**CI 95%**	**P value**
Variable				
CTC presence				**P=0.006**
No	28/30	1.00	Ref	
Yes	23/23	2.27	[1.28 ; 4.04]	
NA	1/1			
PD-L1$^{(+)}$ CTC presence				P=0.442
No	46/48	1.00	Ref	
Yes	5/5	1.47	[0.58 ; 3.74]	
NA	1/1			
PD-L1 status on CTCs				**P=0.020**
CTC$^{(-)}$	28/30	1.00	Ref	
PD-L1$^{(-)}$ – CTC$^{(+)}$	18/18	2.43	[1.30 ; 4.55]	
PD-L1$^{(+)}$ – CTC$^{(+)}$	5/5	1.89	[0.72 ; 4.95]	
NA	1/1			
PD-L1 expression on tissue (≥1% cancer cells)				P=0.204
No	22/23	1.00	Ref	
Yes	18/19	0.67	[0.36 ; 1.25]	
NA	12/12			
Sociodemographic and clinical data				
Sex				P=0.235
Male	30/31	1.00	Ref	
Female	22/23	0.72	[0.41 ; 1.25]	
Smoking status				**P=0.017**
Never smoker	6/7	1.00	Ref	
Former smoker	36/37	3.22	[1.31 ; 7.92]	
Current smoker	8/8	2.51	[0.84 ; 7.47]	
NA	2/2			

Body mass index (kg/m²)				P=0.156
Increase of 1 unit	48/50	1.05	[0.98 ; 1.13]	
NA				
Respiratory symptoms				P=0.197
No	30/30	1.00	Ref	
Yes	22/24	0.69	[0.39 ; 1.22]	
Tumor data				
Histological type				P=0.208
Adenocarcinoma	38/39	1.00	Ref	
SCC	10/11	1.90	[0.93 ; 3.87]	
Other*	4/4	1.54	[0.54 ; 4.38]	
Molecular alterations				**P=0.004**
No	19/19	1.00	Ref	
Yes	22/23	0.50	[0.26 ; 0.95]	
Not applicable	11/12			
Type of molecular alteration				**P=0.015**
No molecular alteration	19/19	1.00	Ref	
Targetable alteration (EGFR/ROS1)	7/8	0.26	[0.09 ; 0.71]	
Non-targetable alteration**	15/15	0.70	[0.35 ; 1.39]	
Not applicable	11/12			
Presence of targetable alteration (EGFR/ROS1)				**P=0.006**
No	34/34	1.00	Ref	
Yes	7/8	0.31	[0.12 ; 0.81]	
Not applicable	11/12			
Clinical node involvement (N)				P=0.111
0	17/19	1.00	Ref	
1-2	13/13	1.70	[0.82 ; 3.53]	
3	17/17	2.01	[1.00 ; 4.03]	
NA	5/5			

Laboratory variables				
Hemoglobin (g/dL)				P=0.215
<11.9	18/19	1.00	Ref	
[11.9 ; 13.1]	15/16	0.82	[0.41 ; 1.64]	
>13.1	17/17	0.56	[0.29 ; 1.09]	
NA	2/2			
Alkaline phosphatase (IU/L)				P=0.194
<83	11/12	1.00	Ref	
[83 ; 104]	11/11	1.13	[0.49 ; 2.62]	
>104	11/11	2.22	[0.91 ; 5.41]	
NA	19/20			
Treatments before inclusion				
Number of prior lines of systemic therapy				P=0.229
0	16/17	1.00	Ref	
1	23/23	1.49	[0.78 ; 2.84]	
2	6/7	1.03	[0.40 ; 2.64]	
>2	7/7	2.55	[1.02 ; 6.38]	
Mono-chemotherapy				P=0.071
No	42/44	1.00	Ref	
Yes	10/10	2.02	[0.99 ; 4.15]	
Platinum-based doublet chemotherapy				P=0.098
No	19/20	1.00	Ref	
Yes	33/34	1.60	[0.91 ; 2.83]	
Tyrosine kinase inhibitors				P=0.083
No	48/49	1.00	Ref	
Yes	4/5	0.44	[0.16 ; 1.24]	

Abbreviations: Nb: number; HR: hazard ratio; CI: confidence interval; NA: not available; SCC: squamous cell carcinoma.

* other = 1 adenosquamous carcinoma, 1 not otherwise specified carcinoma, 2 large cell neuroendocrine carcinomas.

** non-targetable alteration = 13 KRAS mutations, 1 MET amplification, 1 MET mutation.

Table S6: Univariate analysis of overall survival in patients with advanced NSCLC (N = 54)				
	Nb of events / N	**HR**	**CI 95%**	**P value**
Variables				
CTC presence				**P<0.001**
No	22/30	1.00	Ref	
Yes	22/23	3.06	[1.65 ; 5.70]	
NA	1/1			
PD-L1$^{(+)}$ CTC presence				P=0.097
No	39/48	1.00	Ref	
Yes	5/5	2.45	[0.95 ; 6.36]	
NA	1/1			
PD-L1 status on CTCs				**P=0.002**
CTC$^{(-)}$	22/30	1.00	Ref	
PD-L1$^{(-)}$ – CTC$^{(+)}$	17/18	2.93	[1.51 ; 5.68]	
PD-L1$^{(+)}$ – CTC$^{(+)}$	5/5	3.63	[1.33 ; 9.91]	
NA	1/1			
Sociodemographic and clinical data				
Sex				P=0.196
Male	27/31	1.00	Ref	
Female	18/23	0.68	[0.37 ; 1.23]	
Smoking status				P=0.193
Never smoker	5/7	1.00	Ref	
Former smoker	32/37	2.17	[0.84 ; 5.62]	
Current smoker	6/8	1.53	[0.46 ; 5.05]	
NA	2/2			
Body mass index (kg/m²)				P=0.121
<18.5	1/3	0.23	[0.03 ; 1.68]	
[18.5 ; 25[	26/29	1.00	Ref	
[25 ; 30[	10/13	0.68	[0.33 ; 1.43]	

Table S6: Univariate analysis of overall survival in patients with advanced NSCLC (N = 54)				
	Nb of events / N	**HR**	**CI 95%**	**P value**
>30	5/5	1.77	[0.67 ; 4.67]	
NA	3/4			
Time after diagnosis (months)				P=0.244
<6	16/19	1.00	Ref	
[6 ; 18]	15/16	1.21	[0.59 ; 2.45]	
>18	14/19	0.66	[0.32 ; 1.35]	
Tumor variables				
Histological type				**P=0.109**
Adenocarcinoma	32/39	1.00	Ref	
SCC	10/11	2.28	[1.12 ; 4.68]	
Other*	3/4	1.31	[0.40 ; 4.30]	
Presence of molecular alterations				**P=0.011**
No	18/19	1.00	Ref	
Yes	16/23	0.41	[0.21 ; 0.81]	
Not applicable	11/12			
Type of molecular alteration				**P=0.032**
No molecular alteration	18/19	1.00	Ref	
Targetable alteration (EGFR/ROS1)	5/8	0.33	[0.12 ; 0.9]	
Non-targetable alteration**	11/15	0.46	[0.21 ; 0.97]	
Not applicable	11/12			
Presence of targetable alteration (EGFR/ROS1)				P=0.106
No	29/34	1.00	Ref	
Yes	5/8	0.48	[0.18 ; 1.26]	
Not applicable	11/12			
Clinical tumor extension (T)				P=0.083
1-2	10/10	1.00	Ref	
3	13/14	0.46	[0.19 ; 1.11]	

Table S6: Univariate analysis of overall survival in patients with advanced NSCLC (N = 54)				
	Nb of events / N	**HR**	**CI 95%**	**P value**
4	15/19	0.35	[0.15 ; 0.86]	
NA	7/11			
Number of metastatic sites				**P=0.037**
Increase of 1 site	45/54	1.25	[1.02 ; 1.54]	
Laboratory variables				
Hemoglobin (g/dL)				P=0.069
<11.9	17/19	1.00	Ref	
[11.9 ; 13.1]	13/16	0.66	[0.32 ; 1.37]	
>13.1	13/17	0.42	[0.2 ; 0.88]	
NA	2/2			
Albumin (g/L)				P=0.094
<35	10/11	1.00	Ref	
[35 ; 41]	7/9	0.37	[0.13 ; 1.04]	
>41	8/8	0.97	[0.38 ; 2.48]	
NA	20/26			
Treatments before inclusion				
Surgery				P=0.076
No	36/40	1.00	Ref	
Yes	9/14	0.53	[0.26 ; 1.11]	
Radiotherapy (excluding palliative radiotherapy)				P=0.168
No	36/41	1.00	Ref	
Yes	9/13	0.61	[0.29 ; 1.27]	
Number of prior lines of systemic therapy				**P=0.044**
0	12/17	1.00	Ref	
1	20/23	1.52	[0.74 ; 3.12]	
2	6/7	1.6	[0.6 ; 4.27]	
>2	7/7	4.8	[1.73 ; 13.3]	

Table S6: Univariate analysis of overall survival in patients with advanced NSCLC (N = 54)				
	Nb of events / N	**HR**	**CI 95%**	**P value**
Platinum-based doublet chemotherapy				**P=0.020**
No	14/20	1.00	Ref	
Yes	31/34	2.07	[1.10 ; 3.91]	
Immune checkpoint inhibitors				P=0.200
No	43/52	1.00	Ref	
Yes	2/2	3.01	[0.7 ; 12.98]	
Last treatment before inclusion				P=0.203
None	7/9	1.00	Ref	
Surgery	2/2	2.18	[0.45 ; 10.62]	
Radio-chemotherapy or radiotherapy alone	3/6	0.67	[0.17 ; 2.61]	
Systemic therapy	33/37	1.73	[0.76 ; 3.91]	

Abbreviations: Nb: number; HR: hazard ratio; CI: confidence interval; NA: not available; SCC: squamous cell carcinoma.

* other = 1 adenosquamous carcinoma, 1 not otherwise specified carcinoma, 2 large cell neuroendocrine carcinomas.

** non-targetable alteration = 13 KRAS mutations, 1 MET amplification, 1 MET mutation.

SERMENT

SERMENT

- *En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Etre suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.*

- *Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.*

- *Admis (e) dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

- *Respectueux (se) et reconnaissant (e) envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert (e) d'opprobre et méprisé (e) de mes confrères si j'y manque.*

RESUME

Introduction : Chez les patients présentant un carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC), déterminer le statut PD-L1 (programmed cell death ligand 1) sur cellules tumorales circulantes (CTCs) a pour principal objectif de contourner le problème lié à l'hétérogénéité spatio-temporelle de ce biomarqueur. Cependant, la valeur pronostique de la présence de CTCs exprimant le PD-L1 (CTCs-PD-L1$^{(+)}$) est actuellement controversée.

Méthodes : Nous avons évalué de façon prospective la valeur pronostique des CTCs-PD-L1$^{(+)}$ détectées par la technologie CellSearch®, dans une cohorte de 54 patients atteints de CBNPC avancés. D'autre part, nous avons étudié le taux de concordance entre le statut PD-L1 sur CTCs et sur tissu tumoral, et recherché l'existence de corrélations entre la présence de CTCs-PD-L1$^{(+)}$ et certaines caractéristiques clinico-pathologiques.

Résultats : Nous avons détecté des CTCs et des CTCs-PD-L1$^{(+)}$ chez 43.4% et 9.4% des patients. Le taux de concordance entre expression de PD-L1 sur tissu tumoral et sur CTCs était bas (53.7%). La présence de CTCs-PD-L1$^{(+)}$ était associée à l'absence d'altération moléculaire dans le tissu tumoral et à des variables biologiques de mauvais pronostic (anémie, hyponatrémie, taux élevé de LDH). En analyse univariée, l'absence d'altération moléculaire, un nombre élevé de sites métastatiques et de lignes de traitement reçues, la présence de CTCs et de CTCs-PD-L1$^{(+)}$ étaient associés à une diminution de la survie globale (SG), à la différence d'un statut PD-L1 positif sur tissu tumoral. En analyse multivariée, la présence de CTCs et dans une plus grande mesure la présence de CTCs-PD-L1$^{(+)}$ restaient associées à la SG de façon significative.

Conclusion : Notre étude suggère un impact pronostique négatif de la présence de CTCs-PD-L1$^{(+)}$ dans le CBNPC avancé. D'autres études, sur des cohortes de patients plus importantes, sont nécessaires pour confirmer nos résultats et déterminer comment la détection de cette sous-population de CTCs pourrait aider à prédire l'efficacité ou alors la résistance aux immunothérapies anti-PD-L1/PD-1.

MOTS CLES

Carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC) ; programmed cell death ligand 1 (PD-L1) ; cellules tumorales circulantes (CTCs) ; technologie CellSearch® ; valeur pronostique.