

UNIVERSITE DE LILLE  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**  
Année 2020

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**APPORT DES MARQUEURS IMMUNOHISTOCHIMIQUES PD-L1,  
CD8 ET CD39, A L'EVALUATION PRONOSTIQUE ET A LA  
PREDICTION DE LA REPONSE THERAPEUTIQUE, DANS LE  
CANCER PULMONAIRE NON A PETITES CELLULES, TRAITÉ  
PAR PEMBROLIZUMAB**

Présentée et soutenue publiquement le 26 juin 2020 à 18 heures  
Au Pôle Recherche  
**Par Zoé MANSSENS**

---

**JURY**

**Président :**

**Monsieur le Professeur Arnaud SCHERPEREEL**

**Assesseurs :**

**Monsieur le Professeur Alexis CORTOT**

**Monsieur le Docteur Simon BALDACCI**

**Monsieur le Docteur Romain DUBOIS**

**Directeur de thèse :**

**Madame le Professeur Marie-Christine COPIN**

---



## **AVERTISSEMENT**

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.



# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	9
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	11
<b>RESUME</b> .....	15
<b>INTRODUCTION</b> .....	19
Système immunitaire et cancer .....	19
La voie PD-1.....	23
L'immunothérapie.....	26
Notion de marqueur prédictif appliquée aux ICIs ciblant l'axe PD-1/PD-L1 ...	29
Expression de PD-L1 par les cellules tumorales .....	32
La voie de l'adénosine.....	33
Le CPNPC.....	36
<b>CONTEXTE DE L'ETUDE</b> .....	39
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE</b> .....	45
Objectif principal.....	45
Objectifs secondaires .....	45
<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	47
Type d'étude.....	47
Population d'étude.....	48
Critères d'inclusion .....	48
Critères d'exclusion .....	48
Recueil des données.....	49
Données cliniques .....	49
Données moléculaires .....	52
Données anatomopathologiques.....	52
Réalisation des techniques.....	54
Généralités .....	54
Technique.....	54
Contrôle qualité .....	55
Interprétation des techniques .....	57
AC anti-PD-L1 .....	57
AC anti-CD8 .....	61
AC anti-CD39 .....	64

Anonymisation des données et accord de la CNIL.....	69
Analyse statistique .....	70
<b>RESULTATS</b> .....	<b>73</b>
Population et prélèvements.....	73
Données cliniques.....	76
Données anatomopathologiques.....	80
Type de prélèvements.....	80
Type histologique .....	83
A quelle étape de la séquence thérapeutique ont été réalisés les prélèvements ?.....	85
Données moléculaires.....	86
Lien entre l'expression de PD-L1 et l'évolution, toutes lignes de traitement confondues.....	88
Expression immunohistochimique de PD-L1 .....	88
Réponse au pembrolizumab selon le TPS PD-L1 .....	90
Durée de réponse au pembrolizumab selon le TPS PD-L1 .....	91
Survie selon le TPS PD-L1 .....	91
Lien entre la ligne de traitement et l'évolution .....	95
Caractéristiques des patients selon la ligne de traitement.....	95
Réponse au pembrolizumab selon la ligne de traitement.....	95
Durée de réponse au pembrolizumab selon la ligne de traitement.....	97
Survie selon la ligne de traitement .....	97
Lien entre l'expression de CD8 et l'évolution.....	100
Expression immunohistochimique de CD8 .....	100
Réponse au pembrolizumab selon la densité en LT CD8+ .....	100
Durée de réponse au pembrolizumab selon la densité en LT CD8+ .....	101
Survie selon la densité en LT CD8+ .....	101
Topographie du marquage .....	104
Lien entre l'expression de CD39 et l'évolution.....	107
Expression immunohistochimique de CD39 .....	107
Réponse au pembrolizumab selon la densité en cellules CD39+.....	107
Durée de réponse au pembrolizumab selon la densité en cellules CD39+ .....	108
Survie selon la densité en cellules CD39+ .....	108
Topographie du marquage .....	111
Comparaison de l'expression des trois marqueurs.....	114

Description de séquence thérapeutique individuelle .....	115
Impact du traitement reçu sur l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales.....	115
Impact de la nature et du type de prélèvement sur le TPS PD-L1.....	116
<b>DISCUSSION</b> .....	119
Caractéristiques de la cohorte.....	119
Expression de PD-L1 .....	120
Hétérogénéité des marqueurs étudiés .....	120
Modalités d'étude de l'expression de PD-L1 .....	124
Réponse au pembrolizumab.....	127
Survie en fonction de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ..	129
Expression de CD8 .....	135
Lien entre les expressions immunohistochimiques de CD8 et de PD-L1 .	135
Modalités d'étude de l'expression de CD8 .....	136
Expression de CD8 et évolution .....	137
Topographie .....	138
Expression de CD39 .....	140
Marquage observé avec l'AC anti-CD39 .....	140
Expression de CD39 et évolution .....	141
Topographie et encoorbellement.....	143
Au-delà de CD39 : la voie de l'adénosine.....	144
Limites de l'étude et ouvertures.....	146
Limite technique .....	146
Faible nombre d'échantillons inclus.....	147
<b>CONCLUSION</b> .....	149
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	151
<b>ANNEXE 1</b> .....	159
<b>ANNEXE 2</b> .....	163
<b>ANNEXE 3</b> .....	171
<b>ANNEXE 4</b> .....	179
<b>ANNEXE 5</b> .....	183
<b>ANNEXE 6</b> .....	187
<b>ANNEXE 7</b> .....	193





## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b>	Caractéristiques cliniques des patients
<b>Tableau II</b>	Répartition des types de prélèvements
<b>Tableau III</b>	Répartition des types histologiques
<b>Tableau IV</b>	Fréquence des anomalies génétiques
<b>Tableau V</b>	Protocoles de mise au point de l'AC anti-CD39



## LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acide aminé
AC	Anticorps
Ado	Adénosine
ADP	Adénosine diphosphate
AFAQAP	Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ATP	Adénosine triphosphate extracellulaire
CE-IVD	Conformité européenne pour le diagnostic in vitro
CHU	Centre hospitalier universitaire
CNIL	Commission nationale de l'informatique et des libertés
CPNPC	Cancer pulmonaire non à petites cellules
COFRAC	Comité français d'accréditation
DAB	Diaminobenzidine, chromogène
EBUS-TBNA	Endobronchial ultra-sonic guide-transbronchial needle aspiration – ponction à l'aiguille sous échographie bronchique
EEQ	Evaluation externe de la qualité
EMA	European Medicines Agency
ENTP1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
FDA	Foods and Drugs Administration

FFPE	Fixé par le formol et inclus en paraffine
FISH	Hybridation in situ en fluorescence
HES	Hématoxyline éosine safran
HQ	Molécule d'hydroxy-quinoxaline, haptène
HRP	Horse radish peroxidase
IC	Intervalle de confiance
ICI	Inhibiteur des points de contrôle immunitaire
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IgG	Immunoglobuline de type G
IHC	Immunohistochimie
ISO	International Organization for Standardization
IT	Immunothérapie
KN	Keynote
LT	Lymphocyte T
LT CD8+	Lymphocyte T exprimant CD8
PD-1	Programmed death 1
PD-L1	Programmed death ligand 1
PD-L2	Programmed death ligand 2
PMDA	Agence japonaise des produits pharmaceutiques et des dispositifs médicaux
PS	Performance status
SG	Survie globale
SSP	Survie sans progression

Stade TNM	Stade Tumor Node Metastase
TDM	Tomodensitométrie
TIL(s)	Lymphocyte(s) intra-tumoral (-aux)
TIS	T-cell inflammed signature
TPS	Tumor Proportion Score



## RESUME

**Introduction :** l'immunothérapie a constitué une révolution thérapeutique dans la prise en charge des cancers du poumon non à petites cellules (CPNPC) de stade avancé. Le taux de réponse au pembrolizumab varie de 18 à 57.3% selon les études. L'expression immunohistochimique de PD-L1 par les cellules tumorales est le principal marqueur utilisé pour guider la prescription de pembrolizumab.

**Objectifs :** étudier le lien entre l'expression immunohistochimique de PD-L1, la ligne de traitement, l'expression immunohistochimique de CD8, l'expression immunohistochimique de CD39 et différents paramètres évolutifs dans le CPNPC de stade avancé, traité par pembrolizumab.

**Méthodes :** nous avons réalisé une étude descriptive, rétrospective, monocentrique, entre janvier 2012 et janvier 2020. Tous les patients inclus ont été pris en charge pour un CPNPC dans le service d'oncologie thoracique du centre hospitalier universitaire (CHU) de Lille. Ils ont reçu du pembrolizumab et des prélèvements de tumeur étaient disponibles. Toutes les données cliniques, anatomopathologiques et moléculaires pertinentes ont été recueillies. La réponse au pembrolizumab, la durée de cette réponse, la survie sans progression et la survie globale ont été évaluées.

**Résultats :** parmi 55 patients, 13 patients (29.6%) répondaient au pembrolizumab. Ils présentaient tous une réponse partielle.

Concernant l'expression immunohistochimique de PD-L1, 60% des prélèvements avaient un TPS (Tumor Proportion Score) PD-L1  $\geq$  50%.

Lorsque le TPS PD-L1 était évalué par incrément de 10%, le TPS PD-L1 médian des patients répondeurs était significativement plus élevé que celui des patients non répondeurs (100% *versus* 20%), toutes lignes de traitement confondues. En revanche, lorsque le TPS PD-L1 était réparti en deux catégories (TPS PD-L1  $<$ 50% *versus*  $\geq$  50%), la différence en termes de réponse au pembrolizumab (patients répondeurs *versus* non répondeurs) était à la limite de la significativité et il n'y avait pas de différence en termes de survie (survie sans progression et survie globale).

Lorsque les patients bénéficiaient du pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement, la réponse au pembrolizumab et la survie à long terme (survie sans progression et survie globale) étaient meilleures par rapport aux patients sous pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus, quel que soit le TPS PD-L1.

Concernant l'expression immunohistochimique de CD8, la survie sans progression à long terme était significativement meilleure, lorsque la tumeur comportait de nombreux lymphocytes T exprimant CD8 (LT CD8+). Concernant la survie globale à long terme, la différence était à la limite de la significativité. Il n'y avait pas de différence en termes de réponse au pembrolizumab.

Concernant l'expression immunohistochimique de CD39, la présence d'un encoorbellement était associée à une meilleure survie sans progression mais n'avait pas d'impact sur la réponse au pembrolizumab et sur la survie globale.



La réponse au pembrolizumab et la survie n'étaient pas différentes selon la densité en cellules exprimant CD39 (cellules CD39+) des prélèvements tumoraux.

**Conclusion :** l'expression immunohistochimique de PD-L1 par les cellules tumorales se caractérise par son hétérogénéité. Il est nécessaire d'associer une démarche qualité à la réalisation de la technique. Le TPS PD-L1 est un marqueur prédictif de la réponse au pembrolizumab mais il est imparfait.

Notre étude confirme le lien entre le TPS PD-L1, la place du pembrolizumab dans la séquence thérapeutique (1<sup>ère</sup> ligne *versus* 2<sup>ème</sup> ligne ou plus) et différents paramètres évolutifs (réponse au pembrolizumab, survie globale, survie sans progression) dans le CPNPC traité par pembrolizumab.

Ce travail confirme également la valeur pronostique de la densité tumorale en LT CD8+.

Enfin ce travail souligne l'intérêt d'étudier le stroma tumoral. Dans notre étude, la présence d'un encoorbellement des cellules tumorales par des cellules CD39+ du stroma tumoral était associée à une survie sans progression prolongée. La présence d'un encoorbellement n'avait pas d'impact sur la survie globale et sur la réponse au pembrolizumab.

**Mots-clefs :** cancer pulmonaire non à petites cellules, immunothérapie, pembrolizumab, immunohistochimie, PD-L1, CD8, CD39, encoorbellement, pronostic, réponse thérapeutique.



# INTRODUCTION

## Système immunitaire et cancer

Le rôle du système immunitaire, dans le cancer, a été évoqué il y a plus d'un siècle, en 1908, par Paul Ehrlich (1). Le système immunitaire est capable de reconnaître les cellules tumorales et de contrôler le développement des tumeurs. Sir Macfarlane Burnet et Lewis Thomas ont reformulé ce concept en 1957 sous le terme d'immunosurveillance anti-tumorale (2).

Au cours du dernier siècle, la recherche sur le cancer s'est intéressée à la cellule tumorale. Des avancées majeures dans la compréhension de l'oncogenèse ont été faites. Hanahan et Weinberg ont notamment résumé les caractéristiques permettant à une cellule saine d'évoluer vers un phénotype tumoral. L'échappement au système immunitaire a récemment été reconnu comme l'une des propriétés définissant une cellule cancéreuse (3).

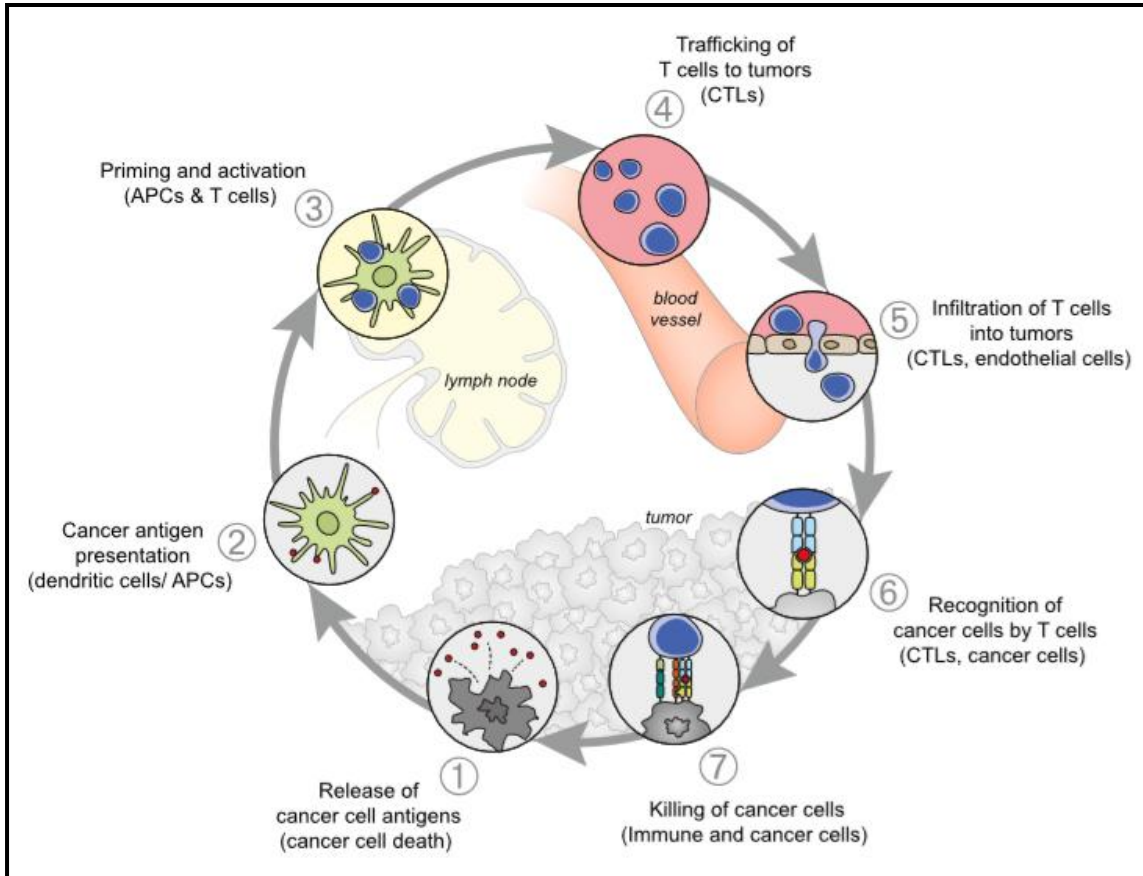
Actuellement, les tumeurs ne sont pas considérées comme un simple amas de cellules tumorales, mais comme un tissu complexe, associant des cellules tumorales et un microenvironnement. Le microenvironnement tumoral contient différentes cellules, dont des fibroblastes, des cellules vasculaires et des cellules immunitaires (4).

Il existe une interaction étroite entre cellules tumorales et microenvironnement.

Cette interaction, théorisée par les 3E de Dunn et Schreiber, est dynamique au cours du temps : 1<sup>ère</sup> phase de détection et d'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire ; 2<sup>ème</sup> phase d'équilibre ; 3<sup>ème</sup> phase d'échappement (5).

Au cours de la première phase, le système immunitaire de l'hôte est capable de détecter et d'éliminer les cellules tumorales (6). Puis dans un deuxième temps, le système immunitaire contrôle les cellules tumorales sans parvenir à toutes les détruire : un équilibre s'installe entre cellules tumorales restantes et système immunitaire. Enfin, les cellules tumorales finissent par échapper au contrôle immunitaire de l'hôte. Les mécanismes d'échappement au système immunitaire sont nombreux : la cellule tumorale est notamment capable de moduler la réponse immunitaire de l'hôte en exprimant des facteurs inhibiteurs. Ces derniers agissent à différents niveaux du cycle de l'immunité anti-cancer, impliquant plusieurs voies de communication cellulaire.

Le cycle de l'immunité anti-tumorale est présenté dans les figures suivantes **(Figures 1 et 2)**.

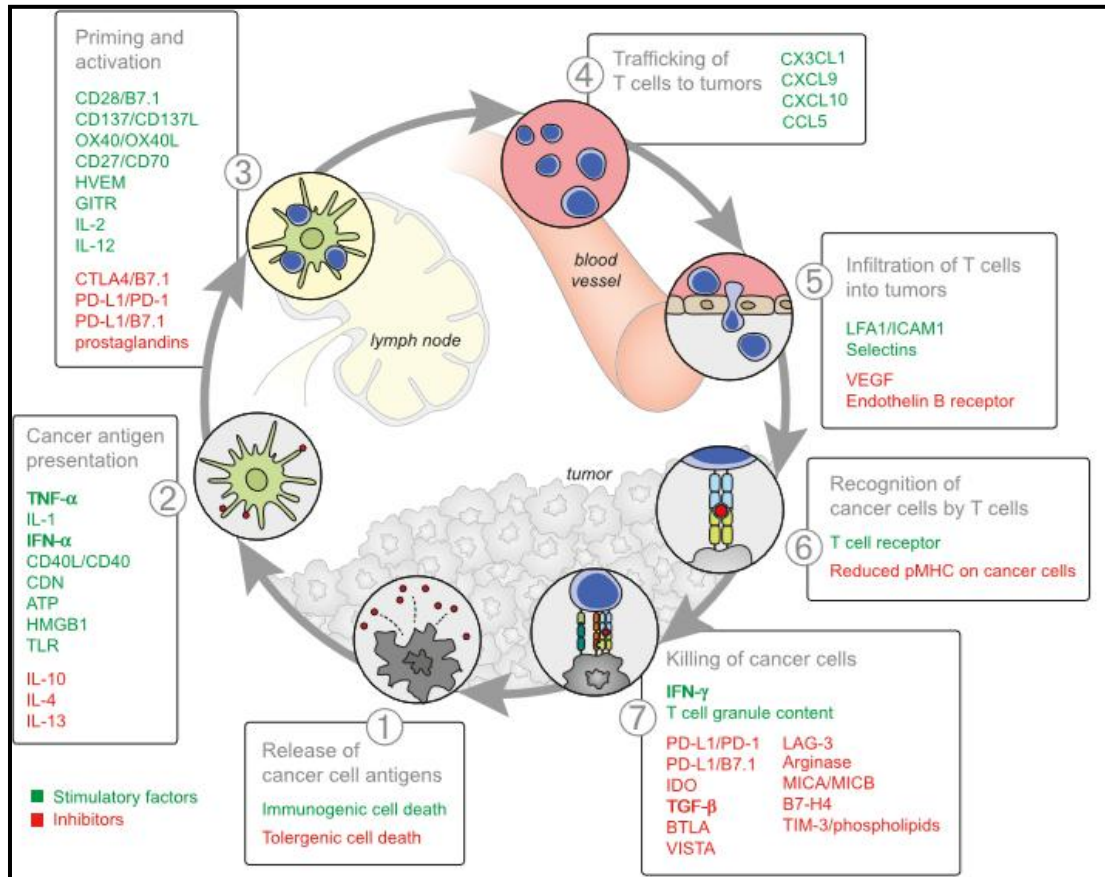


**Figure 1 : le cycle de l'immunité anti-tumorale, d'après Chen DS et Mellman I.**  
 (Chen DS, Mellman I. *Oncology Meets Immunology : The Cancer-Immunity Cycle*. Immunity. 25 juill 2013) (7)

La génération de l'immunité anti-cancer est cyclique. Le cycle se caractérise par la présence de facteurs immunostimulants, qui augmentent en principe la réponse des lymphocytes T, et par la présence de facteurs inhibiteurs rétroactifs, qui peuvent stopper ou limiter la réponse immunitaire.

Ce cycle peut être divisé en sept grandes étapes, qui commencent par la libération de néo-antigènes tumoraux, et se terminent par la destruction des cellules cancéreuses. Chaque étape est décrite ci-dessus, ainsi que les principaux types de cellules impliquées et l'emplacement anatomique.

Abréviations : APC, cellules présentatrices d'antigènes ; CTL, lymphocytes T cytotoxiques.



**Figure 2 : facteurs stimulants et inhibiteurs du cycle de l'immunité anti-tumorale, d'après Chen DS et Mellman I.**

(Chen DS, Mellman I. *Oncology Meets Immunology : The Cancer-Immunity Cycle*. Immunity. 25 juill 2013) (7)

Les facteurs stimulants (en vert) favorisent l'immunité.

Les facteurs inhibiteurs (en rouge) aident à maîtriser le processus, en réduisant l'activité immunitaire et en prévenant l'auto-immunité.

Certains facteurs inhibiteurs agissent sur les étapes initiales de la réponse immunitaire, principalement sur le développement et la prolifération des lymphocytes T (étape 3). Ils se distinguent des facteurs de rhéostat immunitaire ("immunostat"), tel PD-L1, qui peuvent avoir une fonction inhibitrice en modulant la réponse immunitaire à un niveau distal, dans le microenvironnement tumoral (étape 7).

Abréviations : CDN, dinucléotide cyclique ; HMGB1, protéine B1 du groupe à haute mobilité ; TLR, récepteur Toll-like ; HVEM, médiateur de l'entrée du virus de l'herpès ; GITR, gène de la famille des TNFR induit par les glucocorticoïdes ; CTLA4, antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques ; CXCL/CCL, ligands à motif chimiokine ; LFA1, antigène-1 associé à la fonction lymphocytaire ; ICAM1, molécule d'adhésion intracellulaire1 ; IDO, indoleamine2,3-dioxygénase ; BTLA, atténuateur des lymphocytes B et T ; VISTA, Ig du domaine V supprimant l'activation des cellules T ; LAG-3, protéine du gène 3 d'activation des lymphocytes ; MIC, protéine de séquence liée aux polypeptides du CMH de classe I ; TIM-3, domaine de l'immunoglobuline des cellules T et domaine 3 de la mucine.

## **La voie PD-1**

La voie PD-1 est une voie de communication cellulaire, particulièrement étudiée, et impliquée dans le contrôle de la réponse immunitaire (« immune checkpoint »). A l'état physiologique, la voie PD-1 module, entre autres, les dernières phases de la réponse immunitaire, au niveau distal, dans le site inflammatoire. Sa fonction est potentiellement inhibitrice pour réguler la fonction des lymphocytes T (LT) et prévenir l'auto-immunité (8).

Programmed Death-1 (PD-1) est un récepteur de la famille CD28. Il est exprimé à la surface des lymphocytes T et B, monocytes et cellules NK. Il est absent sur les LT naïfs. Son expression est induite après activation. Une expression excessive de PD-1, généralement secondaire à une exposition chronique à l'antigène, est associée à un état d'épuisement ou d'anergie des LT. Ainsi, il est considéré comme un marqueur d'activation, et comme un marqueur d'épuisement lymphocytaire.

PD-1 interagit avec ses deux ligands : PD-L1 et PD-L2.

« Programmed Death Ligand 1 » (PD-L1) est le ligand principal de PD-1. Il est beaucoup plus représenté que PD-L2. A l'état physiologique, PD-L1 est exprimé par de nombreuses cellules immunitaires et non immunitaires.

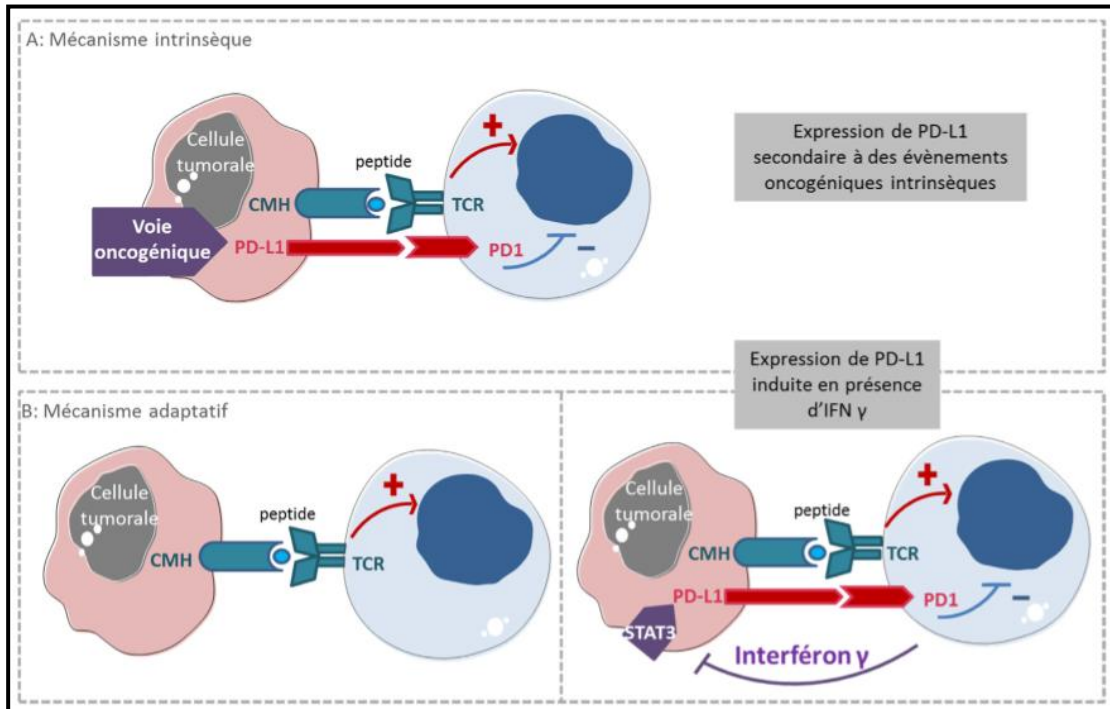
« Programmed Death Ligand 2 » (PD-L2) est exprimé de façon plus sélective par les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes. Son expression est souvent focale et corrélée à l'expression de PD-L1.

Les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement tumoral, notamment dans le cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC), peuvent (sur)-exprimer PD-L1 (**Figure 3**).

Cela perturbe la fonction des cellules immunitaires, en particulier des LT cytotoxiques. En se liant au récepteur PD-1 des LT activés, PD-L1 bloque leur activité et diminue la réaction immunitaire anti-tumorale de l'hôte (9). L'engagement de la voie PD-1 diminue l'induction de cytokines anti-tumorales (comme l'interféron gamma), des protéines de survie (comme Bcl-xL) et entraîne la perte des capacités de prolifération et de survie des LT (10).

Le point de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1 module d'autres cellules immunitaires, dont les macrophages intra-tumoraux en inhibant leur capacité de phagocytose (11).





**Figure 3 : mécanismes induisant l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, d'après Granier *et al*,**

(Granier C, Soumelis V, Mandavit M, Gibault L, Belazzoug R, de Guillebon E, *et al*. The « immune checkpoints », how does it work. Ann Pathol. févr 2017) (10)

**A : mécanisme intrinsèque** : expression de PD-L1 par les cellules tumorales suite à l'activation de voies oncogéniques.

**B : mécanisme adaptatif** : expression de PD-L1 par les cellules tumorales suite à la sécrétion d'interféron par les lymphocytes T.

Il existe un troisième **mécanisme secondaire à l'hypoxie**.

Les trois mécanismes résultent en l'expression de PD-L1 par la cellule tumorale.

Abréviations : TCR, récepteur des lymphocytes T ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité.

## L'immunothérapie

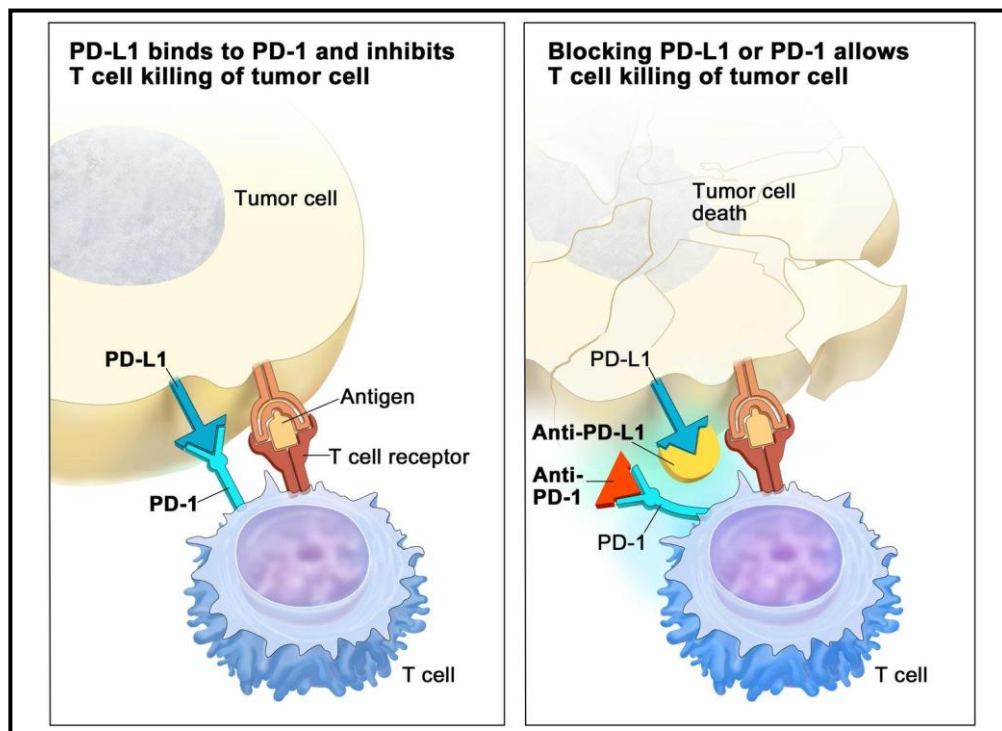
Nous avons vu précédemment qu'il existe des points de contrôle immunitaire, c'est-à-dire des régulateurs de la réponse immunitaire, appelés aussi « immune checkpoints ».

Les « immune checkpoint inhibitors » (ICIs), ou inhibiteurs des points de contrôle immunitaire, sont des familles d'anticorps (AC) monoclonaux. Ils ciblent différents facteurs inhibiteurs. L'objectif est de lever l'inhibition, pour rétablir une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Ils visent notamment à rétablir les capacités fonctionnelles des LT pour qu'ils éliminent les cellules cancéreuses (12). Les traitements les plus avancés ciblent le CTLA-4 et l'axe PD-1/PD-L1.

En ciblant le microenvironnement tumoral, et non plus les cellules tumorales, comme d'autres traitements anti-cancéreux, l'immunothérapie a constitué une véritable révolution thérapeutique. Elle a montré son efficacité dans de multiples cancers. Son développement est associé à une redéfinition des grands concepts d'évaluation de la réponse anti-tumorale, que ce soit en termes d'efficacité ou d'effet secondaire associé (10).

L'importance des ICIs est soulignée par le prix Nobel attribué aux docteurs Allison et Honjo en 2018, et par l'approbation de nombreux ICIs par la Food and Drug Administration (FDA) et l'European Medicines Agency (EMA).

Dans le cadre du CPNPC à un stade avancé, plusieurs AC monoclonaux ciblant l'axe PD-1/PD-L1 ont été approuvés (13). Le nivolumab et le pembrolizumab sont des AC anti-PD-1. L'atézolizumab et le durvalumab sont des AC anti-PD-L1.



**Figure 4 : illustration des inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (ICIs) ciblant PD-1 et PD-L1, d'après Terese Winslow.**

(Terese Winslow, Référence CDR774646, Medical Illustration, National Cancer Institute)

La figure de gauche montre la liaison de la protéine PD-L1 (cellule tumorale) à PD-1 (lymphocyte T). Cela empêche le lymphocyte T de détruire la cellule tumorale. On voit également un antigène de cellule tumorale lié à un récepteur du lymphocyte T.

La figure de droite montre des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (anti-PD-L1 et anti-PD-1) bloquant la liaison de PD-L1 à PD-1, ce qui permet au lymphocyte T de détruire la cellule tumorale.

Le pembrolizumab (MK-3475, KEYTRUDA®, Merck & Co) est un ICI : c'est un anticorps monoclonal humanisé sélectif. Il appartient à une sous-classe des IgG4 (14). Il cible le récepteur PD-1 présent sur les lymphocytes T, bloque l'interaction PD-1/PD-L1, et ainsi réactive la réponse immunitaire anti-tumorale (**Figure 4**).

Plusieurs études ont montré l'intérêt thérapeutique du pembrolizumab dans le CPNPC à un stade localement avancé ou métastatique, comme par exemple l'étude Keynote (KN) 001. Cette étude a identifié l'expression immunohistochimique de PD-L1, comme test compagnon, pour sélectionner les patients les plus susceptibles de répondre au traitement.

Cinq essais cliniques randomisés ont montré l'efficacité du pembrolizumab dans le CPNPC. Le pembrolizumab, en monothérapie, est efficace en 2<sup>ème</sup> ligne, lorsque PD-L1 est exprimé par au moins 1% des cellules tumorales (KN 010). Le pembrolizumab, en monothérapie, est efficace en 1<sup>ère</sup> ligne lorsque PD-L1 est exprimé par au moins 50% des cellules tumorales (KN 024 et KN 042). La combinaison du pembrolizumab et d'une chimiothérapie à base de sels de platine est efficace, en 1<sup>ère</sup> ligne, pour toute expression de PD-L1 (KN 189 et KN 407) (15).

## **Notion de marqueur prédictif appliquée aux ICIs ciblant l'axe**

### **PD-1/PD-L1**

Les ICIs ciblant l'axe PD-1/PD-L1 permettent d'obtenir des réponses partielles voire complètes. Ils améliorent la survie globale des patients atteints de CPNPC à un stade avancé (16,17). Néanmoins, certains patients présentent une résistance au traitement tandis que d'autres bénéficient d'une réponse prolongée. A l'ère de la médecine personnalisée, et par analogie avec les thérapies ciblées, il apparaît nécessaire d'identifier des marqueurs prédictifs de la réponse ou de l'absence de réponse aux ICIs. L'objectif est de guider la prescription des immunothérapies, notamment celles prescrites en monothérapie. Cependant, contrairement aux anomalies moléculaires qui signent la présence d'une addiction oncogénique, les marqueurs potentiels ne présentent pas ce caractère binaire. Le développement des tumeurs peut impliquer des anomalies génétiques et/ou des voies de signalisation cellulaire. Les interactions cellulaires, impliquées dans l'échappement tumoral au système immunitaire, sont particulièrement complexes et fines. Le développement de marqueurs, en rapport avec ces voies de signalisation cellulaire, est délicat (6).

Actuellement, de nombreux marqueurs sont étudiés. Aucun ne permet de parfaitement prédire la réponse aux ICIs. Nous en avons sélectionné quelques-uns, parmi ceux qui nous paraissaient pertinents dans le cadre de cette thèse, mais la liste n'est pas exhaustive.

**L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales** est le principal marqueur, utilisé en pratique clinique, pour sélectionner les patients susceptibles de répondre au pembrolizumab. L'expression de PD-L1 est déterminée par une technique immunohistochimique, réalisée sur une lame de tissu tumoral, fixé par le formol et inclus en paraffine. Plusieurs AC anti-PD-L1 sont commercialisés : leur sensibilité et leur spécificité sont comparables (18,19).

**La charge mutationnelle** correspond au taux de mutation non synonyme, présent dans les cellules tumorales. C'est un marqueur en cours de développement. Les mutations génétiques somatiques, présentes dans les cellules tumorales, sont à l'origine de la synthèse de nouveaux peptides. Ces nouveaux peptides sont présentés comme néo-antigènes tumoraux aux LT et ils induisent une réponse immunitaire. Les tumeurs avec une forte charge mutationnelle, riches en néo-antigènes tumoraux, seraient plus immunogènes. Elles seraient associées à une meilleure réponse aux ICIs. Cependant des exemples négatifs ont récemment été présentés (20,21).

**La composition du microenvironnement tumoral**, et notamment la présence de cellules immunitaires, impacterait la réponse à l'immunothérapie. Les ICIs nécessiteraient la présence de cellules immunitaires, au sein du microenvironnement tumoral et de la tumeur, pour être efficaces. Différentes études caractérisent la composition et les interactions cellulaires au sein du microenvironnement tumoral (22,23). Certains auteurs distinguent ainsi deux types de tumeurs. D'une part, les tumeurs dites « inflammatoires » caractérisées

par la présence de nombreux lymphocytes intra-tumoraux (TILs), un infiltrat dense en LT CD8+, l'expression de points de contrôle immunitaire (PD-1, CTLA4, TIM3, LAG3, ...) et une forte charge mutationnelle. D'autre part, les tumeurs dites « non inflammatoires » caractérisées par l'absence ou la présence de rares TILs, l'absence d'expression des points de contrôle immunitaire, une faible charge mutationnelle et peu de néo-antigènes tumoraux (24,25). Entre ces deux catégories, inflammatoire et non inflammatoire, il existe des formes intermédiaires. La valeur pronostique de ces catégories serait plus élevée que l'analyse isolée des marqueurs qui les composent (26).

## **Expression de PD-L1 par les cellules tumorales**

Le pembrolizumab a démontré son efficacité dans le CPNPC.

Les études montrent que le bénéfice des traitements anti-PD-1/PD-L1 croît avec l'augmentation de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, sans effet de plateau (27). L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales est évaluée, par technique immunohistochimique, en réalisant le Tumor Proportion Score (TPS). Ce score est défini comme le pourcentage de cellules tumorales viables, présentant une coloration au moins partielle de la membrane cellulaire, par rapport à toutes les cellules tumorales viables, dans la section examinée.

Cependant, ce test est imparfait pour prédire la réponse à l'immunothérapie. Il existe des patients répondeurs à la monothérapie avec une faible expression de PD-L1 et inversement, des patients progressant malgré une forte expression de PD-L1 (17,28). L'expression de PD-L1 n'est donc ni nécessaire, ni suffisante à l'obtention d'une réponse à un traitement ciblant l'axe PD-1/PD-L1. Il existe de multiples voies annexes immunosuppressives dans le microenvironnement tumoral. Elles sont redondantes ou non redondantes, ce qui peut expliquer en partie les échecs thérapeutiques des ICIs actuels (29). Ainsi, il paraît intéressant d'associer d'autres marqueurs, pour prédire la réponse au pembrolizumab et plus généralement aux ICIs.



## **La voie de l'adénosine**

La voie adénosinergique CD39/CD73 convertit l'adénosine triphosphate extracellulaire (ATP) en adénosine extracellulaire (Ado).

L'ATP et l'Ado sont deux médiateurs purinergiques, présents dans le microenvironnement tumoral. Ils sont senseurs/effecteurs de la réponse immunitaire. Les concentrations locales, en ATP et en Ado, sont étroitement régulées par un système complexe d'enzymes, transporteurs et récepteurs.

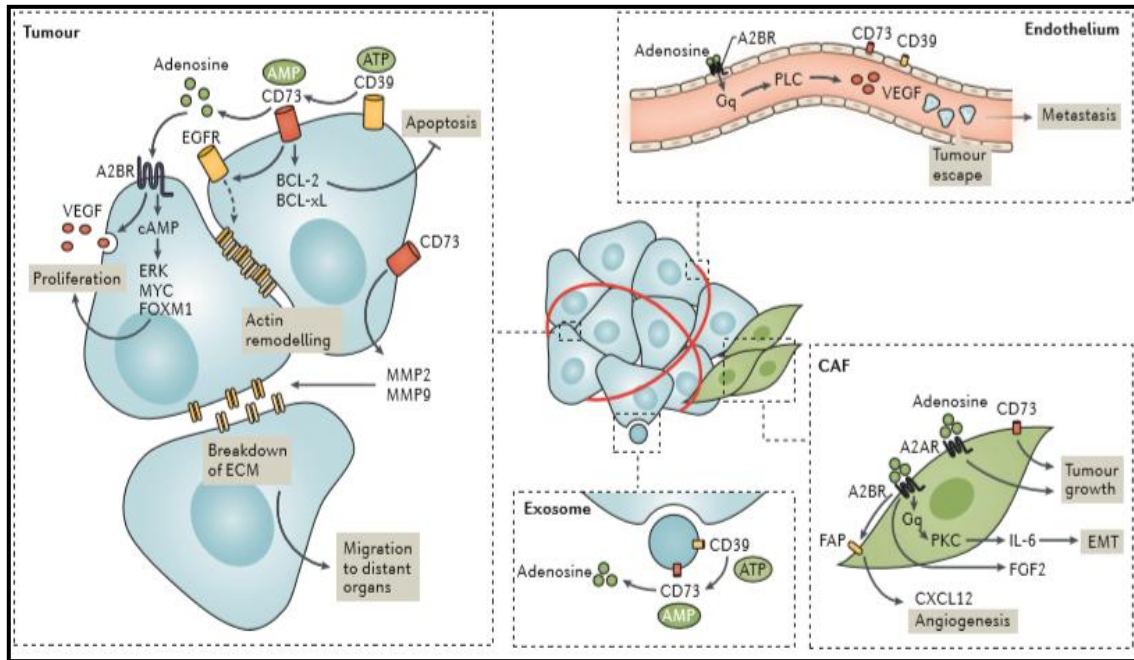
La production d'Ado, implique la dégradation de l'ATP par des ectonucléotidases membranaires, notamment CD39 (ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase 1, E-NTPDase1) et CD73 (ecto-5'-nucléotidase, Ecto5'NTase). Ces ectonucléotidases sont exprimées par certaines cellules cancéreuses, immunitaires et endothéliales.

CD39 hydrolyse d'abord l'ATP et l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine monophosphate (AMP). L'AMP est convertie en Ado par CD73. L'Ado, dérivée de CD73, a une demi-vie très courte. Elle est soit catabolisée en inosine, soit utilisée par des récepteurs purinergiques spécifiques de l'adénosine. Il en existe quatre, distincts, couplés aux protéines G : A1, A2A, A2B et A3.

L'ATP est essentielle à une réponse anti-tumorale efficace. Elle favorise le recrutement des phagocytes et la maturation des cellules dendritiques. En parallèle, elle inhibe la prolifération tumorale et favorise la mort des cellules cancéreuses.

L'Ado est impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques. De façon générale, c'est un signal de détresse cellulaire en réponse à diverses agressions : hypoxie, privation en nutriments, inflammation, tumorigenèse. Ce signal de détresse cellulaire aboutit à des mécanismes de défense et de protection des tissus : limitation des fuites vasculaires, stimulation de l'angiogenèse, activation du remodelage de la matrice extracellulaire et inactivation des cellules immunitaires.

Physiologiquement, la voie adénoenergique protège les organes d'une réaction inflammatoire excessive et favorise la réparation tissulaire. Toutefois, ces mécanismes de défense peuvent contribuer au développement et à la progression d'états pathologiques, y compris dans le cancer. En effet, en éliminant l'ATP extracellulaire pro-inflammatoire, et en générant un environnement immunosuppresseur riche en Ado, la voie CD39/CD73 constitue un mécanisme d'échappement tumoral au système immunitaire (29–31) **(Figure 5)**.



**Figure 5 : effet des molécules adénosinergiques sur la tumeur et le microenvironnement tumoral, d'après Vijayan *et al***

(Vijayan D, Young A, Teng MWL, Smyth MJ. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nat Rev Cancer*. déc 2017) (31)

L'accumulation d'adénosine favorise la croissance tumorale et les métastases par ses effets sur les cellules tumorales et le stroma. Elle atténue la réponse immunitaire en inhibant l'activation des cellules dendritiques, en supprimant l'activité anti-tumorale des cellules effectrices (lymphocytes T et cellules NK) et en stabilisant les fonctions immunosuppressives des lymphocytes T régulateurs et des cellules myéloïdes.

Dans les fibroblastes associés au cancer (CAF), l'A2B induit l'expression du facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF2), augmente le nombre de fibroblastes positifs à la protéine d'activation des fibroblastes (FAP) et entraîne une libération élevée de CXCL12 par ces fibroblastes FAP+, ce qui favorise l'angiogénèse en augmentant le nombre de cellules endothéliales CD31+ dans la tumeur. A2B peut également engager la voie de signalisation du récepteur couplé à la protéine G, la Gq-protéine kinase C (PKC), pour activer l'interleukine-6 (IL-6), qui à son tour sert de médiateur dans la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM).

Abréviations : NK, natural killer ; cAMP, AMP cyclique ; PLC, phospholipase C

## Le CPNPC

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer en France, il représente 20% des décès par cancer, à l'origine de 31 000 décès estimés en 2017. Son incidence est élevée avec plus de 49 000 nouveaux cas/an en France (2<sup>ème</sup> cancer incident chez l'homme, 3<sup>ème</sup> cancer incident chez la femme). La survie tous stades confondus est inférieure à 20% à 5 ans (32).

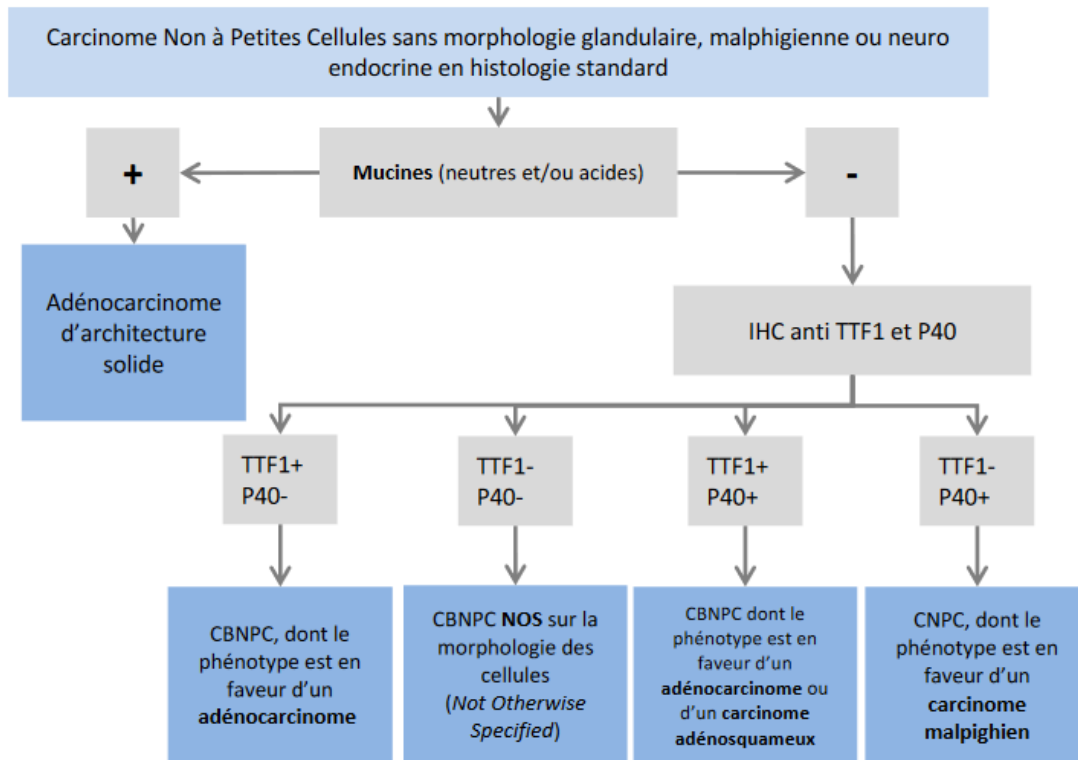
Dans 85% des cas, il s'agit de cancers pulmonaires non à petites cellules. Ils sont diagnostiqués, dans 70% des cas, à un stade localement avancé ou métastatique (stade III-IV).

Au sein des CPNPC, on distingue deux grands types histologiques : les carcinomes épidermoïdes (15 à 25% des cas) et les carcinomes non épidermoïdes (75 à 85% des cas, dont les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules).

Le diagnostic du cancer pulmonaire est fondé sur un examen anatomopathologique. Cet examen comporte une analyse, morphologique et immunohistochimique, qui répond à des règles précises (**Figure 6**).

La prise en charge thérapeutique du CPNPC est elle-même standardisée.

Différents types de prélèvement du CPNPC sont effectués en routine. Ils ont un impact sur l'examen anatomopathologique et sur la prise en charge qui va suivre. Ils sont détaillés en annexe (**Annexe 1**).



**Figure 6 : proposition d'arbre décisionnel pour le diagnostic des carcinomes indifférenciés, d'après les référentiels Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique**

(Couraud S, Westeel V., Toffart A.-C, Souquet P.-J. et le comité de rédaction des référentiels Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique. Référentiel sur le cancer bronchique non à petites-cellules: actualisation 2019. ARISTOT) (33)



## CONTEXTE DE L'ETUDE

La prise en charge, du CPNPC de stade avancé, est définie dans le cadre d'une réunion de concertation pluridisciplinaire. Elle est fonction de la présence d'anomalie moléculaire, de l'expression tumorale du PD-L1, de l'histologie de la tumeur, de l'âge, de l'indice de performance, des comorbidités et des préférences du patient. Les possibilités thérapeutiques sont entre-autres : le traitement systémique par chimiothérapie, les thérapies ciblées, l'immunothérapie.

Le pembrolizumab a récemment intégré l'arsenal thérapeutique.

Il dispose d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en France, en 1ère ligne, en monothérapie, dans le traitement du CPNPC, localement avancé ou métastatique, qui a un TPS PD-L1  $\geq 50\%$ , en l'absence d'altération des gènes *EGFR*, *ALK* ou *ROS1*.

Un TPS PD-L1  $\geq 50\%$  signifie qu'au moins 50% des cellules tumorales expriment PD-L1 (marquage membranaire quelle que soit l'intensité).

Pour les patients dont la tumeur présente un TPS PD-L1  $\geq 1\%$ , le pembrolizumab est indiqué en monothérapie, en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus, après au moins une chimiothérapie antérieure, en l'absence d'altération des gènes *EGFR*, *ALK* ou *ROS1*. Pour les patients présentant des altérations des gènes *EGFR*, *ALK* ou *ROS1*, et un TPS PD-L1  $\geq 1\%$ , le pembrolizumab est

indiqué en monothérapie, en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus, après au moins une thérapie ciblée antérieure.

Depuis peu, le pembrolizumab dispose d'une AMM, dans le CPNPC métastatique épidermoïde, en 1<sup>re</sup> ligne de traitement en association à une chimiothérapie par carboplatine et paclitaxel ou nab-paclitaxel. De même, dans le CPNPC de type carcinome non épidermoïde, sans mutation *EGFR*, *ALK* ou *ROS1*, le pembrolizumab dispose d'une AMM en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement en association à une chimiothérapie par pemetrexed et sel de platine. Ces deux dernières indications sont indépendantes du TPS PD-L1 (34,35).

Dans le service d'anatomopathologie, à la suite de l'AMM du pembrolizumab, nous avons mis au point l'immunomarquage par l'AC anti-PD-L1 proposé comme test compagnon. En 2019, 673 tests PD-L1 ont été réalisés dans le service, soit environ 56 tests par mois, soit environ 13 tests par semaine.

Une démarche qualité a été associée à la mise au point de la technique immunohistochimique. En effet, les recommandations internationales préconisent de mettre en place un programme de contrôle de la qualité des techniques d'analyse, au sein des laboratoires, notamment dans le cadre des tests PD-L1 (36,37). Depuis quelques années, la pratique de la médecine diagnostique commence à être encadrée par des normes et par des textes réglementaires. Cela a débuté avec la biologie puis cela s'étend à d'autres disciplines comme la radiologie ou l'anatomopathologie. En France, l'accréditation selon la norme ISO (International Organization for



Standardization) 15189 est obligatoire pour les laboratoires de biologie depuis 2010. Concernant l'anatomopathologie, même si la norme s'y applique, sa mise en œuvre relève d'une démarche volontaire, tant en secteur libéral qu'en secteur public. Elle est sous le contrôle du COFRAC (Comité Français d'Accréditation).

Un acteur majeur du développement de la qualité en anatomopathologie est l'AFAQAP (Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques). L'AFAQAP permet aux pathologistes d'évaluer et d'améliorer régulièrement la qualité de leurs pratiques, dans les domaines diagnostiques ou techniques, et dans l'organisation des laboratoires. Par ailleurs, en pathologie thoracique, le groupe PATTERN (groupe pathologistes thoraciques de valorisation de l'expertise, de la recherche et de l'innovation) participe au développement de la démarche qualité.

Ainsi, le service d'anatomopathologie a considéré la démarche d'accréditation comme un outil de réflexion visant à améliorer le système en place. La mise en place du test immunohistochimique PD-L1 a été l'occasion de débiter cette démarche qualité. Son développement comportait plusieurs actions : la rédaction de procédures, la formation continue du personnel, le développement d'indicateurs de qualité et l'analyse de ces indicateurs de qualité.

La rédaction de procédures vise à harmoniser le savoir-faire du laboratoire. La formation continue du personnel, aux procédures et à la traçabilité des actions, est indispensable. Les indicateurs de qualité sont multiples. Tout d'abord, le contrôle de la qualité des lames avant leur distribution ou leur interprétation : la

présence de contrôles positifs et négatifs garantit la spécificité et la fiabilité de la technique immunohistochimique. Ensuite, cela peut être la participation à des Evaluations Externes de la Qualité (EEQ). L'AFAQAP et le groupe Pattern ont élaboré un test d'EEQ pour PD-L1. Il existe également une plateforme informatique air PD-L1. Elle permet un suivi national des résultats des tests immunohistochimiques PD-L1 dans le cancer pulmonaire.

L'analyse de ces indicateurs de qualité, mis en place au sein d'un service, a plusieurs utilités. D'une part, cela permet de souligner d'éventuelles déviations. D'autre part, cela permet de définir des objectifs raisonnables et mesurables à atteindre, pour améliorer la qualité des prestations. La démarche qualité s'applique aux 3 étapes techniques : pré-analytique, analytique et post-analytique.

L'ensemble de la démarche qualité doit être évolutif et rester adapté. La démarche qualité ne doit pas être trop lourde dans son application quotidienne. Le risque étant d'avoir, comme effet collatéral, une diminution de l'efficacité de la chaîne diagnostique.

Au-delà de la démarche qualité, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales s'est révélée être un marqueur imparfait de la réponse au pembrolizumab, que ce soit en pratique quotidienne ou dans les données de la littérature. Nous avons donc réfléchi à l'intérêt de tester, conjointement, d'autres marqueurs en immunohistochimie. Cependant, la petite taille des prélèvements et notre technique immunohistochimique ne nous permettaient pas de multiplier

les marqueurs immunohistochimiques. Nous avons donc choisi deux anticorps : anti-CD8 et anti-CD39.

CD8 est exprimé par les LT cytotoxiques. L'anticorps anti-CD8 est robuste et très utilisé en pratique quotidienne. Son intérêt pronostique est souligné dans la littérature. S'il s'avérait intéressant, il serait facile à mettre en place.

L'anticorps anti-CD39 est beaucoup moins connu et non évalué. Il existe peu de données dans la littérature sur l'expression immunohistochimique du CD39 dans le CPNPC.

Cependant, comme mentionnée dans l'introduction, la voie de l'adénosine semble être une piste intéressante

Nous nous y sommes intéressés, dans le cadre des CPNPC traités par pembrolizumab, suite à la lecture de l'article paru dans Nature, « Bystander CD8+ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates », écrit par Yannick Simoni et collaborateurs (38).



# OBJECTIFS DE L'ETUDE

## Objectif principal

L'objectif principal de notre étude est d'étudier le lien entre l'expression de PD-L1 et différents paramètres évolutifs, qui sont :

- La survie globale (SG)
- La survie sans progression (SSP)
- La réponse au pembrolizumab
- La durée de la réponse au pembrolizumab

## Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires de notre étude sont :

- Etudier le lien entre la ligne de traitement (place du pembrolizumab dans la séquence thérapeutique : en 1<sup>ère</sup> ligne *versus* en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus) et les différents paramètres évolutifs (SSP, SG, réponse au pembrolizumab, durée de cette réponse).
- Etudier le lien entre l'expression immunohistochimique de CD8 et les paramètres évolutifs cités ci-dessus.
- Etudier le lien entre l'expression immunohistochimique de CD39 et les paramètres évolutifs cités ci-dessus.



## MATERIEL ET METHODES

### Type d'étude

Nous avons mené une étude descriptive, rétrospective, monocentrique, entre janvier 2012 et janvier 2020. Tous les patients ont été pris en charge pour le traitement d'un CPNPC dans le service d'oncologie thoracique du centre hospitalier universitaire (CHU) de Lille. Les prélèvements tumoraux, que nous avons étudiés, provenaient des services d'anatomopathologie du CHU de Lille, du centre Oscar Lambret et du centre hospitalier (CH) de Valenciennes.

## **Population d'étude**

### **Critères d'inclusion**

Les patients inclus dans l'étude étaient tous, des patients adressés pour prise en charge d'un CPNPC au CHU de Lille, entre janvier 2012 et janvier 2020. Au cours de leur parcours thérapeutique, ils bénéficiaient d'un traitement par immunothérapie par pembrolizumab (avec au moins une cure, c'est-à-dire une injection, administrée). Pour chaque patient, au moins un dossier anatomopathologique intéressant le CPNPC devait être disponible. Un dossier anatomopathologique comporte des blocs de paraffine (prélèvements tumoraux), les lames correspondantes et le compte-rendu de l'examen anatomopathologique.

### **Critères d'exclusion**

Nous avons exclu les dossiers de l'étude lorsque les patients n'ont finalement pas reçu de pembrolizumab ou lorsque les prélèvements tissulaires ne comportaient plus de tissu tumoral.



## **Recueil des données**

### **Données cliniques**

Les données cliniques pertinentes ont été recueillies dans les dossiers médicaux des patients, via le logiciel Sillage®.

Concernant les données démographiques pertinentes, nous avons recueilli pour chaque patient : le sexe, l'âge, le statut tabagique et son évaluation en nombre de paquets-années.

Concernant les données oncologiques pertinentes nous avons recueilli pour chaque patient :

- La date du diagnostic de cancer pulmonaire non à petites cellules
- Le performance status (PS) au diagnostic
- Le stade TNM au diagnostic
- La place de l'immunothérapie par pembrolizumab dans la séquence thérapeutique globale. Nous avons réparti les patients en 2 groupes :
  - Immunothérapie par pembrolizumab prescrite en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement

- Immunothérapie par pembrolizumab prescrite en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus, et dans ce cas, nous avons relevé les traitements reçus avant immunothérapie
- La survenue ou non d'une progression tumorale sous pembrolizumab
- La survenue ou non d'un décès
- La survie globale : délai entre la 1<sup>ère</sup> cure de pembrolizumab et le décès
- La survie sans progression : délai entre la 1<sup>ère</sup> cure de pembrolizumab et la survenue d'un événement (progression tumorale ou décès)
- Concernant l'immunothérapie par pembrolizumab, nous avons recueilli :
  - Le protocole prescrit : 200mg /21jours ou 2mg/kg /21jours
  - Le nombre de cures, c'est-à-dire le nombre d'injections, administrées
  - L'âge de début du traitement
  - La durée du traitement
  - La cause d'arrêt du traitement : toxicité ou progression ou hyperprogression ou autre cause (altération de l'état général, hospitalisation pour événement intercurrent, souhait du patient)
- Concernant la réponse à l'immunothérapie par pembrolizumab, nous avons recueilli le statut répondeur ou non répondeur de chaque patient, ainsi que la durée de réponse au pembrolizumab.

Le statut répondeur correspondait à une réponse totale ou à une réponse partielle. Le statut non répondeur correspondait à une progression tumorale ou à une maladie stable.

Le statut répondeur ou non répondeur était déterminé au cours d'une évaluation thérapeutique : cette évaluation est réalisée à la fin de chaque cycle d'immunothérapie. Pour notre étude, nous avons considéré la meilleure réponse présentée par le patient sur l'ensemble de la ligne de traitement par pembrolizumab. Lorsque la conclusion de l'évaluation thérapeutique était « progression non confirmée », nous nous sommes référés au résultat de l'évaluation suivante.

Les documents d'évaluation thérapeutique regroupaient plusieurs informations : la réponse à l'immunothérapie par pembrolizumab ; les résultats des examens d'imagerie ; le traitement ultérieur envisagé. Lorsque ces documents étaient ambigus ou incomplets, nous avons sollicité l'aide des pneumologues pour déterminer le statut répondeur ou non répondeur des patients.

Nous avons également relevé la durée de la réponse à l'immunothérapie par pembrolizumab, qui était le délai entre la date de la 1<sup>ère</sup> cure du 1<sup>er</sup> cycle présentant cette réponse et la date d'évaluation thérapeutique du dernier cycle présentant cette réponse.

## **Données moléculaires**

Les données moléculaires pertinentes ont été recueillies dans les dossiers médicaux des patients via le logiciel Molis®.

Concernant les données moléculaires pertinentes, nous avons recueilli pour chaque patient : la présence ou non d'anomalie génétique sur les prélèvements tissulaires tumoraux. Nous avons recueilli, plus précisément, la présence ou non d'anomalie sur les gènes : *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *TP53*, *MET*, autre (*HER2*, *PIK3CA*, *MAP2K1*)

## **Données anatomopathologiques**

Les données anatomopathologiques pertinentes ont été recueillies dans les dossiers médicaux des patients à partir du système de gestion de laboratoire Diamic® de l'Institut de Pathologie du CHU de Lille (Pr. Emmanuelle Leteurtre) et à partir des comptes rendus fournis par les services d'anatomie et cytologie pathologiques du CH de Valenciennes et du centre Oscar Lambret.

Pour chaque patient, nous avons recensé les prélèvements disponibles en rapport avec le diagnostic de CPNPC, la date de prélèvement et la séquence d'évènements par rapport aux traitements reçus.

Concernant les données anatomopathologiques pertinentes, nous avons recueilli pour chaque prélèvement :

- Le type histologique
- Le type de prélèvement et sa localisation anatomique :
  - o Liquide (pleural, péricardique)
  - o Cytoponction (cytoponction transbronchique échoguidée ou cytoponction ganglionnaire)
  - o Biopsie (cutanée, ganglionnaire, pulmonaire, bronchique, pleurale, péricardique, gastrique, cérébrale)
  - o Pièce opératoire (wedge pulmonaire, lobectomie pulmonaire, résection hépatique, produit de curetage osseux, exérèse ganglionnaire, exérèse cérébrale, résection grêlique)
- La nature du prélèvement : tumeur primitive ou métastase
- L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales (score TPS PD-L1)
- Le résultat des contrôles qualité du test immunohistochimique PD-L1
- L'expression de *ALK*, *ROS1* et *MET* par les cellules tumorales recherchée par immunohistochimie (IHC) ou par hybridation in situ en fluorescence (FISH).

## **Réalisation des techniques**

### **Généralités**

Pour chaque dossier anatomopathologique retenu, nous avons sélectionné les blocs pertinents, à partir des lames correspondantes colorées par l'HES. Nous avons désarchivé ces lames ou bien nous les avons reçues des centres hospitaliers. Les prélèvements étaient tous fixés par le formol (formol tamponné à 10%, pH neutre) et inclus en paraffine (prélèvements FFPE).

### **Technique**

En raison de leur petite taille, une utilisation rationnelle des prélèvements a été privilégiée. On réalisait d'emblée 5 sections de 4 $\mu$ m, coupées à partir des prélèvements FFPE. Ces sections étaient réalisées en une fois, pour ne pas avoir à dégrossir le bloc entre chaque coupe.

Les coupes étaient montées sur des lames Dakoflex, chargées positivement, ce qui permettait une meilleure adhésion des coupes sur la lame. Le bain d'eau comportait de l'eau distillée sans aucun additif. Le séchage était effectué à l'air.

Les lames non colorées, dites « lames blanches », étaient conservées à l'abri de la lumière au congélateur à -20°C. Le délai entre la coupe et la réalisation des techniques immunohistochimiques était d'environ 1 mois.

La 1<sup>ère</sup> lame blanche était colorée par l'HES. La 2<sup>ème</sup> était utilisée pour la technique immunohistochimique avec l'AC anti-PD-L1. La 3<sup>ème</sup> servait à réaliser l'IHC avec l'AC anti-CD8, et la 4<sup>ème</sup> l'IHC avec l'AC anti-CD39. La dernière lame blanche était mise en réserve en cas d'échec des techniques précédentes.

La lame colorée par l'HES permettait un contrôle morphologique préalable à la réalisation et à l'interprétation des techniques immunohistochimiques (quantité et qualité du matériel tumoral disponible).

Les détails de la technique immunohistochimique et les différents types d'AC utilisés sont présentés en annexe (**Annexe 2**).

### **Contrôle qualité**

Dans le cadre de la démarche qualité, nous avons mis en place des contrôles dans la phase analytique : lame contrôle, témoin externe.

Deux lames contrôles, une négative et une positive, étaient placées dans l'automate, pour chaque série de technique immunohistochimique. Les

conditions pré-analytiques, des lames contrôles et des lames issues des prélèvements tumoraux, étaient identiques.

Pour les techniques immunohistochimiques avec les AC anti-PD-L1 et anti-CD39, on plaçait un témoin externe sur chaque lame.

Les lames contrôles positives et les témoins externes étaient constitués de matériel histologique, dont l'immunoréactivité était connue pour l'anticorps correspondant. Les tissus utilisés étaient : une coupe histologique de placenta pour l'AC anti-PD-L1, et une coupe histologique d'amygdale pour les AC anti-CD8 et anti-CD39 (39).



## **Interprétation des techniques**

### **AC anti-PD-L1**

La technique immunohistochimique avec l'AC anti-PD-L1 était effectuée en routine dans notre laboratoire. Elle ne nécessitait pas de mise au point. Nous avons suivi les recommandations du groupe PATTERN pour interpréter l'immunomarquage (40).

Un contrôle morphologique préalable était effectué sur la lame colorée par l'HES : le prélèvement devait contenir au minimum 100 cellules tumorales.

Puis on interprétait l'immunomarquage des lames contrôles et des témoins positifs. Les résultats attendus étaient :

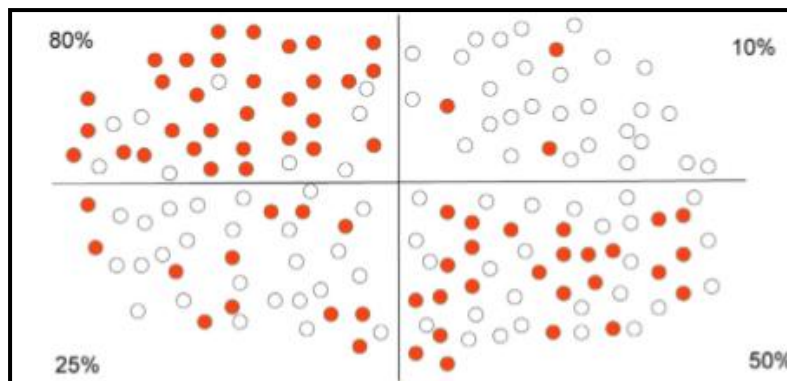
- L'absence de marquage sur la lame contrôle négative
- Le marquage des cellules trophoblastiques du placenta sur la lame contrôle positive et le témoin externe
- Le marquage des cellules immunitaires (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes B et T) qui est un témoin interne positif

Ensuite, on interprétait l'immunomarquage des cellules tumorales. Un marquage positif est défini comme : un marquage membranaire linéaire, complet ou non, quelle qu'en soit l'intensité.

On évaluait l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales en réalisant le score TPS PD-L1. On répartissait ensuite les prélèvements en deux catégories selon leur score TPS PD-L1 :

- score TPS PD-L1 <50% : moins de 50% des cellules tumorales présentaient un marquage positif avec l'AC anti-PD-L1
- score TPS PD-L1  $\geq$  50% : au moins 50% des cellules tumorales présentaient un marquage positif avec l'AC anti-PD-L1

Lorsque le marquage était hétérogène, nous faisons la moyenne des pourcentages mesurés dans chaque champ (**Figure 7**).

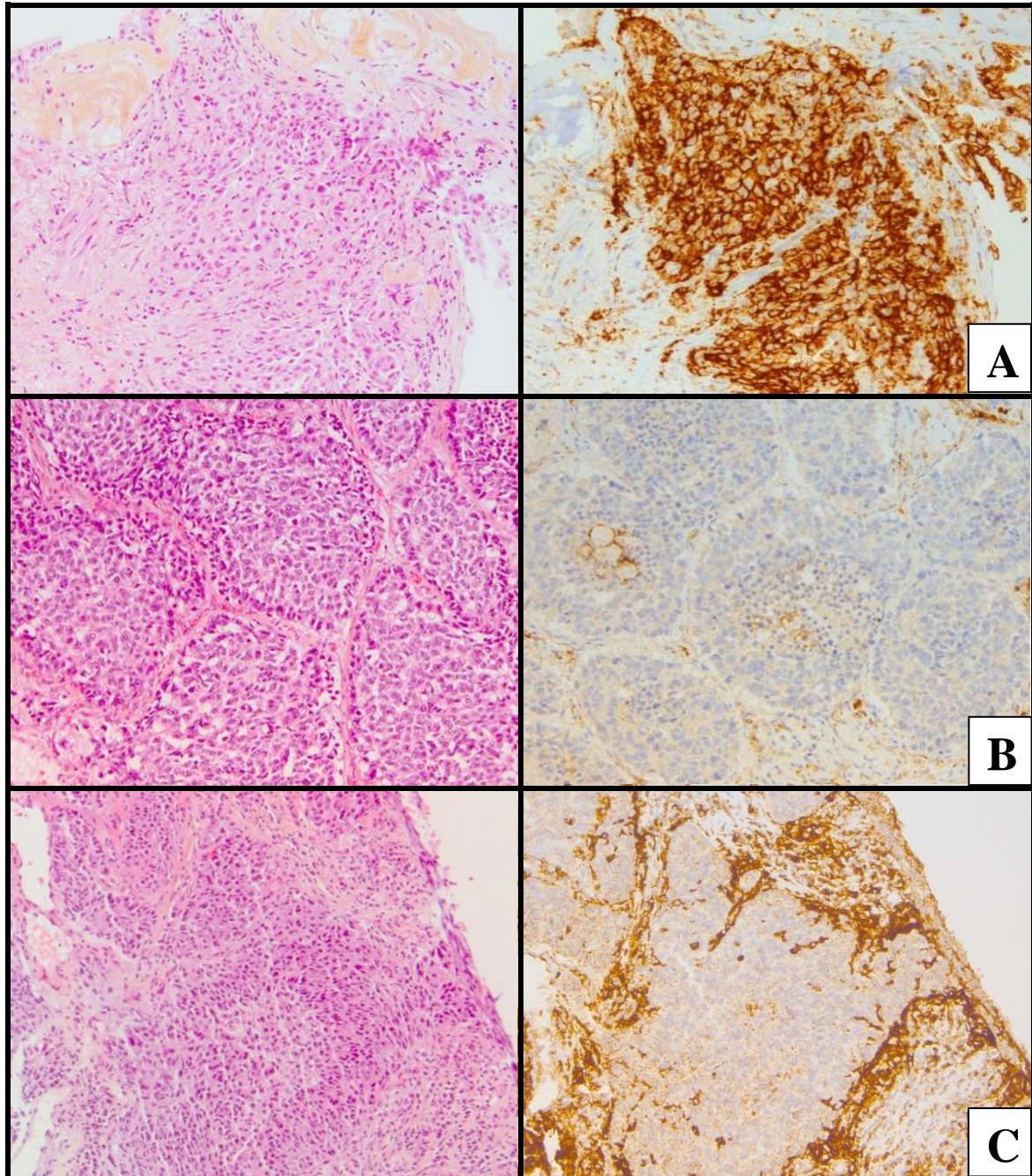


**Figure 7 : méthode pour quantifier une expression hétérogène de PD-L1 en IHC,** d'après Lantuejoul *et al*  
(Lantuejoul S, Adam J, Girard N *et al*. PD-L1 testing in non-small cell lung carcinoma: Guidelines from the PATTERN group of thoracic pathologists. *Ann Pathol.* avr 2018) (40)

Zones équivalentes mais avec des pourcentages de positivité différents : on fait ensuite la moyenne de ces pourcentages. Dans cet exemple, le % de cellules tumorales marquées est  $(80 + 10 + 25) : 4 \sim 40\%$

Pour chaque patient, nous avons réalisé la technique sur tous les prélèvements disponibles et qui nous semblaient pertinents. Les prélèvements qui nous semblaient pertinents étaient ceux réalisés au diagnostic et au cours de la séquence thérapeutique (avant-après radiochimiothérapie ou chimiothérapie, avant-après immunothérapie). L'objectif était de décrire les variations du TPS PD-L1 au cours de la séquence thérapeutique.

Pour certains prélèvements, il existait déjà un score TPS PD-L1, déterminé sur une technique immunohistochimique antérieure. Pour ces prélèvements, nous avons évalué le score TPS-PD-L1 sur une nouvelle immunohistochimie, effectuée au cours de notre étude. Nous avons ensuite comparé notre TPS PD-L1 au TPS PD-L1 antérieur.



**Figure 8 : exemple représentatif du marquage immunohistochimique PD-L1 observé dans notre étude**

**A** : marquage membranaire diffus d'intensité forte des cellules tumorales (HES et IHC, Gx100)

**B** : absence de marquage membranaire des cellules tumorales (HES et IHC, Gx100)

**C** : marquage intense de cellules immunitaires au contact de cellules tumorales négatives (HES et IHC, Gx100)

## **AC anti-CD8**

La technique immunohistochimique avec l'anticorps anti-CD8 était effectuée en routine dans notre laboratoire et ne nécessitait pas de mise au point.

Un contrôle morphologique préalable était effectué sur la lame colorée par l'HES. Puis on interprétait l'immunomarquage des lames contrôles et des témoins positifs. Les résultats attendus étaient :

- L'absence de marquage sur la lame contrôle négative
- Le marquage des LT CD8+ normalement présents dans l'amygdale, sur la lame contrôle positive et le témoin externe
- Le marquage des LT CD8+ normalement présent dans la tumeur, ou dans le tissu non tumoral, qui est un témoin interne

Ensuite on interprétait l'immunomarquage des lymphocytes. Un marquage positif est défini comme : un marquage membranaire, complet ou non, quelle qu'en soit l'intensité.

On évaluait la quantité de LT CD8+ présents au sein du prélèvement.

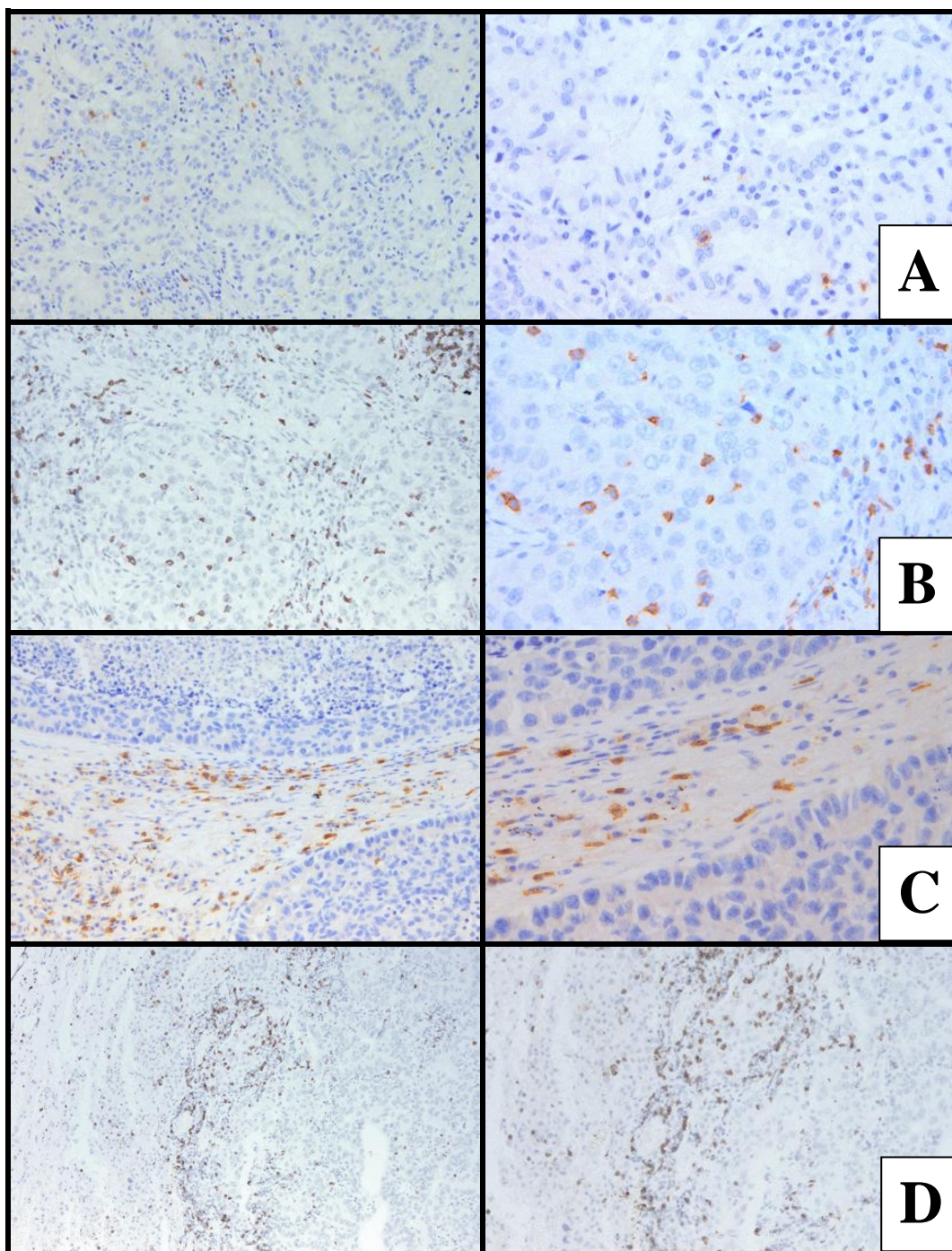
On utilisait une méthode semi-quantitative et on répartissait ensuite les prélèvements en 2 catégories :

- Groupe 1 : LT CD8+ rares et/ou peu nombreux
- Groupe 2 : LT CD8+ assez nombreux et/ou très nombreux

Cette évaluation était d'abord globale, sur l'ensemble de la tumeur, puis elle était réalisée dans 3 zones différentes : au front d'invasion de la tumeur, dans le stroma tumoral, dans la tumeur.

L'interprétation de la technique était uniquement réalisée sur les prélèvements tissulaires. Les prélèvements purement cytologiques étaient considérés comme non interprétables (possible facteur confondant du tissu non tumoral, absence d'architecture).





**Figure 9 : exemple représentatif d'évaluation semi-quantitative du marquage immunohistochimique avec l'AC anti-CD8 (Gx100 et Gx200)**

- A** : LT CD8+ absents ou rares dans le stroma et dans la tumeur (groupe 1)
- B** : LT CD8+ assez ou très nombreux dans le stroma et dans la tumeur (groupe 2)
- C** : LT CD8+ nombreux dans le stroma et rares dans la tumeur (groupe 2)
- D** : présence de nombreux lymphocytes au front d'invasion tumoral

## AC anti-CD39

### Choix de l'AC anti-CD39

La technique immunohistochimique avec l'AC anti-CD39 n'était pas maîtrisée dans notre laboratoire. Elle nécessitait d'être mise au point. La technique immunohistochimique n'était pas standardisée. Il n'existe pas de test, compagnon ou complémentaire, recommandé.

La première étape consistait à commander un AC anti-CD39 parmi différents fournisseurs : Abcam®, LSBio®, Santacruz Biotechnology®, Biolegend®, CliniSciences®. De par les références dans la littérature et l'expérience de l'équipe, nous avons retenu le fournisseur Abcam®. (11)

Abcam® commercialise différents clones d'AC anti-CD39. Nous avons choisi le clone ab223842. C'est un AC monoclonal de lapin de type IgG. Il est adapté à des techniques de western blot ou d'IHC sur paraffine. Il marque la protéine ENTP1 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 – (AA1-500)) d'origine murine ou humaine, codée par le gène *ENTPD1*.



## Mise au point de la technique immunohistochimique

L'AC était fourni avec des recommandations techniques concernant le stockage, la dilution initiale, et avec des précisions sur le modèle attendu de marquage (topographie) et de signal (distribution).

Nous avons testé 5 protocoles techniques. Puis, nous en avons sélectionné un.

La 1<sup>ère</sup> série d'immunomarquage, réalisée avec l'AC anti-CD39, était négative. Cela a ralenti l'étude et nous a amené à réfléchir sur les raisons possibles de ce dysfonctionnement. Une fois le problème résolu (Cf. Annexe 3), nous avons relancé la technique immunohistochimique avec l'AC anti-CD39 sur les lames blanches de réserve. Cette fois-ci, l'AC était préparé de façon extemporanée et la technique a fonctionné. L'ensemble des lames a été passé en deux séries sur l'automate.

Les détails de la mise au point de l'AC anti-CD39 et les éléments de réflexion techniques sont détaillés en annexe (**Annexe 3**).

## **Interprétation de l'immunomarquage avec l'AC anti-CD39**

Un contrôle morphologique préalable était effectué sur la lame colorée par l'HES. Puis on interprétait l'immunomarquage des lames contrôles et des témoins positifs. Les résultats attendus étaient :

- L'absence de marquage sur la lame contrôle négative
- Le marquage des LT CD39+ et des cellules endothéliales sur la lame contrôle positive et le témoin externe
- Le marquage des cellules endothéliales qui est un témoin interne (42)

Ensuite, on interprétait l'immunomarquage avec l'AC anti-CD39 : le marquage était membranaire, d'aspect fasciculé.

On évaluait la quantité de cellules CD39+ présentes au sein du prélèvement.

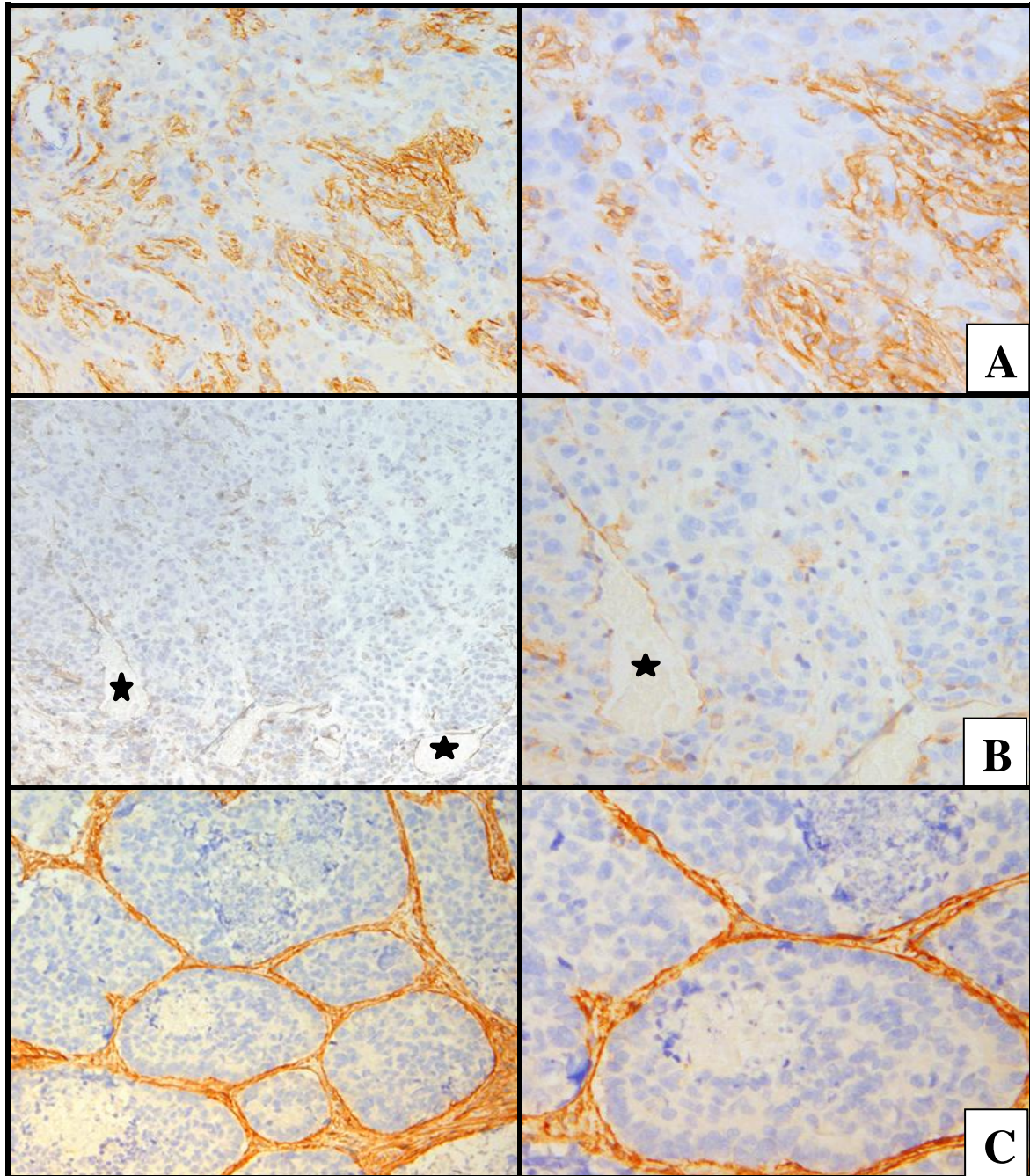
On utilisait une méthode semi-quantitative et on répartissait ensuite les prélèvements en 2 catégories :

- Groupe 1 : cellules CD39+ rares et/ou peu nombreuses
- Groupe 2 : cellules CD39+ assez nombreuses et/ou très nombreuses

Cette évaluation était d'abord globale, sur l'ensemble de la tumeur, puis elle était réalisée dans 2 zones différentes : dans la tumeur et dans le stroma tumoral.

De plus on évaluait la présence ou l'absence d'un encorbellement péri tumoral défini par des cellules du stroma tumoral, intensément marquées avec l'AC anti-CD39, qui encerclent des ilots de cellules tumorales bien limités en périphérie.

L'interprétation de l'immunomarquage était uniquement réalisée sur les prélèvements tissulaires. Les prélèvements purement cytologiques étaient considérés comme non interprétables (possible facteur confondant du tissu non tumoral, absence d'architecture).



**Figure 10 : exemple représentatif d'évaluation semi-quantitative du marquage immunohistochimique avec l'AC anti-CD39 (Gx100 et Gx200)**

**A :** marquage d'assez ou de très nombreuses cellules dans le stroma et la tumeur (groupe 2), absence d'encorbellement

**B :** marquage absent ou rares cellules marquées dans le stroma et la tumeur (groupe 1), pas d'encorbellement. Marquage des cellules endothéliales des capillaires ( \* ).

**C :** présence d'un marquage intense qui cerne les cellules tumorales : encorbellement

## **Anonymisation des données et accord de la CNIL**

La Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL) a donné son accord pour la réalisation de l'étude (numéro de référence DEC 16-464).

Toutes les données collectées ont été entièrement anonymisées, si bien qu'il est impossible de remonter directement au patient.

S'agissant d'une thèse de recueil de données, l'autorisation d'un Comité Protecteur des Personnes n'a pas été nécessaire.

## **Analyse statistique**

L'analyse statistique a été réalisée par Monsieur Julien Labreuche, affecté à l'Unité de Méthodologie - Biostatistique et Data Management, à la Maison Régionale de la Recherche Clinique du Pôle de Santé Publique du CHU de Lille.

Les variables quantitatives sont décrites par les médianes (intervalle interquartile). Les variables qualitatives sont décrites par les effectifs et par les pourcentages. Les survies, sans progression et globale, ont été décrites par les courbes de Kaplan-Meier. Elles ont été comparées selon l'expression du PD-L1 (TPS PD-L1 < 50% *versus* TPS PD-L1 ≥ 50%), la ligne de traitement (pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement *versus* en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus), l'expression de CD8 (rares LT CD8+ *versus* nombreux LT CD8+) et l'expression de CD39 (rares cellules CD39+ *versus* nombreuses cellules CD39+), par le test du log-Rank.

L'intensité des associations a été évaluée, en calculant le rapport des risques instantanés (hazard ratio) d'évènements (décès ou progression tumorale, pour la survie sans progression, et décès pour la survie globale) à l'aide du modèle de Cox à risque proportionnel. L'hypothèse des risques proportionnels a été évaluée à l'aide des résidus de Schoenfeld. L'hypothèse des risques proportionnels n'était pas vérifiée pour :

- l'expression du PD-L1 (TPS PD-L1 < 50% *versus* TPS PD-L1  $\geq$ 50%),
- la ligne de traitement
- l'expression de CD8

Par conséquent, le modèle de Cox a été réalisé en introduisant des coefficients dépendants du temps, modélisant l'effet des prédicteurs potentiels selon deux périodes (de 0 à 90 jours après début du traitement par pembrolizumab *versus*  $\geq$  90 jours).

Le niveau de significativité des tests était fixé à 5% ( $p < 0.05$ )

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS® (SAS Institute version 9.4).





# RESULTATS

## Population et prélèvements

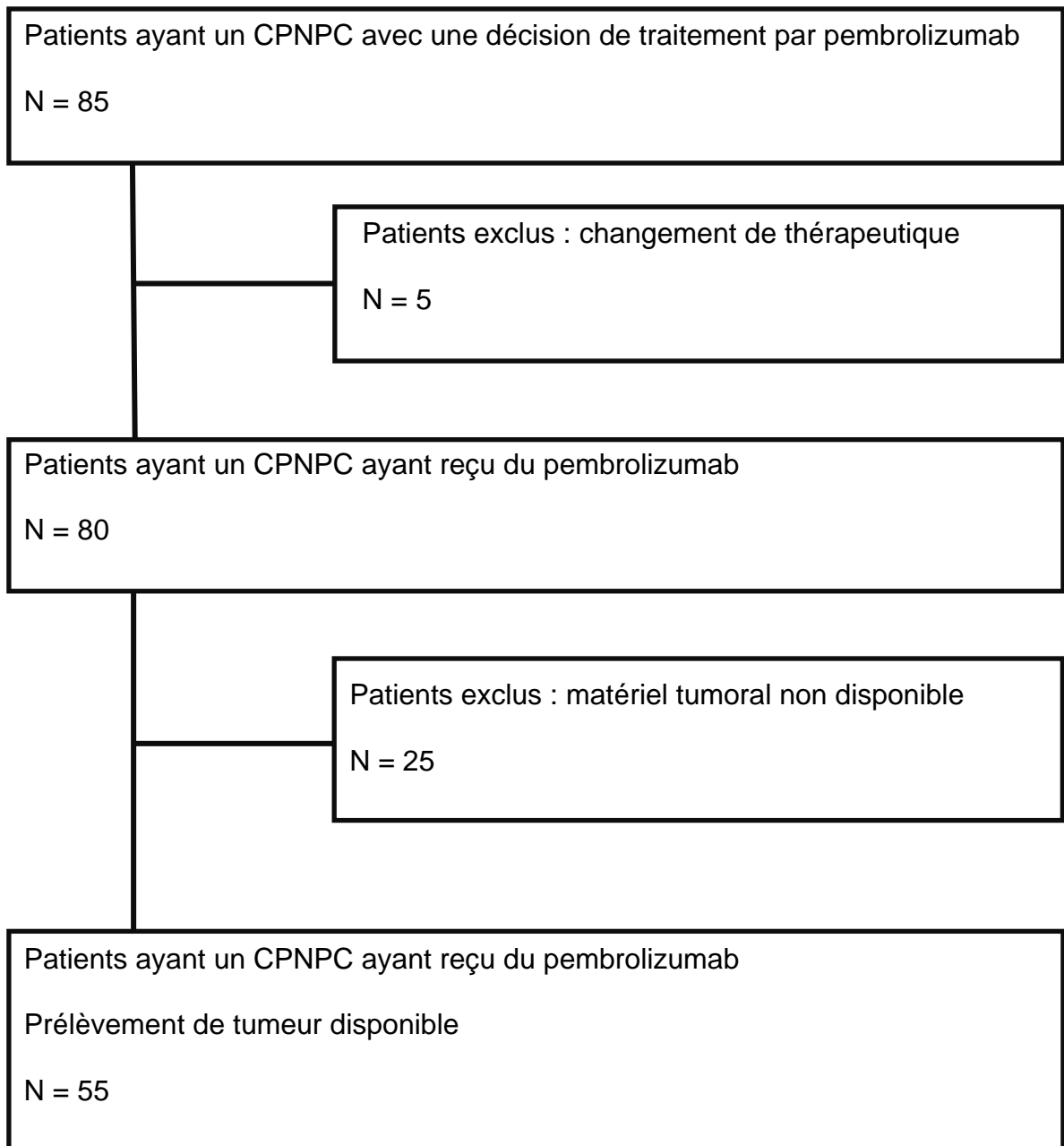
Nous avons considéré 85 patients, dont la liste nous a été fournie par le Dr Simon Baldacci, pneumologue, adressés pour prise en charge par immunothérapie (pembrolizumab) d'un CPNPC, au CHU de Lille dans le service d'Oncologie thoracique, sous la responsabilité du Pr Alexis Cortot.

Parmi eux, cinq patients ont été exclus car ils n'avaient pas reçu de pembrolizumab : un patient a reçu du nivolumab, un patient a reçu du giotrif et trois patients ont bénéficié d'un changement de protocole : chimiothérapie (un patient) ou soins palliatifs (deux patients).

Les dossiers anatomopathologiques, pour les 80 patients inclus, ont été obtenus dans le système de gestion Diamic® de l'Institut de pathologie sous la responsabilité du Pr Emmanuelle Leteurtre. Au total, sur ces 80 patients, 108 prélèvements avaient été réalisés. Chaque dossier correspondait à un prélèvement et à un compte-rendu diagnostique associé (n=108). A partir des 108 prélèvements, nous avons, dans les archives, 230 blocs d'inclusion en paraffine. Mais pour 25 patients (31%), le matériel tumoral n'était plus disponible pour nos analyses.

Au total, nous avons pu inclure, pour notre étude, 55 patients, soit 69 prélèvements (**Figure 11**).

Pour certains patients, il y avait donc plusieurs prélèvements disponibles. Pour l'analyse statistique globale, nous devons sélectionner un seul prélèvement par patient. Nous avons choisi le prélèvement le plus proche du début de l'immunothérapie. Puis pour l'analyse descriptive par patient, des séquences thérapeutiques, nous avons étudié l'ensemble des prélèvements disponibles.



**Figure 11 : Flowchart**

## **Données cliniques**

Les données sont présentées dans le **Tableau I**.

Parmi les 55 patients inclus dans l'étude, on notait 12 femmes (21.8%), 49 patients fumeurs (89%) avec un nombre médian (extrêmes) de paquets-années de 39 (10-90).

Au diagnostic de CPNPC, l'âge médian des patients était de 61 ans (38-87) ; le PS était de 0 ou 1 pour 51 patients (92.7%) ; le stade TNM était de IV chez 37 patients (67.3%) et de III chez 12 patients (21.8%).

Concernant l'immunothérapie, chez 29 patients (52.7%), le pembrolizumab a été administré en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement.

Chez 26 patients (47.3%), le pembrolizumab n'a pas été administré en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement. Il a été administré plus tard, en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus. Parmi ces 26 patients, 25 ont reçu une chimiothérapie, ou une radiochimiothérapie, avant l'immunothérapie.

L'âge médian du début du pembrolizumab était de 62 ans (43-87).

Le nombre médian d'injection (cure) était de cinq par patient (1-33).

La durée médiane de l'immunothérapie par pembrolizumab était de 116 jours (1-496).

Caractéristiques	Total n = 55	Selon la ligne de traitement		Selon le TPS PD-L1	
		Ligne 1 n=29	Ligne 2 n=26	< 50% n=22	≥ 50% n=33
Femme, n (%)	12 (21.8)	6 (20.7)	6 (23.1)	4 (18.2)	8 (24.2)
Fumeur, n (%)	49 (89)	27 (93.1)	22 (84.6)	21 (95.5)	28 (90.3)
Age médian au diagnostic, ans (extrêmes)	61 (38-87)	62 (46-87)	59.5 (38-82)	61.5 (46-82)	60.0 (38-87)
Age médian début IT, ans (extrêmes)	62 (43-87)	62 (46-87)	62 (43-86)	62.5 (46-86)	62 (43-87)
Nombre médian de cures, n (extrêmes)	5 (1-33)	7 (1-33)	3.5 (1-14)	6.5 (1-33)	5 (1-32)
Durée médiane IT, jours (extrêmes)	116 (1-496)	119.5 (1-496)	98 (2-392)	98 (2-374)	117.5 (1-496)
Patients répondeurs, n (%)	13 (23.6)	11 (37.9)	2 (7.7)	3 (13.6)	10 (30.3)
Durée médiane réponse, jours (extrêmes)	455 (63-700)	504 (63-700)	106 (89-123)	440 (89-700)	479.5 (63-610)
Progression tumorale sous IT, n (%)	37 (67)	14 (48.3)	23 (88.5)	18 (82)	19 (57.6)
Décès, n (%)	28 (51)	13 (44.8)	15 (57.7)	11 (50)	17 (51.5)

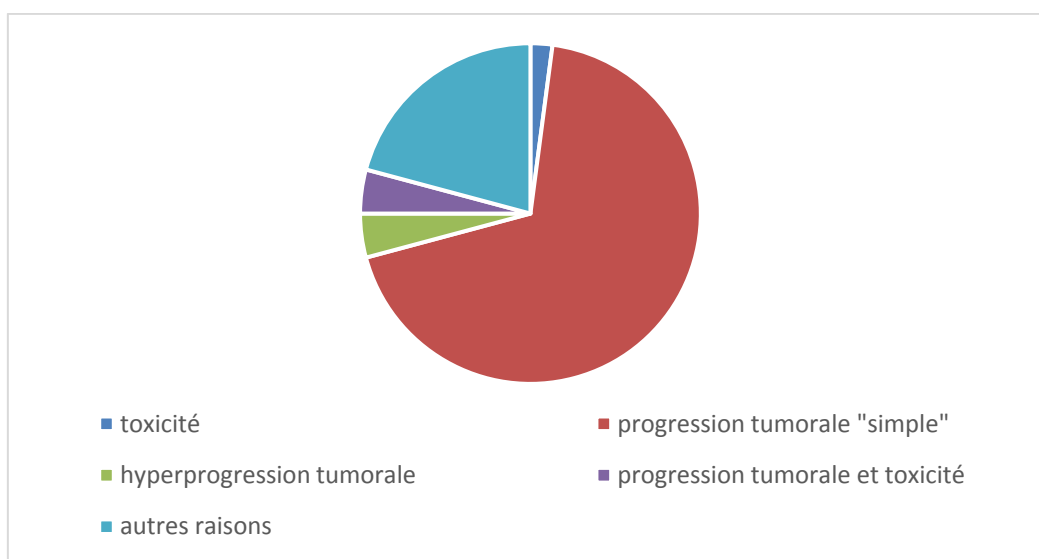
Légende : IT, immunothérapie par pembrolizumab ; ligne 1, IT en 1<sup>re</sup> ligne ; ligne 2, IT en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus ;

Tableau I : caractéristiques cliniques des patients

Concernant l'arrêt du pembrolizumab, 48 patients (87%) n'étaient plus sous pembrolizumab à la fin du suivi et sept patients (13%) étaient toujours sous pembrolizumab.

Les causes d'arrêt de l'immunothérapie étaient : toxicité (n=1, 2%), progression tumorale (n=37, 67%) ou autres raisons (AEG, souhait du patient ou événement intercurrent) (n=10, 18%) (**Figure 12**).

Le terme « progression tumorale » regroupe : progression tumorale « simple » (n=33), hyperprogression tumorale sous pembrolizumab (n=2), association progression tumorale et toxicité (n=2).



**Figure 12 : causes d'arrêt du pembrolizumab**

La réponse au pembrolizumab était non évaluable chez 11 patients (20%). Des événements intercurrents (altération de l'état général (AEG), toxicité ou décès brutal) sont survenus avant la réalisation du bilan d'évaluation.

La réponse au pembrolizumab était évaluable chez 44 patients.

Nous avons relevé la meilleure réponse au pembrolizumab, présentée sur l'ensemble de la ligne de traitement, chez tous les patients dont la réponse était évaluable, quel que soit le TPS PD-L1 et la ligne de traitement.

Trente-et-un patients (70.4%) étaient non répondeurs (maladie stable (n= 4, 7.3%) ou progression tumorale (n=27, 49.1%)).

**Treize patients étaient répondeurs (29.6%).**

**Ils présentaient tous une réponse partielle.**

**La durée médiane de réponse était de 455 jours (63-700).**

Parmi les 55 patients inclus, à la fin du suivi, 46 avaient présenté un événement : décès (n=28, 51%) ou progression tumorale sous pembrolizumab.

La durée médiane de suivi était de 324 jours (1-763).

La durée médiane de la survie sans progression était de 63 jours (1-406).

La durée médiane de la survie globale était de 116,5 jours (1-573).

## **Données anatomopathologiques**

### **Type de prélèvements**

Parmi les 55 prélèvements inclus, les biopsies constituaient le mode de prélèvement le plus fréquent (n=31, 56.4%), suivies des pièces opératoires (n=13, 23.6%), puis des ponctions à l'aiguille sous échographie bronchique (EBUS) (n=11, 20%).

La catégorie des biopsies intéressait soit :

- La tumeur primitive (n=18) : biopsies bronchiques
- Une métastase (n=13) : biopsies pleurales (n=6), péricardiques (n=1), gastriques (n=2), cutanées (n=1) ou de biopsies ganglionnaires (n=3)

La catégorie des pièces opératoires comportait :

- La tumeur primitive (n=6) : lobectomies (n=3) ou résections de type wedge (n=3)
- Une métastase (n=7) : métastase osseuse (n=1), cérébrale (n=2), pleurale (n=1) ou métastase ganglionnaire (n=3)

La catégorie des ponctions sous EBUS intéressait soit :

- La tumeur primitive (n=2)
- Une métastase ganglionnaire médiastinale (n=9)



Parmi les ponctions sous EBUS, sept prélèvements comportaient des microbiopsies tumorales et quatre prélèvements étaient purement cytologiques.

Au total, parmi les 55 prélèvements inclus dans l'analyse statistique, 26 prélèvements (47.3%) intéressaient la tumeur primitive et 29 prélèvements (52.7%) intéressaient une métastase.

Les données sont présentées dans le **Tableau II**.

Type de prélèvements	Population globale n=55	Selon la ligne de traitement		Selon le TPS PD-L1	
		Ligne 1 n=29	Ligne 2 n=26	TPS < 50% n=22	TPS ≥ 50% n=33
Ponction sous EBUS n (%)	11 (20)	9 (31)	2 (7.7)	2 (9.1)	9 (27.3)
Biopsie n (%)	31 (56.4)	17 (58.6)	14 (53.8)	14 (63.6)	17 (51.5)
Pièce opératoire n (%)	13 (23.6)	3 (10.4)	10 (38.5)	6 (27.3)	7 (21.2)

Légende : ligne 1, pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne ; ligne 2, pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus

Tableau II : répartition des types de prélèvement

I

## Type histologique

Parmi les 55 prélèvements inclus pour analyse statistique, les types histologiques les plus fréquents étaient l'adénocarcinome (n=37, 67.2%) et le carcinome épidermoïde (n=10, 18.2%).

Les autres types histologiques étaient : le carcinome à grandes cellules (n=3, 5.5%), le carcinome à contingent sarcomatoïde (n=2, 3.6%) ou d'autres types histologiques (n=3, 5.5%).

Les carcinomes à contingent sarcomatoïde regroupaient un carcinome sarcomatoïde pléomorphe avec contingent adénocarcinomateux et un adénocarcinome avec contingent sarcomatoïde.

La catégorie « autre » comportait un carcinome non à petites cellules, un carcinome peu différencié et un carcinome neuroendocrine à grandes cellules.

Les données sont présentées dans le **Tableau III**.

Type histologique	Population globale n=55	Selon la ligne de traitement		Selon le TPS PD-L1	
		Ligne 1 n=29	Ligne 2 n=26	TPS < 50% n=22	TPS ≥ 50% n=33
Adénocarcinome n (%)	37 (67.3)	23 (79.4)	14 (54)	10 (45.5)	27 (81.8)
Carcinome épidermoïde n (%)	10 (18.2)	1 (3.4)	9 (34.6)	9 (41)	1 (3)
Carcinome à grandes cellules, n (%)	3 (5.5)	2 (6.9)	1 (3.8)	1 (4.5)	2 (6.1)
Carcinome à contingent sarcomatoïde, n (%)	2 (3.6)	1 (3.4)	1 (3.8)	0 (0)	2 (6.1)
Autre, n (%)	3 (5.5)	2 (6.9)	1 (3.8)	2 (9)	1 (3)

Légende : ligne 1, pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne ; ligne 2, pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus

Tableau III : répartition des types histologiques

**A quelle étape de la séquence thérapeutique ont été réalisés les prélèvements ?**

Les prélèvements de tumeur ont été réalisés à différents moments de la séquence thérapeutique.

Parmi les 29 patients sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne, tous les prélèvements tumoraux ont été effectués au diagnostic de CPNPC avant tout traitement.

Parmi les 26 patients sous pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus, les prélèvements tumoraux ont été effectués à différents moments : soit au diagnostic de CPNPC et avant tout traitement (n=18, 69.2%) ; soit après au moins une cure de chimiothérapie et avant immunothérapie par pembrolizumab (n=8, 30.8%)

## Données moléculaires

Parmi les 55 prélèvements inclus pour analyse statistique, 26 présentaient une anomalie moléculaire. Les mutations *KRAS* étaient les plus fréquentes (n=17, 31%), suivies des mutations *TP53* (n=14, 25.5%). La catégorie « autre » regroupait les anomalies des gènes *HER2*, *PIK3CA* ou *MAP2K1*.

Les données sont présentées dans le **Tableau IV**.

Anomalie moléculaire	Population globale n=55	Selon la ligne de traitement		Selon le TPS PD-L1	
		Ligne 1 n=29	Ligne 2 n=26	TPS <50% n=22	TPS ≥50% n=33
Présence d'une mutation ou d'un réarrangement, n (%)	25 (63.4)	16 (55)	10 (38.5)	7 (31.8)	19 (57.6)
EGFR (mutation), n (%)	2 (3.6)	0	2 (7.7)	1 (4.5)	1 (3)
ALK (réarrangement), n (%)	2 (3.6)	0	2 (7.7)	0	2 (6)
ROS1 (réarrangement), n (%)	0 (0)	0	0	0	0
MET (amplification ou mutation), n (%)	3 (5.5)	1 (3.5)	2 (7.7)	1 (4.5)	2 (6)
BRAF (mutation), n (%)	3 (5.5)	3 (10.4)	0	0	3 (9)
KRAS (mutation), n (%)	17 (31)	11 (37.9)	6 (23)	5 (22.7)	12 (36.4)
TP53, n (%)	14 (25.5)	9 (31)	5 (19.2)	4 (18.2)	10 (30.3)
Autre, n (%)	3 (5.5)	3 (10.4)	0	0	3 (9)

Légende : ligne 1, pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne ; ligne 2, pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus

Tableau IV : fréquence des anomalies génétiques

## **Lien entre l'expression de PD-L1 et l'évolution, toutes lignes de traitement confondues**

Les quatre paramètres évolutifs étudiés étaient la SSP, la SG, la réponse au pembrolizumab et la durée de cette réponse.

L'expression de PD-L1 était évaluée par le TPS PD-L1.

### **Expression immunohistochimique de PD-L1**

Les critères qualité de la technique immunohistochimique étaient respectés pour 52 cas (95%). Ils n'étaient pas respectés pour trois cas (5%) : pour deux cas, il n'y avait pas de témoin interne (biopsie gastrique et biopsie bronchique) et un cas comportait un nombre insuffisant de cellules tumorales (<100). Nous avons tout de même inclus ces trois cas dans l'analyse statistique globale.

**Concernant le TPS PD-L1, la médiane était à 80% (0-100) et la moyenne à 58.7% ( $\pm 41.6$ ).**

**22 prélèvements (40%) avaient un TPS PD- L1 < 50%.**

**33 prélèvements (60%) avaient un TPS PD- L1  $\geq$  50%.**



Le résultat du TPS PD-L1, réévalué à l'occasion de l'étude, était concordant avec le résultat initial dans 89% des cas (n=49).

Il était discordant dans 11% des cas (n=6). Ces discordances correspondaient soit à un problème technique (n=2), soit à une mauvaise interprétation non explicable (n=2), soit à une mauvaise interprétation liée à un nombre important de cellules immunitaires marquées (n=1) ou à un marquage hétérogène des cellules tumorales (n=1).

Le TPS PD-L1 des 6 cas discordants avait été initialement surestimé.

Nous avons considéré que les résultats étaient discordants lorsque la catégorie changeait pour un seuil à 50% (TPS PD-L1 < 50 % *versus* TPS PD-L1 ≥ 50%).

Le TPS PD-L1 des patients, sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement, variait de 60% à 100%. La relecture du TPS montrait un résultat discordant dans deux cas (pour le 1<sup>er</sup> cas, le TPS PD-L1 initialement évalué à 100% a été réévalué à 5% ; pour le 2<sup>ème</sup> cas, le TPS PD-L1 initialement évalué à 80% a été réévalué à 40%).

Le TPS PD-L1 des patients, sous pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement et plus, variait de 1 à 100%. La relecture du TPS montrait un résultat discordant dans quatre cas (pour le 1<sup>er</sup> cas, le TPS PD-L1 initialement évalué à 100% a été réévalué à 5% ; pour le 2<sup>ème</sup> cas, le TPS PD-L1 passait de 80% à 30% après relecture ; pour le 3<sup>ème</sup> cas, il passait de 60% à 20% et pour le 4<sup>ème</sup> cas de 55% à 10%).

Pour 49 patients (89%), le prélèvement utilisé pour l'étude était le prélèvement initial, sur lequel le TPS PD-L1 à visée thérapeutique avait été réalisé. Pour six patients (11%), le prélèvement initial était épuisé, nous en avons utilisé un autre.

### **Réponse au pembrolizumab selon le TPS PD-L1**

Nous avons comparé la réponse au pembrolizumab (répondeur si réponse complète ou partielle ; non répondeur si maladie stable ou progression tumorale) et le TPS PD-L1 réparti en deux groupes (TPS PD-L1 < 50 % *versus* TPS PD-L1  $\geq$  50%).

Pour l'analyse statistique, nous avons uniquement considéré les 44 patients chez qui la réponse était évaluable.

Parmi les 13 patients répondeurs, trois (23%) avaient un TPS PD-L1 < 50% et 10 (77%) un TPS PD-L1  $\geq$  50%. Parmi les 31 patients non répondeurs, 17 (55%) avaient un TPS PD-L1 < 50% et 14 (45%) un TPS PD-L1  $\geq$  50%.

Vingt patients avaient un TPS PD-L1 < 50%, dont trois patients (15%) répondeurs et 17 patients (85%) non répondeurs.

Vingt-quatre patients avaient un TPS PD-L1  $\geq$  50%, dont 10 patients (41.7%) répondeurs et 14 patients (58.3%) non répondeurs.

**L'analyse statistique était à la limite de la significativité (p=0.05).**

Nous avons ensuite étudié la réponse au pembrolizumab en fonction du TPS PD-L1 exprimé en valeur continue par incrément de 10%. **Chez les patients répondeurs, le TPS PD-L1 médian était de 100% (5-100).** Plus de la moitié des patients répondeurs avaient un TPS PD-L1 de 100%. **Chez les patients non répondeurs, le TPS PD-L1 médian était de 20% (0-100).**

**La différence entre les deux groupes était statistiquement significative (p=0.009).**

#### **Durée de réponse au pembrolizumab selon le TPS PD-L1**

Dix patients répondeurs avaient un TPS PD-L1  $\geq 50\%$ . La durée médiane de réponse à l'immunothérapie par pembrolizumab était de 480 jours (63-610).

Trois patients répondeurs avaient un TPS PD-L1  $< 50\%$ . Les durées de réponse étaient de 89, 440 et 700 jours.

En raison des petits effectifs, nous n'avons pas effectué d'analyse statistique.

#### **Survie selon le TPS PD-L1**

Nous avons établi les courbes de survie (SSP et SG) des patients répartis en deux groupes selon leur TPS PD-L1 (TPS PD-L1  $< 50\%$  *versus*  $\geq 50\%$ ) **(Figures 13 et 14).**

La survie à long terme semblait meilleure chez les patients ayant un TPS PD-L1  $\geq 50\%$ . Cependant, la différence entre les deux groupes n'était pas statistiquement significative (SSP :  $p=0.4$  ; SG :  $p=0.8$ ).

Quelle que soit la ligne de traitement, la SSP médiane était de 69 jours (62-132) pour les patients ayant un TPS PD-L1  $\geq 50\%$  et de 66.5 jours (59-166) pour un TPS PD-L1  $< 50\%$ . Le taux de SSP à 6 mois était respectivement de 41% et 23%.

La SG médiane était de 461 jours (171-x) pour les patients ayant un TPS PD-L1  $\geq 50\%$  et de 573 jours (117-x) pour un TPS PD-L1  $< 50\%$ , quelle que soit la ligne de traitement. Le taux de SG à 6 mois était respectivement de 85% et 59%.

L'analyse a également été réalisée en distinguant deux périodes de suivi : une première période (de 0 à 90 jours après début du traitement par pembrolizumab) et une deuxième période (de 90 jours à la fin du suivi). La différence en termes de survie, entre les deux groupes, n'était pas statistiquement significative, quelle que soit la période considérée.

Les données statistiques pour la SSP, montrent que, pendant la période initiale, les patients ayant un TPS PD-L1  $\geq 50\%$  avaient un hazard ratio (HR [IC95%]) de présenter un évènement de 0.98 [0.48-1.98] ( $p=0.9$ ) par rapport aux patients ayant un TPS PD-L1  $< 50\%$ . Dans la 2<sup>ème</sup> période, l'HR était à 0.46 [0.16-1.33] ( $p=0.15$ ).

Concernant la SG, pendant la période initiale, les patients ayant un TPS PD-L1  $\geq 50\%$  avaient un hazard ratio de présenter un évènement de 2.75 [0.58-12.94] (p=0.2) par rapport aux patients ayant un TPS PD-L1  $< 50\%$ . Dans la 2<sup>ème</sup> période, l'HR était à 0.53 [0.21-1.35] (p=0.18).

L'étude de la survie, selon le TPS PD-L1 exprimé en valeur continue, n'était pas statistiquement significative. Les données statistiques étaient : pour la SSP, HR = 0.96 [0.89-1.03] (p=0.2) par incrément de 10% ; pour la SG, HR = 0.97 [0.89-1.06] (p=0.4).par incrément de 10%.

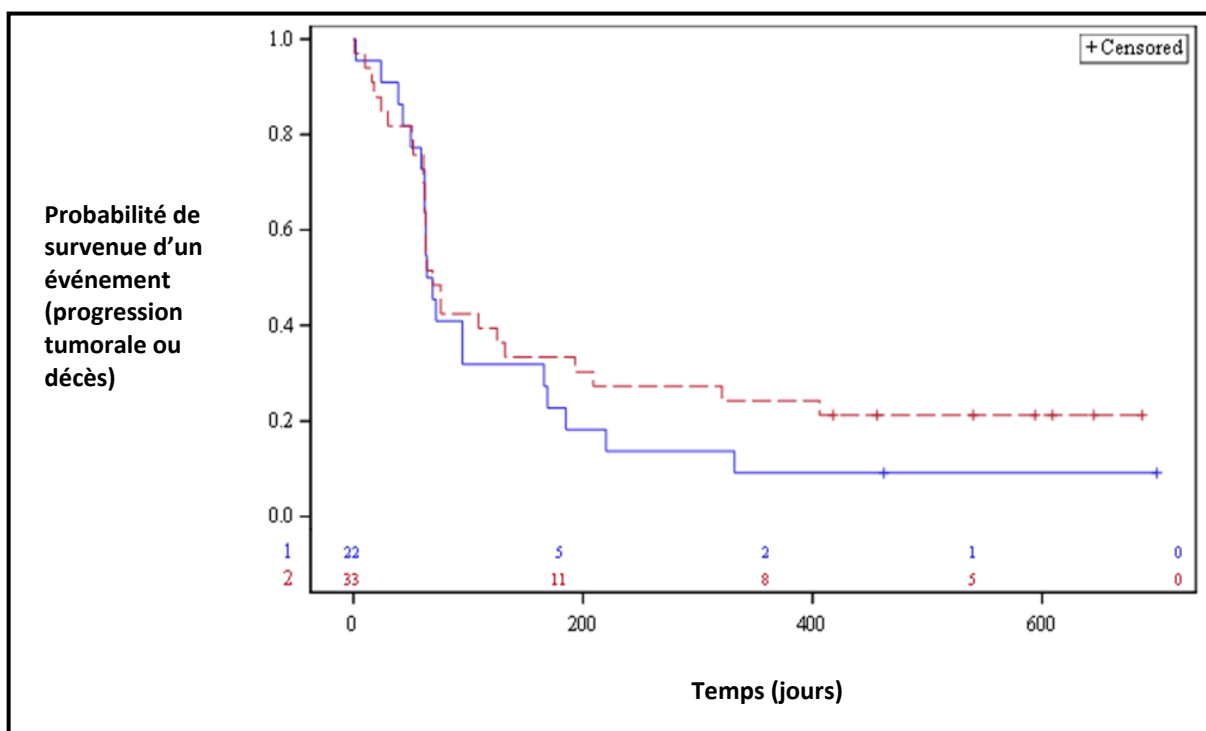


Figure 13 : SSP : en rouge, TPS PD-L1  $\geq$  50% ; en bleu, TPS PD-L1 < 50%.

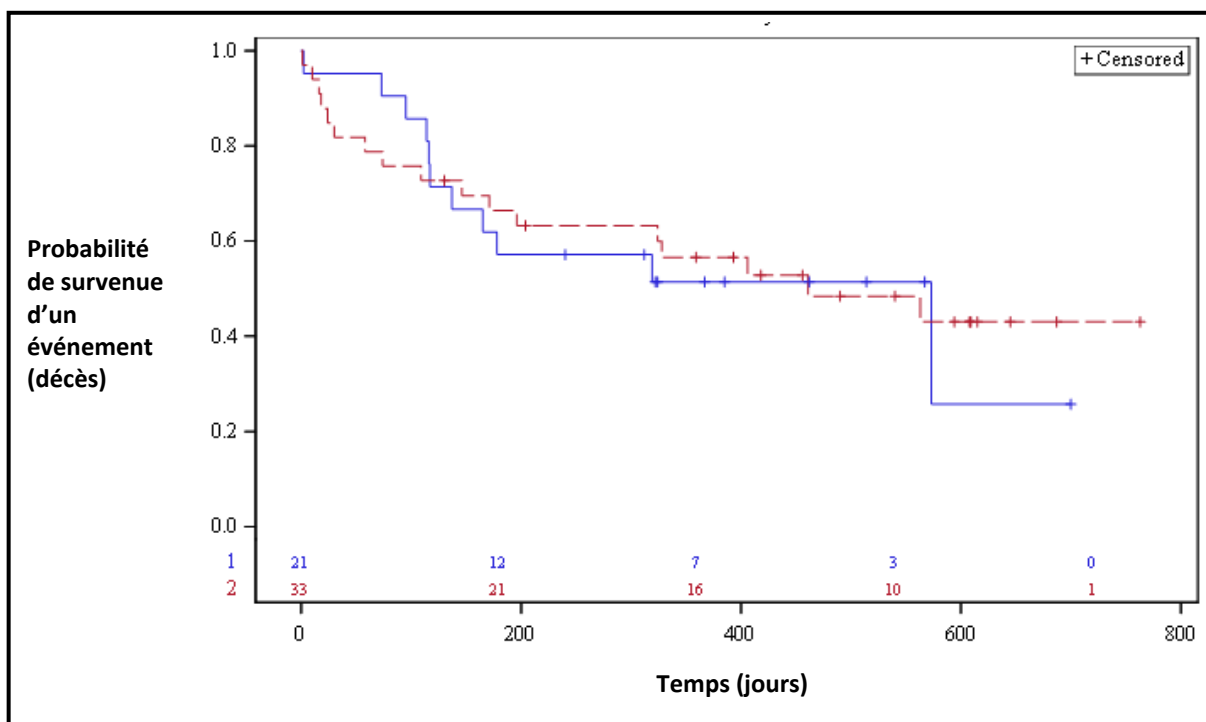


Figure 14 : SG : en rouge, TPS PD-L1  $\geq$  50% ; en bleu, TPS PD-L1 < 50%.

## **Lien entre la ligne de traitement et l'évolution**

### **Caractéristiques des patients selon la ligne de traitement**

Nous avons réparti les patients en deux groupes : les patients traités par pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne *versus* ceux traités par pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus.

Le pembrolizumab était prescrit en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement chez 29 patients. Après relecture, parmi ces 29 patients, 27 présentaient un TPS PD-L1  $\geq$  50%.

Par ailleurs, le pembrolizumab était prescrit en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus chez 26 patients. Parmi eux, 25 patients avaient reçu une chimiothérapie, ou une radiochimiothérapie, avant l'immunothérapie par pembrolizumab. Parmi ces 25 patients, chez 23 patients, la chimiothérapie ou la radiochimiothérapie, était prescrite en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement.

### **Réponse au pembrolizumab selon la ligne de traitement**

Nous avons comparé la réponse au pembrolizumab (patient répondeur *versus* non répondeur) et la place du pembrolizumab dans la stratégie thérapeutique (1<sup>ère</sup> ligne *versus* 2<sup>ème</sup> ligne ou plus).

Pour l'analyse statistique, nous avons considéré uniquement les patients dont la réponse au pembrolizumab était évaluable.

Parmi les 13 patients répondeurs, 11 (84.6%) étaient traités par pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne et deux (15.4%) en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus. Parmi les 31 patients non répondeurs, 10 (32.3%) étaient traités par pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne et 21 (67.7%) en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus.

Vingt et un patients étaient traités par pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne, dont 11 patients (52.4%) répondeurs et 10 patients (47.6%) non répondeurs.

Vingt-trois patients étaient traités par pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus, dont deux patients (8.7%) répondeurs et 21 patients (91.3%) non répondeurs.

**La différence était statistiquement significative ( $p=0.001$ ).**

**Le taux de réponse au pembrolizumab était meilleur lorsque les patients bénéficiaient du pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement (52.4%) par rapport aux patients sous pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus (8.7%).**

Dix-neuf patients étaient sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement et avaient un TPS PD-L1  $\geq 50\%$ , dont neuf patients (47.4%) répondeurs et 10 patients (52.6%) non répondeurs.

Cinq patients étaient sous pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus et avaient un TPS PD-L1  $\geq 50\%$ , dont un patient (20%) répondeur et quatre patients (80%) non répondeurs.



## Durée de réponse au pembrolizumab selon la ligne de traitement

Onze patients répondeurs étaient traités par pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne. La durée médiane de réponse était de 504 jours (63-700).

Deux patients répondeurs étaient traités par pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus. Les durées de réponse étaient de 89 et 123 jours.

En raison des petits effectifs, nous n'avons pas effectué d'analyse statistique

.

## Survie selon la ligne de traitement

Nous avons établi les courbes de survie (SSP et SG) des patients répartis en deux groupes (pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement *versus* en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus) (**Figures 15 et 16**).

Initialement, la survie semblait meilleure chez les patients sous pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus. Puis vers 90 jours, les courbes se croisaient. A long terme, la survie semblait meilleure chez les patients sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement. La différence n'était pas statistiquement significative entre les deux groupes (SSP :  $p=0.06$  ; SG :  $p=0.26$ ).

Quel que soit le TPS PD-L1, la SSP médiane était de 76 jours (61-321) pour les patients sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement et de 63.5 jours (62-95) pour les patients sous pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus. Le taux de SSP à 6 mois était respectivement de 33% et 19%.

Nous ne disposons pas des SG médianes. Le taux de SG à 6 mois était de 70% pour les patients sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement, et de 54% sous pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus, quel que soit le TPS PD-L1.

L'analyse a également été réalisée en distinguant deux périodes de suivi.

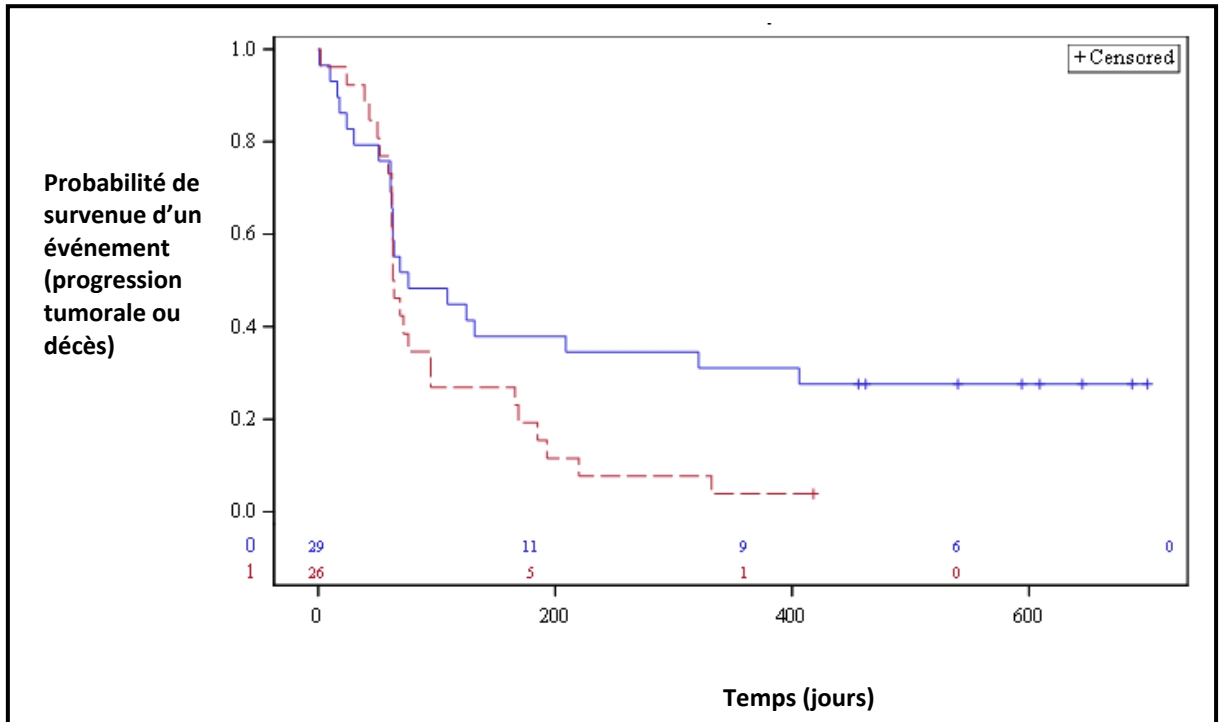
Dans la 1<sup>ère</sup> période (de 0 à 90 jours après début du pembrolizumab), la différence n'était pas statistiquement significative.

Les données statistiques pour la SSP montrent que pendant la période initiale, les patients sous pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus, avaient un HR à 1.29 [0.65-2.60] (p=0.47) par rapport aux patients sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne. Pour la SG, l'HR est à 0.46 [0.12-1.77] (p=0.26).

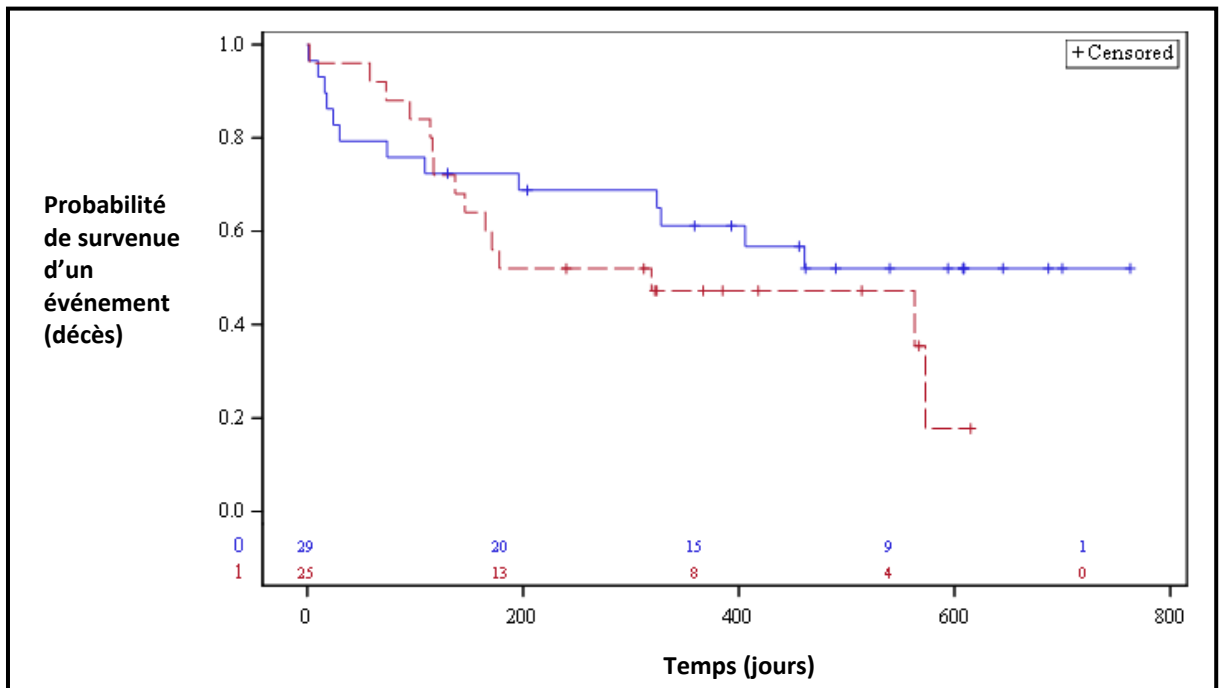
Dans la 2<sup>ème</sup> période (de 90 jours à la fin du suivi), la différence était statistiquement significative.

Dans cette 2<sup>ème</sup> période, pour la SSP, les patients sous pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus avaient un HR à 3.5 [1.2-10.5] (p=0.02) par rapport aux patients sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne. Pour la SG, l'HR était à 3.1 [1.14-8.39] (p=0.03).

**La survie (survie sans progression et survie globale) à long terme, des patients sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement, était significativement meilleure que celle des patients ayant bénéficié du pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus.**



**Figure 15** : SSP : en bleu, pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement ; en rouge : pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus



**Figure 16** : SG : en bleu, pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement ; en rouge, pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus

## **Lien entre l'expression de CD8 et l'évolution**

### **Expression immunohistochimique de CD8**

Dix-neuf prélèvements (34.5%) comportaient peu ou pas de lymphocytes marqués avec l'AC anti-CD8 (LT CD8+). Vingt-huit prélèvements (50.9%) en comportaient de nombreux. Huit prélèvements (14.5%) n'étaient pas interprétables.

### **Réponse au pembrolizumab selon la densité en LT CD8+**

Nous avons comparé la réponse au pembrolizumab et la densité en LT CD8+ (prélèvement tumoral riche en LT CD8+ *versus* pauvre en LT CD8+).

Parmi les 11 patients répondeurs, deux (18.2%) avaient un prélèvement pauvre en LT CD8+ et neuf (81.8%) riche en LT CD8+. Parmi les 26 patients non répondeurs, 11 (42.3%) avaient un prélèvement pauvre en LT CD8+ et 15 (57.7%) riche en LT CD8+.

Treize prélèvements étaient pauvres en LT CD8+, dont deux patients (15.4%) répondeurs et 11 patients (84.6%) non répondeurs. Vingt-quatre prélèvements étaient riches en LT CD8+, dont neuf patients (37.5%) répondeurs et 15 patients (62.5%) non répondeurs.

La différence n'était pas statistiquement significative ( $p=0.26$ ).

### **Durée de réponse au pembrolizumab selon la densité en LT CD8+**

Deux patients répondeurs avaient un prélèvement pauvre en LT CD8+. Les durées de réponse à l'immunothérapie par pembrolizumab étaient de 540 et de 594 jours.

Neuf patients répondeurs avaient un prélèvement riche en LT CD8+. La durée médiane de réponse était de 455 jours (89-700).

En raison des petits effectifs, nous n'avons pas effectué d'analyse statistique.

### **Survie selon la densité en LT CD8+**

Nous avons établi les courbes de survie des patients ayant un prélèvement tumoral riche en LT CD8+ *versus* pauvre en LT CD8+ (**Figures 17 et 18**).

Initialement les courbes se superposaient. A long terme, la survie semblait être meilleure pour les patients ayant un prélèvement tumoral riche en LT CD8+. Cependant, la différence n'était pas statistiquement significative (SSP :  $p=0.36$  ; SG :  $p=0.08$ ).

L'analyse, distinguant deux périodes de suivi, a également été réalisée.

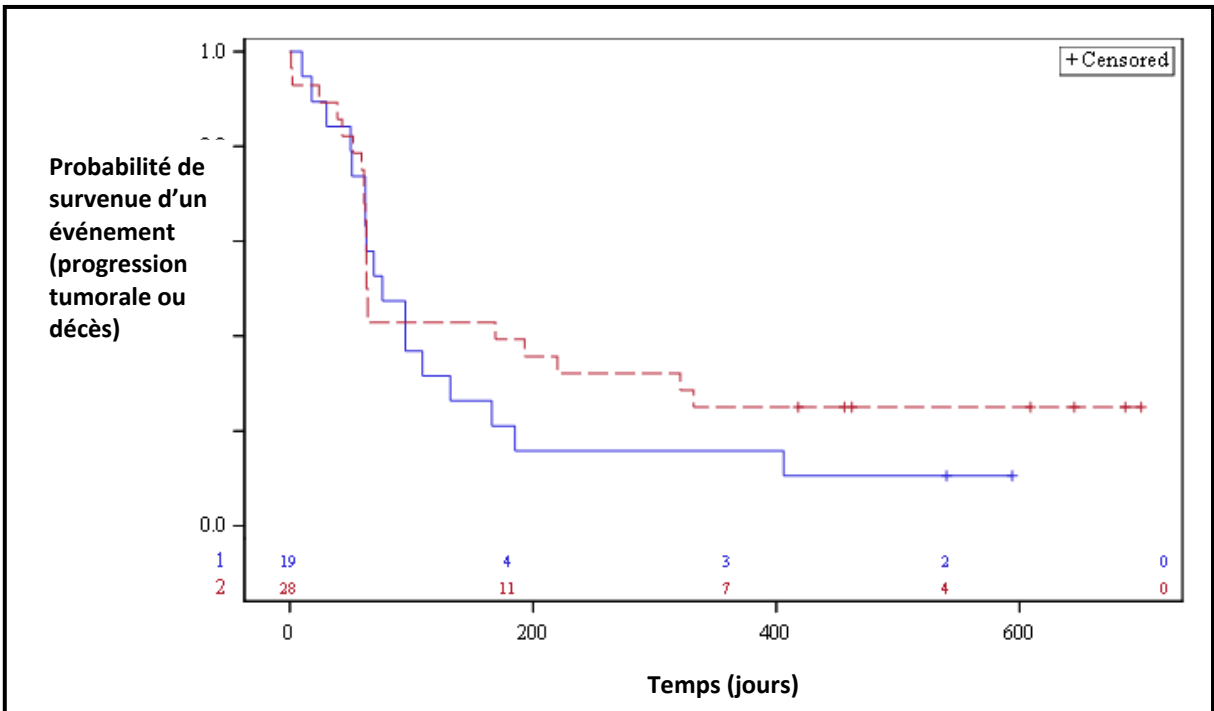
Dans la 1<sup>ère</sup> période (de 0 à 90 jours après le début du pembrolizumab), la

différence n'était pas statistiquement significative. Pour la SSP, les patients ayant un prélèvement tumoral riche en LT CD8+ avaient un HR à 1.2 [0.51-2.47] (p=0.78), par rapport aux patients ayant un prélèvement tumoral pauvre en LT CD8+. Pour la SG, l'HR était à 0.80 [0.22-2.99] (p=0.74).

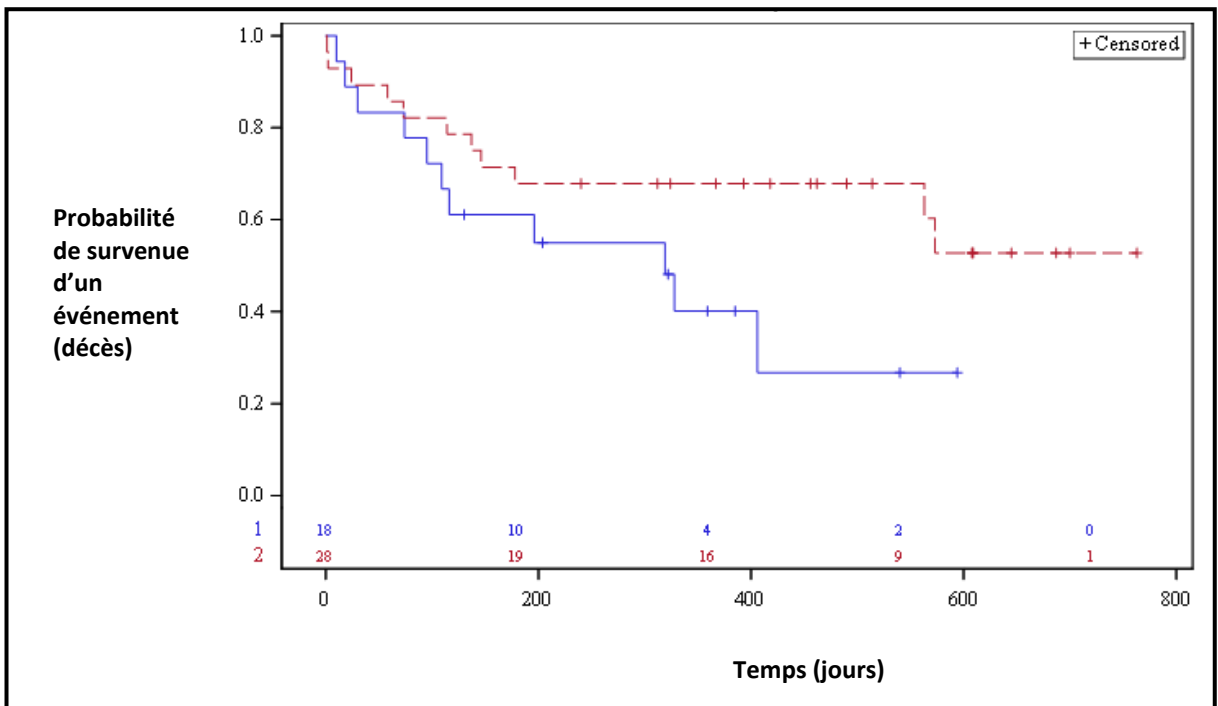
Dans la 2<sup>ème</sup> période (de 90 jours à la fin du suivi), la différence était statistiquement significative.

Pour la SSP, les patients ayant un prélèvement riche en LT CD8+ avaient un HR de 0.3 [0.09-0.96] (p=0.04) par rapport à ceux dont le prélèvement était pauvre en LT CD8+. Pour la SG, l'HR était à 0.32 [0.11-1.00] (p=0.05).

**Les patients dont la tumeur était riche en LT CD8+ avaient une survie sans progression significativement plus longue que les patients dont le prélèvement contenait peu ou pas de LT CD8+. Concernant la survie globale, la différence était à la limite de la significativité.**



**Figure 17 :** SSP : en rouge, prélèvement riche en LT CD8+ ; en bleu, prélèvement pauvre en LT CD8+.



**Figure 18 :** SG : en rouge, prélèvement riche en LT CD8+ ; en bleu, prélèvement pauvre en LT CD8+.

## Topographie du marquage

Nous avons distingué les LT CD8+ situés dans le stroma tumoral, ceux mêlés aux cellules tumorales et ceux situés au front d'invasion tumoral.

Nous décrivons les données recueillies. Nous n'avons pas effectué d'analyse statistique, sauf lorsque cela est précisé.

Concernant les LT CD8+ situés dans le **stroma tumoral** :

Parmi les 55 prélèvements, huit (14.5%) étaient non interprétables, 28 (50.9%) comportaient de nombreux LT CD8+ dans le stroma tumoral et 19 (34.5%) en comportaient peu ou pas.

Les courbes de survie se superposaient à celles décrites précédemment : la survie semblait meilleure pour les patients ayant un stroma tumoral riche en LT CD8+ par rapport aux patients ayant un stroma tumoral pauvre en LT CD8+. Les courbes de survie sont disponibles en annexe (**Annexe 4**).

Parmi les 11 patients répondeurs, neuf (81.8%) avaient un stroma tumoral riche en LT CD8+ et deux (18.2%) pauvre en LT CD8+.

Parmi les 26 patients non répondeurs, 15 (57.7%) avaient un stroma tumoral riche en LT CD8+ et 11 (42.31%) pauvre en LT CD8+.

Treize prélèvements avaient un stroma tumoral pauvre en LT CD8+, dont deux patients (15.4%) répondeurs et onze patients (84.6%) non répondeurs.

Vingt-quatre prélèvements avaient un stroma tumoral riche en LT CD8+, dont neuf patients (37.5%) répondeurs et quinze patients (62.5%) non répondeurs.



La différence n'était pas statistiquement significative ( $p=0.3$ ).

Concernant les LT CD8+ situés au **front d'invasion tumoral** :

Parmi les 55 prélèvements, 42 (76.4%) étaient non interprétables, quatre (7.3%) comportaient de nombreux LT CD8+ au front d'invasion tumoral et neuf (16.4%) en comportaient peu.

A propos de la survie (SSP et SG), les courbes suggéraient que la survie était meilleure chez les patients ayant de nombreux LT CD8+ au front d'invasion tumoral par rapport à ceux en ayant peu ou pas. Les courbes de survie sont disponibles en annexe (**Annexe 4**).

Parmi les deux patients répondeurs, un avait de nombreux LT CD8+ au front d'invasion tumoral et un autre en avait peu.

Parmi les sept patients non répondeurs, cinq (71.4%) avaient peu de LT CD8+ au front d'invasion et deux (28.6%) en avaient de nombreux.

Six prélèvements comportaient peu de LT CD8+ au front d'invasion, dont un patient (16.7%) répondeur et cinq patients (83.3%) non répondeurs.

Trois prélèvements comportaient de nombreux LT CD8+ au front d'invasion, dont un patient (33.3%) répondeur et deux patients (66.4%) non répondeurs.

La différence n'était pas statistiquement significative ( $p=1$ ).

Concernant les LT CD8+ **mêlés aux cellules tumorales** :

Parmi les 55 prélèvements, huit (14.5%) étaient non interprétables, 13 (23.6%) comportaient de nombreux LT CD8+ mêlés aux cellules tumorales et 34 (61.8%) en comportaient peu ou pas.

Les courbes de survie se confondaient. La survie semblait similaire dans les deux groupes (nombreux LT CD8+ mêlés aux cellules tumorales *versus* rares).

Les courbes de survie sont disponibles en annexe (**Annexe 4**).

Parmi les 11 patients répondeurs, cinq (45.5%) avaient de nombreux LT CD8+ mêlés aux cellules tumorales et six (54.5%) peu ou pas.

Parmi les 26 patients non répondeurs, sept (27%) avaient de nombreux LT CD8+ mêlés aux cellules tumorales et 19 (73%) peu ou pas.

Vingt-cinq prélèvements comportaient de rares LT CD8+ mêlés aux cellules tumorales, dont six patients (24%) répondeurs et 19 patients (76%) non répondeurs.

Douze prélèvements comportaient de nombreux LT CD8+ mêlés aux cellules tumorales, dont cinq patients (41.7%) répondeurs et sept patients (58.3%) non répondeurs.

La différence n'était pas statistiquement significative ( $p=0.47$ ).

## **Lien entre l'expression de CD39 et l'évolution**

### **Expression immunohistochimique de CD39**

Parmi les 55 prélèvements inclus : neuf (16.4%) étaient non interprétables, 16 prélèvements (29.1%) comportaient de rares cellules marquées avec l'AC anti-CD39 (cellules CD39+) et 30 prélèvements (54.5%) en comportaient de nombreuses.

La technique a été réalisée en deux séries. Nous nous sommes intéressés aux résultats des deux séries car l'AC anti-CD39 est un AC instable, mis au point pour l'étude, et dont nous n'avons pas l'habitude. Nous avons voulu vérifier que les résultats entre les deux séries étaient comparables : la différence d'expression de CD39 entre les deux séries n'était pas statistiquement significative ( $p=0.07$ ).

### **Réponse au pembrolizumab selon la densité en cellules CD39+**

Nous avons comparé la réponse au pembrolizumab et la densité en cellules CD39+ (prélèvement tumoral riche en cellules CD39+ *versus* pauvre en cellules CD39+).

Parmi les 10 patients répondeurs, 3 (30%) avaient de rares cellules CD39+ et 7 (70%) de nombreuses. Parmi les 27 patients non répondeurs, 10 (37%) avaient de rares cellules CD39+ et 17 (63%) de nombreuses.

Treize prélèvements étaient pauvres en cellules CD39+, dont dix patients (76.9%) non répondeurs et trois patients (23.1%) répondeurs. Vingt-quatre prélèvements comportaient de nombreuses cellules CD39+, dont 17 patients (70.8%) non répondeurs et sept patients (29.2%) répondeurs.

La différence n'était pas statistiquement significative ( $p=1$ ).

#### **Durée de réponse au pembrolizumab selon la densité en cellules CD39+**

Trois patients répondeurs avaient un prélèvement pauvre en cellules CD39+. Les durées de réponse étaient de 123, 455 et 610 jours.

Sept patients répondeurs avaient un prélèvement riche en cellules CD39+. La durée médiane de réponse était de 504 jours (89-700).

En raison des petits effectifs, nous n'avons pas effectué d'analyse statistique.

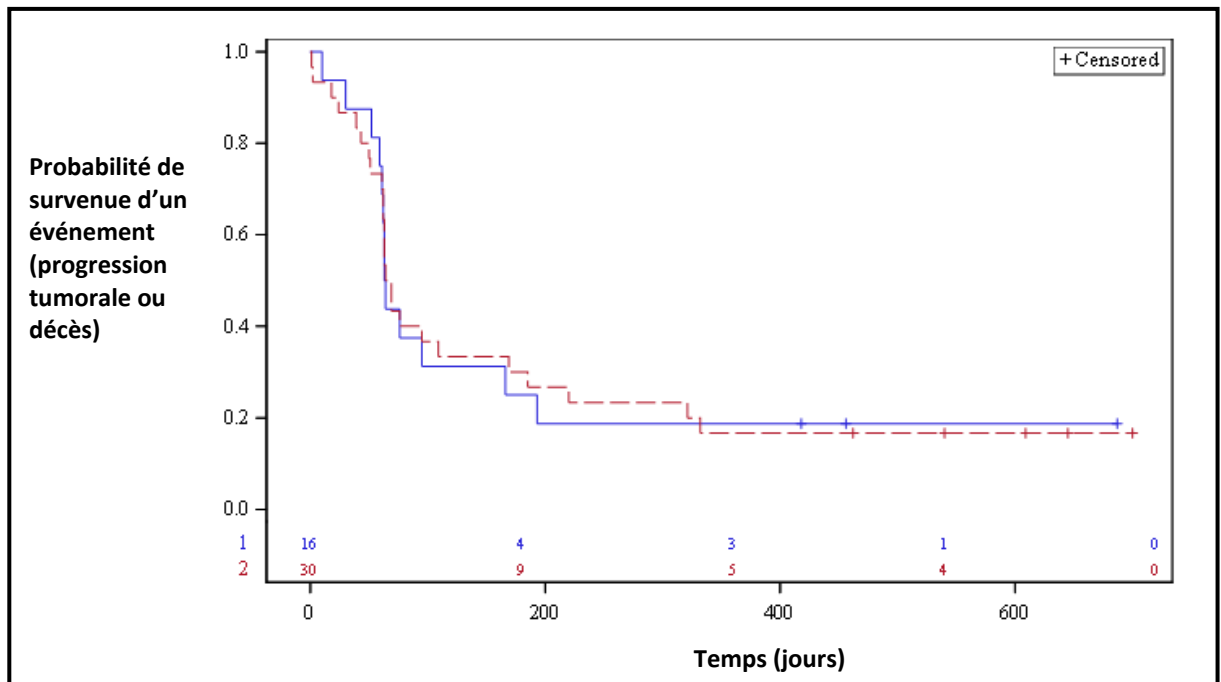
#### **Survie selon la densité en cellules CD39+**

Nous avons établi les courbes de survie (SSP et SG) des patients dont le prélèvement tumoral comportait de nombreuses cellules CD39+ *versus* de rares cellules CD39+ (**Figures 19 et 20**).

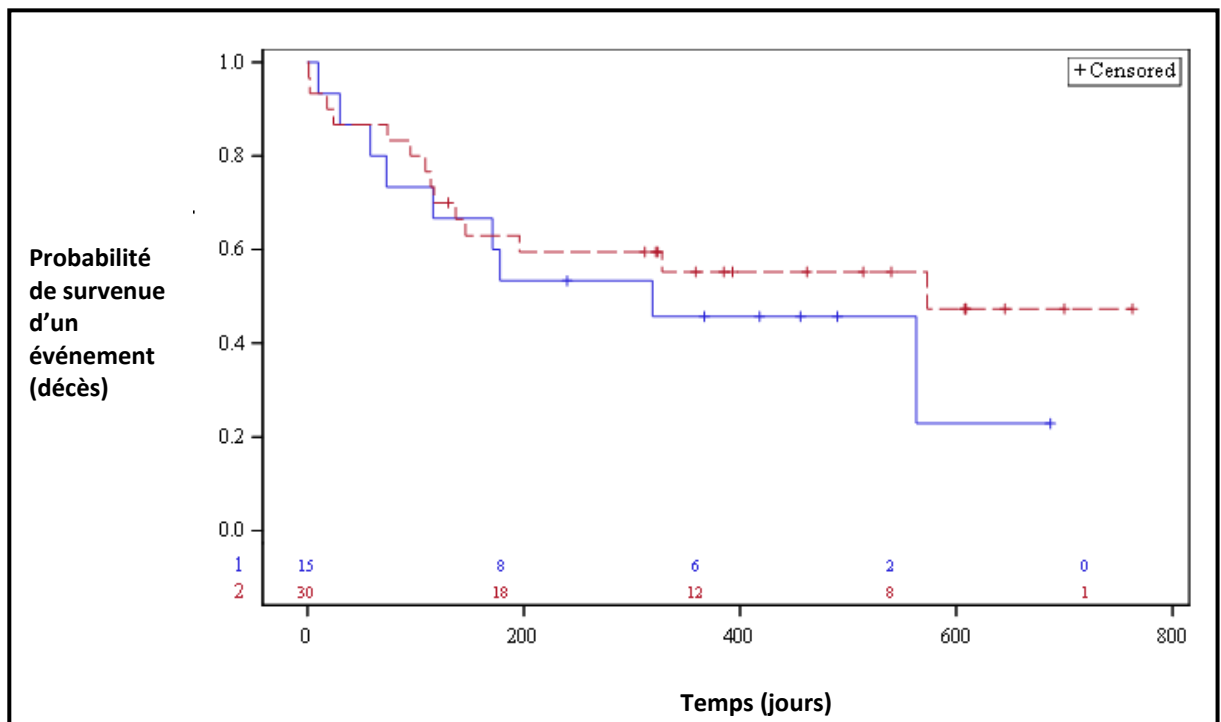
Les courbes se confondaient. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes (SSP :  $p=0.99$  ; SG :  $p=0.42$ ).

La SSP médiane des patients, dont le prélèvement comportait de nombreuses cellules CD39+, était de 66.5 jours (1-332). Elle était de 63.5 jours (10-193) lorsqu'il y avait peu ou pas de cellules CD39+. La différence n'était pas statistiquement significative ( $p=0.99$ ).

La SG médiane des patients, dont le prélèvement comportait de nombreuses cellules CD39+, était de 573 jours (1-573). Elle était de 319 jours (10-563) lorsqu'il y avait peu ou pas de cellules CD39+. La différence n'était pas statistiquement significative ( $p=0.42$ ).



**Figure 19 :** SSP : en rouge, nombreuses cellules CD39+ ; en bleu, rares cellules CD39+.



**Figure 20 :** SG : en rouge, nombreuses cellules CD39+ ; en bleu : rares cellules CD39+

## Topographie du marquage

Nous avons distingué les cellules CD39+ situées dans le stroma tumoral et celles mêlées aux cellules tumorales.

Nous avons évalué la présence d'un encorbellement, défini par la présence de cellules stromales intensément marquées, encerclant des regroupements de cellules tumorales bien délimités en périphérie.

Nous décrivons les données recueillies. Nous n'avons pas effectué d'analyse statistique, sauf lorsque cela est précisé.

Concernant les cellules CD39+ situées dans le **stroma tumoral** :

Parmi les 55 prélèvements, 11 (20%) étaient non interprétables, 24 (43.6%) comportaient de nombreuses cellules CD39+ dans le stroma tumoral et 20 (36.4%) en comportaient peu.

La survie était similaire à celle décrite précédemment. Il ne semblait pas y avoir de différence selon la densité en cellules CD39+ du stroma tumoral. Les courbes de survie sont disponibles en annexe (**Annexe 5**).

Parmi les 10 patients répondeurs, quatre (40%) avaient de rares cellules CD39+ dans le stroma tumoral et six (60%) de nombreuses.

Parmi les 25 patients non répondeurs, 13 (52%) avaient de rares cellules CD39+ dans le stroma tumoral et 12 (48%) de nombreuses.

Dix-sept prélèvements comportaient de rares cellules CD39+ dans le stroma tumoral, dont 13 patients (76.5%) non répondeurs et quatre patients (23.5%)

répondeurs.

Dix-huit prélèvements en comportaient de nombreuses, dont 12 patients (66.7%) non répondeurs et six patients (33.3%) répondeurs.

La différence n'était pas statistiquement significative ( $p=0.79$ ).

Concernant les cellules CD39+ **mêlées aux cellules tumorales** :

Parmi les 55 prélèvements, neuf (16.4%) étaient non interprétables, 25 (45.5%) comportaient de nombreuses cellules CD39+ mêlées aux cellules tumorales et 21 (38.2%) en comportaient peu.

A court terme, la survie (SSP et SG) semblait similaire dans les deux groupes (nombreuses cellules CD39+ mêlées aux cellules tumorales *versus* rares). A long terme, la survie semblait prolongée dans le groupe « nombreuses cellules CD39+ mêlées aux cellules tumorales ». Les courbes de survie sont disponibles en annexe (**Annexe 5**).

Parmi les 10 patients répondeurs, trois (30%) avaient de rares cellules CD39+ mêlées aux cellules tumorales, et sept (70%), de nombreuses.

Parmi les 27 patients non répondeurs, 14 (51.9%) avaient de rares cellules CD39+ mêlées aux cellules tumorales, et 13 (48.1%), de nombreuses.

Dix-sept prélèvements comportaient de rares cellules CD39+ mêlées aux cellules tumorales, dont 14 patients (82.4%) non répondeurs et trois patients (17.6%) répondeurs.

Vingt prélèvements en comportaient de nombreuses, dont 13 patients (65%) non répondeurs et sept patients (35%) répondeurs.

La différence n'était pas statistiquement significative ( $p=0.42$ ).



Concernant la présence d'un **encorbellement** :

Parmi les 55 prélèvements, 14 (25.5%) étaient non interprétables. L'encorbellement était présent sur 12 prélèvements (21.8%) et il était absent sur 29 prélèvements (52.7%).

Les courbes de survie (SSP et SG) suggéraient que l'encorbellement était un facteur protecteur associé à une survie prolongée. Les courbes de survie sont disponibles en annexe (**Annexe 5**).

**La SSP médiane des patients avec encorbellement était de 177 jours (43-332) versus 63 jours (1-321) chez les patients sans encorbellement.**

**La différence était statistiquement significative (p=0,03).**

La SG médiane des patients avec encorbellement était de 573 jours (95-573) versus 319 jours (2-563) chez les patients sans encorbellement (p=0,24).

Parmi les neuf patients répondeurs, trois (30%) ne présentaient pas d'encorbellement et six (70%) en avaient un.

Parmi les 24 patients non répondeurs, sept (29%) n'avaient pas d'encorbellement et 17 (71%) en avaient un

Dix prélèvements présentaient un encorbellement, dont trois patients (30%) répondeurs et sept patients (70%) non répondeurs.

Vingt-trois prélèvements ne présentaient pas d'encorbellement, dont six patients (26%) répondeurs et 17 patients (74%) non répondeurs.

La différence n'était pas statistiquement significative (p=0.8).

## **Comparaison de l'expression des trois marqueurs**

L'expression immunohistochimique de CD8 était indépendante de celle de PD-L1 et de CD39.

Lorsqu'on comparait l'expression de CD8 et de PD-L1, la différence n'était pas statistiquement significative ( $p = 0.08$ ).

De même, lorsqu'on comparait l'expression de CD8 et de CD39, la différence n'était pas statistiquement significative ( $p = 0.76$ ).

L'expression immunohistochimique de CD39 était également indépendante de celle de PD-L1.

Lorsqu'on comparait l'expression de CD39 et de PD-L1, la différence n'était pas statistiquement significative ( $p = 0.98$ ).

## **Description de séquence thérapeutique individuelle**

**Nombre de patients pour lesquels plusieurs prélèvements étaient disponibles : 14**

### **Impact du traitement reçu sur l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales**

Nous nous sommes intéressées à la dynamique de l'expression de PD-L1 au long de la séquence thérapeutique et notamment à l'impact de la chimiothérapie ou de l'immunothérapie sur le TPS PD-L1.

Une des limites de cette partie de l'étude est qu'elle a porté sur des prélèvements de nature différente (tumeur primitive ou métastase) ou de type différent (biopsie, prélèvement cytologique, pièce opératoire).

Après chimiothérapie, on observe une augmentation ou une stabilité du TPS PD-L1. En revanche on n'observe pas de diminution du TPS PD-L1.

Après immunothérapie, on observe une diminution du TPS PD-L1.

Les cas sont détaillés en annexe (**Annexe 6**).

## **Impact de la nature et du type de prélèvement sur le TPS PD-L1**

Nous avons comparé le TPS PD-L1 entre des prélèvements de nature différente (tumeur primitive et métastase) et entre différents types de prélèvement d'une même lésion (prélèvement cytologique, biopsie, pièce opératoire).

Premièrement, nous avons comparé le **TPS PD-L1 entre tumeur primitive et métastase**.

Les prélèvements étaient réalisés chez un même patient et au même moment dans sa séquence thérapeutique.

Nous disposions de cinq cas. Le résultat était concordant dans trois cas et il était discordant dans deux cas. Les résultats sont présentés en annexe (**Annexe 7**).

Deuxièmement, nous avons comparé le **TPS PD-L1 entre différents types de prélèvements d'une même lésion**.

Nous disposions d'un cas. Un ganglion jugulocarotidien métastatique a été prélevé de deux façons différentes (cytoponction à l'aiguille et biopsie chirurgicale). Le TPS PD-L1 était concordant : il était évalué à 100%.

Enfin, un dernier cas intéressant était constitué de plusieurs biopsies bronchiques, effectuées chez un même patient.

La première partie des biopsies intéressait un carcinome épidermoïde invasif et

le TPS PD-L1 était évalué à 80%. La deuxième partie des biopsies bronchiques intéressait un carcinome in situ et le TPS PD-L1 était évalué à 20%.

Le TPS PD-L1 variait entre la tumeur (carcinome épidermoïde) et la lésion tumorale pré invasive (carcinome in situ).



## DISCUSSION

### Caractéristiques de la cohorte

La majorité des patients était de sexe masculin et tabagique. L'âge médian au diagnostic était de 51 ans. Ces caractéristiques sont similaires aux données épidémiologiques du CPNPC dans la population générale (43).

Le principal type histologique par ordre de fréquence était l'adénocarcinome puis le carcinome épidermoïde comme dans la population générale (44).

Les patients étaient inclus selon les recommandations thérapeutiques en vigueur au moment de l'inclusion : pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne pour les patients avec TPS PD-L1  $\geq$  50% et pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus si TPS PD-L1  $\geq$  1% (45).

Tous bénéficiaient de l'immunothérapie par pembrolizumab à un stade avancé métastatique.

Aucun patient n'a bénéficié d'une combinaison immunothérapie et chimiothérapie.

## Expression de PD-L1

### **Hétérogénéité des marqueurs étudiés**

**La notion d'hétérogénéité intra-tumorale** interroge la représentativité de l'échantillonnage tumoral.

Au moins 30 à 40 % des CPNPC à un stade avancé sont diagnostiqués sur des prélèvements cytologiques (46). Dans notre étude ils représentaient 20% de l'ensemble des prélèvements. Les tests immunohistochimiques permettant d'évaluer le statut PD-L1 ont initialement été validés pour des prélèvements tissulaires. Ils peuvent être utilisés pour des échantillons cytologiques, à condition d'analyser au moins 100 cellules tumorales. Les données issues de la comparaison d'échantillons appariés (cytologique et histologique) suggèrent que le matériel cytologique est adéquat pour analyser l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales en IHC (18). Un autre inconvénient des prélèvements cytologiques est de ne pas pouvoir analyser l'hétérogénéité spatiale des marqueurs, en l'absence d'architecture tissulaire (47,48).

Une étude récente rapporte 73% de concordance entre les biopsies et la pièce de résection chirurgicale d'une même lésion, pour l'évaluation du statut PD-L1 (valeur seuil : TPS PD-L1  $\geq$  50%). Le taux de concordance varie selon le seuil utilisé et dans cette même étude, pour une valeur seuil à 1%, le taux de concordance était de 96% (49). Pour que l'évaluation du TPS PD-L1, sur



biopsie, se rapproche le plus possible de la tumeur dans son ensemble, il est recommandé de disposer d'au moins 5 biopsies.

Concernant les pièces opératoires, d'après Rehman *et al*, l'évaluation de l'expression de PD-L1 sur un seul bloc de paraffine est suffisante et reflète le TPS PD-L1 de la tumeur (concordance de 94% entre 3 blocs tumoraux d'une même lésion) (50).

**L'hétérogénéité entre la lésion primitive et les métastases**, et entre les différents sites métastatiques, a été étudiée pour PD-L1 (8).

La comparaison des niveaux d'expression de PD-L1, entre différentes localisations tumorales, chez un même patient, montre un taux de concordance qui varie de 67% à 90%. Cette variation peut résulter de différences dans les caractéristiques des patients, dans la technique immunohistochimique ou dans la valeur seuil utilisée pour évaluer le statut PD-L1 (8).

L'équipe de Mansfield *et al* a comparé 146 prélèvements de CPNPC appariés, constitués de la tumeur primitive et d'une métastase cérébrale : le statut PD-L1 et la densité en TILs sont différents entre la tumeur et la métastase. La discordance augmente lorsque les prélèvements sont espacés de 6 mois ou plus (51).

L'équipe de Munari *et al* relève un taux de discordance de 12% et 9% entre la tumeur primitive et la métastase pour des valeurs seuil, respectivement de 1%

et 50%. Entre tumeur primitive et récurrence locale, le taux de discordance est de 33% et 11% (valeur seuil respectivement de 1% et 50%) (52).

A propos de la densité en TILs, certains auteurs mentionnent qu'elle est similaire dans la métastase et dans la tumeur primitive (53).

Les métastases ganglionnaires sont naturellement riches en lymphocytes. Les LT CD8+ peuvent donc être soit des cellules physiologiques du ganglion, soit des éléments du stroma tumoral. Dans notre étude, les métastases ganglionnaires représentaient 27% de l'ensemble des prélèvements. Pour les prélèvements tissulaires, nous n'avons interprété les marqueurs que dans la zone tumorale. Pour les prélèvements cytologiques, nous n'avons pas interprété l'immunomarquage par l'AC anti-CD8. Pour contourner cette difficulté, certaines études excluent les échantillons ganglionnaires métastatiques (53).

**L'hétérogénéité est également temporelle** car l'expression des marqueurs, liés à la réponse immunitaire, est dynamique. Si des prélèvements sont effectués à différents moments de la séquence thérapeutique, il est recommandé de cibler le même organe pour permettre la comparaison des résultats (23,25).

Dans notre étude, chez les patients ayant reçu une chimiothérapie ou une radiochimiothérapie, avant immunothérapie, et pour lesquels nous disposions de prélèvements adéquats (c'est-à-dire un prélèvement avant et après

radiochimiothérapie ou chimiothérapie), nous avons observé une augmentation ou une stabilité de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales.

Ces traitements peuvent induire une réaction inflammatoire, avoir un effet immunogène et modifier l'expression de PD-L1 (8). Ainsi l'évaluation de l'expression de PD-L1, réalisée avant administration de ces traitements, peut ne pas refléter le réel TPS PD-L1 de la tumeur au moment de la mise en route du traitement par pembrolizumab (22). Dans ces situations, il est envisageable d'effectuer une nouvelle biopsie pour réévaluer le statut PD-L1 (46). Plusieurs études ont comparé l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales avant et après chimiothérapie ou radiochimiothérapie. La modification du statut PD-L1 est rapportée dans 14 à 57% des cas mais le sens de variation (augmentation, diminution ou stabilité) change selon les études. L'augmentation de l'expression de PD-L1, après chimiothérapie ou radiochimiothérapie, est corrélée soit à une meilleure réponse au traitement, soit à un pronostic défavorable (8).

Dans notre étude, nous avons observé deux cas où le TPS PD-L1 diminuait après traitement par pembrolizumab. Les prélèvements avant-après traitement par pembrolizumab étaient effectués sur des lésions tumorales différentes (tumeur primitive avant immunothérapie, métastase après immunothérapie).

Dans la littérature, le traitement par pembrolizumab modifie l'expression de PD-L1. Le sens de variation (augmentation, diminution ou stabilité) varie. L'équipe de Kim *et al* retrouve une stabilité du TPS PD-L1, après immunothérapie par

anti-PD-1, chez des patients répondeurs dont le TPS PD-L1 était positif ou fortement positif. Chez des patients non répondeurs, ils retrouvent soit une nette augmentation (passage d'un test négatif à un test positif) soit une légère diminution du TPS PD-L1 (53).

Par ailleurs, le traitement par pembrolizumab modifie la densité en TILs : l'équipe de Tumei *et al* souligne que l'efficacité des ICI dans le mélanome métastatique est corrélée à la densité tumorale en LT CD8+ avant traitement, et que l'évolution de la densité en LT CD8+ au cours du traitement est corrélée à la réponse observée. Chez les patients répondeurs, la densité en LT CD8+ augmente avant-après traitement ; chez les patients non répondeurs, la densité en LT CD8+ diminue (23).

### **Modalités d'étude de l'expression de PD-L1**

Dans notre étude, nous avons évalué l'expression de PD-L1, en suivant le score TPS, défini comme : pourcentage de cellules tumorales viables avec une coloration au moins partielle de la membrane cellulaire, par rapport à toutes les cellules tumorales viables dans la section examinée. La coloration cytoplasmique exclusive est exclue de la notation (28). On présume que seule l'expression membranaire est pertinente, car la protéine PD-L1 ne serait fonctionnelle que lorsque sa localisation membranaire lui permet de se lier au récepteur PD-1 présent sur la membrane d'une cellule adjacente (54).

Nous n'avons pas considéré l'expression de PD-L1 par les cellules immunitaires pour plusieurs raisons. Premièrement, le statut PD-L1 des cellules immunitaires ne semble pas améliorer la valeur prédictive du TPS PD-L1 (28). Deuxièmement, l'évaluation de l'expression de PD-L1 par les cellules immunitaires est peu reproductible (18,19,48,55). Il n'existe actuellement pas de méthode standardisée permettant d'évaluer et de quantifier l'infiltrat immunitaire dans les tumeurs, ce qui est un prérequis nécessaire à une évaluation fiable de l'expression de PD-L1 par les cellules immunitaires (56).

Dans la littérature, le TPS PD-L1 est souvent interprété selon une valeur seuil : un TPS PD-L1  $\geq 1\%$  est dit « positif » et un TPS PD-L1  $\geq 50\%$  est dit « fortement positif » (8). 1% et 50% sont les deux principales valeurs discriminantes proposées en termes de survie et de réponse au pembrolizumab. La détermination de ces valeurs seuils a souvent été effectuée à partir de l'analyse post-hoc de données obtenues dans les essais cliniques (22,28,57,58). Cependant, ces méthodes de détermination semblent se traduire par une faible reproductibilité (8).

La prescription du pembrolizumab nécessitait, jusqu'à récemment, un test diagnostique compagnon et dépendait du TPS PD-L1. La valeur seuil utilisée varie en fonction du test utilisé, du traitement envisagé ou encore du pays (8). Par exemple, aux Etats-Unis et au Japon, le pembrolizumab est approuvé en 1<sup>ère</sup> ligne, en monothérapie, dans les CPNPC de stade IV, sans mutation

(*EGFR*, *ALK* ou *ROS1*) avec un TPS PD-L1  $\geq 1$  %. En France, dans la même situation, la prescription nécessite un TPS PD-L1  $\geq 50\%$ .

Le TPS PD-L1 peut être soit un test diagnostique compagnon (obligatoire et nécessaire à la prescription des traitements associés), soit un test diagnostique complémentaire (non obligatoire mais utile pour guider la prescription thérapeutique) (8,59). Par exemple, le nivolumab et l'atezolizumab peuvent être prescrits indépendamment du TPS PD-L1 dans le CPNPC métastatique, en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus. Dans la même situation, la prescription de pembrolizumab nécessite un TPS PD-L1  $\geq 1$  %.

## Réponse au pembrolizumab

Dans notre étude, il existait une relation entre le TPS PD-L1, évalué en valeur continue par incrément de 10%, et le taux de réponse au pembrolizumab. Le TPS PD-L1 médian des patients répondeurs était significativement plus élevé que celui des patients non répondeurs (100% versus 20%), toutes lignes de traitement confondues. Plus de la moitié des patients répondeurs avaient un TPS PD-L1 à 100%.

En revanche, lorsque le TPS PD-L1 était réparti en deux catégories (TPS PD-L1 <50% versus  $\geq$  50%), la différence en termes de réponse au pembrolizumab (patients répondeurs *versus* non répondeurs) était à la limite de la significativité.

Le taux de réponse était de 30% quel que soit le statut PD-L1 et quelle que soit la ligne de traitement. Tous les patients répondeurs présentaient une réponse partielle. Parmi les patients avec TPS PD-L1  $\geq$  50% et quelle que soit la ligne de traitement, le taux de réponse était de 42%.

Lorsque le pembrolizumab était administré en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement, le taux de réponse était de 52.4% quel que soit le TPS PD-L1 et de **47.4%** lorsque TPS PD-L1  $\geq$  50%.

Lorsque le pembrolizumab était administré en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus, le taux de réponse était de 8.7% quel que soit le TPS PD-L1 et de **20%** lorsque TPS PD-L1  $\geq$  50%.

Notre étude est issue de la « vraie vie », rétrospective et précoce après AMM du pembrolizumab. Les données recueillies (de 2017 à 2020) sont probablement plus hétérogènes que celles des grands essais cliniques ayant un cahier des charges précis.

Dans la littérature, plusieurs études établissent une relation entre l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, la réponse au pembrolizumab, la survie globale et la survie sans progression dans le CPNPC (16,28).

Dans l'essai KN 024, le taux de réponse des patients, sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement, avec un TPS PD-L1  $\geq 50\%$ , était de **44.8%** (17).

Dans l'essai KN 010, les patients inclus présentaient un CPNPC traité par pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement ou plus et un TPS PD-L1  $\geq 1\%$ . Le taux de réponse au pembrolizumab était de 18%, pour les TPS PD-L1  $\geq 1\%$ . Il était de **30%** pour les TPS PD-L1  $\geq 50\%$ . (16)

Dans les essais de la « vraie vie », le taux de réponse observé dans les CPNPC de stade avancé, sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement, avec un TPS PD-L1  $\geq 50\%$ , varie **de 40% à 57.3%** (60–62). La majorité des patients répondeurs présente une réponse partielle (60).



## Survie en fonction de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales

Nous avons d'abord considéré l'ensemble des patients, répartis en deux groupes selon le TPS PD-L1 (TPS PD-L1  $\geq$  50% *versus* TPS PD-L1 < 50%) quelle que soit la ligne de traitement.

Dans notre étude, la différence en termes de survie (SSP et SG), selon le TPS PD-L1 réparti en deux groupes, n'était pas statistiquement significative.

Pour les patients ayant un TPS PD-L1  $\geq$  50% et quelle que soit la ligne de traitement, la SSP médiane était de **69 jours** (62-132) et le taux de SSP à 6 mois était de 41%. La SG médiane était de 461 jours (171-x) et le taux de SG à 6 mois était de **85%**.

Nous avons ensuite considéré les patients ayant reçu du pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement.

Dans la 1<sup>ère</sup> période de suivi (de 0 à 90 jours après début du pembrolizumab), la survie (SSP et SG) semblait meilleure chez les patients ayant reçu du pembrolizumab en 2<sup>ème</sup> ligne ou plus (la majorité de ces patients ayant reçu une chimiothérapie avant l'immunothérapie par pembrolizumab) mais la différence n'était pas statistiquement significative.

Dans la 2<sup>ème</sup> période de suivi (de 90 jours à la fin du suivi), la survie (SSP et SG) était significativement meilleure chez les patients sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement.

Pour les patients sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement, quel que soit le TPS PD-L1, la SSP médiane était de **76 jours** (61-321) et le taux de SSP à 6 mois était de 33%. Nous ne disposions pas de la SG médiane. Le taux de SG à 6 mois était de **72%**.

Dans la littérature, de nombreux essais ont évalué les immunothérapies ciblant l'axe PD-1/PD-L1. Dans l'ensemble, la survie (SSP et SG) est prolongée chez 15 à 25% des patients sous immunothérapie dans le CPNPC de stade avancé (8).

L'efficacité du pembrolizumab, dans le CPNPC de stade avancé sans anomalie moléculaire (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*) et naïf de tout traitement, a notamment été évaluée par les essais KN 024 et KN 042.

Dans l'essai KN 024, les patients, ayant un TPS PD-L1  $\geq 50\%$ , étaient randomisés en deux groupes selon le traitement administré en 1<sup>ère</sup> ligne : pembrolizumab *versus* chimiothérapie à base de sels de platine. La survie était prolongée sous pembrolizumab par rapport à la chimiothérapie. La SSP médiane était de **10.3 mois** dans le groupe pembrolizumab *versus* 6.0 mois dans le groupe chimiothérapie (HR=0.50 [0.37-0.68],  $p < 0.0001$ ). Le taux de SG à 6 mois était meilleur dans le groupe pembrolizumab (**80.2%**) que dans le groupe chimiothérapie (72.3%) (HR=0.60 [0.41-0.89],  $p = 0.005$ ). Une analyse complémentaire montrait que, à long terme, la SG médiane était prolongée dans le groupe pembrolizumab (30.0 mois) par rapport au groupe chimiothérapie (14.2 mois) (17,63,64).

L'essai KN 042 confirmait ces données. Les patients étaient aussi randomisés en deux groupes selon le traitement administré en 1<sup>ère</sup> ligne : pembrolizumab *versus* chimiothérapie. 3 valeurs seuil étaient utilisées pour le TPS PD-L1 :  $\geq 50\%$ ,  $\geq 20\%$ ,  $\geq 1\%$ . La SG et la SSP étaient prolongées dans le groupe pembrolizumab *versus* chimiothérapie, pour un seuil de TPS PD-L1  $\geq 50\%$  (15,65).

Dans l'essai KN 010, les patients présentaient un CPNPC avec un TPS PD-L1  $\geq 1\%$ , déjà traité au préalable. Le traitement de 2<sup>ème</sup> ligne ou plus était soit du pembrolizumab, soit une chimiothérapie. La SG était meilleure dans le groupe pembrolizumab par rapport au groupe chimiothérapie. (16)

Les essais de la « vraie vie » sont en accord avec ces données.

L'équipe de Amrane *et al* a réalisé une étude rétrospective, portant sur des CPNPC de stade avancé, avec TPS PD-L1  $\geq 50\%$ , et traités par pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne. La SSP médiane était de **10.1 mois** (8.8-11.4). Le taux de SG à 6 mois était de **86.2%**. (60)

Une autre étude portant également sur les CPNPC de stade avancé, avec TPS PD-L1  $\geq 50\%$  et sous pembrolizumab en 1<sup>ère</sup> ligne, la SSP médiane était de **6.1 mois** (3.64-8.56). Le taux de SSP à 6 mois était de **50.9%** et celui de la SG à 78.3%. Les CPNPC de type histologique autre que l'adénocarcinome, ou ayant au moins 3 sites métastatiques, étaient associés à un mauvais pronostic. A l'inverse, le pronostic des patients ayant présenté des effets indésirables liés au

pembrolizumab, et celui des patients sans pathologie pulmonaire interstitielle surajoutée, était meilleur. (61)

Un troisième essai, mené par l'équipe de Tamiya *et al*, relevait une SSP médiane de **8.3 mois** et une SG médiane de 17.8 mois. (62)

La différence observée en termes de survie entre les deux groupes pendant la période initiale (de 0 à 90 jours), nous a fait réfléchir à la combinaison immunothérapie et chimiothérapie.

Récemment, sur la base des essais KN 189 et KN 407, la combinaison pembrolizumab-chimiothérapie a été approuvée dans le CPNPC métastatique, épidermoïde ou non épidermoïde, en 1ère ligne de traitement, indépendamment de l'expression de PD-L1.

Dans l'étude KN 189, 616 patients atteints de CPNPC non épidermoïde étaient randomisés. Ils recevaient soit du pembrolizumab, soit un placebo, et des sels de platine/pemetrexed. Puis ils continuaient à recevoir du pembrolizumab ou un placebo, avec comme traitement d'entretien du pemetrexed. La survie était significativement meilleure pour les patients sous pembrolizumab et sels de platine/pemetrexed. Les avantages en termes de survie étaient observés indépendamment du niveau d'expression de PD-L1.

Dans l'étude KN 407, 559 patients atteints de CPNPC épidermoïdes étaient randomisés pour recevoir soit du pembrolizumab, soit un placebo, avec du carboplatine et du paclitaxel ou nab-paclitaxel. La survie (SSP et SG) était

meilleure dans le groupe recevant une combinaison pembrolizumab - chimiothérapie (8).

Même si les avantages observés en termes de survie ne semblent pas dépendre du TPS PD-L1, le test immunohistochimique PD-L1 permettrait tout de même de guider la stratégie thérapeutique. En particulier pour déterminer le traitement de 1<sup>ère</sup> ligne lorsque les possibilités sont monothérapie par pembrolizumab ou combinaison immunothérapie- chimiothérapie.

En pratique, il semblerait que les patients dont la tumeur présente un TPS PD-L1  $\geq 50\%$  soient traités par pembrolizumab en monothérapie, à moins que certains facteurs cliniques soient présents et influencent la combinaison. Pour les patients avec TPS PD-L1  $< 50\%$ , les combinaisons immunothérapie et chimiothérapie semble être préconisées.

Le temps nécessaire à la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace par les ICIs n'est pas bien compris chez l'homme. Les données cliniques suggèrent un temps de réponse typiquement de 6 à 12 semaines (25).

Concernant l'impact pronostique du TPS PD-L1, indépendamment de l'administration d'une immunothérapie, les résultats sont contradictoires. L'article de Velcheti *et al* rapportait une corrélation entre le TPS PD-L1 et une meilleure SG chez des patients n'ayant pas reçu d'immunothérapie (66).

A l'inverse, en Asie, une méta-analyse récente, incluant 50 études et 11 383 prélèvements, associait un TPS PD-L1 positif (valeur seuil à 5%) à une SG plus

courte, en particulier lorsque le TPS PD-L1 était évalué sur une pièce de résection chirurgicale et lorsque les stades tumoraux allaient de I à III (8,67).

## **Expression de CD8**

### **Lien entre les expressions immunohistochimiques de CD8 et de PD-L1**

Dans notre étude, l'expression immunohistochimique de CD8 était indépendante de celles de CD39 et de PD-L1.

Cependant dans la littérature, les expressions de CD8 et de PD-L1 peuvent être liées par un mécanisme adaptatif. En effet, l'expression de PD-L1 peut être induite par les LT CD8+. Les TILs, dont font partie les LT CD8+, secrètent des molécules induisant l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, après avoir reconnu les néo-antigènes tumoraux. Les prélèvements exprimant fortement PD-L1 sont donc susceptibles de comporter plus de LT CD8+ par rapport à ceux n'exprimant pas ou peu PD-L1 (53,66,68).

Toutefois, cette voie d'activation n'est pas unique, l'expression de PD-L1 peut résulter d'altérations oncogéniques et ne témoigne pas forcément d'une tumeur inflammatoire, riche en LT CD8+ (69,70).

## **Modalités d'étude de l'expression de CD8**

Nous avons utilisé une méthode semi-quantitative, sur coupe tissulaire, pour évaluer la densité des prélèvements en LT CD8+.

Dans la littérature, d'autres méthodes d'évaluation sont décrites.

Au-delà de la densité en LT CD8+, d'autres paramètres sont pris en compte, comme la présence de structures lymphoïdes tertiaires. L'importance pronostique des structures lymphoïdes tertiaires a été étudiée dans le CPNPC : leur présence est corrélée à un meilleur recrutement de LT CD8+ activés. Cela souligne leur rôle dans l'organisation et dans la coordination de la réponse immunitaire anti-tumorale locale (71). D'autres cellules immunitaires seraient associées à la survie, comme les macrophages M1 (72).

Par ailleurs, il n'existe pas de valeur seuil clairement définie permettant de distinguer densité élevée et densité faible en LT CD8+.

Une méthodologie, standardisée et consensuelle, d'étude des LT CD8+ sur coupe tissulaire, permettrait d'instaurer un score reproductible dans les essais cliniques ou dans la pratique anatomopathologique de routine (56).



## Expression de CD8 et évolution

Dans notre étude, la survie sans progression à long terme était significativement meilleure chez les patients dont le prélèvement tumoral comportait de nombreux LT CD8+. Pour la survie globale à long terme, la différence était à la limite de la significativité.

Concernant la réponse au pembrolizumab, le taux de réponse était meilleur lorsque les prélèvements étaient riches en LT CD8+ (37.5%) par rapport aux prélèvements pauvres en LT CD8+ (17%). Cependant la différence n'était pas statistiquement significative.

Dans la littérature, le microenvironnement tumoral immunitaire du CPNPC a été largement étudié (25,73). Le potentiel du système immunitaire adaptatif, en particulier des LT CD8+, à contrôler ou à éradiquer les tumeurs, a été démontré dans des modèles de laboratoire. La densité en TILs et en LT CD8+, dans le CPNPC, est associée à un meilleur pronostic, indépendamment d'un traitement par immunothérapie (22,74,75).

Par ailleurs, de par leur mécanisme d'action, les ICIs ciblant l'axe PD-1/PD-L1, dont le pembrolizumab, nécessitent l'existence de TILs et notamment de LT CD8+ pour être efficaces (23,76). Ainsi, l'évaluation immunohistochimique de la densité en TILs semble être un marqueur potentiel de la réponse au pembrolizumab : les tumeurs dites « inflammatoires », riches en cellules immunitaires et en LT CD8+, sont susceptibles de mieux répondre à

l'immunothérapie par pembrolizumab (22,25,53,77). D'après certains auteurs, la densité tumorale en LT CD8+ a une meilleure valeur prédictive que d'autres marqueurs tels que la charge mutationnelle. Cependant, l'analyse combinée de plusieurs marqueurs serait plus fiable que l'analyse d'un seul marqueur. Par exemple, l'étude conjointe de l'expression de PD-L1 et des TILs améliore la prédiction de la réponse à l'immunothérapie, en identifiant des tumeurs TILs et PD-L1 positives qui bénéficieraient davantage du blocage PD-L1/PD-1 (23,68,74,78).

La corrélation entre densité des TILs, réponse au pembrolizumab et survie est retrouvée dans plusieurs types de cancer (53,77,79).

Cependant, il est intéressant de noter que la réponse à l'immunothérapie, des tumeurs dites « inflammatoires », n'est pas systématique. Ainsi, la présence d'un microenvironnement tumoral inflammatoire semble être un facteur nécessaire mais non suffisant (80).

## **Topographie**

Dans la littérature, la topographie des LT CD8+ semble avoir un impact pronostique. D'après Galon *et al*, dans le cancer du côlon, l'étude spatiale et fonctionnelle des TILs présente une valeur pronostique supérieure à celle de la classification UICC-TNM (81).

D'autres études se sont intéressées aux différences en termes de pronostic tumoral (survie, rechute, réponse au pembrolizumab) en fonction de la topographie des TILs (au centre de la tumeur *versus* au front d'invasion tumoral) (22,23).

Dans le mélanome métastatique sous pembrolizumab, l'équipe de Tumei *et al* a souligné l'importance pronostique des LT CD8+ situés au front d'invasion tumoral (23).

Dans le CPNPC, les données sur l'étude de la topographie des TILs varient : elles soulignent soit l'importance potentielle de séparer les compartiments stroma et tumeur, soit l'intérêt d'une évaluation globale (82,83).

Dans notre étude des topographies, la survie (SSP, SG) semblait meilleure lorsque le prélèvement comportait de nombreux LT CD8+, et ceci quelle que soit leur localisation. Ce résultat se superposait à l'étude de la densité globale en LT CD8+. La différence en termes de survie, en fonction de la densité en LT CD8+, semblait plus marquée lorsque les LT CD8+ étaient situés dans le stroma tumoral ou au front d'invasion tumoral. Cependant, aucune différence n'était statistiquement significative.

## **Expression de CD39**

### **Marquage observé avec l'AC anti-CD39**

Dans notre étude, CD39 était exprimé dans le tissu sain et dans le tissu tumoral, par différents types cellulaires : cellules endothéliales, cellules inflammatoires (macrophage, lymphocyte) et cellules mésenchymateuses comme les fibroblastes associés au cancer.

L'expression de CD39 dans le tissu sain était différente de celle observée dans le tissu tumoral (84).

Sur les prélèvements de tumeur, CD39 était essentiellement exprimé par les cellules du stroma tumoral et les cellules endothéliales.

L'équipe de Bastid *et al* décrit la même distribution du marquage entre tissu sain et tissu tumoral (42,85–87).

Dans notre étude, l'expression de CD39 était indépendante de l'expression de CD8 et de PD-L1. Cela concorde avec l'idée que la voie de l'adénosine est une voie de communication cellulaire indépendante de CD8 et de PD-L1. De multiples voies de communication cellulaire, plus ou moins indépendantes, régulent la réponse immunitaire dans le microenvironnement tumoral (31).

La majorité des prélèvements tumoraux (54.5%) comportaient de nombreuses cellules CD39+. Dans la littérature, la surexpression de CD39 est retrouvée dans de multiples tumeurs (mélanome, carcinome hépatocellulaire, cancer du côlon, du pancréas, de l'endomètre, ...) : l'expression du CD39 est plus élevée dans le tissu tumoral (stroma tumoral) que dans le tissu sain (85,88).

### **Expression de CD39 et évolution**

Dans notre étude, la survie n'était pas différente selon la densité en cellules CD39+ des prélèvements tumoraux.

Dans la littérature, il existe une corrélation entre augmentation de l'expression de CD39 et augmentation du niveau d'agressivité tumorale (grade, récurrence, décès) (86). Une forte expression de CD39 est associée à un pronostic défavorable (29,87).

Cependant, des études présentent des résultats contradictoires, notamment dans l'adénocarcinome rectal et le cancer du pancréas, où l'expression du CD39 est associée à une survie prolongée (29).

De plus, dans notre étude, la réponse au pembrolizumab n'était pas différente selon la densité en cellules CD39+ des prélèvements tumoraux.

Pourtant, dans la littérature, la délétion de CD39 *in vivo* améliore l'efficacité anti-tumorale des chimiothérapies et des ICIs, en supprimant l'action immunosuppressive de CD39 (41).

Les ectonucléotidases CD39, et surtout CD73, pourraient être des marqueurs potentiels de réponse aux ICIs (89,90).

Aucune étude ne présente CD39 comme étant un facteur pronostique indépendant (29). La valeur pronostique du CD39 varie selon les études et son impact pronostique semble dépendre du type de cellule qui l'exprime.

Des essais ont typé les cellules exprimant, ou non, CD39 et en ont tiré des conclusions intéressantes (24,91).

L'équipe de Canale *et al* a identifié une sous-population de TILs CD8+ CD39+, caractérisée par un phénotype dit « épuisé ». Les auteurs détaillent les mécanismes conduisant à l'expression de CD39 par les LT CD8+ au sein du microenvironnement tumoral. Cette expression a un effet immunosuppresseur dans la tumeur primitive et dans les métastases. Par ce biais, la tumeur inhibe la réponse immunitaire anti-tumorale (30).

L'équipe de Bastid *et al* a montré que l'expression de CD39 à la surface des cellules tumorales participe aussi à l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale (85).

## **Topographie et encoorbellement**

Dans notre étude, la survie (SSP et SG) et la réponse au pembrolizumab étaient similaires, quelle que soit la densité en cellules CD39+ du stroma tumoral.

La survie globale et la réponse au pembrolizumab semblaient meilleures, lorsque le prélèvement comportait de nombreuses cellules CD39+, mêlées aux cellules tumorales. Cependant, aucune différence n'était statistiquement significative.

Dans la littérature, d'après Perrot *et al*, le CD39 est principalement exprimé par les TILs mêlés aux cellules tumorales (41). Cela peut expliquer que le lien, entre expression de CD39 et évolution, soit plus net lorsqu'on considère les cellules CD39+ mêlées aux cellules tumorales.

**L'encoorbellement était associé à une survie sans progression prolongée mais il n'avait pas d'impact sur la survie globale et sur la réponse au pembrolizumab.**

L'encoorbellement n'était pas observé dans le tissu sain où CD39 était essentiellement exprimé par les cellules endothéliales (42,88).

Le lien avec la survie prolongée peut paraître paradoxal si on considère l'action immunosuppressive de CD39 (85).

Or il existe plusieurs sous types de fibroblastes associés au cancer, certains pourraient avoir un rôle protecteur en limitant la croissance tumorale, les récurrences et les métastases (92,93).

Dans le cancer du pancréas, l'équipe de Künzli *et al* montre que CD39 est exprimé par les fibroblastes associés au cancer, notamment en cas de stroma desmoplasique. Dans cette étude, les tumeurs ayant un niveau élevé d'ARNm *CD39* étaient significativement associées à une meilleure survie postopératoire. Les échantillons tumoraux, avec faible expression de CD39, semblent associés à un stade tumoral plus avancé. L'expression élevée de CD39, dans le stroma tumoral, pourrait avoir un effet protecteur, de par son implication dans le remodelage des tissus et la fibrogenèse, et probablement la progression tumorale (84).

### **Au-delà de CD39 : la voie de l'adénosine**

Le CD39 est directement lié aux autres acteurs de la voie de l'adénosine.

Pour rappel, une forte activité du CD39 génère des niveaux accrus d'AMP, substrat de CD73, qui est également fortement exprimé dans les tumeurs. Le CD73 génère à son tour des niveaux accrus d'adénosine extracellulaire immunosuppressive. L'expression de CD73 est associée à un mauvais pronostic tumoral et à un phénotype pro-métastatique. A l'inverse, l'expression du récepteur de l'adénosine A2A est associée à une survie prolongée (41,94).



La combinaison de l'expression de CD39 et de CD73 semble avoir une meilleure valeur pronostique que l'expression isolée de ces marqueurs (29).

Les traitements, ciblant la voie de l'adénosine et notamment les ectonucléotidases CD39 et CD73, ont pour objectif de promouvoir une meilleure réponse anti-tumorale en bloquant leur activité immunosuppressive.

Des essais précliniques ont montré que le déficit de l'hôte en CD39 ou CD73, ou l'utilisation d'AC anti-CD39 ou anti-CD73, favorisaient l'immunité anti-tumorale. En effet, ils réduisent l'accumulation d'adénosine immunosuppressive et augmentent les niveaux d'ATP immunostimulante. Cela ralentit la croissance tumorale, limite l'angiogenèse tumorale, prévient la survenue de métastases et améliore l'immunité anti-tumorale (85,95).

Ces données soutiennent le développement clinique d'AC anti-CD39 et anti-CD73, potentiellement combinés à d'autres traitements comme la chimiothérapie ou d'autres ICIs (31,89,90).

Les AC anti-CD39 et anti-CD73 fonctionnent de façon individuelle mais leur combinaison serait plus efficace (41).

## **Limites de l'étude et ouvertures**

### **Limite technique**

L'étude simultanée des marqueurs (PD-L1, CD8 et CD39) n'était pas réalisable avec les outils dont nous disposions.

On ne pouvait pas toujours déterminer le type cellulaire marqué. Par exemple, en se basant sur des critères morphologiques, les cellules inflammatoires pouvaient être difficiles à différencier des cellules stromales. Contrairement aux cellules tumorales, leur morphologie n'est pas caractéristique.

On ne pouvait pas déterminer si une cellule particulière exprimait plusieurs marqueurs. Les 3 techniques immunohistochimiques étaient réalisées sur des lames différentes. Il était difficile de les superposer pour étudier les coexpressions. Par exemple, nous ne pouvions pas étudier l'expression de CD39 par les LT CD8+.

Pourtant, l'étude des coexpressions de marqueurs permet de typer les cellules du microenvironnement tumoral. Cela permet notamment d'identifier des sous populations de cellules immunitaires.

Des techniques sont capables de documenter les coexpressions de marqueurs sur coupe tissulaire.

Par exemple, l'IHC multiparamétrique avec analyse d'image est une technique innovante, permettant d'étudier plusieurs marqueurs sur une même lame de tissu FFPE. Ce conditionnement du tissu étant celui du diagnostic. Cette technique n'est pas encore utilisée en routine, mais elle a fait la preuve de son utilité. Elle nécessite une seule coupe tissulaire. Cela permet d'économiser le prélèvement et permet de ne pas compromettre la réalisation d'autres analyses nécessaires à la prise en charge du patient. De plus, elle peut préciser la répartition spatiale de différentes populations cellulaires sur une même coupe tissulaire. Elle peut également documenter d'éventuelles coexpressions en étudiant simultanément plusieurs marqueurs. Au final, cet outil permettrait de cartographier la réponse immunitaire intra-tumorale et de disposer de résultats reproductibles (96–98). D'autres techniques existent, comme par exemple la cytométrie de flux multiparamétrique, la tomographie transparente tissulaire (T3) ou le développement de biomarqueurs basé sur la radiomics (99,100).

### **Faible nombre d'échantillons inclus**

Pour 25 patients (31%), les prélèvements de tumeur étaient épuisés. Nous avons inclus les patients pour qui des prélèvements étaient disponibles (biais potentiel).

A l'heure de la médecine personnalisée, de plus en plus d'analyses sont nécessaires pour la prise en charge du patient. Ces analyses doivent être

réalisées à partir de prélèvements de petite taille (53). Une prise en charge raisonnée, des prélèvements, au sein du laboratoire d'anatomopathologie est primordiale : traitement optimal des petits prélèvements, stratégie de coupe, priorisation des analyses. Dans notre étude, nous avons utilisé un ultra microtome, les lames blanches ont été réalisées en série et les techniques ont été hiérarchisées par ordre de priorité.

Des techniques, indépendantes des prélèvements anatomopathologiques, permettraient d'évaluer certains marqueurs. L'article de Hegde *et al* (25) mentionne que les analyses sanguines permettent de suivre l'évolution de cellule immunitaire circulante. Un autre exemple est le développement d'outils d'imagerie sophistiqués permettant une analyse globale, précise et dynamique, de population cellulaire (99).

## CONCLUSION

L'immunothérapie a constitué une révolution thérapeutique dans la prise en charge du CPNPC de stade avancé. Dans l'ensemble, la survie (SSP et SG) est prolongée chez 15 à 25% des patients. Le taux de réponse au pembrolizumab varie de 18 à 57.3% selon les études.

Notre étude confirme le lien entre le TPS PD-L1, la place du pembrolizumab dans la séquence thérapeutique (1<sup>ère</sup> ligne *versus* 2<sup>ème</sup> ligne ou plus) et différents paramètres évolutifs (réponse au pembrolizumab, survie globale, survie sans progression) dans le CPNPC traité par pembrolizumab.

Notre étude confirme également la valeur pronostique de la densité tumorale en LT CD8+ : la survie sans progression à long terme était meilleure lorsque le prélèvement comportait de nombreux LT CD8+. Concernant la survie globale, la différence était à la limite de la significativité. Il n'y avait pas de différence concernant la réponse au pembrolizumab.

Enfin ce travail souligne l'intérêt d'étudier le stroma tumoral. Dans notre étude, la présence d'un encoorbellement des cellules tumorales par des cellules CD39+ du stroma tumoral était associée à une survie sans progression prolongée. La présence d'un encoorbellement n'avait pas d'impact sur la survie globale et sur la réponse au pembrolizumab.

L'expression immunohistochimique de PD-L1 par les cellules tumorales se caractérise par son hétérogénéité. La réalisation de la technique nécessite d'y associer une démarche qualité pour améliorer sa reproductibilité et sa fiabilité. Le TPS PD-L1 est un marqueur prédictif de la réponse au pembrolizumab mais il reste imparfait.

## BIBLIOGRAPHIE

1. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1908 [Internet]. NobelPrize.org. [cité 1 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/summary/>
2. Corthay A. Does the Immune System Naturally Protect Against Cancer? *Front Immunol* [Internet]. 2014 [cité 1 mars 2020];5. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00197/full>
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 4 mars 2011;144(5):646- 74.
4. Terme M, Tanchot C. [Immune system and tumors]. *Ann Pathol*. févr 2017;37(1):11- 7.
5. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 25 mars 2011;331(6024):1565- 70.
6. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. avr 2012;12(4):252- 64.
7. Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*. 25 juill 2013;39(1):1- 10.
8. Lantuejoul S, Sound-Tsao M, Cooper WA, Girard N, Hirsch FR, Roden AC, et al. PD-L1 Testing for Lung Cancer in 2019: Perspective From the IASLC Pathology Committee. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 20 déc 2019;
9. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol*. 2018;8:86.
10. Granier C, Soumelis V, Mandavit M, Gibault L, Belazzoug R, de Guillebon E, et al. [The « immune checkpoints », how does it work]. *Ann Pathol*. févr 2017;37(1):18- 28.
11. Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, Hutter G, George BM, McCracken MN, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*. 25 2017;545(7655):495- 9.
12. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov*. 2018;8(9):1069- 86.
13. Yang C-Y, Yang JC-H, Yang P-C. Precision Management of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Annu Rev Med*. 2020;71(1):117- 36.
14. Rocco D, Malapelle U, Del Re M, Della Gravara L, Pepe F, Danesi R, et al. Pharmacodynamics of current and emerging PD-1 and PD-L1 inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. févr 2020;16(2):87- 96.
15. Palumbo G, Carillio G, Manzo A, Montanino A, Sforza V, Costanzo R, et al. Pembrolizumab in lung cancer: current evidence and future perspectives. *Future Oncol*. 21 août 2019;15(29):3327- 36.

16. 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.
17. 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.
18. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2017;12(2):208- 22.
19. Rimm DL, Han G, Taube JM, Yi ES, Bridge JA, Flieder DB, et al. A Prospective, Multi-Institutional Assessment of Four Assays for PD-L1 Expression in NSCLC by Immunohistochemistry. *JAMA Oncol*. 1 août 2017;3(8):1051- 8.
20. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 31 mai 2018;378(22):2078- 92.
21. Garassino MC, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, Speranza G, Domine M, et al. Patient-reported outcomes following pembrolizumab or placebo plus pemetrexed and platinum in patients with previously untreated, metastatic, non-squamous non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-189): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. mars 2020;21(3):387- 97.
22. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(5):275- 87.
23. Tumeu PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 27 nov 2014;515(7528):568- 71.
24. Lizotte PH, Ivanova EV, Awad MM, Jones RE, Keogh L, Liu H, et al. Multiparametric profiling of non-small-cell lung cancers reveals distinct immunophenotypes. *JCI Insight*. 08 2016;1(14):e89014.
25. Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 avr 2016;22(8):1865- 74.
26. Marisa L, Svrcek M, Collura A, Becht E, Cervera P, Wanherdrick K, et al. The Balance Between Cytotoxic T-cell Lymphocytes and Immune Checkpoint Expression in the Prognosis of Colon Tumors. *J Natl Cancer Inst*. 01 2018;110(1).
27. Aguilar EJ, Ricciuti B, Gainor JF, Kehl KL, Kravets S, Dahlberg S, et al. Outcomes to first-line pembrolizumab in patients with non-small-cell lung cancer and very high PD-L1 expression. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 01 2019;30(10):1653- 9.
28. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 21 mai 2015;372(21):2018- 28.
29. Hammami A, Allard D, Allard B, Stagg J. Targeting the adenosine pathway for cancer immunotherapy. *Semin Immunol*. 2019;42:101304.



30. Canale FP, Ramello MC, Núñez N, Furlan CLA, Bossio SN, Serrán MG, et al. CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells. *Cancer Res.* 1 janv 2018;78(1):115- 28.
31. Vijayan D, Young A, Teng MWL, Smyth MJ. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nat Rev Cancer.* déc 2017;17(12):709- 24.
32. Collège Français des Pathologiste 3ème édition. Item 306 Tumeurs du poumon primitives et secondaires. Méthodes et stratégies diagnostiques d'une tumeur pulmonaire. [Internet]. iPublishcentral. [cité 29 févr 2020]. Disponible sur: <http://www.elsevierelibrary.fr/epubreader/anatomie-et-cytologie-pathologiques>
33. Couraud S, Westeel V, Toffart A-C, Souquet P-J. Référentiel sur le cancer bronchique non à petites-cellules: actualisation 2019. ARISTOT.2019. ISBN 978-2-490858-00-2. ARISTOT. 2019.
34. KEYTRUDA - Cancer bronchique non à petites cellules 1ere ligne - épidermoïde [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 12 mars 2020]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3112911/fr/keytruda-cancer-bronchique-non-a-petites-cellules-1ere-ligne](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3112911/fr/keytruda-cancer-bronchique-non-a-petites-cellules-1ere-ligne)
35. KEYTRUDA - Cancer bronchique non à petites cellules 1ère ligne - non épidermoïde [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 12 mars 2020]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_2906433/fr/keytruda-cancer-bronchique-non-a-petites-cellules-1ere-ligne](https://www.has-sante.fr/jcms/c_2906433/fr/keytruda-cancer-bronchique-non-a-petites-cellules-1ere-ligne)
36. Torlakovic EE, Cheung CC, D'Arrigo C, Dietel M, Francis GD, Gilks CB, et al. Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine. Part 3: Technical Validation of Immunohistochemistry (IHC) Assays in Clinical IHC Laboratories. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* 2017;25(3):151- 9.
37. Torlakovic EE, Cheung CC, D'Arrigo C, Dietel M, Francis GD, Gilks CB, et al. Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine - Part 2: Immunohistochemistry Test Performance Characteristics. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* 2017;25(2):79- 85.
38. Simoni Y, Becht E, Fehlings M, Loh CY, Koo S-L, Teng KWW, et al. Bystander CD8+ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature.* 2018;557(7706):575- 9.
39. Dolled-Filhart M, Roach C, Toland G, Stanforth D, Jansson M, Lubiniecki GM, et al. Development of a Companion Diagnostic for Pembrolizumab in Non–Small Cell Lung Cancer Using Immunohistochemistry for Programmed Death Ligand-1. *Arch Pathol Lab Med.* 23 août 2016;140(11):1243- 9.
40. Lantuejoul S, Adam J, Girard N, Duruisseaux M, Mansuet-Lupo A, Cazes A, et al. [PD-L1 testing in non-small cell lung carcinoma: Guidelines from the PATTERN group of thoracic pathologists]. *Ann Pathol.* avr 2018;38(2):110- 25.
41. Perrot I, Michaud H-A, Giraudon-Paoli M, Augier S, Docquier A, Gros L, et al. Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies. *Cell Rep.* 21 2019;27(8):2411-2425.e9.
42. Behdad A, Sun X, Khalpey Z, Enyoji K, Wink M, Wu Y, et al. Vascular smooth muscle cell expression of ectonucleotidase CD39 (ENTPD1) is required for neointimal formation in mice. *Purinergic Signal.* sept 2009;5(3):335- 42.
43. Référentiel National de Pneumologie – CEP [Internet]. [cité 29 févr 2020]. Disponible sur: <http://cep.splf.fr/enseignement-du-deuxieme-cycle-dcem/referentiel-national-de->

pneumologie/

44. de Sousa VML, Carvalho L. Heterogeneity in Lung Cancer. *Pathobiology*. 2018;85(1- 2):96- 107.
45. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 01 2018;29(Suppl 4):iv192- 237.
46. Cheung CC, Barnes P, Bigras G, Boerner S, Butany J, Calabrese F, et al. Fit-For-Purpose PD-L1 Biomarker Testing For Patient Selection in Immuno-Oncology: Guidelines For Clinical Laboratories From the Canadian Association of Pathologists-Association Canadienne Des Pathologistes (CAP-ACP). *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*. déc 2019;27(10):699- 714.
47. Skov BG, Skov T. Paired Comparison of PD-L1 Expression on Cytologic and Histologic Specimens From Malignancies in the Lung Assessed With PD-L1 IHC 28-8pharmDx and PD-L1 IHC 22C3pharmDx. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*. 2017;25(7):453- 9.
48. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley M-B, Borczuk AC, Botling J, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2018;13(9):1302- 11.
49. Kim I, Kim A, Lee CH, Lee G, Kim A, Jo EJ, et al. Reliability of PD-L1 assays using small tissue samples compared with surgical specimens. *Medicine (Baltimore)*. avr 2019;98(14):e14972.
50. Rehman JA, Han G, Carvajal-Hausdorf DE, Wasserman BE, Pelekanou V, Mani NL, et al. Quantitative and pathologist-read comparison of the heterogeneity of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2017;30(3):340- 9.
51. Mansfield AS, Aubry MC, Moser JC, Harrington SM, Dronca RS, Park SS, et al. Temporal and spatial discordance of programmed cell death-ligand 1 expression and lymphocyte tumor infiltration between paired primary lesions and brain metastases in lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27(10):1953- 8.
52. Munari E, Zamboni G, Lunardi G, Marchionni L, Marconi M, Sommaggio M, et al. PD-L1 Expression Heterogeneity in Non-Small Cell Lung Cancer: Defining Criteria for Harmonization between Biopsy Specimens and Whole Sections. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2018;13(8):1113- 20.
53. Kim H, Kwon HJ, Han YB, Park SY, Kim ES, Kim SH, et al. Increased CD3+ T cells with a low FOXP3+/CD8+ T cell ratio can predict anti-PD-1 therapeutic response in non-small cell lung cancer patients. *Mod Pathol*. mars 2019;32(3):367- 75.
54. Sznol M, Chen L. Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 mars 2013;19(5):1021- 34.
55. Scheel AH, Baenfer G, Baretton G, Dietel M, Diezko R, Henkel T, et al. Interlaboratory concordance of PD-L1 immunohistochemistry for non-small-cell lung cancer. *Histopathology*. 2018;72(3):449- 59.
56. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. Assessing tumor

infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group. *Adv Anat Pathol*. nov 2017;24(6):311- 35.

57. Thunnissen E, Allen TC, Adam J, Aisner DL, Beasley MB, Borczuk AC, et al. Immunohistochemistry of Pulmonary Biomarkers: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med*. 7 juill 2017;142(3):408- 19.
58. Hui R, Garon EB, Goldman JW, Leighl NB, Hellmann MD, Patnaik A, et al. Pembrolizumab as first-line therapy for patients with PD-L1-positive advanced non-small cell lung cancer: a phase 1 trial. *Ann Oncol*. 1 avr 2017;28(4):874- 81.
59. Jørgensen JT. Companion and Complementary Diagnostics: Clinical and Regulatory Perspectives. *Trends Cancer*. 1 déc 2016;2(12):706- 12.
60. Amrane K, Geier M, Corre R, Léna H, Léveiller G, Gadby F, et al. First-line pembrolizumab for non-small cell lung cancer patients with PD-L1  $\geq 50\%$  in a multicenter real-life cohort: The PEMBREIZH study. *Cancer Med*. 5 févr 2020;9(7):2309- 16.
61. Tambo Y, Sone T, Shibata K, Nishi K, Shirasaki H, Yoneda T, et al. Real-World Efficacy of First-Line Pembrolizumab in Patients With Advanced or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer and High PD-L1 Tumor Expression. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 26 févr 2020 [cité 27 mai 2020]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525730420300425>
62. Tamiya M, Tamiya A, Hosoya K, Taniguchi Y, Yokoyama T, Fukuda Y, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer with at least 50% PD-L1 positivity: a multicenter retrospective cohort study (HOPE-001). *Invest New Drugs*. 2019;37(6):1266- 73.
63. Pacheco JM, Gao D, Camidge DR. Extended follow-up on KEYNOTE-024 suggests significant survival benefit for pembrolizumab in patients with PD-L1  $\geq 50\%$ , but unanswered questions remain. *Ann Transl Med* [Internet]. juill 2019 [cité 27 mai 2020];7(Suppl 3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6685853/>
64. 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 01 2019;37(7):537- 46.
65. 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.
66. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Szolc M, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest*. janv 2014;94(1):107- 16.
67. Li H, Xu Y, Wan B, Song Y, Zhan P, Hu Y, 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.
68. Taube JM, Galon J, Sholl LM, Rodig SJ, Cottrell TR, Giraldo NA, et al. Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2018;31(2):214- 34.

69. Sanmamed MF, Chen L. Inducible Expression of B7-H1 (PD-L1) and Its Selective Role in Tumor Site Immune Modulation. *Cancer J Sudbury Mass.* 2014;20(4):256- 61.
70. Zhang X, Xu W. Neutrophils diminish T-cell immunity to foster gastric cancer progression: the role of GM-CSF/PD-L1/PD-1 signalling pathway. *Gut.* 1 nov 2017;66(11):1878- 80.
71. Goc J, Germain C, Vo-Bourgais TKD, Lupo A, Klein C, Knockaert S, et al. Dendritic Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Signal a Th1 Cytotoxic Immune Contexture and License the Positive Prognostic Value of Infiltrating CD8+ T Cells. *Cancer Res.* 1 févr 2014;74(3):705- 15.
72. Liu S-Y, Wu Y-L. Biomarker for personalized immunotherapy. *Transl Lung Cancer Res.* 20 août 2019;0(0):S308- 17.
73. Remark R, Becker C, Gomez JE, Damotte D, Dieu-Nosjean M-C, Sautès-Fridman C, et al. The Non–Small Cell Lung Cancer Immune Contexture. A Major Determinant of Tumor Characteristics and Patient Outcome. *Am J Respir Crit Care Med.* 4 nov 2014;191(4):377- 90.
74. Edlund K, Madjar K, Mattsson JSM, Djureinovic D, Lindskog C, Brunnström H, et al. Prognostic Impact of Tumor Cell Programmed Death Ligand 1 Expression and Immune Cell Infiltration in NSCLC. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2019;14(4):628- 40.
75. Geng Y, Shao Y, He W, Hu W, Xu Y, Chen J, et al. Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Cancer: a Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(4):1560- 71.
76. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* mars 2019;19(3):133- 50.
77. Zhou J, Gong Z, Jia Q, Wu Y, Yang Z-Z, Zhu B. Programmed death ligand 1 expression and CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte density differences between paired primary and brain metastatic lesions in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 15 avr 2018;498(4):751- 7.
78. Zhang Y, Chen L. Classification of Advanced Human Cancers Based on Tumor Immunity in the MicroEnvironment (TIME) for Cancer Immunotherapy. *JAMA Oncol.* 1 nov 2016;2(11):1403- 4.
79. Uppal A, Dehal A, Chang S-C, Barrak D, Naeini Y, Jalas JR, et al. The Immune Microenvironment Impacts Survival in Western Patients with Gastric Adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* 17 oct 2019;
80. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point. *Nature.* janv 2017;541(7637):321- 30.
81. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 29 sept 2006;313(5795):1960- 4.
82. Donnem T, Kilvaer TK, Andersen S, Richardsen E, Paulsen EE, Hald SM, et al. Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 1 févr 2016;27(2):225- 32.
83. Brambilla E, Le Teuff G, Marguet S, Lantuejoul S, Dunant A, Graziano S, et al. Prognostic Effect of Tumor Lymphocytic Infiltration in Resectable Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin*

Oncol. 1 févr 2016;34(11):1223- 30.

84. Künzli BM, Berberat PO, Giese T, Csizmadia E, Kaczmarek E, Baker C, et al. Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptors in human pancreatic disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* janv 2007;292(1):G223-230.
85. Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, Déjou C, Giustiniani J, Laheurte C, et al. Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer Immunol Res.* mars 2015;3(3):254- 65.
86. Aliagas E, Vidal A, Texidó L, Ponce J, Condom E, Martín-Satué M. High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:509027.
87. Cai X-Y, Ni X-C, Yi Y, He H-W, Wang J-X, Fu Y-P, et al. Overexpression of CD39 in hepatocellular carcinoma is an independent indicator of poor outcome after radical resection. *Medicine (Baltimore).* oct 2016;95(40):e4989.
88. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou J-F, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene.* avr 2013;32(14):1743- 51.
89. Beavis PA, Slaney CY, Milenkovski N, Henderson MA, Loi S, Stagg J, et al. CD73: A potential biomarker for anti-PD-1 therapy. *Oncoimmunology.* nov 2015;4(11):e1046675.
90. Ono K, Shiozawa E, Ohike N, Fujii T, Shibata H, Kitajima T, et al. Immunohistochemical CD73 expression status in gastrointestinal neuroendocrine neoplasms: A retrospective study of 136 patients. *Oncol Lett.* févr 2018;15(2):2123- 30.
91. Tøndell A, Wahl SGF, Sponaas A-M, Sørhaug S, Børset M, Haug M. Ectonucleotidase CD39 and Checkpoint Signalling Receptor Programmed Death 1 are Highly Elevated in Intratumoral Immune Cells in Non-small-cell Lung Cancer. *Transl Oncol.* janv 2020;13(1):17- 24.
92. Franco-Barraza J, Francescone R, Luong T, Shah N, Madhani R, Cukierman G, et al. Matrix-regulated integrin  $\alpha\beta 5$  maintains  $\alpha 5\beta 1$ -dependent desmoplastic traits prognostic of neoplastic recurrence. *eLife [Internet].* [cité 27 mai 2020];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5283834/>
93. Zeltz C, Primac I, Erusappan P, Alam J, Noel A, Gullberg D. Cancer-associated fibroblasts in desmoplastic tumors: emerging role of integrins. *Semin Cancer Biol.* 1 mai 2020;62:166- 81.
94. Inoue Y, Yoshimura K, Kurabe N, Kahyo T, Kawase A, Tanahashi M, et al. Prognostic impact of CD73 and A2A adenosine receptor expression in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget.* 31 janv 2017;8(5):8738- 51.
95. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer.* déc 2013;13(12):842- 57.
96. Ilié M, Beaulande M, Ben Hadj S, Chamorey E, Schiappa R, Long-Mira E, et al. Chromogenic Multiplex Immunohistochemistry Reveals Modulation of the Immune Microenvironment Associated with Survival in Elderly Patients with Lung Adenocarcinoma. *Cancers.* 13 sept 2018;10(9).
97. Steele KE, Tan TH, Korn R, Dacosta K, Brown C, Kuziora M, et al. Measuring multiple parameters of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers by image analysis. *J*

Immunother Cancer. 06 2018;6(1):20.

98. Barua S, Fang P, Sharma A, Fujimoto J, Wistuba I, Rao AUK, et al. Spatial interaction of tumor cells and regulatory T cells correlates with survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth.* 2018;117:73- 9.
99. Sun R, Limkin EJ, Vakalopoulou M, Dercle L, Champiat S, Han SR, et al. A radiomics approach to assess tumour-infiltrating CD8 cells and response to anti-PD-1 or anti-PD-L1 immunotherapy: an imaging biomarker, retrospective multicohort study. *Lancet Oncol.* 1 sept 2018;19(9):1180- 91.
100. Lee SS-Y, Bindokas VP, Lingen MW, Kron SJ. Non-destructive, multiplex three-dimensional mapping of immune infiltrates in core needle biopsy. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* sept 2019;99(9):1400- 13.
101. Cancer du poumon - Bilan initial : abrégé - Ref : PLACPOUM11 [Internet]. [cité 29 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Cancer-du-poumon-Bilan-initial-abrege>
102. WCLC 2019 – La cryobiopsie transbronchique peut améliorer le diagnostic et la recherche des biomarqueurs dans le cadre du cancer du poumon [Internet]. WCLC 2019 – La cryobiopsie transbronchique peut améliorer le diagnostic et la recherche des biomarqueurs dans le cadre du cancer du poumon | Univadis. [cité 29 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.univadis.fr/viewarticle/wclc-2019-la-cryobiopsie-transbronchique-peut-ameliorer-le-diagnostic-et-la-recherche-des-biomarqueurs-dans-le-cadre-du-cancer-du-poumon-691842>
103. Chantal A. HAS écho-endoscopie bronchique avec ponction transbronchique à l'aiguille. 2014;86.
104. Neuman T, London M, Kania-almog J, Litvin A, Zohar Y, Fridel L, et al. A Harmonization Study for the Use of 22C3 PD-L1 Immunohistochemical Staining on Ventana's Platform. *J Thorac Oncol.* 1 nov 2016;11(11):1863- 8.
105. Neuman T, London M, Kania-almog J, Litvin A, Zohar Y, Fridel L, et al. A Harmonization Study for the Use of 22C3 PD-L1 Immunohistochemical Staining on Ventana's Platform. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2016;11(11):1863- 8.

## **ANNEXE 1**

### **Les différents types de prélèvement anatomopathologique dans le CPNPC**

Le diagnostic positif du cancer pulmonaire repose sur l'obtention d'une preuve anatomopathologique. Afin de réaliser l'examen anatomopathologique, des prélèvements sont effectués sur la tumeur primitive ou sur les métastases accessibles (ganglionnaires ou viscérales).

Les prélèvements peuvent être de nature tissulaire ou cytologique : une analyse histologique doit être préférée à un examen cytologique lorsqu'elle est réalisable (101).

Il est recommandé de choisir une technique qui recueille suffisamment de matériel, pour permettre de poser un diagnostic précis de cancer pulmonaire. Ce diagnostic nécessite un examen morphologique, un examen immunohistochimique et des techniques moléculaires.

La caractérisation précise de la tumeur, et notamment la détermination du type histologique, permet d'adapter la prise en charge thérapeutique de chaque patient.

Il existe différents types de prélèvement anatomopathologique (32,43).

Pour les prélèvements de tumeur primitive, le choix de la technique dépend de la localisation tumorale (centrale ou périphérique). Par exemple, les carcinomes

épidermoïdes ont un développement souvent central et les adénocarcinomes ont un développement plutôt périphérique.

Les moyens disponibles pour prélever la tumeur primitive sont :

- Bronchoscopie souple (fibroscopie bronchique) : cette technique est utilisée pour les tumeurs centrales, de développement péri ou endobronchique. Elle est réalisée sous anesthésie locale ou sédation. Elle permet la réalisation de biopsies ou cryobiopsies (histologie), et de lavages bronchoalvéolaires ou brossages bronchiques (cytologie) (102).
- Ponction-biopsie par voie transpariétale à l'aiguille : elle est réalisée sous anesthésie locale, guidée par tomodensitométrie (TDM), ou rarement par échographie (envahissement tumoral de la paroi thoracique). Elle est utile pour les tumeurs périphériques non accessibles à la fibroscopie bronchique. La principale complication est le pneumothorax (environ 20%).
- Techniques chirurgicales (thoracoscopie, médiastinoscopie, vidéo thoracotomie exploratrice) : ces techniques sont réalisées si le diagnostic n'est pas obtenu par des techniques moins invasives, et si la suspicion de cancer est élevée. Ils permettent, par exemple, de réaliser une biopsie ou une résection pulmonaire. Si la tumeur est résécable, et si le patient est opérable, un geste chirurgical peut éventuellement être proposé en 1<sup>ère</sup> intention à but diagnostique et thérapeutique.



Deuxièmement, nous nous intéressons aux prélèvements de métastase. Pour les métastases, dans certains cas, lorsque l'une d'entre elles est accessible, elle peut être prélevée pour confirmation diagnostique ou pour bilan d'extension de la maladie.

Les moyens disponibles pour prélever une métastase sont :

- Echo-endoscopie bronchique : l'écho-endoscopie bronchique avec ponction transbronchique à l'aiguille est aussi appelée « EBUS-TBNA » (EndoBronchial Ultra-Sonic guide-TransBronchial Needle Aspiration). Cette technique associe endoscopie bronchique et échographie. Elle permet de réaliser des ponctions échoguidées avec des aiguilles de petit calibre. Cette technique est plus précise que les ponctions transbronchiques réalisées à l'aveugle. Elle permet de recueillir un matériel cytologique et parfois des microbiopsies. Elle est utilisée pour prélever des ganglions médiastinaux, ou parfois pour prélever la tumeur primitive (103).
- Autres méthodes : ponction (par exemple, ponction d'un épanchement pleural ou péricardique), ponction-biopsie (guidée sous TDM ou par échographie) ou exérèse. La lésion prélevée peut être une adénopathie, une métastase hépatique ou cérébrale, une lésion ostéolytique, ...



## **ANNEXE 2**

### **Protocole de la technique immunohistochimique**

Les lames blanches stockées sont décongelées 10 minutes à température ambiante.

Puis les techniques immunohistochimiques sont effectuées à l'aide des trois anticorps :

- AC anti-CD39 (clone EPR20627, ab223842, Abcam®) : anticorps monoclonal de lapin, dilué au 1/1000, préparé extemporanément
- AC anti-CD8 (clone C8/144B, M7103, Dako®) : anticorps monoclonal de souris, dilué au 1/25
- AC anti-PD-L1 (clone 22C3, M3653, Dako®) : anticorps monoclonal de souris, dilué au 1/50.

Les techniques sont automatisées, ce qui apporte un gain de temps technique et une meilleure reproductibilité (104). Les techniques sont réalisées à l'aide d'un automate : le Benchmark Ultra® de la société Roche Ventana. Son utilisation est validée pour la réalisation du test compagnon diagnostique PD-L1 (105). Les étapes de déparaffinage, réhydratation, prétraitement, incubation, révélation et contre coloration sont effectuées à l'aide de cet automate.

Les coupes sont **déparaffinées**.

Puis elles subissent un **prétraitement pour restauration antigénique**, via l'hydrolyse des liaisons covalentes, formées par le formaldéhyde dans les tissus. Les épitopes antigéniques deviennent alors accessibles.

Il s'agit d'un démasquage antigénique thermique, dans une solution de démasquage.

Les températures et durées du démasquage sont fonction des anticorps :

- 30 minutes à 95°C pour l'AC anti-CD8
- 64 minutes à 95°C pour l'AC anti-CD39
- 32 minutes à 100°C pour l'AC anti-PD-L1

La solution de démasquage est le tampon de démasquage Ultra CC1 de la société Roche Ventana : tampon Tris/ Borate/EDTA, légèrement basique (pH = 8.4).

L'activité peroxydase endogène est inhibée à l'aide de peroxyde d'hydrogène puis les lames sont incubées avec l'**anticorps primaire** :

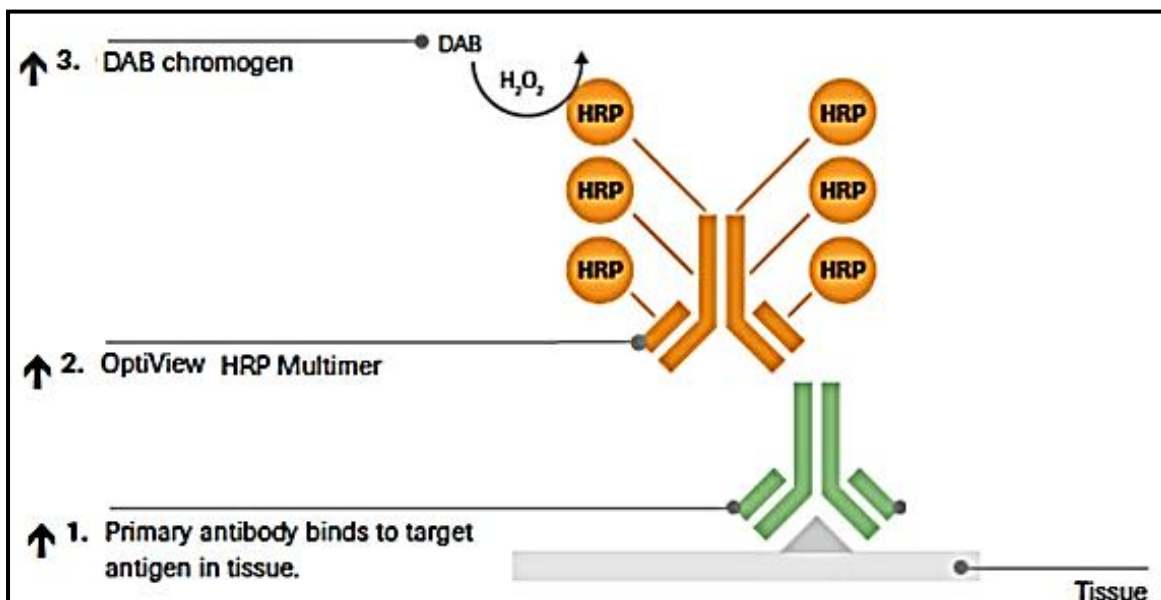
- pour les AC anti-CD39 et anti-CD8 : incubation pendant 32 minutes à 36°C
- pour l'AC anti-PD-L1 : incubation pendant 60 minutes à 36°C

L'anticorps primaire se fixe sur son épitope antigénique spécifique (protéine PD-L1, CD8 ou CD39).

Ensuite nous utilisons un **système de détection** qui améliore le signal.

Les anticorps primaires sont détectés par technique multimère selon deux méthodes.

- **Méthode Ultraview**, utilisée pour les AC anti-CD39 et anti-CD8.
  - o Elle fonctionne en intercalant des polymères. Elle consiste à réaliser une incubation, pendant 8 minutes, avec un cocktail d'**anticorps secondaires** appelés « HRP multimères ».
  - o Ces AC secondaires se lient aux AC primaires, et sont eux-mêmes directement liés à une enzyme appelée « horseradish peroxydase » (HRP)
  - o Nous avons utilisé le Kit UltraView® de la société Ventana Roche : référence 760-500



**Figure 21 : méthode de détection UltraView**  
D'après « UltraView Universal DAB Detection Kit Reaction, Roche/Ventana »

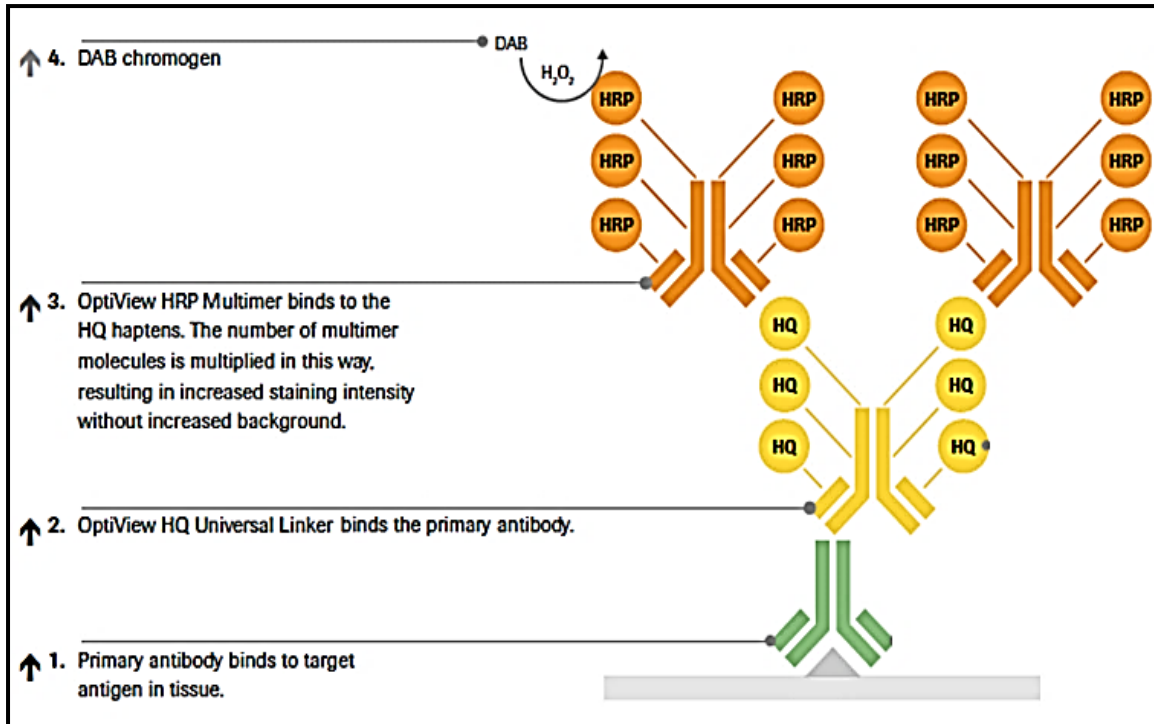
– **Méthode Optiview avec amplification :**

- Cette méthode est utilisée pour l'AC anti-PD-L1
- Elle fonctionne en intercalant des polymères et en utilisant la cascade de la tyramide.
- Le protocole technique est détaillé ci-dessous : la 1<sup>ère</sup> étape est celle de la détection, la 2<sup>ème</sup> étape est celle de l'amplification
- Nous avons utilisé le Kit Optiview DAB® (référence 760 – 700) et le Kit Optiview Amplification® (référence 760 – 099) de la société Ventana Roche
- **Etape de détection :** elle consiste à réaliser **deux incubations**
  - Une 1<sup>ère</sup> incubation pendant 12 minutes, avec un cocktail d'**AC secondaires**, appelés « HQ linker ».

Ces AC sont directement liés à plusieurs haptènes (12 à 15). Les haptènes sont des molécules d'hydroxy-quinoxaline (HQ) : molécule synthétique absente chez les mammifères. Cela permet d'éliminer les interactions inter-espèces potentiellement responsables de fixation aspécifique (bruit de fond). Ces AC se lient aux AC primaires.

- Une 2<sup>ème</sup> incubation pendant 12 minutes, avec un cocktail d'**AC tertiaires anti-HQ**, appelés « HRP multimère ».

Ces AC comportent plusieurs molécules d'enzyme HRP. Ces AC se lient aux haptènes HQ des AC secondaires. Ces AC augmentent la quantité de signal produit, en augmentant le nombre final d'enzyme HRP associé à chaque antigène cible. En effet, au moment de la révélation, chaque molécule d'HRP crée un signal.



**Figure 22 : méthode de détection OptiView**

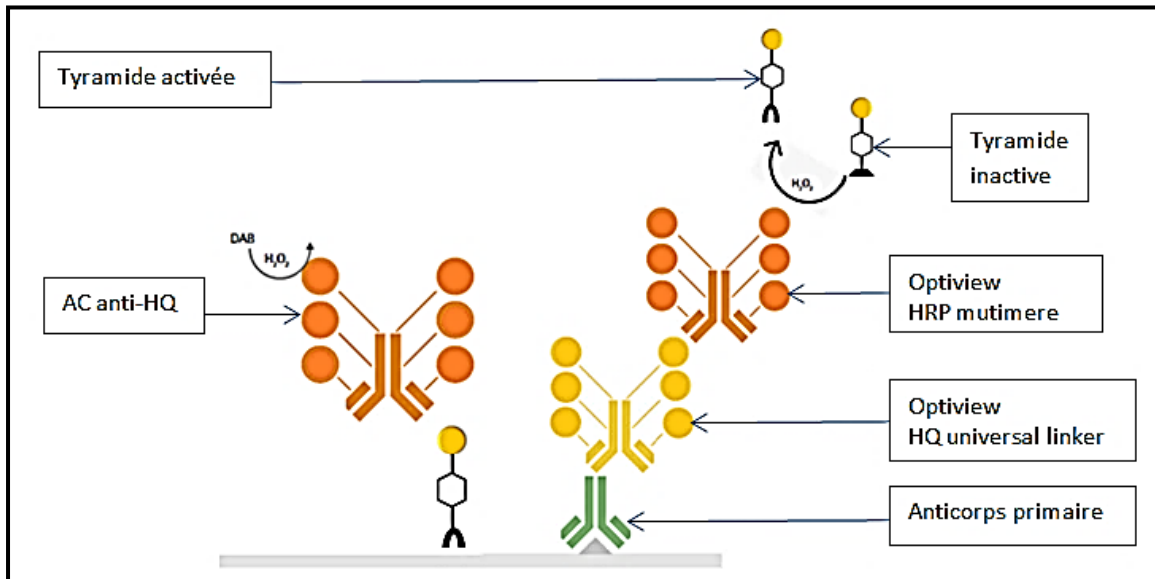
D'après « OptiView Universal DAB Detection Kit Reaction, Roche/Ventana »

- **Etape d'amplification** : elle consiste à réaliser **deux incubations**
  - Une 1<sup>ère</sup> incubation pendant 12 minutes, avec deux molécules : le **peroxyde d'hydrogène** et la **tyramide inactive et conjuguée à un haptène HQ**.

En présence de peroxyde d'hydrogène et d'enzyme HRP, la tyramide inactive se transforme en tyramide activée, qui est un radical libre se fixant à proximité.

- Une 2<sup>ème</sup> incubation pendant 12 minutes, avec des **anticorps anti-HQ**.

Ces AC se fixent sur les haptènes HQ des molécules de tyramide. Ils comportent eux-mêmes plusieurs enzymes HRP.



**Figure 23 : méthode de détection OptiView avec amplification**  
 D'après « OptiView Universal DAB Detection Kit Reaction, Roche/Ventana »

De façon générale, l'étape d'amplification est facultative. Elle est recommandée pour les antigènes très peu exprimés et/ou associés à un signal faible en technique immunohistochimique standard. L'amplification augmente la visibilité du signal avec en contrepartie un étalement du signal, d'aspect granuleux.

Après l'étape de détection, dont nous avons détaillé deux méthodes, nous abordons la **révélation de la réaction antigène/anticorps**. Cette révélation est enzymatique : l'hydrolyse du chromogène, la diaminobenzidine (DAB), par la peroxydase (HRP) en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit une réaction colorée sous forme d'un précipité brun.

Ensuite, afin de mieux apprécier la morphologie tissulaire, on réalise une **contre-coloration** légère à l'hématoxyline associée au Bluing Reagent. Le



Bluing Reagent est une solution au carbonate de lithium. Elle rend l'hématoxyline bleue et augmente le contraste avec le chromogène. On obtient ainsi une légère coloration bleu clair.

Enfin, les lames sont déshydratées, passées dans le xylène et montées.



## ANNEXE 3

### Technique immunohistochimique avec l'AC anti-CD39

Pour mettre au point la technique immunohistochimique avec l'AC anti-CD39, nous avons testé **5 protocoles** différents. Les 5 protocoles sont détaillés dans le **Tableau V**.

Pour l'élaboration des protocoles, les **variables d'ajustement** étaient :

- à l'étape de **prétraitement** :
  - le type de démasquage antigénique :
    - pour le démasquage thermique, il existe deux solutions de démasquage :
      - solution CC1 : tampon Tris/Borate/EDTA (pH 8,4)
      - solution CC2 : tampon Citrate (pH 6)
    - pour le démasquage enzymatique, plusieurs cocktails sont disponibles :
      - cocktail protéase 3, équivalent ficine
      - cocktail protéase 2, équivalent trypsine
      - cocktail protéase 1, équivalent pronase

Ces cocktails sont de puissance croissante de la protéase 3 à la protéase 1.

- la durée du démasquage antigénique
- la température du démasquage antigénique
- à l'étape d'**incubation** avec l'anticorps : la dilution de l'anticorps

- facteur de dilution
- type de diluant

Nous avons utilisé une dilution au 1/1000, avec un diluant standard (cocktail d'immunoglobulines polyvalentes et de protéines stabilisantes).

- à l'étape de **détection** : méthode Ultraview (UV) ou Optiview (OV)

Les autres paramètres techniques pré-analytiques (fixation, traitement, inclusion du tissu, ...) et analytiques (préparation, déparaffinage, contre-coloration, montage de la lame, ...) étaient identiques entre les protocoles.

Tous les protocoles étaient réalisés sur un automate Ventana Benchmark Ultra® de la société Roche Ventana®. D'abord sur des coupes tissulaires dont l'immunoréactivité était connue (myocarde, amygdale, côlon, poumon sain, foie et rate) puis sur les lames blanches dédiées.

Le protocole retenu est associé à un numéro dans la base de données de l'automate : 4905.

**Tableau V : protocoles de mise au point de l'AC anti-CD39**

N°	Démasquage	AC primaire	Amplification	Révélation
4905	CC1 – 64min	32min Dilué 1/1000	Non	UV
4906	CC2 – 40min	32min Dilué 1/1000	Non	UV
4907	P1 – 4min	32min Dilué 1/1000	Non	OV
4908	CC1 – 64min	32min Dilué 1/1000	Non	OV
4909	CC2 – 40min	32min Dilué 1/1000	Non	OV

### **Premiers résultats**

Pendant la phase de mise au point, l'AC anti-CD39 était toujours préparé de façon extemporanée et utilisé dans un délai maximum de 24 heures.

Puis dans la phase d'automatisation de la technique, une seringue de 10 à 30 µL d'AC anti-CD39, dilué au 1/1000, était préparée et stockée au réfrigérateur pendant 15 jours.

Puis la technique immunohistochimique avec l'AC anti-CD39 a été lancée : la technique sur automate a duré deux jours.

Lors de la lecture, il n'y avait aucun marquage sur les lames, y compris sur les lames contrôles positives, malgré une contre-coloration correcte.

### **Adaptation de la technique**

Plusieurs hypothèses sont alors envisagées pour expliquer l'absence de signal :

- **erreur pré-analytique :**

C'est à dire une erreur dans la préparation du tissu (temps d'ischémie froide, fixation, stockage, durée de conservation, inclusion ou enrobage) ou une erreur dans la préparation des lames (coupe, séchage)

Cela peut aussi être dû à la fragilité de l'épitope antigénique. Par exemple, l'épitope antigénique des protéines MSH6 et PMS2 est particulièrement fragile : les lames blanches doivent être préparées et techniquées dans un délai de 24h. A l'inverse, certains épitopes antigéniques sont particulièrement robustes comme par exemple la cytokératine 7.

Cette hypothèse a été éliminée. En effet, les conditions pré analytiques utilisées étaient identiques à celles de la mise au point. Et lors de la mise au point, la technique fonctionnait. De plus, lorsque nous avons relancé la technique, en utilisant les mêmes conditions pré-analytiques, et en changeant d'autres variables (AC fraîchement dilué), le marquage était correct.

Ce n'était donc pas une erreur pré-analytique

- **erreur technique :**

C'est-à-dire une erreur, dans l'étape analytique, liée à un dysfonctionnement de l'automate : distribution des réactifs, étape de contre-coloration, ...

Cette hypothèse a également été éliminée. En effet, d'autres techniques immunohistochimiques ont été réalisées, sur le même automate, en parallèle de la technique immunohistochimique avec l'AC anti-CD39. Elles ont bien fonctionné.

Cela excluait un problème lié au fonctionnement de l'automate.

- **erreur humaine :**

C'est-à-dire une erreur dans les étapes manuelles de préparation des réactifs, et notamment dans la dilution de l'AC.

Cette hypothèse nous paraissait peu probable mais nous l'avons tout de même vérifiée en préparant une nouvelle seringue.

Le résultat était similaire, ce qui éliminait une erreur humaine dans la préparation des réactifs.

- **problème de stabilité des réactifs :**

La dernière hypothèse concerne la stabilité des réactifs : c'est-à-dire l'impact du temps et de la température de stockage sur la stabilité de l'anticorps (anticorps déjà dilué).

Une instabilité peut se manifester par une absence ou une diminution du signal immunohistochimique observé sur la lame finale.

En routine, un AC, qui a déjà été dilué, peut être conservé au réfrigérateur pendant environ 6 mois, tout en restant stable.

Dans notre étude, pendant l'étape de mise au point, l'AC anti-CD39 était préparé de façon extemporanée et utilisé dans un délai maximum de 24 heures.

Ceci pour des raisons pratiques.

Puis, dans la phase d'automatisation, afin d'anticiper la technique, les réactifs étaient préparés à l'avance. L'AC anti-CD39 était dilué manuellement et une seringue de 10 à 30  $\mu$ L d'AC dilué était stockée au réfrigérateur pendant 15 jours.

Pour tester l'impact du temps et de la température de stockage sur la stabilité de l'AC anti-CD39 dilué, nous avons réalisé des tests complémentaires.

Nous avons préparé 2 seringues d'AC anti-CD39 dilué au 1/1000 : une seringue était stockée à température ambiante, l'autre seringue était stockée au réfrigérateur.

Nous avons ensuite lancé la technique avec des temps de conservation différents :

- extemporané : c'est-à-dire dans un délai de 24h après préparation de la seringue d'AC dilué
- après 72h de conservation
- après 1 semaine de conservation
- après 15 jours de conservation

Nous avons observé une perte de signal selon le temps de conservation et la température de stockage.



Nous avons ainsi attribué l'échec de la technique à l'instabilité des réactifs et modifié le protocole technique : la seringue d'AC anti-CD39 est préparée extemporanément.



## ANNEXE 4

### Courbes de survie selon la topographie des LT CD8+

Concernant les LT CD8+ situés dans le **stroma tumoral** :

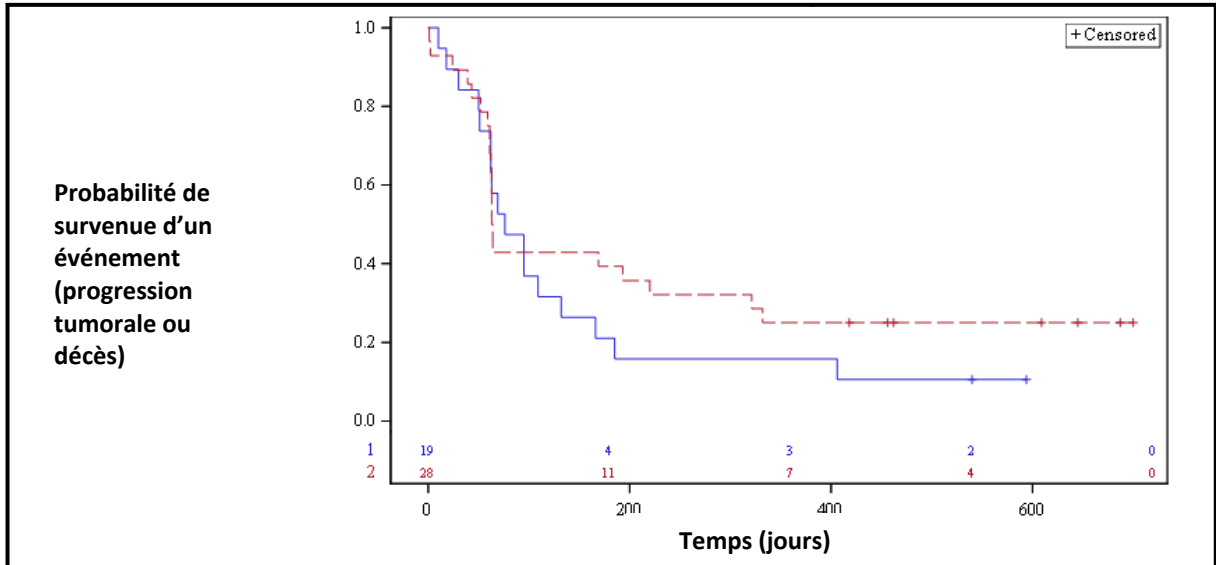


Figure 24 : SSP : en rouge, nombreux LT CD8+ ; en bleu, rares LT CD8+.

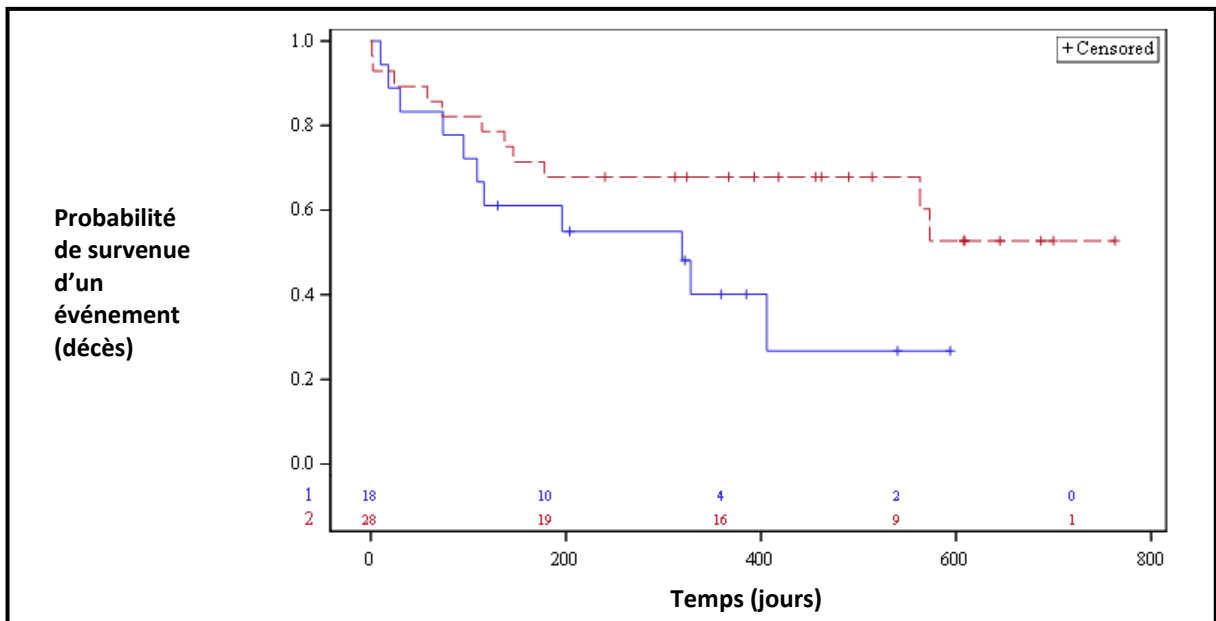
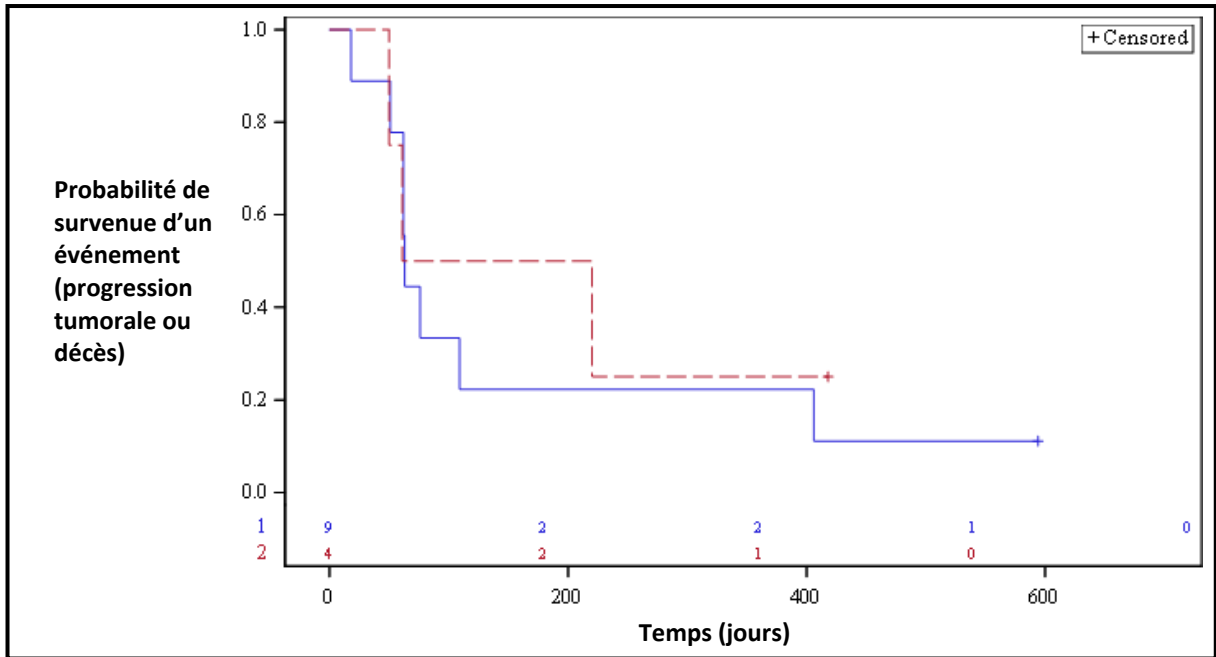
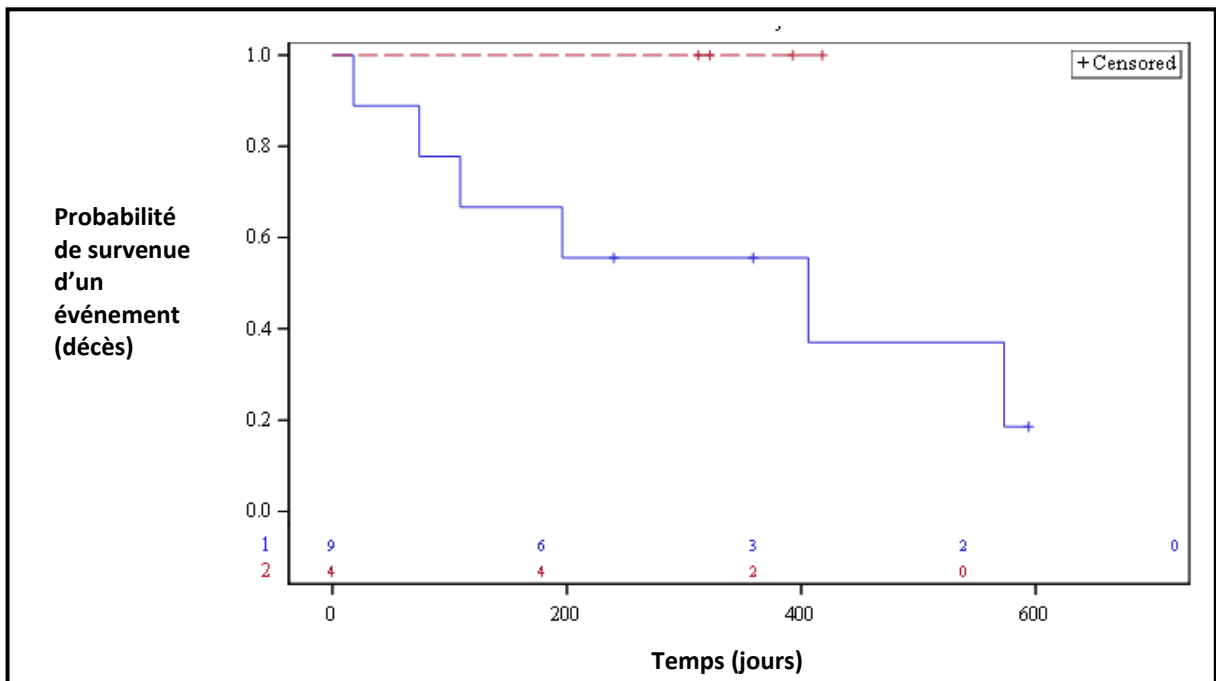


Figure 25 : SG : en rouge, nombreux LT CD8+ ; en bleu, rares LT CD8+.

Concernant les LT CD8+ situés au **front d'invasion tumorale** :



**Figure 26** : SSP : en rouge, nombreux LT CD8+ ; en bleu, rares LT CD8+.



**Figure 27** : SG : en rouge, nombreux LT CD8+ ; en bleu, rares LT CD8+.

Concernant les LT CD8+ mêlés aux cellules tumorales :

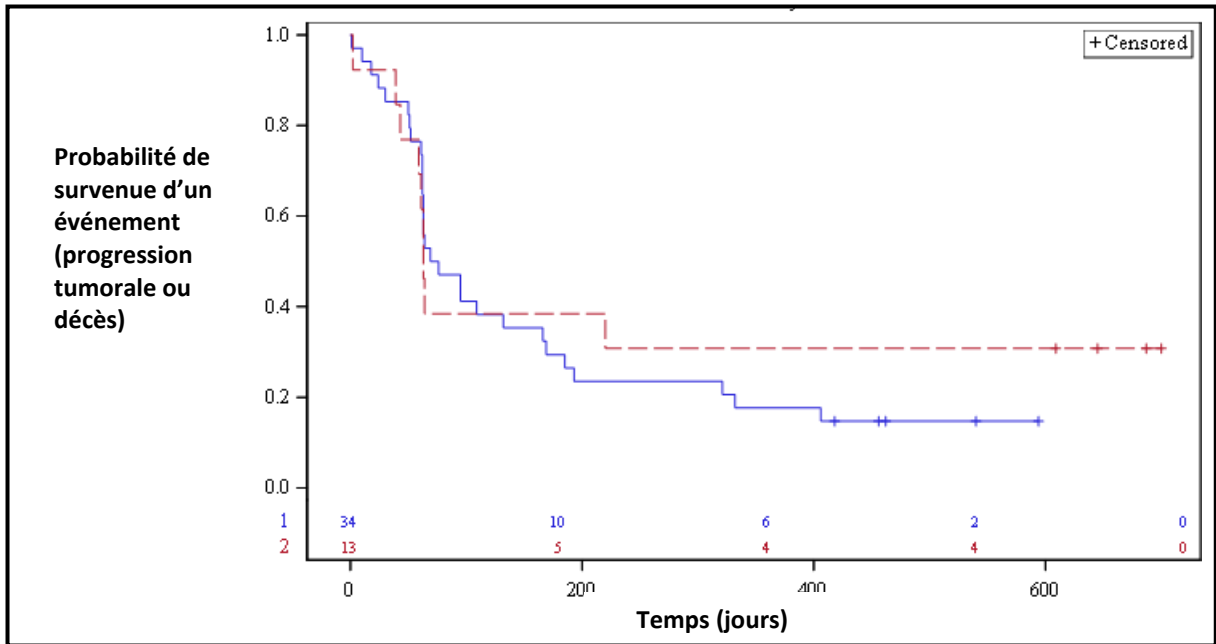


Figure 28 : SSP : en rouge, nombreux LT CD8+ ; en bleu, rares LT CD8+.

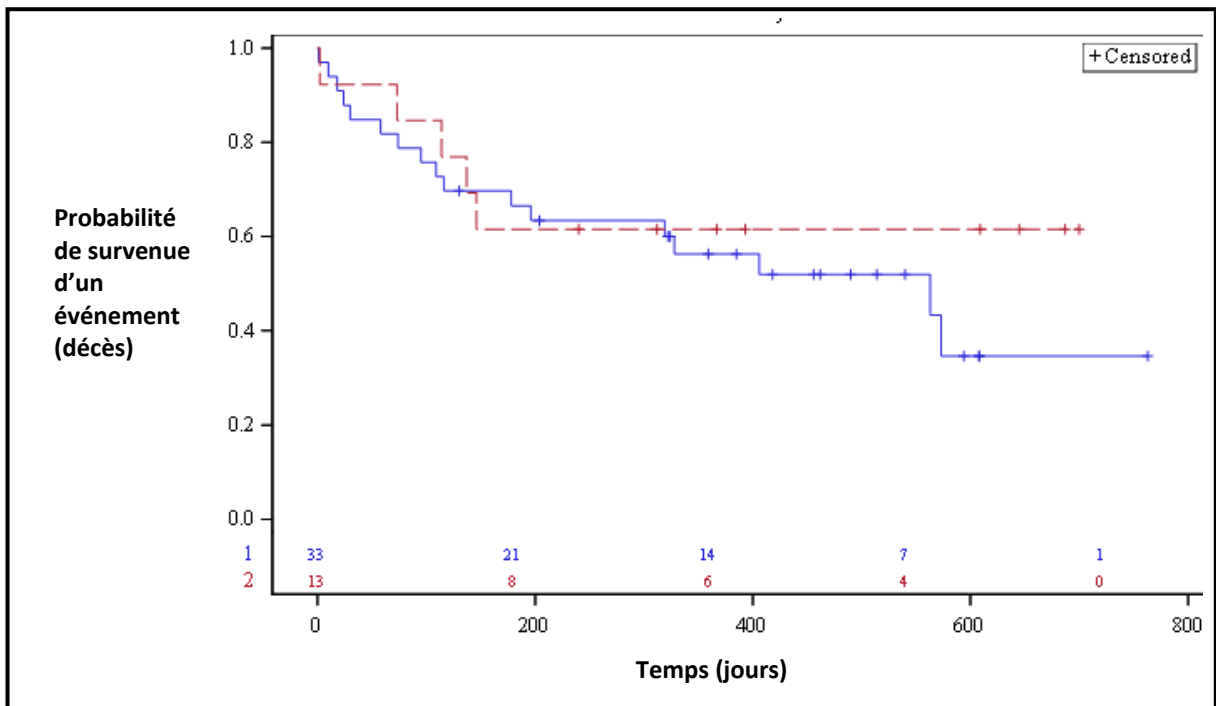


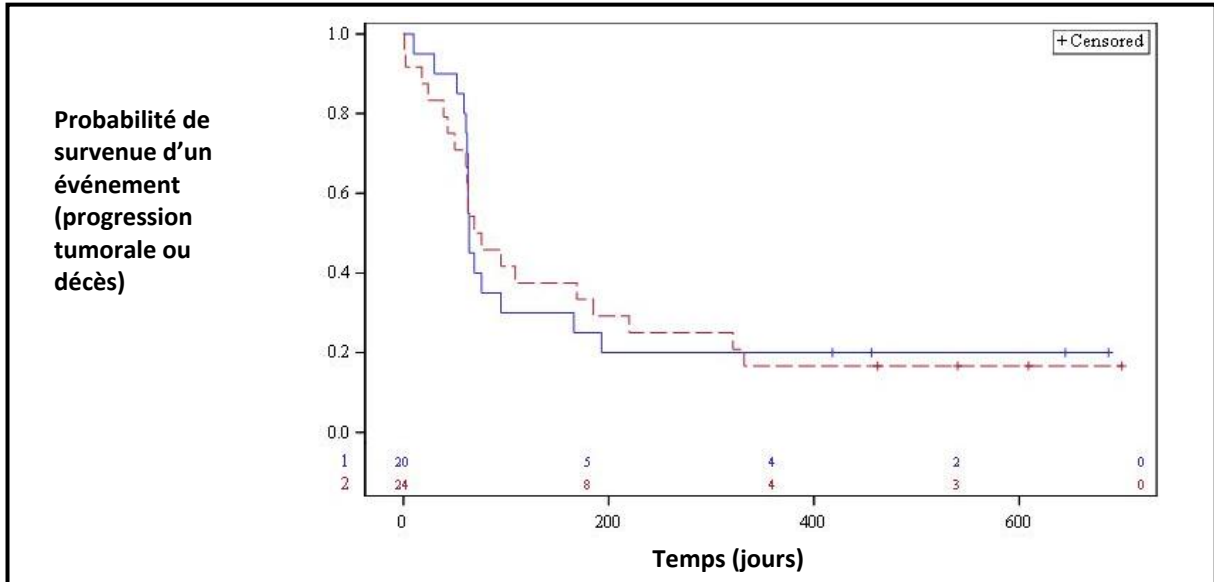
Figure 29 : SG : en rouge, nombreux LT CD8+ ; en bleu, rares LT CD8+.



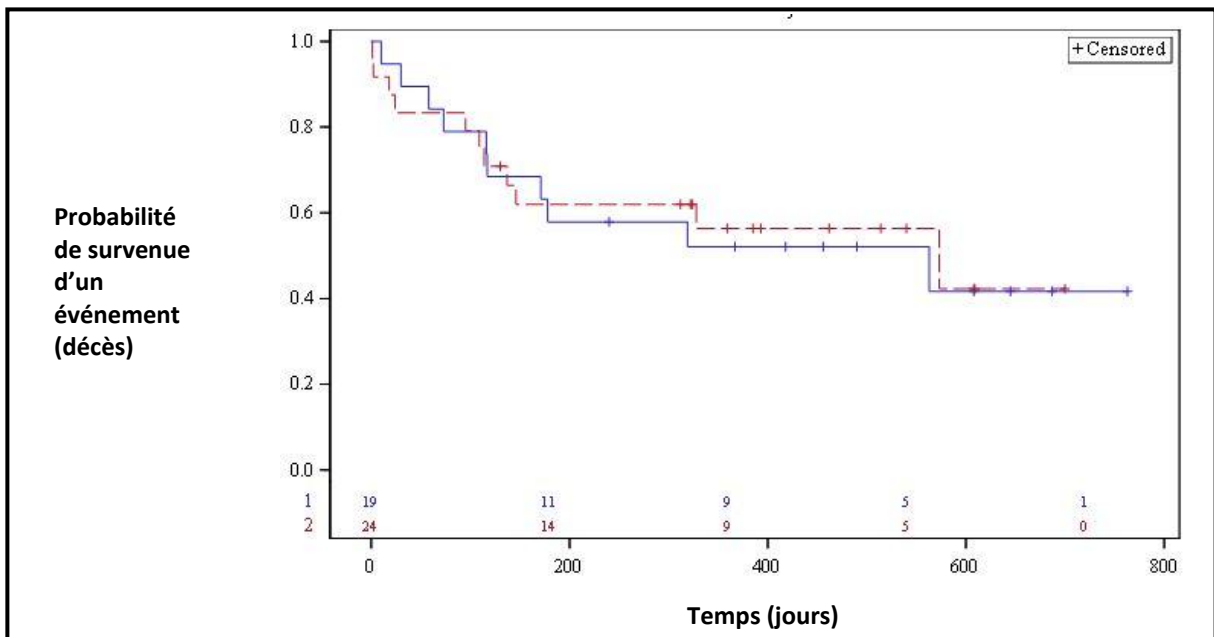
## ANNEXE 5

### Courbes de survie selon la topographie des cellules CD39+

Concernant les cellules CD39+ situées dans le **stroma tumoral** :

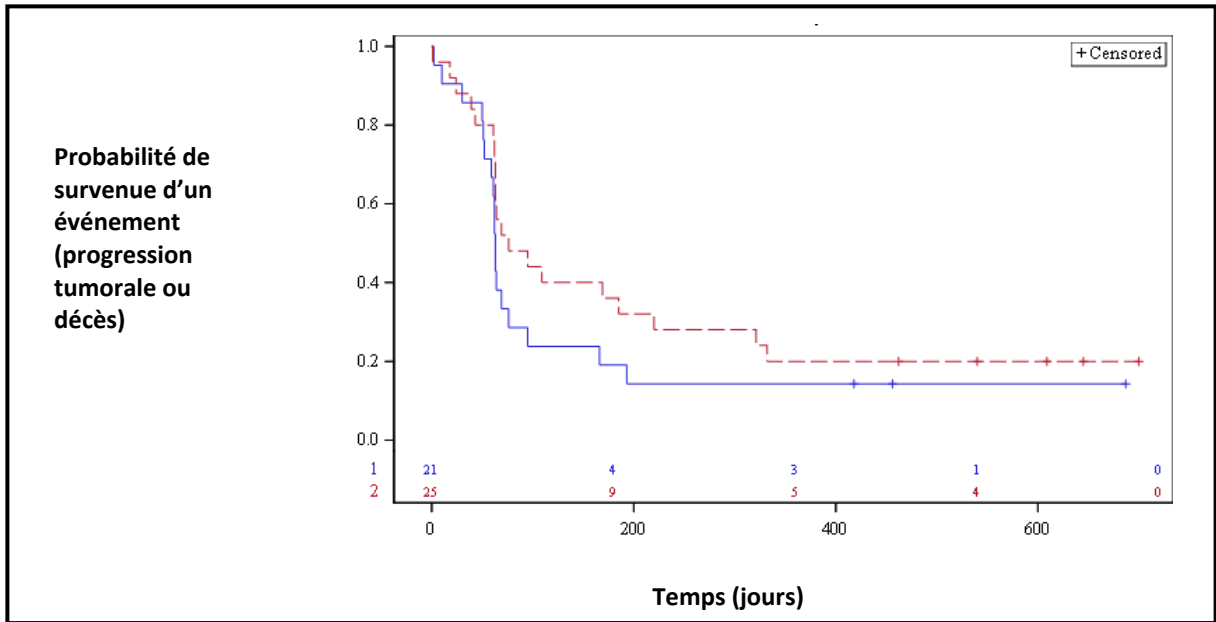


**Figure 30** : SSP : en rouge, nombreuses cellules CD39+ ; en bleu, rares cellules CD39+.

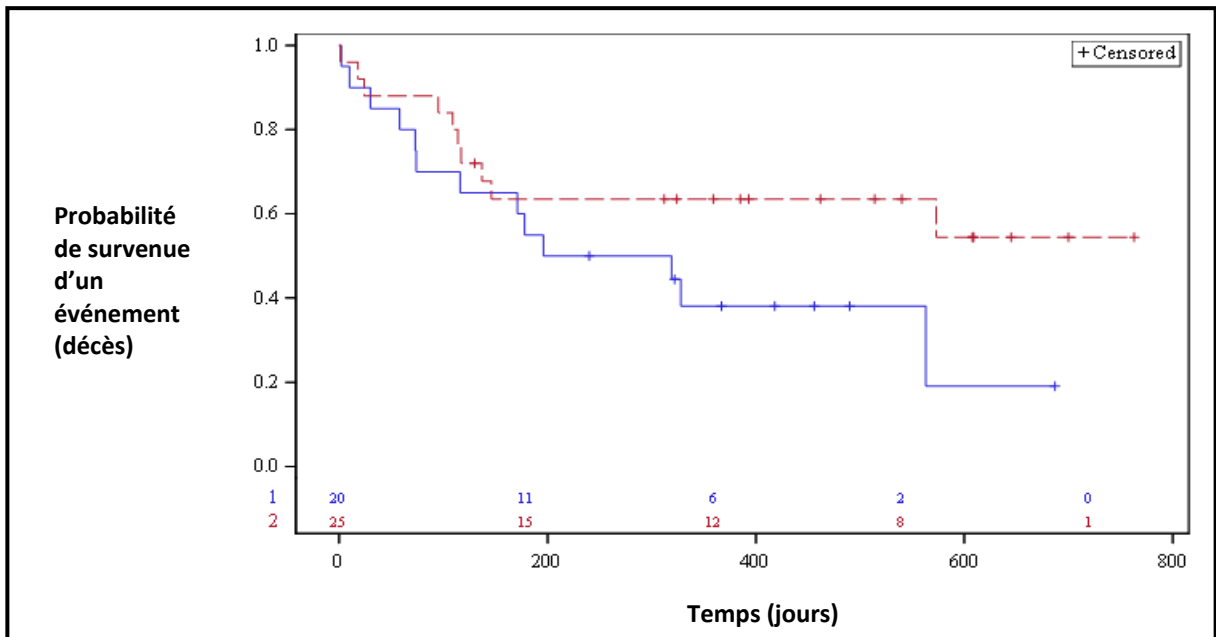


**Figure 31** : SG : en rouge, nombreuses cellules CD39+ ; en bleu, rares cellules CD39+.

Concernant les cellules CD39+ **mêlées aux cellules tumorales** :



**Figure 32** : SSP : en rouge, nombreuses cellules CD39+ ; en bleu, rares cellules CD39+.



**Figure 33** : SG : en rouge, nombreuses cellules CD39+ ; en bleu, rares cellules CD39+.



Concernant la présence d'un **encorbellement** :

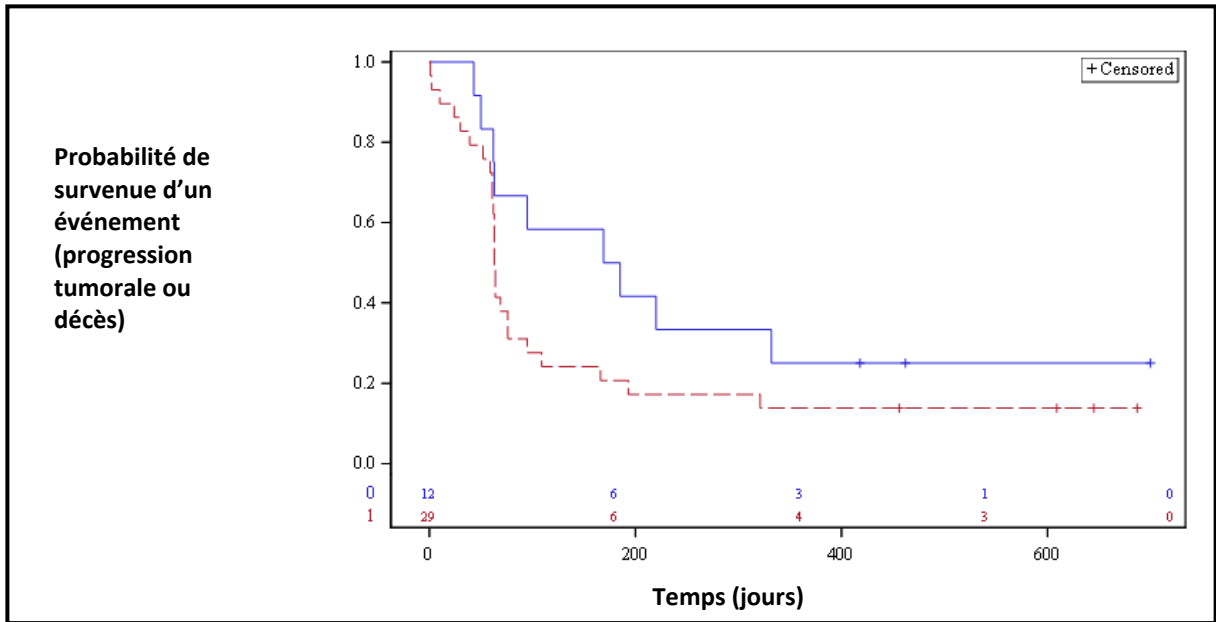


Figure 34 : SSP : en rouge, absence ; en bleu, présence

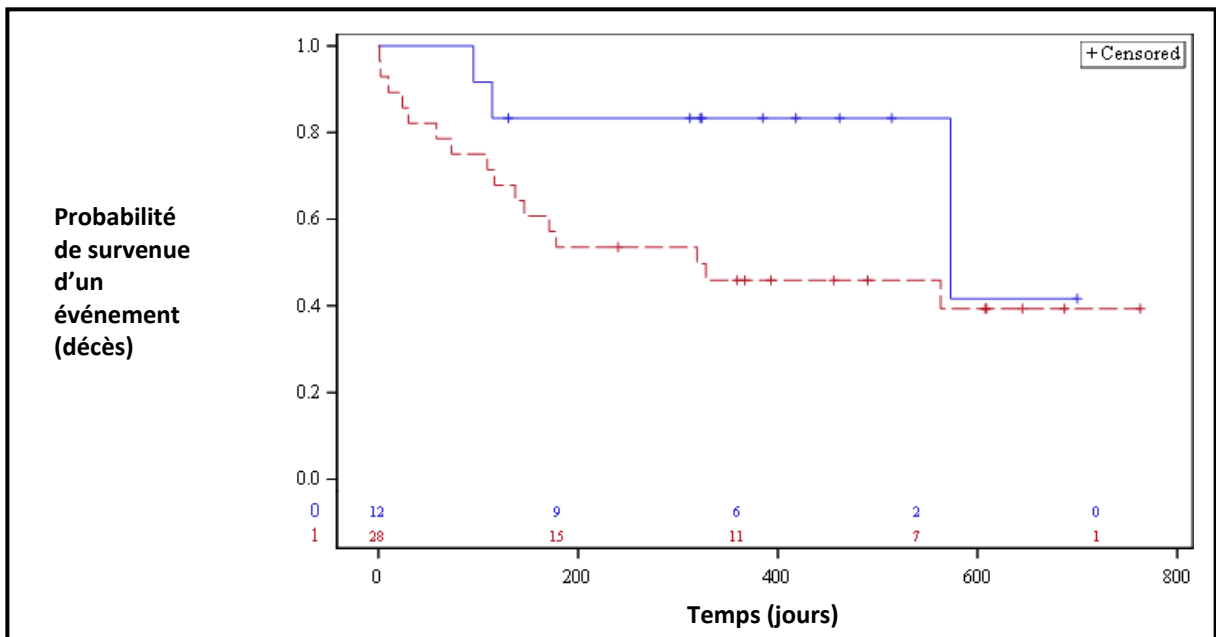


Figure 35 : SG : en rouge, absence ; en bleu, présence



## **ANNEXE 6**

### **Variation du TPS PD-L1 au cours de la séquence thérapeutique**

**Nous disposons de six cas pour décrire les variations du TPS PD-L1 après chimiothérapie (entre autres traitements). Le TPS PD-L1 a augmenté dans trois cas (cas n°1 à 3). Le TPS PD-L1 est resté stable dans trois cas (cas n°4 à 6).**

#### **Cas n° 1 :**

Le TPS PD-L1 a d'abord été évalué à 30% en 2013, sur le prélèvement diagnostique effectué avant tout traitement. Il s'agissait d'une pièce de résection d'un nodule pulmonaire.

Ce patient a ensuite bénéficié de différents traitements : chimiothérapie en 1<sup>ère</sup> ligne (cisplatine, alimta), puis crizotinib, puis ceritinib, puis lorlatinib.

Puis en 2018, le TPS PD-L1 a été évalué à 80% sur un prélèvement effectué après les traitements cités ci-dessus et avant immunothérapie par pembrolizumab. Il s'agissait d'une ponction sous EBUS de ganglions médiastinaux. Ce TPS PD-L1 a été réalisé à visée thérapeutique.

Ce patient a bénéficié de huit cures de pembrolizumab et était non répondeur.

#### **Cas n°2 :**

Le TPS PD-L1 a d'abord été évalué à 20% en 2012, sur le prélèvement diagnostique effectué avant tout traitement. Il s'agissait d'une pièce de

résection chirurgicale pulmonaire.

Ce patient a ensuite bénéficié de différents traitements : chirurgie (segmentectomie atypique avec curage ganglionnaire) et chimiothérapie adjuvante (cisplatine navelbine), puis radiochimiothérapie concomitante (taxol carboplatine).

Puis en 2018, le TPS PD-L1 a été évalué à 100% sur un prélèvement effectué après les traitements cités ci-dessus et avant immunothérapie par pembrolizumab. Il s'agissait d'une biopsie bronchique. Ce TPS PD-L1 a été réalisé à visée thérapeutique.

Ce patient a bénéficié de trois cures de pembrolizumab et était non répondeur.

### **Cas n°3 :**

Le TPS PD-L1 a d'abord été évalué en 2013, sur le prélèvement diagnostique effectué avant tout traitement. Il s'agissait de biopsies bronchiques et d'un curage ganglionnaire médiastinal. Le TPS PD-L1 était évalué à 75% sur les biopsies bronchiques et à 10% sur les métastases ganglionnaires du curage.

Différents traitements ont ensuite été administrés : 1<sup>ère</sup> ligne par chimiothérapie (cisplatine alimta), puis 2<sup>ème</sup> ligne par radiochimiothérapie concomitante (cisplatine navelbine).

Puis en 2014, le TPS PD-L1 a été évalué à 90% sur un prélèvement effectué après les traitements cités ci-dessus, et avant immunothérapie par pembrolizumab. Il s'agissait de biopsies bronchiques.

Ce patient a ensuite bénéficié d'autres traitements : 3<sup>ème</sup> ligne par crizotinib et radiothérapie stéréotaxique, puis 4<sup>ème</sup> ligne par céritinib, puis 5<sup>ème</sup> ligne par

taxol avastin puis taxol seul, puis 6<sup>ème</sup> ligne par brigatinib, puis lorlatinib.

Puis en 2018, le TPS PD-L1 a été évalué à 90% sur un prélèvement effectué après les traitements cités ci-dessus et avant immunothérapie par pembrolizumab. Il s'agissait d'un liquide pleural. Ce TPS PD-L1 a été réalisé à visée thérapeutique.

Ce patient a bénéficié de trois cures de pembrolizumab et était non répondeur.

#### **Cas n°4 :**

Le TPS PD-L1 a d'abord été évalué à 80% en 2016, sur le prélèvement diagnostique effectué avant tout traitement. Il s'agissait d'une pièce de lobectomie pulmonaire.

Différents traitements ont ensuite été administrés : 1<sup>ère</sup> ligne par chirurgie (lobectomie et curage ganglionnaire) et chimiothérapie adjuvante (carboplatine taxol) puis exérèse chirurgicale de la métastase cérébrale ; puis 2<sup>ème</sup> ligne par nivolumab (1 cure).

Puis en 2017, le TPS PD-L1 a été évalué à 80% sur un prélèvement effectué après les traitements cités ci-dessus et avant immunothérapie par pembrolizumab. Il s'agissait d'une métastase cérébrale. Ce TPS PD-L1 a été réalisé à visée thérapeutique.

Ce patient a bénéficié de 13 cures de pembrolizumab et a présenté une réponse partielle.

#### **Cas n°5:**

Le TPS PD-L1 a d'abord été évalué à 5% en 2018, sur le prélèvement

diagnostique effectué avant tout traitement. Il s'agissait d'une pièce de lobectomie pulmonaire.

Ce patient a ensuite bénéficié d'une chimiothérapie adjuvante par cisplatine navelbine.

Puis en 2018, le TPS PD-L1 a été évalué à 1% sur un prélèvement effectué après les traitements cités ci-dessus et avant immunothérapie par pembrolizumab. Il s'agissait d'une biopsie pleurale. Ce TPS PD-L1 a été réalisé à visée thérapeutique.

Ce patient a bénéficié de neuf cures de pembrolizumab et était non répondeur.

#### **Cas n°6 :**

Le TPS PD-L1 a été évalué à 1% en 2018, sur un prélèvement effectué avant tout traitement. Il s'agissait d'une ponction sous EBUS de la masse pulmonaire. Ce TPS PD-L1 a été réalisé à visée thérapeutique.

Puis ce patient a bénéficié d'une chimiothérapie par cisplatine alimta avastin, puis par alimta avastin.

Le TPS PD-L1 a ensuite été évalué à 0% en 2019, sur un prélèvement effectué après les traitements cités ci-dessus. Il s'agissait d'un liquide péricardique.

Ce patient a bénéficié de deux cures de pembrolizumab et était non répondeur.

**Nous disposons de deux cas pour décrire les variations du TPS PD-L1 après immunothérapie par pembrolizumab :**

**Cas n° 1 :**

Le TPS PD-L1 a été évalué en 2018 à 100%, sur un prélèvement effectué après radiochimiothérapie et avant immunothérapie. Il s'agissait de biopsies bronchiques. Ce TPS PD-L1 a été réalisé à visée thérapeutique.

Le TPS PD-L1 a ensuite été évalué à 40%, sur un autre prélèvement datant de 2018, effectué après immunothérapie par pembrolizumab (trois cures). Il s'agissait d'une métastase ganglionnaire.

Ce patient a bénéficié de trois cures de pembrolizumab et était non répondeur.

**Cas n° 2 :**

Le TPS PD-L1 a été évalué à 100% en 2017, sur un prélèvement effectué au diagnostic avant traitement. Il s'agissait de ponctions ganglionnaires médiastinales sous EBUS. Ce TPS PD-L1 a été réalisé à visée thérapeutique.

Le TPS PD-L1 a ensuite été évalué à 40%, sur un autre prélèvement datant de 2018, effectué après immunothérapie par pembrolizumab (deux cures). Il s'agissait d'une métastase intestinale.

Ce patient a bénéficié de deux cures de pembrolizumab.





## ANNEXE 7

### Variation du TPS PD-L1 entre tumeur primitive et métastase

Nous avons comparé le TPS PD-L1 de la tumeur primitive et d'une métastase, lorsqu'ils étaient prélevés au même moment de la séquence thérapeutique, chez un même patient. Nous disposons de cinq cas. Le TPS PD-L1 était concordant dans trois cas et discordant dans deux cas.

Cas	Lésion	Organe	Prélèvement	TPS PD-L1
N°1	Primitif	Poumon	Résection atypique	0%
	Métastase	Foie	Biopsie	0%
N°2	Primitif	Poumon	Biopsie bronchique	100%
	Métastase	Estomac	Biopsie	40%
N°3	Primitif	Poumon	Biopsie bronchique	100%
	Métastase	Estomac	Biopsie	80%
N°4	Primitif	Poumon	Biopsie bronchique	100%
	Métastase	Ganglions médiastinaux	Cytoponction sous EBUS	30%
N°5	Primitif	Poumon	Biopsie bronchique	5%
	Métastase	Ganglions médiastinaux	Cytoponction sous EBUS	0%



**Auteur :** MANSSENS Zoé

**Date de soutenance :** 26 juin 2020

**Titre de la thèse :** apport des marqueurs immunohistochimiques PD-L1, CD8, et CD39 à l'évaluation pronostique et à la prédiction de la réponse thérapeutique, dans le cancer pulmonaire non à petites cellules, traité par pembrolizumab

**Thèse - Médecine - Lille 2020**

**Cadre de classement :** Anatomie et Cytologie pathologiques

**Mots-clés :** cancer pulmonaire non à petites cellules, immunothérapie, pembrolizumab, immunohistochimie, PD-L1, CD8, CD39, encorbellement, pronostic, réponse thérapeutique.

**Résumé :**

L'immunothérapie a révolutionné la prise en charge des cancers du poumon non à petites cellules (CPNPC) de stade avancé. Le taux de réponse au pembrolizumab varie de 18 à 57.3% selon les études. Nous avons étudié le lien entre trois immunomarquages (PD-L1, CD8, CD39) et différents paramètres évolutifs dans le CPNPC traité par pembrolizumab.

L'étude était descriptive, rétrospective, monocentrique, réalisée entre 2012 et 2020. Les patients étaient pris en charge pour un CPNPC au centre hospitalier universitaire (CHU) de Lille. La réponse au pembrolizumab, la durée de cette réponse, la survie sans progression (SSP) et la survie globale étaient évaluées.

Parmi 55 patients, 13 étaient répondeurs, 33 avaient un TPS (Tumor Proportion Score) PD-L1  $\geq$  50%. Le TPS PD-L1 médian des patients répondeurs était significativement plus élevé que celui des patients non répondeurs, toutes lignes de traitement confondues. La réponse et la survie à long terme étaient meilleures lorsque le pembrolizumab était administré en 1ère ligne de traitement. La SSP était meilleure lorsque la tumeur était riche en LT CD8+ ou lorsque des cellules du stroma tumoral exprimant CD39 (cellules CD39+) encerclaient la tumeur (encorbellement).

Le TPS PD-L1 se caractérise par son hétérogénéité. C'est un marqueur prédictif mais imparfait de la réponse au pembrolizumab. Notre étude confirme le lien entre le TPS PD-L1, la place du pembrolizumab dans la séquence thérapeutique et différents paramètres évolutifs. Elle confirme la valeur pronostique de la densité tumorale en lymphocytes T exprimant CD8 (LT CD8+). Elle souligne également l'intérêt pronostique de l'encorbellement.

**Composition du Jury :**

**Président**  
**Assesseurs**

**Directeur de thèse**

**Monsieur le Professeur Arnaud SCHERPEREEL**  
**Monsieur le Professeur Alexis CORTOT**  
**Monsieur le Docteur Simon BALDACCI**  
**Monsieur le Docteur Romain DUBOIS**  
**Madame le Professeur Marie-Christine COPIN**

