

Faculté de Médecine

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

le 11 octobre 2019

Par Nellie DELACOURT

Né(e) le 16 juin 1989 à Le Mans

Mesure de l'expression de PD-1 et PD-L1 à la surface des cellules immunitaires circulantes par cytométrie de flux chez les patients atteints de CBNPC métastatiques : étude préliminaire prospective.

Thèse dirigée par M. le Professeur Alain VERGNENEGRE

Examineurs :

M. le Professeur Boris MELLONI, PU-PH, CHU de Limoges

M. le Professeur Jean FEUILLARD, PU-PH, CHU de Limoges

Mme. le Docteur Julia BALLOUHEY, PH, CHU de Limoges

M. le Docteur Robin JEANNET, CHU de Limoges

Faculté de Médecine

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

Le 11 octobre 2019

Par Nellie DELACOURT

Né(e) le 16 juin 1989 à Le Mans

Mesure de l'expression de PD-1 et PD-L1 à la surface des cellules immunitaires circulantes par cytométrie de flux chez les patients atteints de CBNPC métastatiques : étude préliminaire prospective.

Thèse dirigée par M. le Professeur Alain VERGNENEGRE

Examineurs :

M. le Professeur Boris MELLONI, PU-PH, CHU de Limoges

M. le Professeur Jean FEUILLARD, PU-PH, CHU de Limoges

Mme. le Docteur Julia BALLOUHEY, PH, CHU de Limoges

M. le Docteur Robin JEANNET, CHU de Limoges

Professeurs des Universités - praticiens hospitaliers

Le 1^{er} septembre 2017

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE (Surnombre jusqu'au 31-08-2020)
AUBARD Yves	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AUBRY Karine	O.R.L.
BEDANE Christophe	DERMATO-VENEREOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	O.R.L. (Surnombre jusqu'au 31-08-2018)
BORDESSOULE Dominique	HEMATOLOGIE (Surnombre jusqu'au 31-08-2018)
CAIRE François	NEUROCHIRURGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre	PSYCHIATRIE d'ADULTES
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DES GUETZ Gaëtan	CANCEROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION

DRUET-CABANAC Michel	MEDECINE et SANTE au TRAVAIL
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE (Surnombre jusqu'au 31-08-2018)
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FAUCHER Jean-François	MALADIES INFECTIEUSES
FAVREAU Frédéric	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
FEUILLARD Jean	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAUTHIER Tristan	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
LY Kim	MEDECINE INTERNE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARIN Benoît	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE

MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
MOREAU Jean-Jacques	NEUROCHIRURGIE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE
PARAF François	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
SALLE Jean-Yves	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
SAUTEREAU Denis	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
STURTZ Franck	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
TREVES Richard	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole	CANCEROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VERGNENEGRE Alain	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe	REANIMATION
VINCENT François	PHYSIOLOGIE
WEINBRECK Pierre	MALADIES INFECTIEUSES
YARDIN Catherine	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES A MI-TEMPS DES DISCIPLINES MEDICALES

BRIE Joël	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE
------------------	---

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
BARRAUD Olivier	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
BOURTHOUMIEU Sylvie	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE
BOUTEILLE Bernard	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
CHABLE Hélène	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE (Retraite au 31-07-2018)
DURAND Karine	BIOLOGIE CELLULAIRE
ESCLAIRE Françoise	BIOLOGIE CELLULAIRE
HANTZ Sébastien	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
JACQUES Jérémie	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
JESUS Pierre	NUTRITION
LE GUYADER Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
LIA Anne-Sophie	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
MURAT Jean-Benjamin	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
QUELVEN-BERTIN Isabelle	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
RIZZO David	HEMATOLOGIE
TCHALLA Achille	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
TERRO Faraj	BIOLOGIE CELLULAIRE
WOILLARD Jean-Baptiste	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie	ANGLAIS
-----------------------	---------

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

BUCHON Daniel	(Maintenu en fonction jusqu'au 31.08.2019)
DUMOITIER Nathalie	(Responsable du département de Médecine Générale)

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

MENARD Dominique	(du 1 ^{er} septembre 2016 au 12 janvier 2018)
-------------------------	--

PREVOST Martine (du 1^{er} septembre 2015 au 31 août 2018)

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

HOUDARD Gaëtan (du 1^{er} septembre 2016 au 31 août 2019)

LAUCHET Nadège (du 1^{er} septembre 2017 au 31 août 2020)

PAUTOUT-GUILLAUME Marie-Paule (du 1^{er} septembre 2015 au 31 août 2018)

PROFESSEURS EMERITES

ADENIS Jean-Paul du 01.09.2017 au 31.08.2019

ALDIGIER Jean-Claude du 01.09.2016 au 31.08.2018

BONNAUD François du 01.09.2017 au 31.08.2019

DE LUMLEY WOODYEAR Lionel du 01.09.2017 au 31.08.2019

DENIS François du 01.09.2017 au 31.08.2019

GAINANT Alain du 01.09.2017 au 31.08.2019

MERLE Louis du 01.09.2017 au 31.08.2019

MOULIES Dominique du 01.09.2015 au 31.08.2018

VALLAT Jean-Michel du 01.09.2014 au 31.08.2018

VIROT Patrice du 01.09.2016 au 31.08.2018

Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

Le 1^{er} janvier 2018

ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES

BASTIEN Frédéric	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
BAUDRIER Fabien	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
CHARISSOUX Aurélie	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
CHARPENTIER Mathieu	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
DUCHESNE Mathilde	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
FAYE Piere-Antoine	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
GAUTHIER François	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
KONG Mélody	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
LARRADET Matthieu	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE (Démission à compter du 1 ^{er} janvier 2018)
LEGRAS Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION (Surnombre du 1 ^{er} novembre 2017 au 20 février 2018 inclus)
MARQUET Valentine	HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE et CYTOGENETIQUE

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX

AZAÏS Julie	MEDECINE INTERNE A
BAUDONNET Romain	OPHTALMOLOGIE
BIDAUT-GARNIER Mélanie	OPHTALMOLOGIE (A compter du 11 mai 2016)
BLOSSIER Jean-David	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
BOSETTI Anaïs	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
BOUKEFFA Nejma	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BOUSQUET Pauline	PEDIATRIE (A compter du 09 janvier 2017)
CHAMPIGNY Marie-Alexandrine	PEDIATRIE
CHRISTOU Niki	CHIRURGIE DIGESTIVE

COLOMBIÉ Stéphanie	MEDECINE INTERNE A (A compter du 02 mai 2017)
COMPAGNAT Maxence	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
CROSSE Julien	PEDIATRIE
DANTHU Clément	NEPHROLOGIE
DARNIS Natacha	PEDOPSYCHIATRIE
DELUCHE Elise	CANCEROLOGIE
DE POUILLY-LACHATRE Anaïs	RHUMATOLOGIE (A compter du 02 mai 2017)
DIDOT Valérian	CARDIOLOGIE
DUSSAULT-JARLAN Lucile	CARDIOLOGIE
EVARD Bruno	REANIMATION
FAURE Bertrand	PSYCHIATRIE d'ADULTES
FAYEMENDY Charlotte	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
GORDIENCO Alen	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE
GOUDELIN Marine	REANIMATION
HARDY Jérémy	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
JASMIN Michèle	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE (à compter du 1er janvier 2018)
KRETZSCHMAR Tristan	PSYCHIATRE d'ADULTES
LACHATRE Denis	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
LACOSTE Marie	MALADIES INFECTIEUSES
LAFON Thomas	MEDECINE d'URGENCE
LAHMADI Sanae	NEUROLOGIE
LATHIERE Thomas	OPHTALMOLOGIE
LEHMAN Lauriane	GASTROENTEROLOGIE
LEPETIT Hugo	GASTROENTEROLOGIE
MARGUERITTE François	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE

MARTINS Elie	CARDIOLOGIE
ORLIAC Helene	RADIOTHERAPIE
PRUD'HOMME Romain	DERMATOLOGIE-VENERELOGIE
RAMIN Lionel	ORL
ROUCHAUD Aymeric	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE (NRI)
ROUSSELLET Olivier	NEUROLOGIE
SALLE Henri	NEUROCHIRURGIE
SANGLIER Florian	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
TAÏBI Abdelkader	ANATOMIE
USSEGLIO-GROSSO Julie	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE et STOMATOLOGIE
VAYSSE VIC Mathieu	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
VITAL Pauline	MEDECINE INTERNE B
VITALE Gaetano	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE

CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE

DOIN Corinne
RUDELLE Karen
SEVE Léa

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

BALLOUHEY Quentin	CHIRURGIE INFANTILE (du 1er mai 2015 au 30 avril 2019)
CROS Jérôme	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION (du 1 ^{er} mai 2014 au 31 octobre 2018)
LERAT Justine	O.R.L. (du 1er mai 2016 au 31 octobre 2020)
MATHIEU Pierre-Alain	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE (du 1er mai 2016 au 31 octobre 2020)

Remerciements

A mon Directeur de thèse

M. le Professeur Alain VERGNENEGRE, Professeur des Universités, Epidémiologie, Santé publique, Chef de service de pôle Oncologie Médicale, Médecin des Hôpitaux

Je vous remercie sincèrement de m'avoir soutenue pendant toutes mes années d'internat, pour chacun des projets que j'ai entrepris.

Je vous témoigne ma profonde reconnaissance pour avoir pris le temps de m'écouter et de discuter avec moi un nombre incalculable de fois au sujet de mon choix de carrière.

A vos côtés, j'ai pu trouver confiance et mener à bien mes stages et travaux.

Si mon choix s'oriente aujourd'hui vers un poste de Praticien Hospitalier, je ne suis pas sans penser, avec un brin de nostalgie, à l'honneur que vous m'avez fait en me proposant une carrière Universitaire.

Au Président du jury

M. le Professeur Boris MELLONI, Professeur des Universités, Chef de service de Pneumologie, Médecin des Hôpitaux

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du service avec beaucoup de gentillesse et d'accessibilité.

A mes juges

M. le Professeur Jean FEUILLARD, Chef de service d'Immunologie et d'immunogénétique du CHU de Limoges

Je vous remercie d'avoir mené ce travail collaboratif avec beaucoup de sympathie et de professionnalisme. Je vous remercie également pour votre disponibilité et votre écoute.

Mme le Dr Julia BALLOUHEY, Praticien Hospitalier, Unité d'Oncologie Thoracique et Cutanée, CHU de Limoges

Merci Julia de m'avoir tant appris pendant cet internat, sur le plan médical, technique et relationnel. En plus de te faire part de ma plus grande reconnaissance en te considérant comme un modèle, je te déclare une amitié sincère et durable. Je n'oublie pas de saluer Quentin, Anna, Arthur et Clara.

Au membre invité

M. le Dr Robin JEANNET

Je te remercie pour ta motivation et ta disponibilité. Travailler à tes côtés pendant ces 2 ans était un plaisir et soutien, je t'en suis très reconnaissante. Je te souhaite de persévérer dans ta réussite professionnelle et ton épanouissement personnel.

A mes Chefs, Séniors et Co-internes

Dr Thomas EGENOD, Praticien Hospitalier, Unité d'Oncologie Thoracique et Cutanée, CHU de Limoges
Merci de m'avoir donné envie de me spécialiser en Oncologie Thoracique, de m'avoir transmis un savoir et savoir-faire à travers des techniques innovantes. Je te remercie de m'avoir soutenue, guidée et accompagnée durant mes stages, mais par-dessus tout, de m'avoir fait confiance.

Dr Yannick SIMMONEAU, Chef de Clinique, Unité d'Oncologie Thoracique et Cutanée, CHU de Limoges
Merci pour ta gentillesse et ton soutien.

Dr Rémi VEILLON, Praticien Hospitalier, service d'Oncologie Thoracique, CHU de Bordeaux
Merci pour ces six mois passés au sein de l'unité d'Oncologie Thoracique de Bordeaux.

Dr Aude SAIN-PAUL, Praticien Hospitalier, Service de Pneumologie, île de la Réunion
Merci pour ta bonne humeur durant les deux semestres passés à ses côtés. A bientôt peut être pour un nouveau dîner les pieds dans le sable.

Dr Helene ORLIAC, Chef de Clinique, Service de radiothérapie, CHU de Limoges
A tes conseils en radiothérapie. A notre amitié et nos déjeuners blabla. Merci d'avoir été là pour moi et pour avoir eu des paroles rassurantes au quotidien. J'ai aimé travailler à tes côtés, j'espère te revoir souvent en dehors du CHU.

Dr BELLET Elisabeth, Praticien Hospitalier, Service de Pathologies Respiratoires
Merci pour ton peps, ta gentillesse inégalable, ton écoute et ton soutien. Les patients ont raison de reconnaître ton implication et ton dévouement au quotidien. Je vous embrasse, toi, Camille et Louise et je vous souhaite beaucoup de bonheur.

Dr DUPUY GRASSET, Praticien Hospitalier, Service de Pathologies Respiratoires
Merci pour ton énergie, ta gentillesse et ta bonne humeur.

Dr TOURAINE, Praticien Hospitalier, Service de Pathologies Respiratoires
Merci pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre dévouement.

A Matthieu, mon binome.

Ces quelques lignes auront du mal à décrire notre amitié soudée. Tu as su être là dans les bons comme dans les mauvais moments et je t'en serai éternellement reconnaissante. Ta rencontre m'a apporté beaucoup et tu restes à mes yeux mon plus gros coup de cœur amical. J'aurai aimé travailler avec toi sur la durée afin de profiter de tes mérites et de notre complicité. Je te souhaite plein de bonheur auprès d'Aurélie et de Louis que j'embrasse tous les deux. Tes épaules vont me manquer grand frère.

A Philippe-Olivier et Camille.

A notre amitié et votre union. Merci pour ces heures passées sur votre canapé. Bon vol vers la Réunion, j'espère venir vous rendre visite très prochainement. Vous allez me manquer. Je vous adore. A la fondue chinoise. Au mariage.

A Benoit, Sophie, Thomas C., Valentin, mes co-internes.

A nos anecdotes, à nos fous rires et nos repas improvisés. Je pense à vous. La route est longue, parsemée d'embûches mais j'ai une grande confiance en vous et je suis sereine pour la suite de votre parcours.

A Mathilde, Claire, Martin, Tara, Clara, Julie, Pierre et Aurélie, mes co-internes Bordelais.

A ce semestre passé à vos côtés. Vous avez su m'intégrer au mieux. Aux Mosco Moul. A l'Ambassade.

A Anaïs, Gladys, Aurélia, Audrey, Raphaël Serre, Elodie, Freddy, Raphaël Sanchez, Léa, Yacine, mes co-internes d'adoption. A Stéphanie et Laurie.

A ma famille et mes proches

A ma Mère, Mum.

Je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien, tes paroles réconfortantes et protectrices. Trente ans ont déjà passé, trente ans de complicité entre « Nellyies », malgré la distance qui nous sépare depuis mes 17 ans. Je te suis redevable de tout ce parcours, tu as su me motiver et m'encourager au quotidien. Je suis très heureuse d'avoir grandi à tes côtés, d'avoir acquis tes valeurs et de te voir au premier rang en ce jour si important pour moi. Je t'aime. Chère Docteur de Ton cœur.

A Guy, qui prend soin de toi au quotidien et qui m'a soutenue pendant ces dernières années.

A Mamie

J'espère te rendre fière. Je te souhaite une bonne santé.

A Alexis.

« Loin des yeux, près de la thèse ». Et pourtant... L'année 2019 concrétise avant tout notre rencontre. Saches que tu m'apportes beaucoup au quotidien et ce, depuis le premier jour de notre histoire. J'espère que nous irons loin ensemble. J'irai te voir à Tahiti car je suis prête à tout pour toi et pour les plages paradisiaques ☺. Je sais que cette épreuve nous attend mais nous saurons la surmonter ensemble. Merci de m'avoir tant soutenue. Merci de m'avoir supportée pendant cette thèse. Je t'aime.

A la famille Ardouin, à mon frère Jean-Noël, Anne-Sophie, Timéo et Lilou.

Timeo, peux-tu lire ces lignes à voix haute s'il te plaît ? Je vous remercie pour tous ces bons moments passés à vos côtés, JN et Anne-Sophie. J'espère vous avoir rendus fiers de mon parcours. Je remercie mon neveu et ma nièce, Timéo et Lilou, pour nos moments de complicité, de jeux et de joie. JN, je te remercie d'offrir à maman des séjours à Annecy et des moments inoubliables avec ses petits-enfants. Sache que je suis triste de ne pas te compter présent en ce jour si important pour moi...

Aux « meufs », aux copines

A Célia.

A toi, ma grande sœur, ma meilleure amie.

Si je le pouvais, je signerais une colocation avec toi à vie. Tu incarnes pour moi un modèle de féminité, de douceur, de gentillesse et de bravoure. Je suis fière de ton parcours et stupéfaite de ton courage au quotidien. Merci pour tous ces moments de complicité. Tu as su me transmettre de vraies valeurs. Tu es brillante dans la vie professionnelle et rayonnante dans la vie personnelle. Ne l'oublie pas.

A nos achats impulsifs. A tes conseils avisés. A tes mots de réassurance. Au Vatican que tu as cassé. Promis, je mangerai moins salé.

Embrasse ta famille pour moi.

A Charlotte et Claudia, du groupe « Traitement de la crise ».

A notre amitié soudée, à nos moments de panique et nos moments de réconfort. A notre comité Golden. A nos heures perdues devant l'IDLT. A nos GIFs toujours plus emblématiques. A nos vacances en Espagne. Je vous adore les filles, ne changez rien.

La bise à Yanis et Briec.

A Louise, Lucie, Julie, du groupe « Balance ton chaton ».

A notre rencontre chez Claudia. A nos Spritz et nos préfous. Ce mémoire de thèse valide que le préfou à l'ail est le meilleur. A nos feux de camps toujours plus solidaires. A Patrick, le vrai chaton.

A Eline, ma binome.

Au stress qu'on aura canalisé ensemble et à ces bonnes parties de régales et rigolades. J'espère te revoir souvent avec Nicolas D. Vous êtes extra, ne changez pas.

A Sonia

Merci à Limoges d'avoir permis notre rencontre et notre amitié soudée. Excuse-moi pour cette année d'absence. Je suis contente de te pouvoir repasser du temps avec toi et persuadée que tout ira pour le mieux de ton côté malgré les rebondissements. Je te souhaite plein de bonheur. Tu le mérites.

A Clémentine

A ma co-interne et ma co-thésarde de cœur. A notre amitié tardive mais certaine. Tu vas me manquer.

A Elise

A notre amitié. Merci pour ton soutien. Je suis impressionnée par ton savoir. J'aurai aimé poursuivre le chemin universitaire à tes côtés. Je te souhaite de persévérer dans ta réussite exemplaire. Tu le mérites largement.

A Tiffany et Oli

A nos repas chez Mamie Bigoude. A notre « arbre internalogique ».

A mes amis

A Philippe O.

A toi mon meilleur ami wakeborder.

A notre complicité et amitié à toutes épreuves. J'ai gardé confiance en moi grâce à toutes tes paroles encourageantes. Je t'en serai éternellement reconnaissante. Je suis comblée de te compter parmi mes amis les plus chers. Sache que je resterai toujours là pour toi. Je te souhaite plein de bonheur et d'épanouissement dans ta vie personnelle et professionnelle. Tu le mérites.

A Romain, « PU-PH ».

A ton mérite, tes publications et ta volonté exemplaire d'aller toujours plus loin. A ton soutien sans faille. A ton « content de te voir » qui me comble de joie au quotidien. A notre amitié sur laquelle je peux compter sans commune mesure. A nos colocations sur Bordeaux et sur Limoges. Aux travaux de la rue Fondaudege. A nos soirées « thèse » et nos tisanes party. A ce dossier d'inter-CHU que tu as sauvé. A ce brunch chez Gordon Ramzay. A Philippe Etchebest qui doit être jaloux. A nos phrases pépites et notre boulier. Aux parties de Nerf. A Jurassic Park. A notre sponsor « Faudra Tiff Hair », et surtout à Georges Vé... N'oublie pas : tu es un chef d'œuvre que j'adore profondément. A la rayonnante petite Jeanne avec qui je te sens heureux et comblé. A ses tartes au citron meringué. Bonne route sur Poitiers.

A Maxime

A toi mon colocataire de choc. A ces 3 années passées rue François Chenieux. A nos « bagarres » improvisées. Tu vas me manquer. A Clémentine que j'embrasse (« hey coucou toi »). Je vous souhaite une bonne installation tous les deux. Je reviendrai vous voir à Limoges.

A Nabil.

A mon voisin de l'internat. A mon coloc. A nos moments de complicité que je n'oublierai jamais. A Claire avec qui je te sens très heureux. Bonne route à tous les deux. A très vite sur Bordeaux.

A Eve et Chris.

A cette nouvelle amitié pérenne. Merci de m'avoir aidée à construire ce projet. Sortez l'apéro, je vous rejoins très vite.

A Abdel

Merci de m'avoir redonné confiance à quelques mois de la thèse. Merci d'avoir pris le temps de me conseiller afin de mener à bien ce travail.

A Nicolas R

Merci de m'avoir conseillée un bon logiciel. Bonne route.

Aux collègues indispensables

A Pauline, Charlène, Marie, Perrine, Mylène, Gwen, Amélie L., Marion, Martine, Baptiste, Sophie C., Emmanuelle, Sonia, Barbara, Valou, Nath, Amélie P., Christelle T., Khedidja, Christelle B, Cyrielle, Severine D., Lucie, Aurore, Léonore, Sophie L, Severine Z, Magalie, Dominique, Mumu, Céline C, Céline W, Kevin.

Aux dream teams de l'UOTC et du Cluzeau.

A Fabienne

A ma secrétaire préférée. Merci pour tout et bonne continuation. Bonne santé à toi et aux gens qui t'entourent. Tu vas me manquer.

A Patricia

A notre rencontre en radiothérapie. A ta bonne humeur et ton énergie débordante. Merci de m'avoir soutenue. J'en profite pour saluer toute la sympathique équipe de radiothérapie.

A Annie

A ma petite Annie. Reste forte. Tu es pleine de courage.

A Laurence

L'HDJ ne serait pas pareille sans toi...

A Marie-Sophie, Solange, Sarah et Marie Laure

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique	LT CD-8: lymphocyte T CD8
ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase	Mature Gran: Mature granulocyte
AMM: Autorisation de Mise sur le Marché	M-CSF: Monocyte Colony Stimulating Factor
ARG-1: Arginase-1	M-MDSC: Monocytic Myeloid Suppressor Cells
ASCO: American Society of Clinical Oncology	MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cells
BRAF: B-Raf Proto-Oncogene	MMP9: Métalloprotéinase Matricielle 9
CBNPC : Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules	MP: Monocyte Progenitor
CBP: Cancer broncho-pulmonaire	NFS: Numération Formule Sanguine
CHU : Centre Hospitalier Universitaire	NGS: Next Generation Sequencing
CI: cellule immunitaire	NK: Natural Killer
CMF: cytométrie de flux	OR: Objective Response
CTC: cellule tumorale circulante	PBS: phosphate buffered saline
CTL: cytotoxic T lymphocyte	PCT : pourcentage de cellules tumorales
CTLA4 : Cytotoxic T Lymphocyte Associated protein 4	PD-1 : Programmed cell Death Protein-1
DC : dendritic cell	PD-L1 : Programmed Death Ligand-1
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor	PD-L2: Programmed Death Ligand-2
ELISA : Enzyme-linked Immunosorbent Assay	PI3K-AKT : Phospholinositide 3-Kinase -protein Kinase B
G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor	PMN-MDSC: Polymorphonuclear myeloid derived suppressor cells
GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor	PS : performans status
G-MDSC : Granulocyte- Myeloid Derived Suppressor Cells	PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
GMP: Granulocyte Monocyte Progenitor	ROS1: proto-oncogene tyrosine- protein kinase
GB: globule blanc	RR: relative risk
GP: Granulocyte Progenitor	OR: odds ratio
HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2	ORR: objective response rate
HLA: Human Leukocyte Antigen	RCP: Réunion de concertation pluridisciplinaire
HR: Hazard Ratio	RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
ICC: immunocytochimie	ROC: receiver operating characteristic
ICI: inhibiteur de check-point immunitaire	SG: survie globale
IHC: immuno-histochimie	SSP: survie sans progression
IMC : Immature myeloid cells	STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3
IMF : intensité moyenne de fluorescence	STK11: Serine / Threonine Kinase 11
Imm Gran : Immature granulocyte	TAM: Tumor Associated Macrophage
INCa : Institut National du Cancer	TCR: T-cell Receptor
INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale	TIL: tumor infiltrating lymphocyte
ISET: isolement par taille des cellules tumorales	TIM-3: T-cell Immunoglobulin and Mucine - domain containing-3
JAK : Janus Kinase	TLR: Toll Like Receptor
KRAS: Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog	TMB: Tumor Mutational Burden
LB: lymphocyte B	Treg : lymphocyte T régulateur
LT: lymphocyte T	VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
LT CD-4: lymphocyte T CD4	WBC: white blood cell

Table des matières

Introduction.....	25
I. PREMIERE PARTIE : RAPPELS	27
I.1. Le Cancer Broncho-Pulmonaire : généralités	27
I.2. L'axe PD-1 / PD-L1 dans le CBNPC.....	27
I.2.1. Définition et rôle du couple PD-1 / PD-L1	27
I.2.2. L'approche anti- PD-1 / PD-L1 et les inhibiteurs de check-points immunologiques (ICI)	28
I.3. Expression tumorale de PD-L1 dans le CBNPC.....	30
I.3.1. Mécanismes impliqués dans la surexpression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales	30
I.3.2. Prévalence de l'expression de PD-L1 dans les CBNPC avancés ou métastatiques	30
I.3.3. Expression de PD-L1 et hétérogénéité intra-tumorale	30
I.3.4. Expression lymphocytaire et micro-environnementale de PD-1 et PD-L1 dans le CBNPC.....	31
I.3.5. Spécificités des MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells).....	31
I.4. Valeur pronostique et prédictive de l'expression de PD-L1 dans le CBNPC	33
I.4.1. Valeur pronostique de l'expression de PD-L1 dans le CBNPC.....	33
I.4.2. Valeur prédictive de la réponse aux anti-PD-1 / PD-L1	34
I.5. L'émergence de nouveaux biomarqueurs	35
I.6. Evaluation de l'expression de PD-L1	36
I.6.1. Evaluation immuno-histochimique (IHC) de l'expression de PD-L1 dans le CBNPC	36
I.6.1.1. Phase pré-analytique.....	36
I.6.1.2. Phase analytique	36
I.6.1.3. Limites de la méthode immuno-histochimique.....	37
I.6.2. Evaluation de l'expression de PD-1 et PD-L1 dans le sang et concordance avec l'immuno-histochimie.....	38
I.6.2.1. Etude du taux plasmatique de PD-L1	39
I.6.2.2. Etude de l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales circulantes (CTC).....	39
I.6.2.3. Etude de l'expression de PD-1 à la surface des globules blancs circulants (WBC) : abord du micro-environnement liquide plasmatique et de la réponse aux traitements systémiques	40
I.6.2.4. Etude des MDSC circulantes et de l'expression de PD-L1 à leur surface.....	43
II. MATERIELS ET METHODES	45
II.1. Population de l'étude	45
II.2. Analyse de PD-L1 sur tissu tumoral par immuno-histochimique (IHC) au diagnostic	45
II.3. Analyse de PD-1 et PD-L1 sur sang périphérique par cytométrie de flux (CMF)	46
II.4. Analyses statistiques	48
II.5. Financement de l'étude	49
III. CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION ETUDIEE.....	50
III.1. Caractéristiques cliniques et histo-pathologiques des patients assignés à l'étude	50
III.2. Séquences thérapeutiques, réponses à deux cycles de traitement et données de survie globale et survie sans progression	52

IV. RESULTATS DE L'ANALYSE DE PD-1 A LA SURFACE DES LYMPHOCYTES T CD4 ET CD8 CIRCULANTS PAR CYTOMETRIE DE FLUX	54
IV.1. Expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 circulants au diagnostic.....	54
IV.2. Evaluation de la réponse à la chimiothérapie de première ligne en fonction de l'expression évolutive de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8	55
IV.3. Evaluation de la survie après une chimiothérapie de première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic	57
IV.4. Evaluation de la réponse à l'immunothérapie de première et deuxième ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic	60
IV.5. Evaluation de la survie après une immunothérapie de première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic	61
V. RESULTATS DE L'ANALYSE DE PD-L1 A LA SURFACE DES MDSC CIRCULANTES PAR CYTOMETRIE DE FLUX.....	62
V.1. Expression de PD-L1 sur les MDSC et sous-populations circulantes au diagnostic...	62
V.2. Evaluation de la réponse à la chimiothérapie de première ligne en fonction de l'expression évolutive de PD-L1 sur les MDSC circulantes	63
V.3. Evaluation de la survie après une chimiothérapie de première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 sur les MDSC et sous-populations au diagnostic	65
V.4. Evaluation de la réponse à l'immunothérapie de première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 à la surface des MDSC circulantes au diagnostic	67
V.5. Evaluation de la survie après une immunothérapie de première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 sur les MDSC circulantes au diagnostic	69
VI. DISCUSSION.....	72
VI.1. Faisabilité de l'analyse de l'expression de PD-1 et PD-L1 à la surface des lymphocytes et MDSC circulants	72
VI.2. Comparaison de l'expression de PD-1 et PD-L1 obtenue par cytométrie de flux avec l'expression de PD-L1 obtenue par immuno-histochimie	72
VI.3. Intérêt de la cytométrie de flux dans la prédiction de la réponse à la chimiothérapie de première ligne et de la survie après traitement.....	73
VI.3.1. Intérêt prédictif de l'évaluation de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 au diagnostic.....	73
VI.3.2. Intérêt pronostique de l'étude des MDSC au diagnostic.....	73
VI.4. Intérêt de la cytométrie de flux dans la prédiction de la réponse à la l'immunothérapie de première ligne et de la survie après traitement.....	74
VI.4.1. Intérêt prédictif de l'évaluation de PD-L1 à la surface des granulocytes immatures	74
VI.4.2. Intérêt pronostique de l'évaluation de PD-L1 à la surface des MDSC.....	74
VI.5. Prédiction de la réponse aux traitements de première ligne au regard de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 et de PD-L1 à la surface des granulocytes immatures	74
VI.5.1. Patients traités par chimiothérapie en première ligne.....	75
VI.5.2. Patients traités par immunothérapie en première ligne	75
VI.6. Proposition d'un algorithme décisionnel.....	79
VI.7. Limites de l'étude	80
VII. CONCLUSION	82
VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	83
IX. ANNEXES	88

X. ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	100
Serment d'Hippocrate.....	126

Table des illustrations

Figure 1: Le couple PD-1/PD-L1 et l'échappement immunitaire anti-tumoral [1]	28
Figure 2 : Le couple PD-1/PD-L1 et l'approche anti-PD-1 / PD-L1 [1]	29
Figure 3: Lignées hématopoïétiques dérivées des GMP (Granulocyte-Monocyte Progenitors).	32
Figure 4: Mécanismes de régulation des MDSC au sein du micro-environnement tumoral [30].	33
Figure 5: Aspect courant du marquage IHC PD-L1 dans les CBNPC.....	37
Figure 6: Evaluation de la survie globale et survie sans progression en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4+ lors du diagnostic initial dans une étude menée sur 42 CBNPC avancés.	42
Figure 7: Evaluation de l'association entre la réponse thérapeutique et l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 lors du diagnostic initial dans une étude menée sur 42 CBNPC avancés [48].	42
Figure 8: Stratégie de fenêtrage des différentes sous-populations lymphocytaires mises en évidence par cytométrie de flux.....	47
Figure 9: Stratégie de fenêtrage des différentes sous-populations de MDSC mises en évidence par cytométrie de flux.	48
Figure 10: Diagramme des flux des patients assignés à l'étude.	52
Figure 11: Mise en évidence de l'absence de corrélation entre l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic et le statut PD-L1 obtenu par immuno- histochimie.	55
Figure 12: Comparaison des niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic et au cours de la chimiothérapie de première ligne, entre les patients répondeurs et non répondeurs au traitement.	57
Figure 13: Courbes de survie globale (à gauche) et survie sans progression (à droite) des patients traités par chimiothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes au diagnostic.....	59
Figure 14: Comparaison des niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic entre les patients répondeurs et non répondeurs à l'immunothérapie de première ligne.	61
Figure 15: Mise en évidence de l'absence de corrélation entre l'expression de PD-L1 à la surface des MDSC au diagnostic et le statut PD-L1 obtenu par immuno-histochimie.	63
Figure 16: Courbes de survie globale (à gauche) et survie sans progression (à droite) des patients traités par chimiothérapie en première ligne en fonction du pourcentage de Imm Gran, MMDS et de l'expression de PD-1 sur les MMDSC au diagnostic.	67
Figure 17: Comparaison des niveaux d'expression de PD-L1 sur les MDSC au diagnostic entre les patients répondeurs et non répondeurs à l'immunothérapie de première ligne.....	69

Figure 18: Courbes de survie globale (à gauche) et survie sans progression (à droite) des patients traités par immunothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 à la surface des cellules myéloïdes, MMDSC, Imm Gran et Mature Gran.71

Figure 19: Arbre décisionnel proposé pour le traitement de première ligne des patients atteints de CBNPC métastatiques. IMF : intensité moyenne de fixation.80

Table des tableaux

<i>Tableau 1: Anticorps utilisés en IHC pour la détection de PD-L1, seuils de positivité étudiés dans le CBNPC et traitement associé [54]</i>	38
<i>Tableau 2: Caractéristiques de 6 patients traités par anti-PD-1 en première ligne. Expression de PD-1 sur les CD4 et données de réponse et survie [55]. ACA: adénocarcinome. SCC: carcinome épidermoïde</i>	43
<i>Tableau 3: Caractéristiques cliniques et histo-pathologiques des patients assignés à l'étude</i>	51
<i>Tableau 4: Traitements administrés, réponses à deux cycles et données de survie des patients répartis en trois groupes "Chimiothérapie première ligne", "Immunothérapie première ligne" et "Immunothérapie deuxième ligne".</i>	53
<i>Tableau 5: Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T circulants au diagnostic. ...</i>	54
<i>Tableau 6: Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 circulants au diagnostic, après une et deux cures de chimiothérapie.</i>	55
<i>Tableau 7: Comparaison des niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic et au cours de la chimiothérapie de première ligne, entre les patients répondeurs et non répondeurs au traitement.</i>	56
<i>Tableau 8: Survie globale et survie sans progression des patients traités par chimiothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes au diagnostic. ..</i>	58
<i>Tableau 9: Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 circulants au diagnostic chez les patients traités par immunothérapie anti-PD-1.</i>	60
<i>Tableau 10: Comparaison des niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic entre les patients répondeurs et non répondeurs à deux cures d'immunothérapie anti-PD-1.....</i>	60
<i>Tableau 11: Survie globale et survie sans progression des patients traités par immunothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes au diagnostic. ..</i>	61
<i>Tableau 12: Expression de PD-1 à la surface des MDSC circulantes au diagnostic.</i>	62
<i>Tableau 13: Expression de PD-L1 à la surface des MDSC circulantes au diagnostic, après une et deux cures de chimiothérapie.</i>	64
<i>Tableau 14: Comparaison des niveaux d'expression de PD-L1 sur les MDSC et sous populations au diagnostic et au cours de la chimiothérapie de première ligne, entre les patients répondeurs et non répondeurs au traitement.</i>	65
<i>Tableau 15: Survie globale et survie sans progression des patients traités par chimiothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 sur les MDSC et sous populations.</i>	66
<i>Tableau 16: Expression de PD-L1 à la surface des MDSC circulantes au diagnostic chez les patients traités par immunothérapie anti-PD-1.</i>	68
<i>Tableau 17: Comparaison des niveaux d'expression de PD-L1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic et à C1 entre les patients répondeurs et non répondeurs à deux cures d'immunothérapie anti-PD-1.....</i>	68

Tableau 18: : Survie globale et survie sans progression des patients traités par immunothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 sur les MDSC et sous populations.70

Tableau 19: Comparaison de la prédiction de la réponse au traitement avec la réponse objective chez les patients traités par chimiothérapie en première ligne77

Tableau 20: Comparaison de la prédiction de la réponse au traitement avec la réponse objective chez les patients traités par immunothérapie en première ligne78

Introduction

L'essor de l'immunothérapie et le ciblage de l'axe PD-1/PD-L1 a suscité beaucoup d'enthousiasme dans le domaine de l'oncologie thoracique, notamment dans le traitement des patients atteints de Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules (CBNPC) avancés.

L'axe PD-1/PD-L1, impliquant la protéine PD-1 (Programmed cell Death Protein 1) et son ligand PD-L1, est un point de contrôle majeur du système immunitaire anti-tumoral. Il a été démontré que l'expression de PD-L1 par les cellules cancéreuses permettrait d'échapper à la cytotoxicité des lymphocytes T exprimant PD-1 à leur surface [1].

Les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire permettent, via l'action d'anticorps anti PD-1 et PD-L1, de restaurer l'immunité anti-tumorale. Leur emploi est approuvé depuis 2015 dans le traitement des patients atteints de CBNPC métastatiques dépourvus d'addiction oncogénique, après échec d'une chimiothérapie de première ligne. Le lien suggéré dans certaines études entre l'expression tumorale de PD-L1 et la prédiction de l'efficacité de l'immunothérapie a permis l'acquisition d'une application en première ligne chez les patients sélectionnés en fonction de leur statut PD-L1 [2].

L'exploration biologique de PD-1 et PD-L1 est complexe. A l'heure actuelle, la mesure immuno-histochimique de l'expression tumorale de PD-L1, obtenue à partir d'échantillons tissulaires, frais ou archivés, et retranscrite par les anatomopathologistes en pourcentage de cellules marquées, est la seule méthode standardisée adossée aux AMM. L'identification des patients potentiellement répondeurs à l'immunothérapie qu'elle suppose est désormais remise en question par l'existence d'un bénéfice thérapeutique significatif chez des populations n'exprimant pas la protéine, et inversement, ne confortant pas sa fiabilité en routine. Ces constats semblent expliqués, au-delà de l'absence de standardisation relative aux seuils de détection des tests compagnons, par l'hétérogénéité spatiale admise de l'expression de PD-1 au sein de la tumeur primitive et des sites métastatiques et l'hétérogénéité temporelle attribuable aux traitements systémiques et aux mécanismes de résistance au traitement [3].

De manière générale, la complexité et la plasticité de la réponse immunitaire rendent difficile l'identification d'un marqueur théranostique associé aux chimiothérapies et immunothérapies. Les challenges des travaux actuels se concentrent sur la détermination d'un biomarqueur applicable en routine, donnant l'accès au profil moléculaire de la tumeur et de son micro-environnement à l'échelle individuelle.

Les cellules immunitaires circulantes, ont fait l'objet d'études pilotes prometteuses depuis l'amorçage de la cytométrie de flux sur de simples échantillons sanguins. Une forte expression de PD-1 mesurée à la surface des lymphocytes T CD4+ en circulation semble reliée à un pronostic clinique médiocre objectivé par une progression précoce de la maladie

chez les patients porteurs d'un CBNPC avancé traités par chimiothérapie, immunothérapie et thérapie ciblée [4].

Les cellules suppressives dérivées de myéloïdes (MDSC ou Myeloid-Derived Suppressor Cells), représentent une population hétérogène de cellules précurseurs de granulocytes (G-MDSC) et monocytes (M-MDSC) impliquées dans la suppression de la réponse T face aux antigènes tumoraux. Leur action anti-lymphocytaire s'opère grâce à une variété de mécanismes incluant la production de cytokines et d'espèces réactives de l'oxygène. Au-delà de la reconnaissance de l'expression de PD-L1 à leur surface, des études récentes ont révélé des fréquences de détection accrues au niveau du sang périphérique dans des conditions pathologiques telles que le CBNPC [5,6]. Bien que ces études préliminaires divergent au sujet du lien entre un profil d'évolution péjoratif et l'accumulation de certaines sous-populations, l'intérêt de ce marqueur semble potentiellement prédictif pour l'identification des patients atteints de mélanomes métastatiques susceptibles de bénéficier d'un traitement par ipilimumab [7].

Malgré ces constats, l'impact des traitements systémiques sur ces différentes populations cellulaires et l'éventuelle prédiction de la réponse aux traitements ne semblent pas parfaitement élucidés dans le CBNPC.

A travers notre étude préliminaire et observationnelle, nous avons cherché à étudier les populations lymphocytaires et MDSC circulantes de 41 patients atteints de CBNPC métastatiques par cytométrie de flux. Nous avons tenté de corréler, de manière prospective, les niveaux d'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 et PD-L1 à la surface des MDSC et sous-populations, à la réponse à la chimiothérapie et l'immunothérapie de première et deuxième ligne, afin d'en déduire un éventuel intérêt prédictif. Notre approche s'est secondairement attardée sur l'analyse des survies globale et sans progression afin de démontrer l'éventuel intérêt pronostique de nos marquages.

I. PREMIERE PARTIE : RAPPELS

I.1. Le Cancer Broncho-Pulmonaire : généralités

Avec plus de 49 000 nouveaux cas par an en France en 2017 selon les chiffres de l'INCa, le cancer broncho-pulmonaire (CBP) est le deuxième cancer le plus incident chez l'homme et le troisième chez la femme avec un âge médian au diagnostic de 65 ans. Sa mortalité, dépassant 30 000 décès par an, et sa survie à 5 ans avoisinant 17 % tous stades confondus, le placent au premier rang national des causes de mortalité par cancer.

Les Cancers Broncho-pulmonaires Non à Petites Cellules (CBNPC), regroupant les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes indifférenciés à grandes cellules, constituent le type histologique majoritaire (80 %) devant la prévalence des CBPC (Carcinomes Broncho-pulmonaires à Petites Cellules). Leur caractère silencieux conduit à un retard diagnostique considérable générant leur annonce au stade avancé voire métastatique dans deux tiers des cas.

La prise en charge des CBNPC au stade avancé ou métastatique, dépourvus d'addiction oncogénique, repose sur un traitement systémique. En première ligne, le traitement de référence a longtemps reposé sur une chimiothérapie à base de sels de platine (cisplatine ou carboplatine), couplée à une molécule de troisième génération (gemcitabine, taxane, pemetrexed ou vinorelbine), avant le recours au docetaxel en cas de progression tumorale. En dépit de ces thérapies, la médiane de survie globale restait inférieure à 12 mois.

I.2. L'axe PD-1 / PD-L1 dans le CBNPC

I.2.1. Définition et rôle du couple PD-1 / PD-L1

La réponse immunitaire anti-tumorale, principalement adaptative, repose sur l'activation des lymphocytes T-CD8 cytotoxiques (CTL) à travers la reconnaissance de néo-antigènes exprimés à la surface des cellules tumorales. Cela implique, via le relai de cellules présentatrices, l'interaction entre l'antigène ciblé et un récepteur membranaire spécifique aux lymphocytes naïfs en voie de devenir effecteurs, le T-Cell Receptor (TCR). Cette liaison est entretenue par des co-récepteurs activateurs et inhibiteurs.

Parmi les molécules de co-inhibition ou rétrocontrôles inhibiteurs, PD-L1 (Programmed Death Ligand-1) est une protéine transmembranaire exprimée à la surface des cellules tumorales capable de se lier au récepteur de mort cellulaire programmée (PD-1 ou Programmed Death Receptor 1) exprimé à la surface d'un grand nombre de cellules immunitaires (lymphocytes T

CD4 et CD8, régulateurs, B, cellules NK, cellules dendritiques et monocytes). De manière schématique, l'axe PD-1/PD-L1 forme, au sein de la tumeur et du micro-environnement tumoral, un couple moléculaire responsable de la transduction d'un signal inhibiteur bloquant la cascade de signalisation déclenchée en aval du TCR (Figure 1). Le freinage des différents mécanismes lymphocytaires, à savoir la migration, la prolifération et la sécrétion de cytokines, induit l'anergie et l'apoptose des cellules effectrices et, in fine, participe à l'échappement immunitaire tumoral. Ainsi, il est admis que l'expression tumorale de PD-L1 constitue un mécanisme d'échappement majeur des cancers à la réponse immunitaire adaptative anti-tumorale [1].

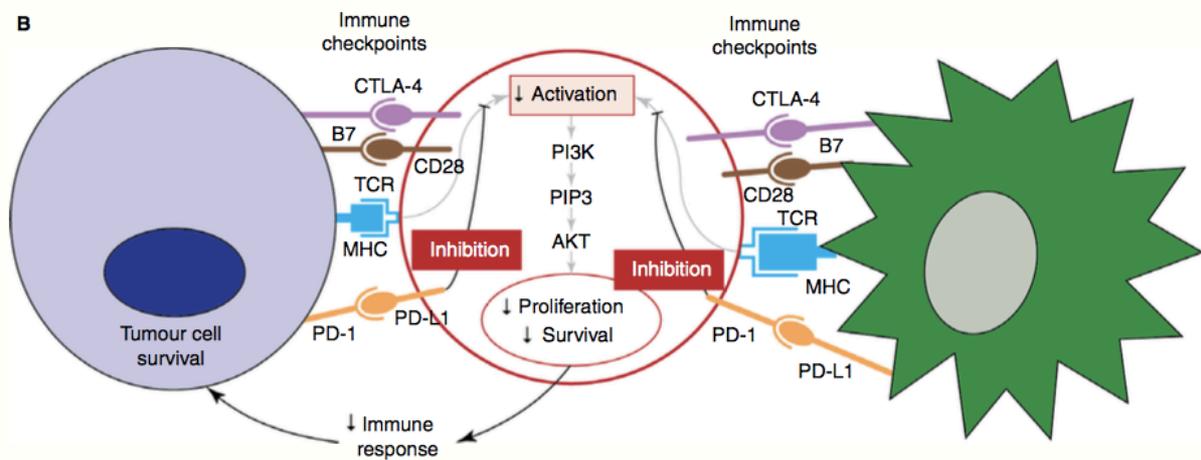


Figure 1: Le couple PD-1/PD-L1 et l'échappement immunitaire anti-tumoral [1]

1.2.2. L'approche anti- PD-1 / PD-L1 et les inhibiteurs de check-points immunologiques (ICI)

Parmi les stratégies anti-tumorales développées au cours de la dernière décennie, l'immunothérapie est devenue une voie de recherche et d'application majeure en oncologie thoracique au travers les thérapies anti-PD-1, anti PD-L1 et anti CTLA4 (Figure 2).

Les données obtenues dans les études de phase III sont comparables avec des réponses objectives parfois longues variant de 20 à 25 % [8,9]. Le lien suggéré dans certaines études entre l'expression de PD-L1 par la tumeur et la prédiction de l'efficacité de l'immunothérapie a permis l'acquisition d'applications récentes fonction du statut PD-L1 [2].

A ce jour, le Pembrolizumab (anti-PD-1, Keytruda®, Merck) est la seule immunothérapie dont les indications de traitement des CBNPC métastatiques sont conditionnelles à l'expression de PD-L1. Administré à dose fixe toutes les trois semaines, il est applicable à partir de la seconde ligne pour les tumeurs exprimant PD-L1 au-delà de 1% grâce à un

allongement admis de la survie globale (SG) face à la chimiothérapie pour ce seuil (médiane de survie globale 10,4 mois contre 8,5 mois pour la chimiothérapie, HR = 0,71 [0,58–0,88]) [10]. Il est utilisable en première ligne pour les tumeurs exprimant PD-L1 à plus de 50 % en lien avec un bénéfice admis sur la survie sans progression (SSP) et survie globale (SG) au sein de la cohorte Keynote-010. Ce lien est évoqué croissant avec l'augmentation du pourcentage d'expression (SSP 2,1 mois et SG 8,6 mois pour un statut PD-L1 inférieur à 1%, SSP 5,8 mois et SG 15,5 mois pour un statut PD-L1 supérieur ou égal à 50 %) [2,10,11].

Malgré son antériorité, le Nivolumab (anti-PD-1, Opdivo®, Bristol Myers Squibb), administré à fréquence bi-mensuelle, ne reste accessible qu'au-delà de la première ligne, indépendamment du statut PDL1, bien que des essais aient été menés sur une sélection de patients présentant une expression tumorale de PD-L1 d'au moins 1% et 5 % (cohorte Ckeckmate-026) [12]. L'Atezolizumab (anti-PD-L1, Tecentriq®, Roche) s'est vu décerner, en 2018, la même indication.

Plus récemment, l'essai Keynote-021, comparant la chimiothérapie à son association avec le Pembrolizumab, a conclu en faveur de la double thérapie (réponse objective 55 % contre 29 %, médiane de SSP 13 mois contre 8,9 mois, HR 0,52). Cette approche ne concerne toutefois que le domaine de la recherche clinique [13].

Au-delà de l'avantage thérapeutique, les avantages de l'immunothérapie se manifestent par un meilleur profil de tolérance clinico-biologique face à la chimiothérapie chez les patients en bon état général (PS 0 ou 1) et un bénéfice plus marqué chez les profils tabagiques actifs ou sevrés [14].

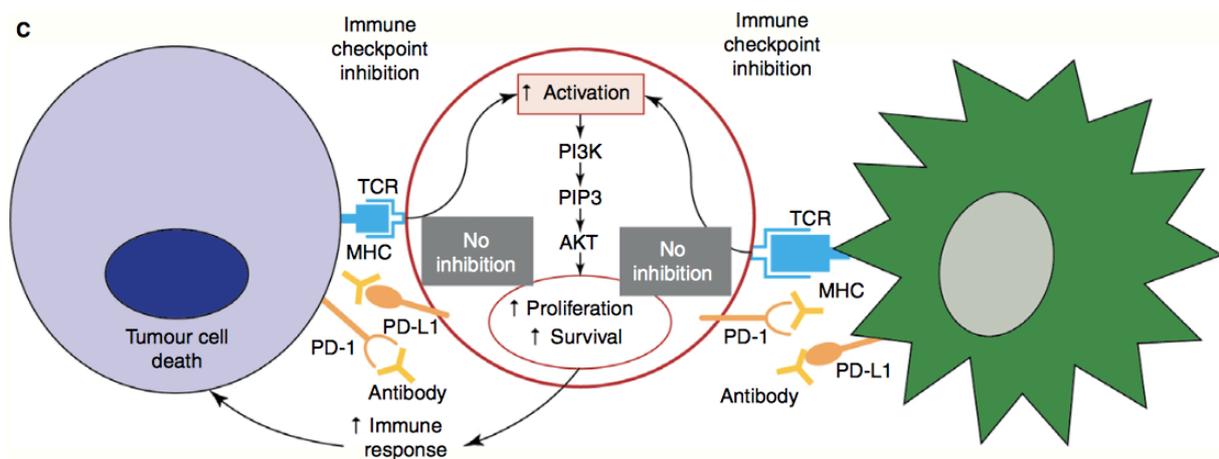


Figure 2 : Le couple PD-1/PD-L1 et l'approche anti-PD-1 / PD-L1 [1]

I.3. Expression tumorale de PD-L1 dans le CBNPC

I.3.1. Mécanismes impliqués dans la surexpression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales

L'expression de PD-L1 au sein des cellules tumorales peut être constitutive ou induite. L'expression tumorale constitutive de PD-L1, par définition indépendante de la réponse immunitaire, est diffuse et liée à l'activation d'une voie de signalisation oncogénique telle que STAT3 ou PI3K-AKT par anomalie moléculaire (perte des voies de la phosphatase et de l'homologue de la tensine PTEN). Elle concerne également la survenue de mutations activatrices du gène EGFR ou réarrangements de ALK [15].

L'expression tumorale induite de PD-L1 est d'avantage focale et réactionnelle à la présence de cellules immunitaires au sein du micro-environnement tumoral. Alors que les lymphocytes T, activés après contact avec les néo-antigènes, stimulent l'expression de PD-1, les signaux inflammatoires, tels que la sécrétion d'interférons, induisent l'expression de son ligand PD-L1 afin de réduire l'activité des lymphocytes T activés (CTL) et de limiter la réponse immunitaire [16]. Ce mécanisme explique l'association quasi constante, dans les études, entre l'expression de PD-L1 et l'abondance de l'infiltrat de lymphocytes T activés exprimant PD-1.

I.3.2. Prévalence de l'expression de PD-L1 dans les CBNPC avancés ou métastatiques

Concernant le CBNPC, les études ont révélé une grande variabilité de l'expression de PD-L1 à l'échelle interindividuelle, en lien avec une prévalence de positivité allant de 13 à 70% [17]. Des groupes histologiques (adénocarcinomes, carcinomes épidermoïdes, carcinomes sarcomatoïdes), des données moléculaires (mutation KRAS, charge mutationnelle élevée) voire tissulaires (nécrose tumorale importante), semblent liés dans les études à une expression plus fréquente de PD-L1 [18-20]. Le niveau d'expression semble également influencé par le statut tabagique, avec une expression plus fréquente chez les fumeurs (44 %) que chez les patients sevrés (20 %) ou non-fumeurs (13%) [21].

I.3.3. Expression de PD-L1 et hétérogénéité intra-tumorale

Les constats actuels plaident pour une variabilité de l'expression de PD-L1 à l'échelle intra-individuelle. Cette hétérogénéité d'expression intra-tumorale a été mise en évidence dans plusieurs études portant sur l'analyse des échantillons biopsiques et la révélation d'un degré

de discordance de 48% avec les résultats obtenus après résection tumorale chirurgicale [22]. Au-delà des écarts entre les pourcentages d'expression positive, il semble exister une discordance entre la négativité des prélèvements biopsiques et la positivité admise sur la pièce opératoire correspondante. Cette différence semble systématiquement observée dans le sens d'une sous-estimation du statut PD-L1 au sein des échantillons biopsiés (74 % de biopsies négatives contre 26 % des pièces opératoires).

Une hétérogénéité spatiale de l'expression de la protéine a également été admise entre le site primitif, les sites ganglionnaires et les sites métastatiques [3].

Ces constats ne sont pas sans négliger l'hétérogénéité temporelle de l'expression de PD-L1 rapportée au cours de l'évolution de la maladie et de l'administration des thérapies systémiques (chimiothérapies, immunothérapies, radiothérapie et/ou thérapies ciblées). Les études portées sur le sujet exposent toutefois des résultats contradictoires [23,24].

Ainsi, selon le type de prélèvement et le moment de son analyse, l'hétérogénéité de l'expression de PD-L1 pourrait entraîner des résultats inexacts en lien avec leur faible représentativité. Ce constat peut concerner des petits prélèvements de choix comme les biopsies endo-bronchiques ou trans-bronchiques. Les faux négatifs résultants pourraient, de ce fait, conduire à un moindre usage de l'immunothérapie pour une proportion non négligeable de patients [22,25] .

1.3.4. Expression lymphocytaire et micro-environnementale de PD-1 et PD-L1 dans le CBNPC

PD-1 est exprimé à la surface des lymphocytes T, y compris régulateurs (Treg), mais aussi par les cellules NK et certaines lignées B. Il est admis que l'expression de PD-1 est significativement plus élevée sur les lymphocytes CD-4 et CD-8 infiltrant la tumeur (TIL ou Tumor Infiltrating Lymphocytes) que sur les lymphocytes du tissu sain voire du sang périphérique. Conjointement, il est démontré qu'un infiltrat CD-8 dense est lié à une expression tumorale de PD-L1 plus fréquente [26].

1.3.5. Spécificités des MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells)

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC ou Myeloid-Derived Suppressor Cells) forment, au sein du micro-environnement tumoral, une population phénotypiquement hétérogène subdivisée en sous-populations granulocytaires (G-MDSC ou PMN-MDSC) et monocytaires (M-MDSC) [27]. Issues de cellules myéloïdes immatures (IMC), leur formation dans les environnements cancéreux, infectieux ou auto-immuns, voire leur accumulation dans la circulation sanguine, sont favorisées par la différenciation des granulocytes, des

macrophages et des cellules dendritiques (*Figure 3*). Leur différenciation s'effectue aux dépends d'un facteur de stimulation, le GM-CSF [28]. Leur expansion et leur activation sont contrôlées par un réseau complexe d'autres facteurs solubles tels que le M-CSF, le G-CSF, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) ainsi que des ligands du TLR.

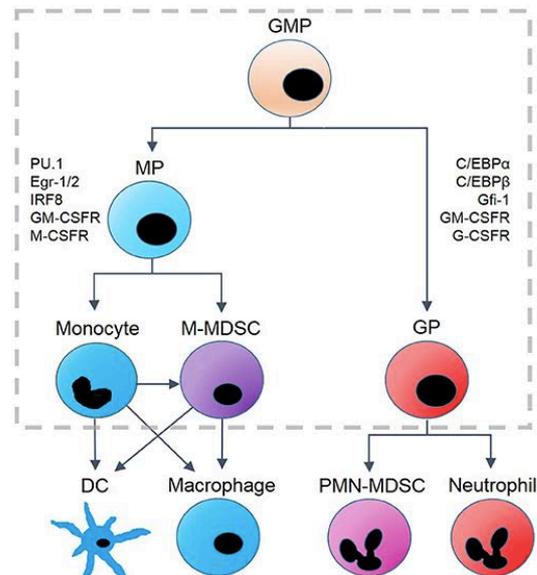


Figure 3: Lignées hématopoïétiques dérivées des GMP (Granulocyte-Monocyte Progenitors). Différenciation des GMP en MP (Monocyte Progenitors) et GP (Granulocyte Progenitors). Différenciation des MP en monocytes et M-MDSC (Monocytes and Monocytic Myeloid Derived Suppressor Cells). Différenciation des M-MDSC en cellules dendritiques (DC) et macrophages. Différenciation des GP en PMN-MDSC (Polymorphonuclear MDSC). Source : frontiers in Immunology.

L'activité biologique commune de ces cellules myéloïdes est la suppression de la réponse lymphocytaire T contre les antigènes tumoraux à travers une variété de mécanismes incluant la production de cytokines et d'espèces réactives de l'oxygène [27]. En effet, les MDSC activées produisent des niveaux élevés d'oxyde nitrique et régulent positivement l'expression d'arginase-1 (ARG-1). Ceci entraîne l'arrêt du cycle cellulaire lymphocytaire, notamment par l'épuisement de l'acide aminé arginine au sein du micro-environnement.

L'anergie des cellules T est également induite par la régulation négative de l'expression du TCR.

De plus, les MDSC ont démontré une activité d'induction de lymphocytes Treg au détriment des lymphocytes T effecteurs et une dégradation de la fonction des cellules NK (*Figure 4*).

Au-delà de leurs propriétés immunosuppressives, les MDSC favoriseraient la croissance tumorale en stimulant l'angiogenèse et la croissance des fibroblastes. En sécrétant des métalloprotéinases matricielles, en particulier MMP9, elles affecteraient l'intégrité de la matrice extra-cellulaire, permettant aux cellules tumorales de circuler et de générer des sites métastatiques [29].

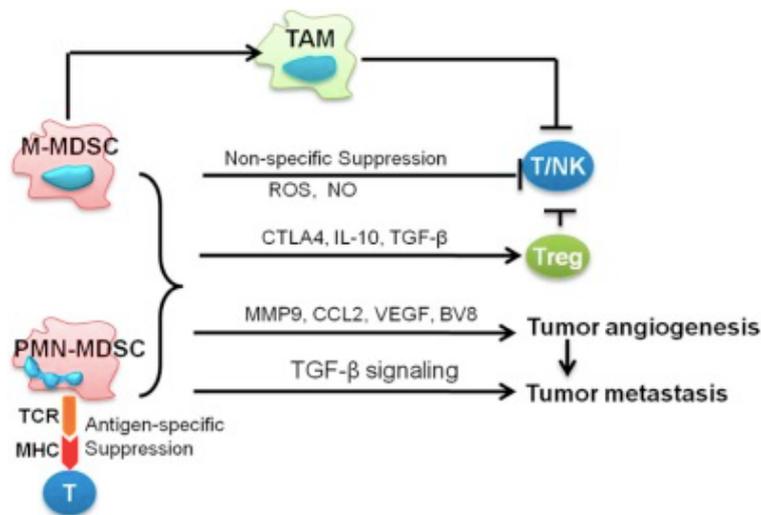


Figure 4: Mécanismes de régulation des MDSC au sein du micro-environnement tumoral [30].
TAM : Tumor associated macrophages.

A l'échelle moléculaire, plusieurs études soutiennent l'expression courante des marqueurs myéloïdes CD-11b, CD-33, CD-66b/CD-15 à la surface des PMN-MDSC et CD-14 sur les M-MDSC [28].

Récemment, les PMN-MDSC ont révélé, au sein du micro-environnement tumoral, une expression positive pour PD-L1, expliquant l'interaction avec les lymphocytes T exprimant PD-1 et, in fine, leur épuisement [30].

Sur l'hypothèse que les MDSC participeraient à la réponse immunitaire adaptative adoptée au sein du micro-environnement, des expérimentations suggèrent que le ciblage thérapeutique de PD-L1 inhiberait partiellement la suppression des cellules T médiées par les MDSC [31].

I.4. Valeur pronostique et prédictive de l'expression de PD-L1 dans le CBNPC

I.4.1. Valeur pronostique de l'expression de PD-L1 dans le CBNPC

A ce jour, l'impact de l'expression de PD-L1 sur le pronostic des CBNPC avancés ou métastatiques reste controversé. Bien qu'un grand nombre d'études associe une forte expression de PD-L1 à un pronostic favorable quel que soit le stade, un pronostic péjoratif a été décrit dans d'autres séries et méta-analyses [32-36]. A titre indicatif, les carcinomes sarcomatoïdes sur-expriment PD-L1 dans leur grande majorité et dévoilent par ailleurs un pronostic très défavorable. L'absence d'incidence pronostique a même été déclarée dans une cohorte d'un millier d'échantillons [37]. Parallèlement, les études décrivant l'évolution

longitudinale de l'expression de PDL1 ne retrouvent aucune tendance évolutive au cours de l'évolution naturelle ou sous traitement.

1.4.2. Valeur prédictive de la réponse aux anti-PD-1 / PD-L1

Sur l'hypothèse que l'expression de PD-L1 pourrait être requise pour l'efficacité des inhibiteurs de PD-1/PD-L1, plusieurs études ont rapporté des taux de réponse objective et des données de survie chez des patients atteints de CBNPC avancés traités par immunothérapie après échec d'une première ou ligne de sels de platine.

Deux méta-analyses ont suggéré une réponse globale aux anti-PD1 supérieure chez les patients porteurs d'une tumeur exprimant PD-L1 (PCT $\geq 1\%$) par rapport aux non-expresses (HR = 2,44, $p < 0,0001$). Une rétrospection stratifiée selon des valeurs seuils de PD-L1 de 1 à 50 %, a par ailleurs mis en évidence une corrélation positive entre le taux de réponse objective et le niveau d'expression de la protéine (HR 2,18 pour un PCT $\geq 1\%$ vs 3,99 pour un PCT $\geq 50\%$, taux de réponse sous Nivolumab 37 % pour un PD-L1 $\geq 10\%$ au sein de l'étude Checkmate-057, 19 % pour un PD-L1 $\geq 10\%$ au sein de l'étude Checkmate-017, taux de réponse sous Pembrolizumab 18 % pour un PD-L1 $\geq 1\%$ et 30 % pour PD-L1 $\geq 50\%$ au sein de l'étude Keynote-010) [38,39].

Comme discuté précédemment, les données des essais reposent, dans la majorité des cas, sur des biopsies chimio-naïves archivées et suscitent des inquiétudes quant à la fiabilité de l'expression de PD-L1 des tumeurs traitées en seconde ligne.

Parallèlement, bien que le seuil d'expression de PD-L1 varie d'une étude à l'autre, les auteurs mentionnent également une supériorité des anti-PD-1 face au Docetaxel pour les tumeurs n'exprimant pas la protéine.

Malgré ces constats, 5 à 20 % des patients présentant une tumeur « PD-L1 négative » dévoilent une réponse thérapeutique parfois longue sous immunothérapie. Cette part non négligeable de patients interroge les onco-pneumologues concernés par le risque d'envisager, sur la simple analyse du statut PD-L1, une chimiothérapie plutôt qu'une immunothérapie chez des répondeurs potentiels [40].

De ce fait, la positivité du marquage ne semble pas systématiquement associée à une réponse et son faible niveau voire son absence ne permettraient pas d'exclure un bénéfice attribuable à l'immunothérapie.

I.5. L'émergence de nouveaux biomarqueurs

En dépit de son caractère prédictif imparfait, le statut PD-L1 reste aujourd'hui le seul marqueur thérapeutique adossé aux AMM pour la prescription conditionnelle d'une immunothérapie en première ligne.

A l'échelle moléculaire, des études insistent sur le caractère prédictif de l'expression de PD-L2, second ligand de PD-L1 [41].

Des travaux de plus en plus nombreux se penchent sur le séquençage de nouvelle génération basé sur la capture hybride (NGS Next Generation Sequencing), permettant l'identification des modifications de l'ADN et de la charge mutationnelle en lien avec la mise en évidence de néo-antigènes. Les études menées sur le TMB (Tumor Mutational Burden) révèlent une corrélation positive avec la réponse à l'immunothérapie [42,43]. L'identification permise de certaines mutations comme JAK ou STK11 semble témoin d'une résistance au traitement. Les travaux présentés à l'ASCO 2018, reprenant les données de l'essai Checkmate-057, ont confirmé les co-mutations KRAS/STK11 comme résistantes aux anti PD-1 [44].

Dans le compartiment sanguin, une augmentation significative des taux d'IL-8 serait observée chez les patients non-répondeurs à l'immunothérapie ($p=0,013$). La chute du niveau d'expression de l'IL-8 pourrait ainsi refléter l'efficacité du traitement [45].

La diminution de l'ADN circulant chez les patients traités par immunothérapie serait également un facteur d'efficacité [46].

Concernant l'hôte, l'association entre le microbiote intestinal et l'efficacité de l'immunothérapie est également énoncée dans un rapport récent. L'utilisation d'une antibiothérapie orale ou intra-veineuse dans les 30 jours précédant l'initiation de l'immunothérapie serait associée à une diminution de la survie sans progression et de la diminution globale, sans argument pour une majoration du taux de progression primaire sous traitement. La dysbiose induite perturberait l'action des inhibiteurs de check point par la modification de la richesse taxonomique requise pour l'immunogénicité de l'hôte [47].

L'effet délétère de la corticothérapie systémique a également été montré du doigt. Une étude menée sur une cohorte américaine a récemment précisé que l'utilisation de corticoïdes au-delà de 10 mg/jour dans les 30 jours précédant l'initiation d'une immunothérapie serait associée à une diminution du taux de réponse globale (ORR 6% vs 19%; $p = 0,02$) [48]. Ces données semblent refléter l'atténuation d'une poussée proliférative de lymphocytes T CD8 au moment du blocage de l'axe PD1/PDL1.

Malgré ces constats, la considération de ces nouveaux biomarqueurs en tant que tests diagnostiques « compagnons » n'est pas validée en pratique clinique. Un « immunoscore »

pourrait à l'avenir être établi, à visée pronostique et théranostique, comme celui proposé par l'étude combinée du statut PD-L1 et de l'infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD8+ [49,50]. Une approche associant plusieurs tests immuno-histochimiques (PD-L1, PD-L2), la charge mutationnelle, la charge de néo-antigènes, la signature d'altérations génomiques avec un panel plus ou moins large (incluant à minima EGFR, ALK, ROS1, KRAS, MET, BRAF, STK11, HER2), pourrait être intéressante pour sélectionner les candidats potentiels à l'immunothérapie [51].

Hormis la complexité de leur analyse, ces approches soulèvent des contraintes relatives au délai d'obtention des résultats, au coût non négligeable et à la difficulté d'établir des tests combinant plusieurs cibles d'intérêt sur une seule analyse [1, 52].

I.6. Evaluation de l'expression de PD-L1

I.6.1. Evaluation immuno-histochimique (IHC) de l'expression de PD-L1 dans le CBNPC

La protéine PD-L1 est aujourd'hui mise en évidence par immuno-histochimie (IHC) sur des coupes de tissus en suivant une démarche pré-analytique et analytique.

I.6.1.1. Phase pré-analytique

La phase pré-analytique, standardisée, concerne la préparation de l'échantillon tissulaire frais ou archivé. Elle désigne sa fixation dans le formaldéhyde, son inclusion en paraffine et sa coupe au microtome [18, 22, 52].

I.6.1.2. Phase analytique

L'étape d'immuno-marquage consiste en l'application d'anticorps monoclonaux spécifiques à un épitope de la protéine PD-L1. Ces clones d'anticorps, développés par les sociétés de biotechnologies Dako® et Ventana Medical Systems® pour les compagnies pharmaceutiques développant les anticorps commerciaux, sont disponibles sous forme de tests standardisés voire de kits de marquage prêts à l'emploi. Ainsi, sont référencés pour la plateforme IHC Dako, les clones de détection DAKO28.8 (PharmDx, Nivolumab®), DAKO22C3 (PharmDx, Pembrolizumab®) et pour la plateforme IHC Ventana, SP142 (Atezolizumab®) [54].

Des tests « maison » moins coûteux, réalisés à partir d'anticorps primaires concentrés, peuvent être développés par un laboratoire si leur calibration, leur reproductibilité et leur concordance avec un test de référence sont validées par les normes qualité [54].

Le pourcentage de cellules tumorales exprimant PD-L1, ou PCT, est rapporté par le pathologiste à partir du nombre de cellules exposant un marquage membranaire linéaire, complet ou partiel, visible au microscope optique, en comparaison avec des témoins positifs extraits de tissus amygdaliens ou de lignées tumorales traitées dans les mêmes conditions (Figure 5) [52].

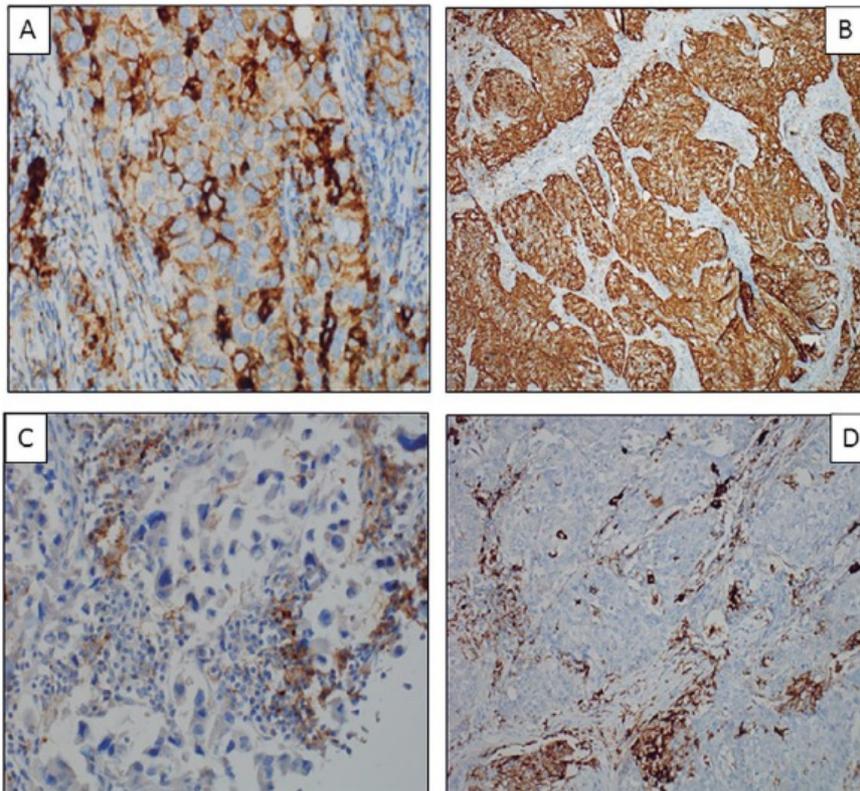


Figure 5: Aspect courant du marquage IHC PD-L1 dans les CBNPC.

A : marquage membranaire sur plus de 50 % de cellules tumorales d'un adénocarcinome (PCT > 50 %). B : marquage membranaire sur 100 % des cellules tumorales d'un carcinome épidermoïde (PCT = 100 %). C et D : marquages au niveau des cellules du micro-environnement et absence de marquage sur les cellules tumorales de carcinomes pulmonaires peu différenciés [52].

1.6.1.3. Limites de la méthode immuno-histochimique

La mesure immuno-histochimique de PD-L1 soulève plusieurs problèmes assignables au prélèvement et sa préparation, au choix du test et à la subjectivité de l'opérateur.

Premièrement, l'analyse doit être effectuée dans des conditions parfaitement maîtrisées et, au mieux, dans un laboratoire accrédité. Des critères pré-analytiques tels que l'ancienneté du prélèvement supérieure à 6 mois, la présence de moins de 100 cellules tumorales au sein de l'échantillon, d'une proportion importante de nécrose et/ou le recours à une décalcification sont à mentionner et peuvent aboutir à la reconsidération de la qualité du prélèvement [1].

La fiabilité de la mesure effectuée à partir d'échantillons cytologiques, tels que des cytoponctions ganglionnaires, est remise en question par l'absence de validation clairement définie dans les essais cliniques. En effet, seuls les patients fournissant un matériel histologique ont été inclus dans les études, bien qu'une d'entre elles ait confirmé la faisabilité de la méthode [53].

Deuxièmement, la spécificité d'un clone d'anticorps à un épitope de PD-L1 et un automate suggère une différence d'affinité entre les réactifs et la protéine et ainsi une variabilité des colorations apparentes pouvant complexifier la définition des seuils de positivité [54]. Ces derniers, propres à chaque laboratoire, sont échelonnés de 1 à 50 % (Tableau 1). Le choix du clone utilisé repose sur le laboratoire.

Tableau 1: Anticorps utilisés en IHC pour la détection de PD-L1, seuils de positivité étudiés dans le CBNPC et traitement associé [54]

CLONE	ESPÈCE	FOURNISSEUR	SEUILS DE POSITIVITÉ ÉTUDIÉS DANS LE CPNPC (INTENSITÉ DE MARQUAGE)	TRAITEMENT ASSOCIÉ (NOM COMMERCIAL, FOURNISSEUR)
22C3	Souris	Dako North America, Inc.	PCT : $\geq 1\%$, $\geq 50\%$ (toutes intensités)	Pembrolizumab, anti-PD-1 (Keytruda ^{MC} , Merck)
28-8	Lapin		PCT : $\geq 1\%$ ou $\geq 5\%$ (toutes intensités)	Nivolumab, anti-PD-1 (Opdivo ^{MC} , BMS)
SP142	Lapin	Ventana Medical Systems, Inc.	PCT : $< 1\%$, 1 à 4 %, 5 à 49 %, $\geq 50\%$ (intensité modérée ou forte) PCI : $< 1\%$, 1 à 4 %, 5 à 9 %, $\geq 10\%$	Atézolizumab, anti-PD-L1 (Tecentriq ^{MC} , Roche),
SP263	Lapin		PCT : $\geq 25\%$	Durvalumab, anti-PD-L1 (AstraZeneca Canada, Inc.)

Enfin, l'absence de standardisation, empêchant la formulation d'un système de notation universel, occasionne une part de variabilité laissée à la subjectivité de chaque pathologiste. La prise en compte de l'intensité du marquage, modérée ou forte, avec le clone SP142, reste au libre choix du pathologiste. Il en est de même pour le rendu du niveau de PD-L1 au sein du micro-environnement tumoral, à savoir le nombre de cellules immunitaires marquées infiltrant la tumeur. Ce dernier n'a pas fait preuve de son utilité clinique dans la littérature.

1.6.2. Evaluation de l'expression de PD-1 et PD-L1 dans le sang et concordance avec l'immuno-histochimie

PD-L1 a pu être mis en évidence de manière non invasive dans le plasma, à la surface des cellules tumorales circulantes ou encore des globules blancs circulants (WBC). La

faisabilité de la détection de PD-L1 dans le sang est de plus en plus suggérée dans le CBNPC [53,55,56].

1.6.2.1. Etude du taux plasmatique de PD-L1

Le taux plasmatique de PD-L1 peut être testé par une technique ELISA à l'aide d'un kit de dosage lié à une enzyme pour PD-L1. Des travaux ont permis de constater, chez des patients porteurs de CBNPC, une concentration sanguine de PD-L1, sans corrélation avec l'âge, le sexe, le Performans Status ni le statut tabagique. Cette concentration semble toutefois supérieure chez les patients porteurs d'un adénocarcinome par rapport aux carcinomes épidermoïdes. Cette différence a également été remarquée entre les stades avancés et les stades précoces, sans association avec une chimiothérapie antérieure [56,57].

D'un point de vue pronostique, les patients présentant des niveaux plasmatiques élevés au diagnostic présentent un pronostic significativement plus sombre (13 mois vs 20 mois, $p=0,037$). Sur ces constats, plusieurs hypothèses ont été établies. La concentration plasmatique de PD-L1 pourrait être corrélée à la maladie et la liaison PD-1/PD-L1 impliquant les CTL du sang périphérique altérerait l'immunité anti-tumorale médiée [56].

1.6.2.2. Etude de l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales circulantes (CTC)

La diffusion des cellules tumorales au sein de la circulation sanguine est une étape obligatoire à l'évolution de la maladie métastatique. Plusieurs travaux de recherche ont conforté le lien entre la détection de CTC au moyen de biopsies liquides et un résultat clinique défavorable voire une tendance à une moindre réponse à l'immunothérapie [58-60].

Très récemment, PD-L1 et PD-1 ont été recherchés sur l'analyse des CTC chez des patients atteints d'un CBNPC métastatique, afin de s'affranchir de l'hétérogénéité tumorale propre au statut PD-L1. L'évaluation membranaire et cytoplasmique de PD-L1 a pu être rendue après l'isolement des CTC par une méthode combinant une filtration et une évaluation cytopathologique (technologie ISET, coloration Giemsa, coloration automatique Ventana, immunofluorescence).

Il semble exister une concordance entre l'expression de PD-L1 au sein des CTC et le tissu tumoral chez 93 % des 106 sujets assignés à l'étude d'Illie [55]. Pour 5 % de cas discordants, la différence reste en faveur d'un résultat négatif sur les CTC et positif sur tissu [55]. Dans une autre étude, aucune comparaison n'a pu être observée, avec un taux de conformité de seulement 45 % [60].

Au même titre que le taux plasmatique, les CTC exprimant PD-L1 semblent davantage détectées chez les patients en progression dans une étude [55]. Dans une autre étude, la présence de CTC PD-L1+ avant une immunothérapie de deuxième ligne n'a pas été corrélée de manière significative aux résultats, mais une tendance à un niveau d'expression plus élevé a été observée dans le groupe de patients non répondeurs (SSP < 6 mois, p=0,04). Dans le même sens, tous les patients en progression ont révélé la présence de CTC PD-L1+ dans leur sang [60].

Sur l'hypothèse que l'expression de PD-L1 pourrait être modulée par les traitements antérieurs, l'impact d'une chimiothérapie de première ligne sur la détection des CTC PD-L1+ et PD-1+ a été évalué. A travers une analyse prospective, le taux moyen de CTC PD-L1+ semble augmenté entre le diagnostic et le troisième cycle de traitement (respectivement 15 % et 80 %). A l'inverse, la population CTC PD-1+ semble être réduite (respectivement 67 % et 25 %) [59-61]. A ce titre, la chimiothérapie éliminerait de manière préférentielle la sous population de CTC PD-1+.

Une analyse multivariée effectuée auprès de CBNPC localement avancés a révélé que la surexpression de PD-L1 à la surface des CTC à la fin de la radio-chimiothérapie serait un facteur pronostique indépendant. De plus, l'absence d'expression à la fin du traitement serait associé à une réponse complète (OR =16, p=0,002) [61].

L'impact de l'immunothérapie a également été exploré par la mise en évidence du nombre de CTC PD-L1+ après 3 mois de traitement par Nivolumab dans une étude. Cette dernière a suggéré une maladie évolutive voire une résistance des CTC PD-L1+ à l'immunothérapie. A contrario, les patients présentant des taux élevés de CTC PD-L1- ont présenté un bénéfice clinique [62].

De par leur complexité, ces constats demeurent non parfaitement élucidés. Les CTC peuvent exprimer PD-L1 et PD-1 avant et après les traitements systémiques, en suggérant une relation complexe avec les cellules immunitaires au sein du compartiment sanguin.

1.6.2.3. Etude de l'expression de PD-1 à la surface des globules blancs circulants (WBC) : abord du micro-environnement liquide plasmatique et de la réponse aux traitements systémiques

Plusieurs études ont démontré l'intérêt de détecter PD-1 au sein des leucocytes en circulation (WBC), filtrés par ISET. Une concordance a été admise avec l'expression de PD-L1 au sein des cellules immunitaires infiltrant la tumeur (73-80%) [55-60].

Une investigation a cherché à évaluer la signification clinique de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes circulants à l'aide de la cytométrie de flux [4].

L'expression de PD-1 sur les cellules T n'était pas statistiquement corrélée à l'expression de PD-L1 tumorale rapportée par immuno-histochimie chez les 42 CBNPC suivis. L'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4+ était statistiquement supérieure chez les patients atteints de CBNPC lors du diagnostic initial, comparativement aux sujets sains (fréquence moyenne d'expression de PD-1 parmi les cellules T CD4+ 13,3 % contre 8,8%, $p = 0,0045$). En revanche, la fréquence d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8 semblait statistiquement comparable.

D'un point de vue pronostique, la tendance s'est révélée équivalente à l'expression de PD-L1 à la surface des CTC [55].

Sur la base d'un seuil d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 lors du diagnostic initial défini par la moyenne, une forte expression de PD-1 ($\geq 12,27$ %) semblait associée à un pronostic médiocre illustré par une réduction significative de la SSP (médiane 2.9 mois vs 13 mois, $p=0,044$) et de la SG (médiane 12.6 mois vs 24 mois, $p=0,028$). Ce résultat s'observait quel que soit le traitement systémique administré, à savoir chimiothérapie, immunothérapie ou thérapie ciblée (*Figure 6*).

Conformément à ces conclusions, une expression élevée de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 a été observée chez les patients présentant une progression précoce de la maladie par rapport aux patients annonçant une réponse partielle ou une stabilité (*Figure 7*). A l'inverse, aucune corrélation entre l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8 et les résultats cliniques n'a été observée.

Bien que la conclusion de cette étude prospective soit limitée en raison de la petite taille de l'échantillon de patients traités par immunothérapie (N=6), une tendance semble établie entre une expression de PD-1 élevée sur les lymphocytes T CD4 et une réponse médiocre au traitement (*Tableau 2*).

Ces indications semblent indiquer l'apport potentiellement prédictif de l'expression de PD-1 sur la réponse aux inhibiteurs de l'axe PD-1/PD-L1. Elles suggèrent le rôle pivot des cellules T CD4+ dans la tolérance immunitaire dépendante de PD-1 et l'association avec des résultats cliniques plus défavorables.

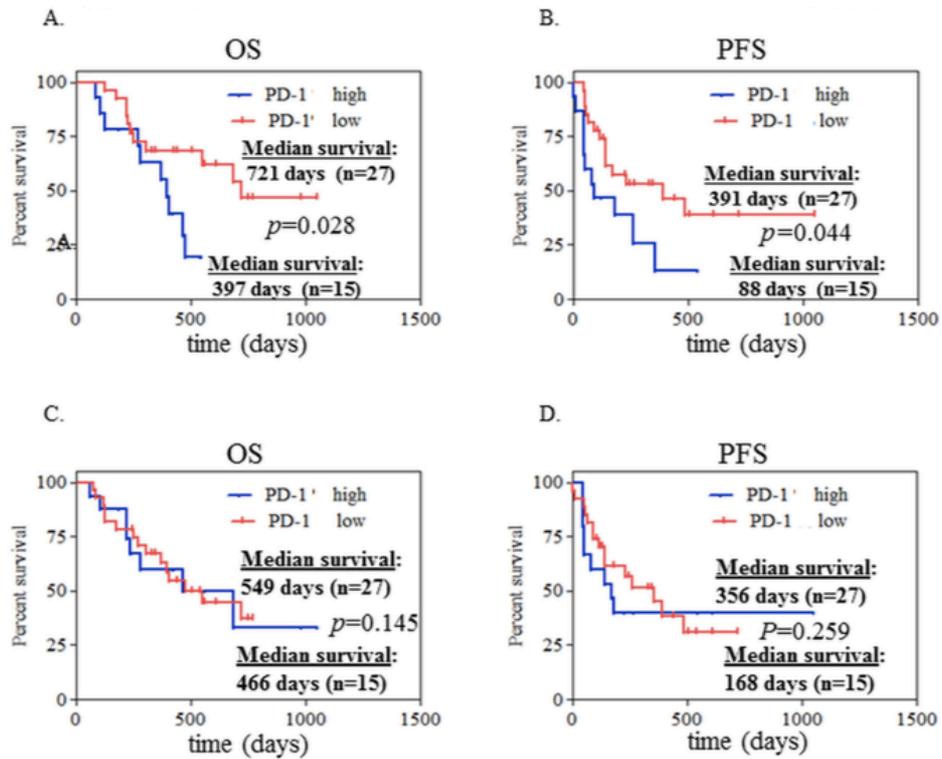


Figure 6: Evaluation de la survie globale et survie sans progression en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4+ lors du diagnostic initial dans une étude menée sur 42 CBNPC avancés. Les courbes de Kaplan-Meier ont été séparées en 2 groupes. A et B : Evaluation en fonction de la valeur médiane de CD4 PD-1+ (seuil haut défini supérieur à 12.27 % vs seuil bas défini inférieur à 12.27%). C et D : Evaluation en fonction de la valeur médiane de CD8 PD-1+ (seuil défini à 11.75 %) [55].

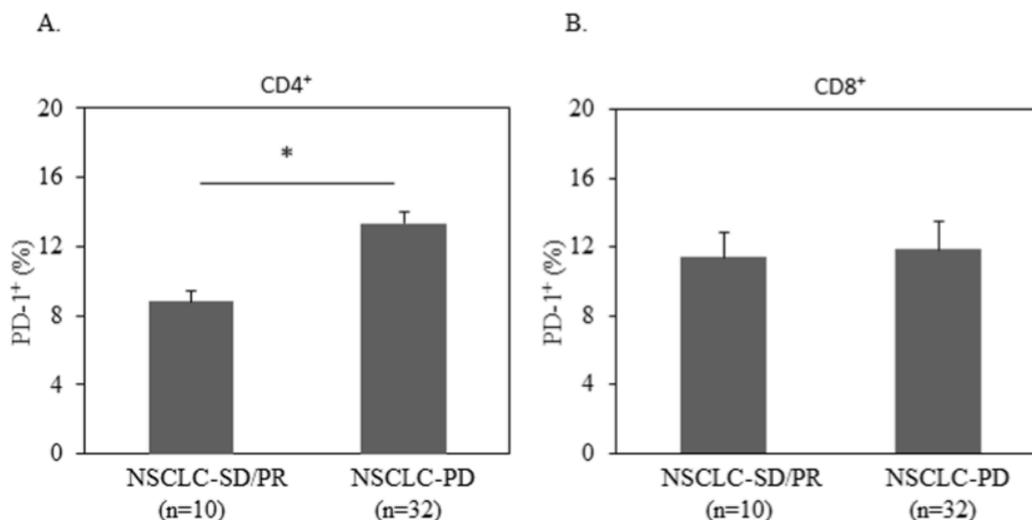


Figure 7: Evaluation de l'association entre la réponse thérapeutique et l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 lors du diagnostic initial dans une étude menée sur 42 CBNPC avancés [48].

Tableau 2: Caractéristiques de 6 patients traités par anti-PD-1 en première ligne. Expression de PD-1 sur les CD4 et données de réponse et survie [55]. ACA: adénocarcinome. SCC: carcinome épidermoïde

Patient #	Patient #1	Patient #2	Patient #3	Patient #4	Patient #5	Patient #6
age	66	67	65	77	55	57
gender	female	female	female	female	female	female
histology	ACA	ACA	SCC	ACA	ACA	ACA
Smoking status	smoker	smoker	smoker	Non-smoker	Non-smoker	smoker
PD-1% CD4+	6.12	12.18	9.99	25.89	15.73	25.53
last follow-up	645 days with stable disease	539 days with stable disease	264 days with progressed disease	43 days died with progressed disease	120 days with progressed disease	52 days died with progressed disease

1.6.2.4. Etude des MDSC circulantes et de l'expression de PD-L1 à leur surface

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) sont absentes de la circulation dans les conditions homéostatiques mais peuvent être accumulées dans des conditions pathologiques telles que le cancer [28, 63, 64]. Les résultats d'études ont ainsi révélé des fréquences de MDSC circulantes augmentées chez les patients atteints d'un CBNPC, avec une fréquence plus élevée au sein des carcinomes épidermoïdes [5].

Bien que l'hétérogénéité des sous-populations de MDSC complique leur détection, une analyse fiable de leur répartition sanguine peut être effectuée par cytométrie de flux [6].

Les études prospectives ayant opté pour cette technique s'accordent vers un profil évolutif péjoratif en cas de forte proportion de MDSC dans le sang périphérique au diagnostic [6, 65, 66]. Certaines études soulignent la prédominance de la sous-population PMN-MDSC par rapport aux individus sains [6, 67]. D'autres soulignent la prédominance de la sous-population M-MDSC en révélant un niveau d'expression de PD-L1 à leur surface supérieur aux individus sains, toutefois faible par rapport aux MDSC détectées au sein du micro-environnement tumoral [29].

Les résultats du faible nombre d'études portés sur le sujet semblent discordants en ce qui concerne l'étude des sous populations et la réponse des CBNPC avancés et métastatiques aux traitements systémiques administrés.

En ce qui concerne la chimiothérapie de première ligne, deux études ont démontré une accumulation de l'ensemble des sous-populations de MDSC chez les patients non répondeurs [5, 68]. Une étude portée sur 20 patients a mis en évidence une augmentation de la proportion de MDSC totales chez les patients non répondeurs et une tendance inverse chez les patients présentant une réponse partielle au traitement [5]. D'autres études ont remarqué une tendance à l'augmentation de la proportion de M-MDSC voire des PMN-MDSC chez les patients non

répondeurs en reflétant l'efficacité de la chimiothérapie à travers les changements dynamiques de ces sous-populations [68-70].

Les schémas thérapeutiques à base de Bevacizumab, traitement anti-VEGF, semblent avoir un impact non uniforme sur les MDSC en circulation. En effet, cette thérapie anti-angiogénique semble cibler préférentiellement la sous population PMN-MDSC en réduisant considérablement sa fréquence [68].

Concernant la réponse aux inhibiteurs du check-point immunitaires, les auteurs signalent depuis 2014 le rôle potentiellement prédictif des PMN-MDSC chez les patients atteints de mélanomes métastatiques en soulignant l'intérêt de ce marqueur pour l'identification des patients susceptibles de bénéficier d'un traitement par anti-CTLA4 (Ipilimumab, Yervoy®, Bristol Myers Squibb) [7, 71, 72]. Dans le domaine de l'oncologie thoracique, peu d'études se sont penchées sur l'application des MDSC. Une récente étude menée chez 53 patients traités par Nivolumab en deuxième ligne a mis en évidence une meilleure réponse au traitement et un meilleur pronostic chez les patients présentant une proportion élevée de PMN-MDSC au diagnostic [73]. Une autre étude a révélé une tendance à la diminution du nombre de MDSC circulantes en cas de réponse au traitement chez 10 patients traités par Atezolizumab [74].

A ce titre, l'implication des MDSC dans la réponse aux traitements systémiques et le pronostic des patients atteints d'un CBNPC avancé ou métastatique reste une voie d'étude prometteuse non encore parfaitement élucidée.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Population de l'étude

Quarante et un patients porteurs d'un CBNPC métastatique sans addiction oncogénique, exceptée KRas, ont été assignés à l'étude au diagnostic initial entre le 1^{er} janvier 2018 et le 1^{er} juillet 2019.

Avant leur inclusion, tous les patients ont signé, de manière éclairée, un consentement écrit approuvé par le comité d'éthique du CHU de Limoges (référence n° 287-2018-53).

Ces sujets ont bénéficié, en première ligne, d'une chimiothérapie (couplée ou non au Bevacizumab) ou d'une immunothérapie par anti-PD-1 conditionnelle au statut PD-L1, en accord avec les recommandations en vigueur (seuil d'application ≥ 50 %).

Sur la base des critères RECIST 1.0, les patients ont pu être définis « Répondeurs » ou « Non répondeurs » après deux cures. Par définition, les patients « Répondeurs » démontraient une réponse partielle ou une stabilité de la maladie à deux cures. A l'inverse, les patients « Non répondeurs » annonçaient une progression objective clinique ou scannographique. Ces derniers ont par la suite bénéficié immunothérapie ou d'une chimiothérapie de deuxième ligne selon le schéma thérapeutique initial.

II.2. Analyse de PD-L1 sur tissu tumoral par immuno-histochimique (IHC) au diagnostic

L'expression de PD-L1 sur tissu a été évaluée, au sein du laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Limoges, à partir des prélèvements frais ayant permis le diagnostic histologique. L'analyse immuno-histochimique a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin anti-PD-L1 (clone QR1, technologie Diagnostics®). Les contrôles positifs et négatifs étaient respectivement des tissus amygdaliens sur lame et des tampons dépourvus d'anticorps primaires. La quantification de l'expression de la protéine, rendue en pourcentage de cellules tumorales marquées (PCT), a été déterminée à l'issue de la révélation de l'immuno-marquage membranaire et cytoplasmique. Le rendu conjoint du résultat relatif aux cellules immunitaires infiltrant la tumeur, non systématique en pratique, était laissé au libre choix de l'anatomopathologiste.

II.3. Analyse de PD-1 et PD-L1 sur sang périphérique par cytométrie de flux (CMF)

Le délai moyen entre l'analyse immuno-histochimique, rendue au diagnostic, et la cytométrie de flux, réalisée avant traitement, était en moyenne de 18 jours. Il s'agissait du temps nécessaire au déroulement de la consultation d'annonce, la pose d'un site implantable et l'organisation d'une hospitalisation de jour.

Les échantillons de sang périphérique ont été fraîchement recueillis au diagnostic, chez les patients naïfs de tout traitement, puis avant chaque cycle de chimiothérapie ou immunothérapie de première voire seconde ligne, à savoir tous les 15 ou 21 jours. Ces échantillons correspondaient à des reliquats de tubes de NFS (Numération Formule Sanguine) nécessaires à la validation médicale des cures, afin de ne pas imposer de prélèvement subsidiaire.

La suite du protocole a été réalisée au sein du laboratoire INSERM U1262/CNRS 7276.

Les échantillons sanguins ont été soumis à la lyse des globules rouges par ajout d'une solution tampon hypotonique. Des cocktails d'anticorps monoclonaux, anti PD-1 et anti PD-L1, conjugués à des fluorochromes, ont été utilisés afin de permettre l'expression des marqueurs de surface. Ce marquage a été effectué dans des tubes laissés 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Après lavage, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS pour permettre l'analyse à l'aide d'un cytomètre de flux (Navios Beckman Coulter®). Le traitement des données relatives aux cellules identifiées a été réalisée à l'aide du logiciel Kaluza® (Beckman Coulter®). Les sous-populations de lymphocytes T et MDSC ont été mise en évidence selon l'expressions des marqueurs de surface respectifs : CD3, CD8, CD4, CD127, CD38 et HLA DR pour les lymphocytes, CD11b, CD14, CD33 et Lin pour les MDSC (*Figures 8 et 9*). Nous avons, sur ce principe, isolé les populations suivantes : **lymphocytes T CD4, CD8, cellules myéloïdes, M-MDSC, Granulocytes immatures (Imm Gran)** et **Granulocytes matures (Mature Gran)**. Le résultat de chaque marquage a pu être rendu sous 2 heures dans chaque unité (pourcentage pour l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes, intensité moyenne de fluorescence ou IMF pour l'expression de PD-L1 à la surface MDSC).

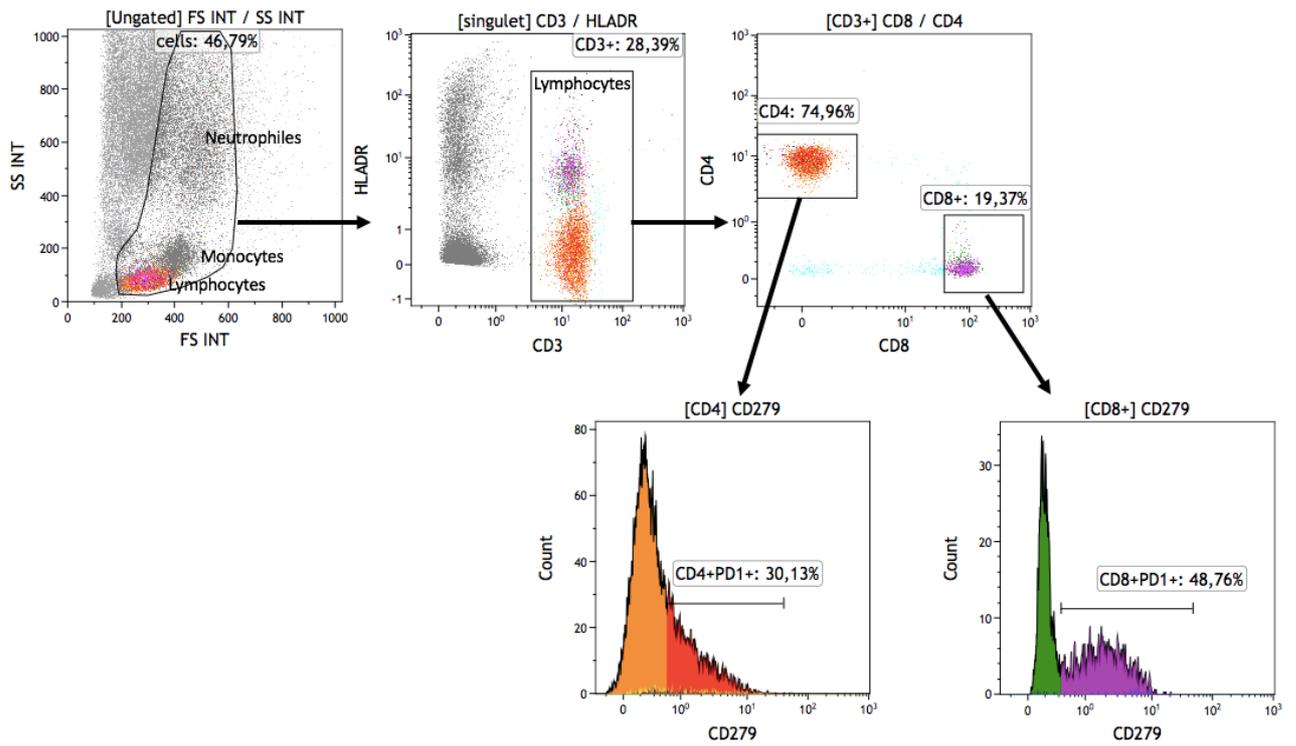


Figure 8: Stratégie de fenêtrage des différentes sous-populations lymphocytaires mises en évidence par cytométrie de flux.
Exemple de mesure de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4+ (30.13%) et T CD8+ (48.76%).

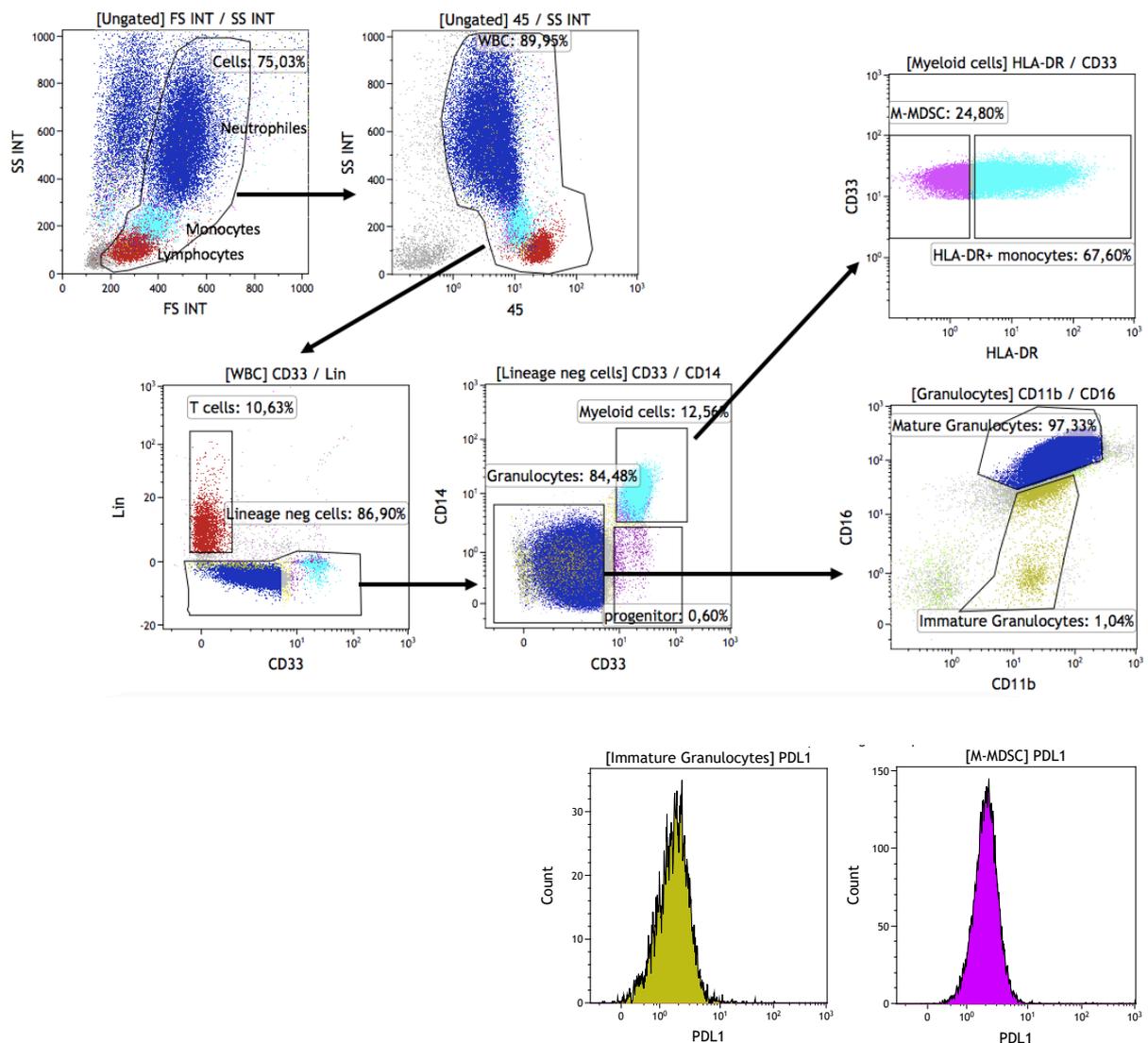


Figure 9: Stratégie de fenêtrage des différentes sous-populations de MDSC mises en évidence par cytométrie de flux.

Exemple de mesure de l'expression de PD-L1 à la surface des granulocytes immatures et des M-MDSC (IMF). Isolement de la population lymphocytaire et de la population Linéage négative (CD33-, CD19-, CD20-, CD123-, CD56-). Mise en évidence des M-MDSC (CD33-, HLA DR-) parmi les cellules myéloïdes (CD33+, CD14+). Mise en évidence des granulocytes matures (CD16+, CD11b+) et des granulocytes immatures (CD11b-) parmi la population granulocytaire (CD33-, CD14-).

II.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des logiciels GraphPad Prism® et Pvalue.io®. Devant la petite taille des échantillons indépendants, nous avons utilisé un test non paramétrique de Mann-Whitney. Nous avons opté pour un coefficient de corrélation de Pearson pour démontrer une relation linéaire significative entre deux variables quantitatives.

Les courbes de survie ont été comparées sur la base du test du Logrank. Pour se faire, nous avons considéré les niveaux d'expression de PD-1 et PD-L1 au diagnostic pour définir des niveaux seuils d'expression et déterminer de fortes ou faibles expressions. Les résultats révélant un p inférieur à 0.05 ont été considérés comme statistiquement significatifs.

II.5. Financement de l'étude

Ces travaux et analyses ont été financés grâce à l'obtention de la Bourse Boehringer Ingelheim® en 2018 (15 000 euros). A titre indicatif, le coût matériel d'une analyse cytométrique sur un échantillon est de l'ordre de 35 euros.

III. CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION ETUDIEE

III.1. Caractéristiques cliniques et histo-pathologiques des patients assignés à l'étude

Les patients ont été séparés en trois groupes selon le schéma thérapeutique instauré («Chimiothérapie première ligne», «Immunothérapie première ligne», « Immunothérapie deuxième ligne »). Les effectifs, caractéristiques cliniques et histo-pathologiques de chaque groupe sont détaillées dans le *Tableau 3*.

Tableau 3: Caractéristiques cliniques et histo-pathologiques des patients assignés à l'étude

	Cohorte (N = 41)	Chimiothérapie première ligne (N = 28)	Immunothérapie première ligne (N = 12)	Immunothérapie deuxième ligne (N = 7*)
Age				
Age médian +/- SD	67 +/- 8	67 +/- 8	68 +/- 7	61 +/- 8
Sexe				
Homme, n (%)	29 (71)	21 (75)	8 (67)	4 (57)
Femme, n (%)	12 (29)	7 (25)	4 (33)	3 (43)
Statut tabagique				
Sevré, n (%)	33 (80)	24 (86)	8 (67)	6 (86)
Nombre Paquets-Années médian +/- SD	35 +/- 21	40 +/- 22	30 +/- 9	50 +/- 29
Actif, n (%)	7 (17)	4 (14)	3 (25)	1 (14)
Nombre Paquets-Années médian +/- SD	40 +/- 35	35	40 +/- 12	-
Non fumeur, n (%)	1 (3)	0 (0)	1 (8)	0 (0)
Exposition professionnelle				
Non exposé, n (%)	39 (95)	27 (96)	11 (92)	7 (100)
Exposé, n (%)	2 (5)	1 (4)	1 (8)	0 (0)
Score PS				
0, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1, n (%)	30 (73)	18 (64)	11 (92)	5 (71)
2, n (%)	11 (27)	10 (36)	1(8)**	2 (29)**
Comorbidités extra-pulmonaires				
Aucune, n (%)	13 (32)	8 (29)	3 (26)	3 (43)
Cardio-vasculaire, n (%)	25 (61)	16 (57)	8 (67)	3 (43)
Cancer en rémission > 5 ans, n (%)	9 (22)	7 (25)	2 (17)	1 (14)
Nombre de sites métastatiques				
1, n (%)	21 (51)	18 (64)	3 (25)	5 (71)
2, n (%)	14 (34)	7 (25)	6 (50)	2 (29)
≥3, n (%)	6 (15)	3 (11)	3 (25)	0 (0)
Sites métastatiques				
Os, n (%)	19 (46)	15 (54)	4 (33)	4 (57)
Poumon ou plèvre, n (%)	13 (32)	8 (29)	5 (42)	2 (29)
Cerveau, n (%)	9 (22)	6 (21)	3 (25)	1 (14)
Surrénale, n (%)	9 (22)	4 (14)	5 (42)	0 (0)
Foie, n (%)	8 (20)	5 (18)	2 (17)	2 (29)
Ganglion sus-clav. ou sous-diaphragmatique, n (%)	4 (10)	2 (7)	3 (25)	0 (0)
Tissu mou, n (%)	2 (5)	2 (7)	0 (0)	0 (0)
Pancréas, n (%)	1 (2)	0 (0)	1 (8)	0 (0)
Type de prélèvement				
Biopsie endo-bronchique, n (%)	16 (40)	10 (36)	5 (42)	5 (71)
Biopsie site métastatique, n (%)	9 (22)	8 (29)	1 (8)	1 (14)
Biopsie pulmonaire trans-pariétale, n (%)	9 (22)	8 (29)	1 (8)	0 (0)
Biopsie exérèse ganglionnaire, n (%)	3 (7)	0 (0)	3 (25)	0 (0)
Cytoponction ganglionnaire, n (%)	2 (5)	2 (7)	0 (0)	1 (14)
Ponction pleurale, n (%)	1 (2)	0 (0)	1 (8)	0 (0)
Biopsie pleurale, n (%)	1 (2)	0 (0)	1 (8)	0 (0)
Histologie				
Adénocarcinome, n (%)	35 (85)	24 (86)	10 (84)	5 (71)
Carcinome épidermoïde, n (%)	4 (10)	3 (11)	1 (8)	1 (14)
Carcinome indifférencié, n (%)	2 (5)	1 (4)	1 (8)	1 (14)
Statut mutationnel				
Non muté KRAS, n (%)	30 (73)	20 (71)	9 (75)	6 (86)
Muté KRAS, n (%)	11 (27)	8 (29)	3 (25)	1 (14)
Statut PD-L1 tumoral (IHC)				
Négatif, n (%)	17 (42)	17 (61)	0 (0)	2 (29)
Positif (≥1 %), n (%)	24 (58)	11 (39)	12 (100)	5 (71)
1 ≤ PD-L1 < 5 %	5 (12)	4 (14)	1(8)***	3 (43)
5 ≤ PD-L1 < 25 %	5 (12)	4 (14)	0 (0)	1 (14)
25 ≤ PD-L1 < 50 %	3 (7)	2 (7)	1(8)***	1 (14)
PDL1 ≥ 50 %	11 (27)	1 (4)	10 (84)	0 (0)
Statut PDL1 lymphocytaire (IHC)				
Non évalué, n (%)	23 (56)	12 (43)	10 (84)	3 (43)
Rendu, n (%)	18 (44)	16 (57)	2 (17)	4 (57)
Négatif, n (%)	8 (20)	8 (29)	0 (0)	1 (14)
Positif (≥1 %), n (%)	10 (24)	8 (29)	2 (17)	3 (43)
1 ≤ PD-L1 < 5 %	2 (5)	2 (7)	0 (0)	0 (0)
5 ≤ PD-L1 < 25 %	6 (15)	4 (14)	2 (17)	2 (29)
25 ≤ PD-L1 < 50 %	2 (5)	2 (7)	0 (0)	1 (14)
PDL1 ≥ 50 %	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Séquence de traitement				
Chimiothérapie 1ière ligne, n (%)	29 (71)			
Chimiothérapie seule, n (%)	14 (34)			
Chimiothérapie puis immunothérapie à progression, n (%)	11 (27)			
Traitement non reçu, n (%)	4 (10)			
Immunothérapie 1ière ligne, n (%)	12 (29)			
Immunothérapie seule, n (%)	7 (17)			
Immunothérapie puis chimiothérapie à progression, n (%)	4 (10)			
Traitement non reçu, n (%)	1 (2)			

* : Sur les sept patients éligibles à une immunothérapie de seconde ligne, six appartenaient déjà au groupe « Chimiothérapie de première ligne », une patiente supplémentaire a été incluse avant l'initiation de l'immunothérapie de seconde ligne.

** : Trois patients ont bénéficié d'une immunothérapie malgré un score PS supérieur à 1, sur décision validée de manière collégiale en RCP.

*** : Deux patients ont bénéficié d'une immunothérapie en première ligne malgré un statut PD-L1 inférieur à 50%, dans le cadre d'un protocole de recherche clinique.

III.2. Séquences thérapeutiques, réponses à deux cycles de traitement et données de survie globale et survie sans progression

Le détail des séquences thérapeutiques, des réponses à deux cycles de traitement et les données de survie figures dans la *Figure 10* et le *Tableau 4*.

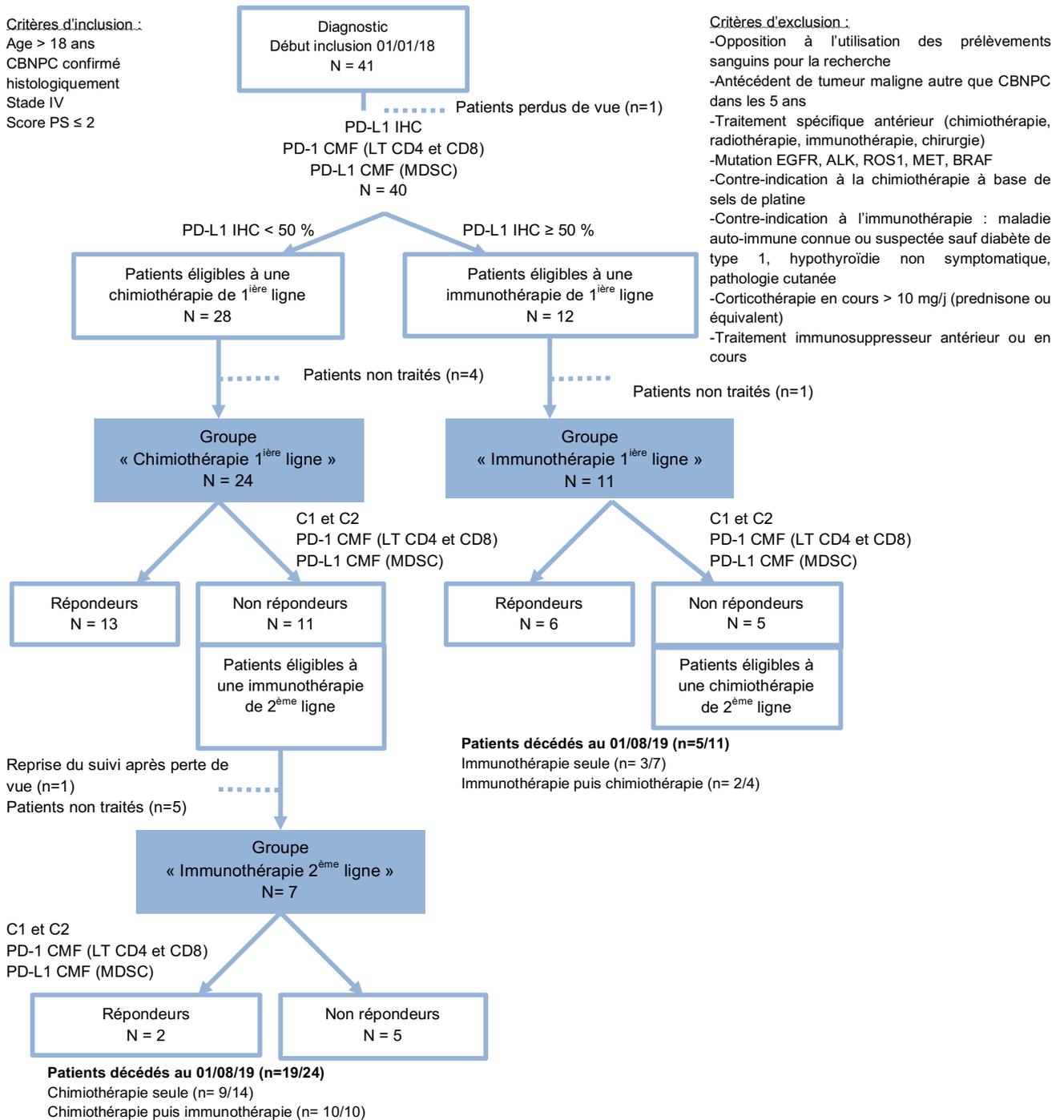


Figure 10: Diagramme des flux des patients assignés à l'étude.

Tableau 4: Traitements administrés, réponses à deux cycles et données de survie des patients répartis en trois groupes "Chimiothérapie première ligne", "Immunothérapie première ligne" et "Immunothérapie deuxième ligne".

	Cohorte (N = 41)	Groupe « Chimiothérapie première ligne » (N = 24/28)	Groupe « Immunothérapie première ligne » (N = 11/12)	Groupe « Immunothérapie deuxième ligne » (N = 7)
Séquence de traitement validée en RCP				
Immunothérapie 1ière ligne, n (%)	12 (29)		12 (100)	
Immunothérapie seule, n (%)	7 (17)		7 (58)	
Immunothérapie puis chimiothérapie à progression, n (%)	4 (10)		4 (34)	
Traitement non reçu, n (%) *	1 (2)		1 (8)	
Chimiothérapie 1ière ligne, n (%)	29 (71)	28 (100)		7 (100)
Chimiothérapie seule, n (%)	14 (34)	14 (50)		-
Chimiothérapie puis immunothérapie à progression, n (%)	11 (27)	10 (36)		7 (100)
Traitement non reçu, n (%) *	4 (10)	4 (14)		0 (0)
Traitement administré				
Chimiothérapie, n (%)	29 (71)	24 (86)	4 (33)	7 (100)
Sel de platine + pemetrexed, n (%)	24 (59)	20 (71)	4 (33)	4 (57)
Sel de platine + gemcitabine, n (%)	2 (5)	2 (7)	0 (0)	1 (14)
Sel de platine + vinorelbine, n (%)	2 (5)	2 (7)	0 (0)	1 (14)
Sel de platine + paclitaxel, n (%)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	1 (14)
Bevacizumab, n (%)	9 (22)	7 (25)	2 (17)	0 (0)
Immunothérapie, n (%)	22 (54)	10 (42)	11 (92)	7 (100)
Nivolumab, n (%)	11 (27)	10 (42)	0 (0)	7 (100)
Pembrolizumab, n (%)	11 (27)	0 (0)	11 (92)	0 (0)
Réponse à 2 cycles de traitement				
Réponse, n (%)		13 (54)	6 (55)	2 (29)
Stabilité, n (%)		7 (29)	2 (18)	0 (0)
Réponse partielle, n (%)		6 (25)	4 (36)	2
Progression, n (%)		11 (46)	5 (45)	5 (71)
Données de survie				
Tous les patients, n	41	24	11	7
Survie globale médiane mois [min ;max]	8.4 [0.3 ; 18.7]	8.8 [0.3 ; 17.6]	8.9 [0.7 ; 18.7]	8.4 [3.3 ; 10.6]
Survie sans progression médiane mois [min ;max]	3.7 [0.3 ; 17.6]	5.7 [0.3 ; 17.6]	1.8 [0.7 ; 16.6]	2.7 [1.7 ; 6.3]
Patients « Répondeurs », n (%)		13	6	2
Survie globale médiane mois [min ;max]		11.4 [4.8 ; 17.6]	11.4 [1.5 ; 18.7]	6.4 [4.3 ; 8.4]
Survie sans progression médiane mois [min ;max]		8.7 [3.3 ; 17.6]	8.5 [1.5 ; 16.6]	3.2 [2.7 ; 3.7]
Patients « Non répondeurs », n(%)		11	5	5
Survie globale médiane mois [min ;max]		5.3 [0.3 ; 15.3]	0.9 [0.7 ; 16.8]	8.4 [3.3 ; 10.6]
Survie sans progression médiane mois [min ;max]		2.7 [0.3 ; 6.5]	1.1 [0.7 ; 2.4]	2.3 [1.7 ; 6.3]

IV. RESULTATS DE L'ANALYSE DE PD-1 A LA SURFACE DES LYMPHOCYTES T CD4 ET CD8 CIRCULANTS PAR CYTOMETRIE DE FLUX

IV.1. Expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 circulants au diagnostic

Lors du diagnostic initial, nous avons évalué l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 du sang périphérique des 40 patients. Les résultats ont pu être rendus de manière exhaustive pour l'intégralité des patients.

Avant tout traitement, l'expression médiane de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 était respectivement de 26.0 % [22.6; 32.3] et 43.0 % [33.8; 50.1] (*Tableau 5, Annexe 1*).

Tableau 5: Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T circulants au diagnostic.

	Moyenne (écart-type)	Médiane [Q25-75]	min	max	n
CD4 PD1+ diagnostic (%)	28.8 (13.0)	26.0 [22.6; 32.3]	7.78	63.1	40
CD8 PD1+diagnostic (%)	43.2 (14.4)	43.0 [33.8; 50.1]	13.5	70.5	40

De manière constante, les analyses univariées ont démontré ces résultats indépendants de l'histologie et des caractéristiques propres aux individus, à savoir le score PS, le sexe, l'âge et le statut tabagique (*Annexe 2*).

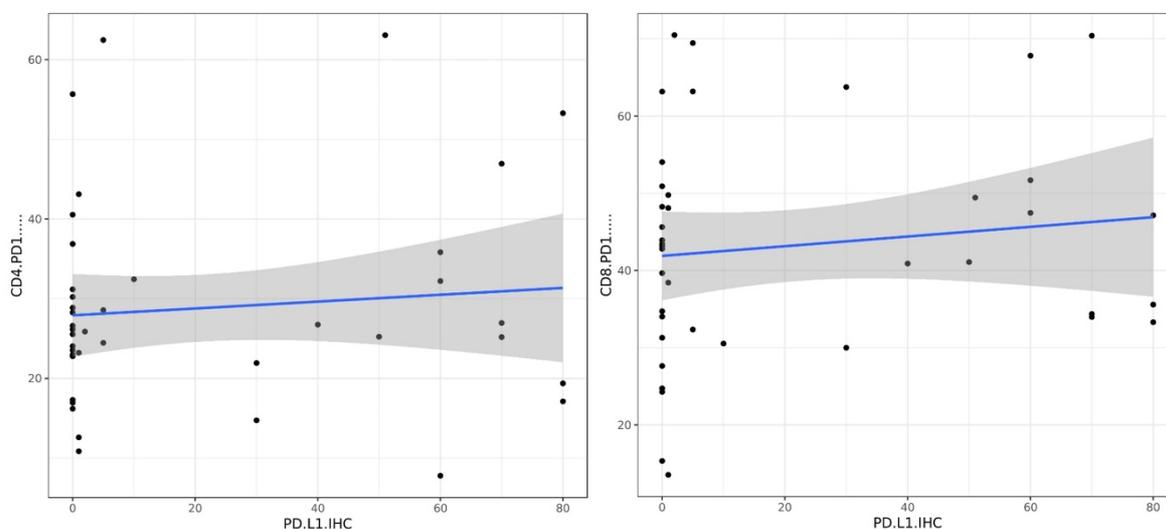
Parallèlement, nous avons pu observer une corrélation linéaire et statistiquement significative entre l'expression de PD-1 à la surface des CD4 et des CD8 (*Annexe 3*, coefficient de corrélation de Pearson 0.427 ; IC95 [0.133-0.651], $p < 0.01$).

Nous avons ensuite cherché à comparer l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 circulants au diagnostic au statut PD-L1 obtenu par IHC.

L'expression de PD-1 sur les cellules T obtenue à partir du sang périphérique ne s'associe pas à l'expression de PD-L1 sur les tissus tumoraux chez les patients atteints de CBNPC avancés.

Comme l'indique la *Figure 11*, l'expression de PD-1 sur les cellules T CD4 et CD8 du sang périphérique n'était pas statistiquement corrélée à l'expression de PD-L1 mesurée au sein des cellules tumorales par immuno-histochimie ($p=0.54$ et 0.43). Le pourcentage d'expression de

PD-1 sur les cellules T semblait statistiquement comparable malgré des statuts PD-L1 négatifs et positifs.



	Médiane [Q25-75]	min	max	n	Coeff. de corrélation (IC95)	p
PD-L1 IHC (%)	1.00 [0; 50.2]	0	80.0	40	-	-
CD4 PD1+ (%)	26.0 [22.6; 32.3]	7.78	63.1	40	0.0987 (-0.220; 0.398)	0.54
CD8 PD1+ (%)	43.0 [33.8; 50.1]	13.5	70.5	40	0.130 (-0.190; 0.424)	0.43

Figure 11: Mise en évidence de l'absence de corrélation entre l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic et le statut PD-L1 obtenu par immuno-histochimie.

IV.2. Evaluation de la réponse à la chimiothérapie de première ligne en fonction de l'expression évolutive de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8

Nous avons étudié les niveaux d'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 au cours des cures de chimiothérapie de première ligne (Tableau 6). Aucune différence significative sur les niveaux d'expressions respectifs n'a été observée au cours de l'avancée du traitement (Annexe 4).

Tableau 6: Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 circulants au diagnostic, après une et deux cures de chimiothérapie.

	Moyenne (écart-type)	Médiane [Q25-75]	Min	Max	n
CD4 PD1+ diagnostic (%)	28.3 (11.6)	26.0 [22.9; 29.4]	10.8	62.5	24
CD4 PD1+ C1 (%)	28.4 (11.7)	27.3 [20.9; 33.5]	9.45	63.3	20
CD4 PD1+ C2 (%)	35.8 (14.6)	33.1 [25.9; 41.8]	17.2	66.3	11
CD8 PD1+ diagnostic (%)	43.7 (14.9)	43.0 [33.1; 51.7]	15.3	70.5	24
CD8 PD1+ C1 (%)	40.1 (12.6)	39.5 [28.4; 49.3]	23.1	62.5	20
CD8 PD1+ C2 (%)	44.2 (12.6)	41.2 [35.8; 51.4]	29.4	64.7	11

Nous avons par la suite tenté de corrélés les résultats à la réponse thérapeutique.

Le haut niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 est associé à la réponse thérapeutique après deux cures de chimiothérapie de première ligne.

Parmi les 24 patients traités par chimiothérapie en première ligne, 13 ont été décrits « Répondeurs » et 11 « Non répondeurs » après deux cures. Au diagnostic, il ne semblait pas exister de lien significatif entre le niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes CD4 et la réponse au traitement (« Répondeurs » CD4 PD1+ 31.1 % vs « Non répondeurs » CD4 PD1+, 25.0 % p=0.30). Ces données figurent dans le *Tableau 7*.

Toutefois, une différence significative s'est révélée après deux cures, indépendamment de l'histologie, du sexe, de l'âge, du statut tabagique et du score PS (*Tableau 7, Annexes 5 et 6*). Cette différence a été observée dans le sens d'une moindre expression de PD-1 à la surface des LT CD4 dans le groupe « Non répondeur » (CD4 PD1+ 19.5 % vs CD4 PD1+ 41.9 %, p=0.012). A l'inverse, le groupe de patients « Répondeurs » a exposé des niveaux d'expression de PD-1 à la surface des LT CD4 supérieurs.

Tableau 7: Comparaison des niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic et au cours de la chimiothérapie de première ligne, entre les patients répondeurs et non répondeurs au traitement.

	Répondeurs (n = 13)	Non répondeurs (n = 11)	n	p	Test
CD4 PD1+ (%) diagnostic, moyenne (%)	31.1 (±13.7)	25.0 (±7.91)	24	0.3	Mann-Whitney
CD4 PD1+ C1, moyenne (%)	32.2 (±12.4)	22.8 (±8.40)	20	0.13	Mann-Whitney
CD4 PD1+ C2, moyenne (%)	41.9 (±12.2)	19.5 (±2.05)	11	0.012	Mann-Whitney
CD8 PD1+ diagnostic, moyenne (%)	37.9 (±14.5)	50.5 (±12.8)	24	0.026	Mann-Whitney
CD8 PD1+ C1, moyenne (%)	36.9 (±11.2)	45.1 (±13.7)	20	0.16	Mann-Whitney
CD8 PD1+ C2, moyenne (%)	41.7 (±12.6)	50.8 (±12.3)	11	0.38	Mann-Whitney

Un faible niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8 au diagnostic est associé à la réponse thérapeutique à la chimiothérapie de première ligne.

Nous avons observé un niveau d'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8+ significativement plus bas au diagnostic dans le groupe de patients « Répondeurs » à la chimiothérapie par rapport au groupe « Non Répondeurs » (CD8 PD1+ 37.9 % vs CD8 PD1+ 50.5 % ; p=0.026), indépendamment de l'histologie, du sexe, de l'âge, du statut tabagique et du score PS (*Tableau 7, Annexes 5 et 6*).

Ces données démontrent que l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 périphériques est associée à des résultats cliniques plus défavorables dans le CBNPC.

L'ensemble des données est illustré par la *Figure 12*.

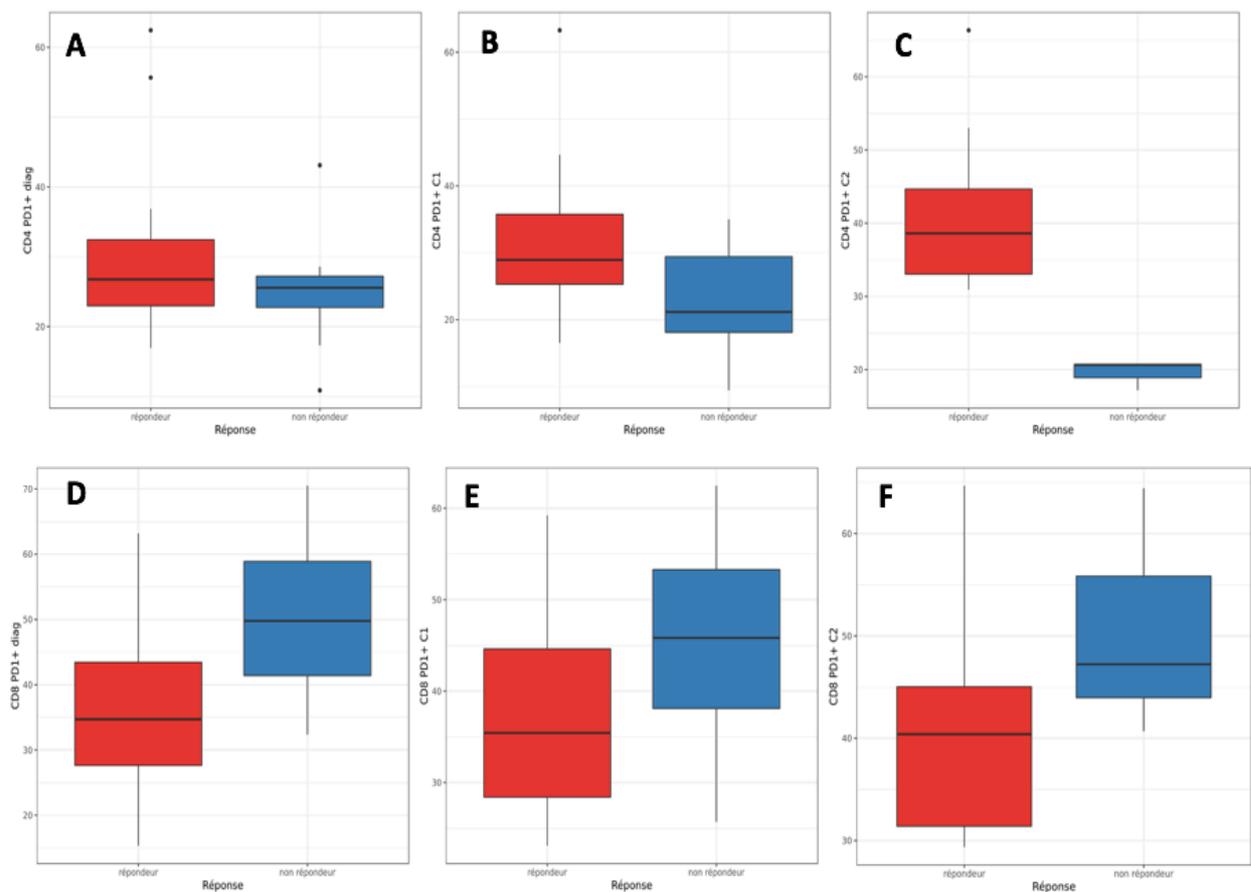


Figure 12: Comparaison des niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic et au cours de la chimiothérapie de première ligne, entre les patients répondeurs et non répondeurs au traitement. A : CD4 PD-1+ au diagnostic, Répondeurs à gauche versus Non répondeurs à droite. B : CD4 PD-1+ après une cure de chimiothérapie. C : CD4 PD-1+ après 2 cures de chimiothérapie ($p=0.012$). D : CD8 PD-1+ au diagnostic ($p=0.026$). E : CD8 PD-1+ après une cure de chimiothérapie. F : CD8 PD-1+ après 2 cures de chimiothérapie.

IV.3. Evaluation de la survie après une chimiothérapie de première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic

Pour cette partie de l'étude, nous nous sommes attardés sur les données de survie globale et survie sans progression des patients traités par chimiothérapie de première ligne voire immunothérapie de deuxième ligne en cas de progression. Comme décrit dans la partie II.4, nous avons retenus les médianes d'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic, à savoir 26.0 et 43.0 %.

Un haut niveau d'expression de PD-1 sur les LT CD4 au diagnostic est associé à un meilleur pronostic clinique.

Le taux de survie globale était statistiquement différent suivant l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes CD4+ au diagnostic (*Tableau 8, Figure 11*). En effet, un niveau d'expression de PD-1 supérieur ou égal à 26% sur les lymphocytes T CD4+ au diagnostic était corrélé à une meilleure survie par rapport à un niveau d'expression inférieur (médiane de survie globale 15.2 mois [7.8 ; -] vs 8.3 mois [4.8 ; -] soit une différence de **6.9 mois**; p=0.01). L'étude de la relation avec les variables cliniques et histo-pathologiques propres aux individus a mis en évidence une corrélation significative entre les données de survie globale et le score PS (p = 0.015) (*Annexe 7*). Après ajustement, un niveau d'expression de PD-1 à la surface des CD4 supérieur ou égal à 26 % au diagnostic semblait être un facteur protecteur indépendant de la survenue du décès (HR 0.312 [0.119 ; 0.815] ; p=0.017).

Ces résultats ont conforté les données de survie sans progression. Un faible niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 au diagnostic était associé à une progression plus précoce de la maladie (médiane de survie sans progression 3.5 mois [2.3;-] vs 11.4 mois [6.1;-] ; p<0.01, soit une différence de **7.9 mois**).

Le score PS n'affectait pas le taux de survie sans progression (*Annexe 7, p=0.15*).

Tableau 8: Survie globale et survie sans progression des patients traités par chimiothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes au diagnostic.

Groupe « Chimiothérapie 1 ^{ère} ligne »				
N = 24				
	CD4 PD-1+ < 26 %	CD4 PD-1+ ≥ 26 %	p	Test
Survie globale médiane mois (IC95)	8.33 (4.77 ; -)	15.2 (7.77 ; -)	0,01	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)	3.50 (2.33 ; -)	11.4 (6.13 ; -)	<0.01	Logrank
	CD8 PD-1+ < 43 %	CD8 PD-1+ ≥ 43 %	p	Test
Survie globale médiane mois (IC95)	10.2 (7.77 ; -)	8.65 (5.27 ; -)	0.37	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)	5.72 (4.10 ; -)	5.02 (2.33 ; -)	0.59	Logrank

Le niveau d'expression PD-1 sur les lymphocytes T CD8 au diagnostic n'est pas associé au pronostic clinique.

Le taux de survie globale et survie sans progression n'était pas statistiquement significativement différent suivant l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8, que ce dernier soit supérieur ou inférieur à 43% (*Tableau 8, p = 0.37 et 0.59, Figure 13*).

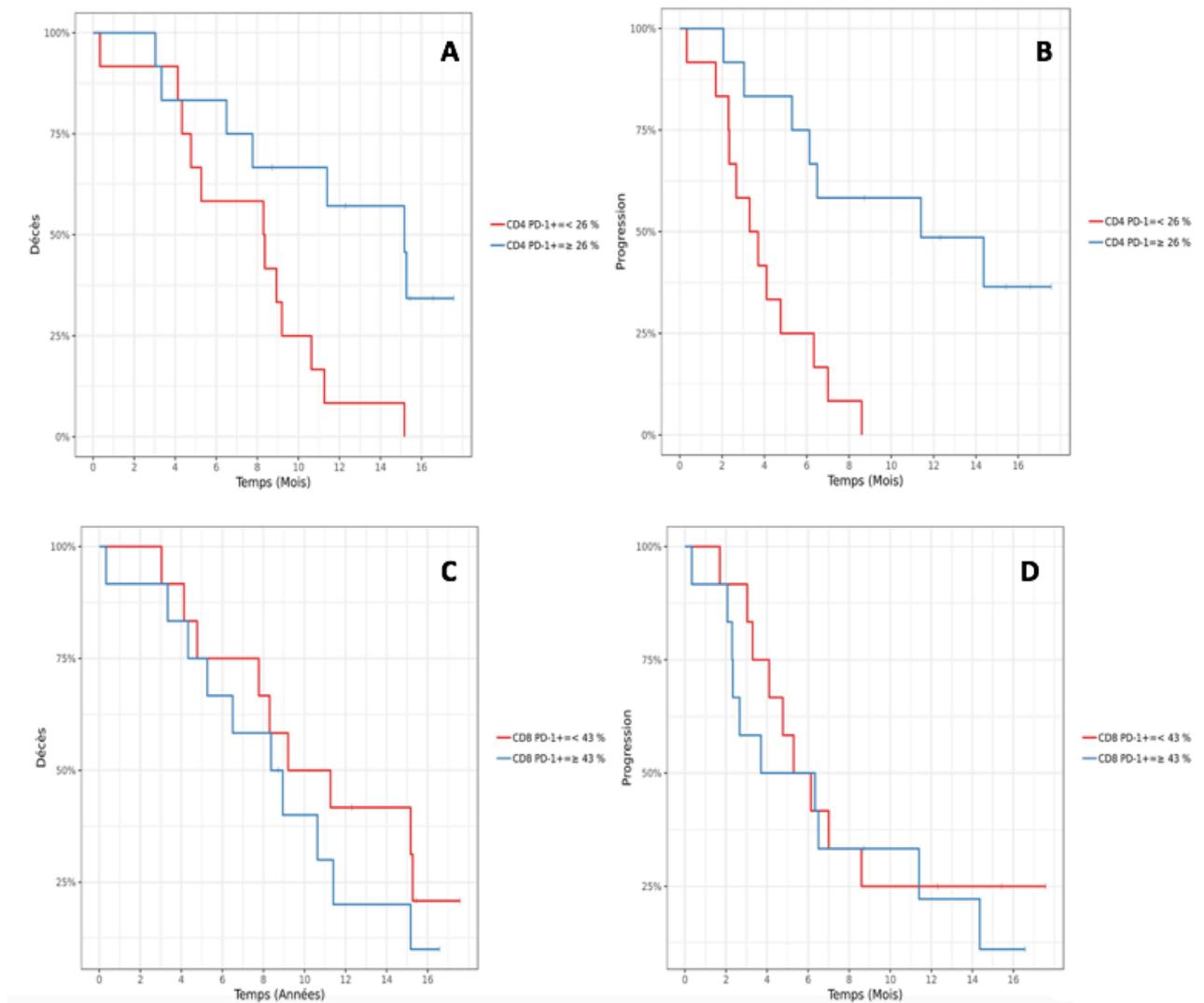


Figure 13: Courbes de survie globale (à gauche) et survie sans progression (à droite) des patients traités par chimiothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes au diagnostic.
 A : Survie globale en fonction du niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes CD4 au diagnostic (<26 % ou ≥26 % ; 8.3 mois vs 15.2 mois, $p=0.01$). B : Survie sans progression en fonction du niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes CD4 au diagnostic (3.5 mois vs 11.4 mois ; $p<0.01$). C : Survie globale en fonction du niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes CD8 au diagnostic (<43 % ou ≥43 %, 10.2 mois vs 8.6 mois, $p=0.37$). D : Survie sans progression en fonction du niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes CD8 au diagnostic (5.7 mois vs 5.0 mois ; $p=0.59$).

IV.4. Evaluation de la réponse à l'immunothérapie de première et deuxième ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic

Cette partie de l'étude a concerné un effectif plus restreint de patients, à savoir 11 traités par immunothérapie en première ligne et 7 traités par immunothérapie en deuxième ligne.

A l'inverse des patients traités par chimiothérapie, le niveau d'expression de PD-1 n'a pas été étudié de manière prospective. En effet, la liaison de l'anticorps thérapeutique anti-PD-1 à son ligand PD-1 a rendu le marquage inaccessible à toute interprétation cytométrique et a induit la négativité des mesures.

Les patients traités par immunothérapie en première ligne ont présenté des niveaux d'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic comparables à ceux traités par chimiothérapie. La médiane d'expression de PD-1 était respectivement de 26.9 % [24.2; 41.4] et 47.1 % [35.0; 50.6] sur les lymphocytes T CD4 et CD8 (*Tableau 9, Annexe 8*).

Tableau 9: Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 circulants au diagnostic chez les patients traités par immunothérapie anti-PD-1.

	Moyenne (écart-type)	Médiane [Q25-75]	Min	Max	n
CD4 PD1+ diagnostic (%)	33.3 (15.1)	26.9 [24.2; 41.4]	14.7	63.1	11
CD8 PD1+ diagnostic (%)	46.3 (13.4)	47.1 [35.0; 50.6]	30.0	70.4	11

L'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic n'est pas associée à la réponse aux anti-PD-1 en première et seconde ligne.

Parmi le petit effectif de 11 patients traités par anti-PD-1 en première ligne, 6 se sont révélés « Répondeurs » et 5 « Non Répondeurs » à deux cures. Les niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes CD4 et CD8 n'ont pas montré de différence significative entre les patients « Répondeurs » et Non Répondeurs (*Tableau 10, p=0.93, Figure 14, Annexe 10*).

Tableau 10: Comparaison des niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic entre les patients répondeurs et non répondeurs à deux cures d'immunothérapie anti-PD-1.

	Répondeurs (n = 6)	Non répondeurs (n = 5)	n	p	Test
CD4 PD1+ diagnostic, moyenne	34.1 (±17.1)	32.3 (±14.2)	11	0.93	Mann-Whitney
CD8 PD1+ diagnostic, moyenne	45.3 (±14.1)	47.5 (±13.9)	11	0.93	Mann-Whitney

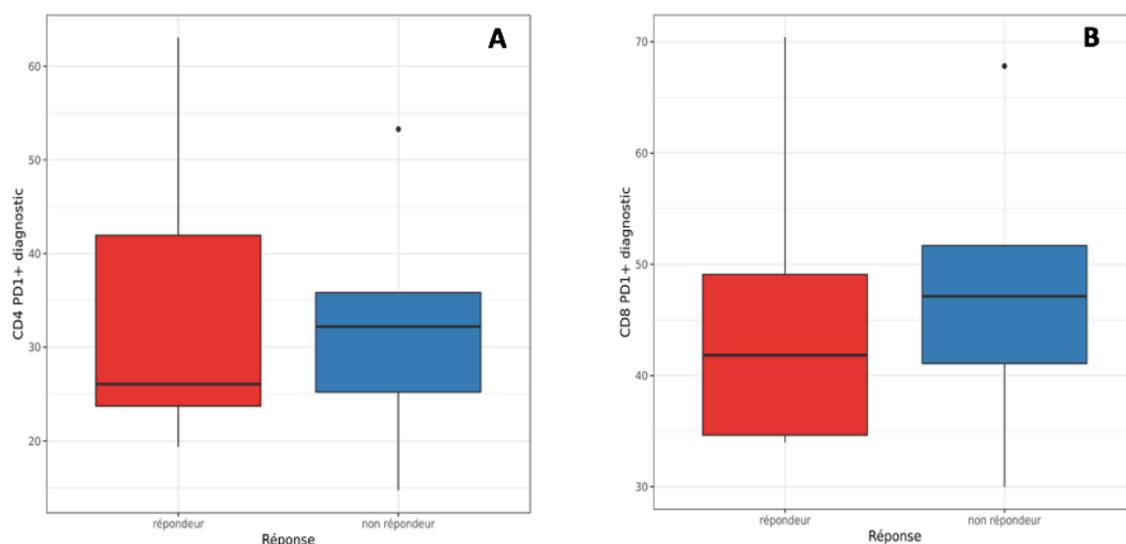


Figure 14: Comparaison des niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic entre les patients répondeurs et non répondeurs à l'immunothérapie de première ligne.
 A : CD4 PD-1+ au diagnostic, Répondeurs à gauche versus Non répondeurs à droite. B : CD8 PD-1+ au diagnostic, Répondeurs à gauche versus Non répondeurs à droite.

IV.5. Evaluation de la survie après une immunothérapie de première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic

Le niveau d'expression PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic n'est pas associé au pronostic clinique.

Le taux de survie globale n'était pas statistiquement significativement différent suivant le niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic. Il en est de même pour la survie sans progression, non significativement différente selon les niveaux d'expression (Tableau 11, Annexe 9).

Tableau 11: Survie globale et survie sans progression des patients traités par immunothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes au diagnostic.

Groupe « Immunothérapie 1 ^{ère} ligne »				
N = 11				
	CD4 PD-1+ < 26 %	CD4 PD-1+ ≥ 26 %	p	Test
Survie globale				
Médiane mois (IC95)	13.3 (8.93; -)	9.50 (9.50; -)	0.62	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)				
	5.32 (1.77; -)	8.77 (0.767; -)	0.73	Logrank
	CD8 PD-1+ < 43 %	CD8 PD-1+ ≥ 43 %	p	Test
Survie globale				
Médiane mois (IC95)	9.50 (8.93; -)	- (13.3; -)	0.61	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)				
	8.27 (2.37; -)	1.77 (0.767; -)	0.8	Logrank

V. RESULTATS DE L'ANALYSE DE PD-L1 A LA SURFACE DES MDSC CIRCULANTES PAR CYTOMETRIE DE FLUX

V.1. Expression de PD-L1 sur les MDSC et sous-populations circulantes au diagnostic

Nous avons tenté d'évaluer l'expression de PD-1 sur les cellules myéloïdes et sous populations de MDSC du sang périphérique des 40 patients lors du diagnostic initial. Les résultats ont pu être rendus de manière exhaustive pour 36 patients, soit pour 90 % d'entre eux.

Avant tout traitement, l'intensité moyenne de fluorescence (IMF), reflétant l'expression de PD-L1 à la surface des cellules myéloïdes et des sous populations isolées (M-MDSC, granulocytes immatures et matures), était respectivement de 8.34 [4.33; 17.5], 5.90 [3.11; 11.2], 3.21 [2.27; 4.48] et 5.13 [3.05; 9.63] (Tableau 12, Annexe 1). Les résultats se sont montrés indépendants de l'histologie, de l'âge, du sexe et du statut tabagique (Annexe 2).

Tableau 12: Expression de PD-1 à la surface des MDSC circulantes au diagnostic.

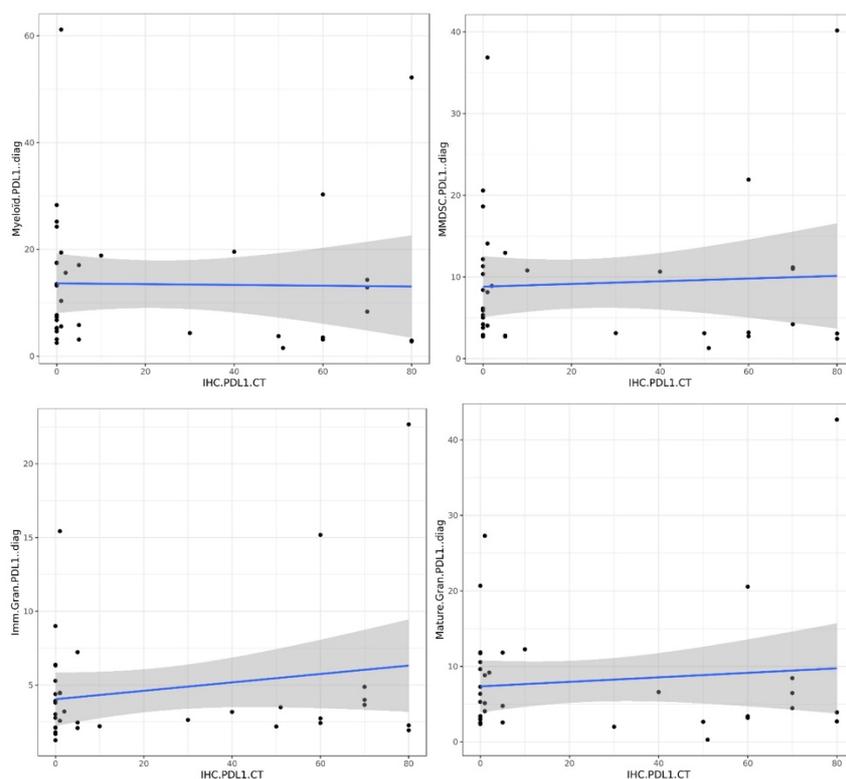
	Moyenne (écart-type)	Médiane [Q25-75]	min	max	n
Myeloïd PDL1+ diag (IMF)	13.5 (13.2)	8.34 [4.33; 17.5]	1.54	61.1	37
MMDSC PDL1+ diag (IMF)	9.18 (8.87)	5.90 [3.11; 11.2]	1.29	40.2	37
Imm Gran PDL1+ diag (IMF)	4.68 (4.39)	3.21 [2.27; 4.48]	1.26	22.7	37
Mature Gran PDL1+ diag (IMF)	8.02 (8.26)	5.13 [3.05; 9.63]	0.290	42.7	37

Nous avons pu observer une corrélation statistiquement significative entre l'ensemble des données. En effet, l'intensité du marquage PD-L1 sur une sous population était reliée de manière linéaire et positive au marquage annoncé sur une autre sous population ($p < 0.01$, coefficient de corrélation 0.94 [0.777 ; 0.981]).

Nous avons ensuite cherché à comparer l'expression de PD-L1 sur les MDSC circulantes au diagnostic au statut PD-L1 obtenu par IHC.

L'expression de PD-L1 sur les MDSC obtenue à partir du sang périphérique ne s'associe pas à l'expression de PD-L1 sur les tissus tumoraux chez les patients atteints de CBNPC avancés.

Comme l'indique la *Figure 15*, l'expression de PD-L1 sur l'ensemble des sous populations de MDSC n'était pas statistiquement corrélée à l'expression tumorale de PD-L1 mesurée par immuno-histochimie ($p > 0.05$). L'expression de PD-L1 sur les cellules T semblait statistiquement comparable malgré des statuts PD-L1 tumoraux négatifs et positifs.



	Médiane [Q25-75]	min	max	n	Coeff. de corrélation (IC95)	p
IHC PDL1 CT (%)	1.00 [0; 50.2]	0	80.0	40	-	-
Myeloïd PDL1+ diag (IMF)	8.34 [4.33; 17.5]	1.54	61.1	37	-0.0173 (-0.339; 0.308)	0.92
MMDSC PDL1+ diag (IMF)	5.90 [3.11; 11.2]	1.29	40.2	37	0.0569 (-0.272; 0.374)	0.74
Imm Gran PDL1+ diag (IMF)	3.21 [2.27; 4.48]	1.26	22.7	37	0.199 (-0.134; 0.491)	0.24
Mature Gran PDL1+ diag (IMF)	5.13 [3.05; 9.63]	0.290	42.7	37	0.111 (-0.221; 0.420)	0.51

Figure 15: Mise en évidence de l'absence de corrélation entre l'expression de PD-L1 à la surface des MDSC au diagnostic et le statut PD-L1 obtenu par immuno-histochimie.

V.2. Evaluation de la réponse à la chimiothérapie de première ligne en fonction de l'expression évolutive de PD-L1 sur les MDSC circulantes

Nous avons étudié les niveaux d'expression de PD-L1 à la surface des MDSC et sous populations au cours des cures de chimiothérapie de première ligne (*Tableau 13, Annexe 4*). Aucune différence significative des niveaux d'expressions respectifs ne s'est prononcée au cours de l'avancée du traitement.

Les patients ayant reçu un traitement par Bevacizumab (N= 7) ont présenté, après une cure, une expression de PD-L1 à la surface des granulocytes matures circulants plus faible que les patients ayant reçu un doublet de chimiothérapie sans Bevacizumab (IMF 4.90 +/- 1.42 vs 9.55 +/- 5.15, p=0.043).

Tableau 13: Expression de PD-L1 à la surface des MDSC circulantes au diagnostic, après une et deux cures de chimiothérapie.

	Moyenne (écart-type)	Médiane [Q25-75]	Min	Max	n
Myeloïd PDL1+ diag (IMF)	12.9 (11.2)	9.02 [5.36; 17.3]	2.49	52.2	22
Myeloïd PDL1+ C1 (IMF)	14.7 (6.42)	15.8 [9.60; 19.6]	2.81	24.4	18
Myeloïd PDL1+ C2 (IMF)	7.93 (5.26)	7.30 [3.78; 10.8]	2.19	16.9	7
MMDSC PDL1+ diag (IMF)	8.99 (8.63)	6.02 [3.28; 10.8]	2.71	40.2	22
MMDSC PDL1+ C1 (IMF)	8.96 (4.48)	7.96 [5.50; 12.0]	3.06	16.9	18
MMDSC PDL1+ C2 (IMF)	6.61 (4.48)	6.76 [2.80; 8.45]	2.35	14.7	7
Imm Gran PDL1+ diag (IMF)	4.49 (4.51)	3.10 [2.27; 4.32]	1.26	22.7	22
Imm Gran PDL1+ C1 (IMF)	4.02 (1.81)	3.92 [2.47; 4.94]	1.75	8.17	18
Imm Gran PDL1+ C2 (IMF)	3.53 (1.74)	4.44 [1.84; 4.67]	1.50	5.74	7
Mature Gran PDL1+ diag (IMF)	8.34 (8.96)	5.21 [3.13; 10.3]	2.00	42.7	22
Mature Gran PDL1+ C1 (IMF)	8.26 (4.88)	6.38 [4.87; 9.44]	3.64	20.2	18
Mature Gran PDL1+ C2 (IMF)	4.70 (1.77)	5.38 [3.20; 6.24]	2.31	6.37	7

Nous avons par la suite tenté de corréler les résultats à la réponse thérapeutique.

Le niveau d'expression de PD-L1 sur les MDSC et les sous populations n'est pas associé à la réponse à la chimiothérapie de première ligne.

Aucune relation statistiquement significative ne s'est révélée entre le niveau d'expression de PD-L1 à la surface des MDSC et la réponse à la chimiothérapie de première ligne (Tableau 14, Annexe 5). Une tendance à la diminution de l'expression de PD-L1 à la surface de l'ensemble des sous-populations a toutefois été soulignée chez les patients répondeurs à deux cures.

Tableau 14: Comparaison des niveaux d'expression de PD-L1 sur les MDSC et sous populations au diagnostic et au cours de la chimiothérapie de première ligne, entre les patients répondeurs et non répondeurs au traitement.

	Répondeurs (n = 13)	Non répondeurs (n = 11)	n	p	Test
Myeloïde PDL1+ diag moyenne (IMF)	15.5 (±14.2)	10.3 (±6.93)	22	0.44	Mann-Whitney
Myeloïde PDL1+ C1 moyenne (IMF)	13.2 (±5.68)	16.6 (±7.17)	18	0.32	Mann-Whitney
Myeloïde PDL1+ C2 moyenne (IMF)	7.13 (±3.82)	9.92 (±9.81)	7	0.86	Mann-Whitney
MMDSC PDL1+ diag moyenne (IMF)	11.2 (±11.0)	6.79 (±4.95)	22	0.39	Mann-Whitney
MMDSC PDL1+ C1 moyenne (IMF)	8.93 (±4.25)	8.99 (±5.05)	18	0.97	Mann-Whitney
MMDSC PDL1+ C2 moyenne (IMF)	7.38 (±5.04)	4.69 (±2.93)	7	0.57	Mann-Whitney
Imm Gran PDL1+ diag moyenne (IMF)	5.44 (±6.19)	3.54 (±1.59)	22	0.95	Mann-Whitney
Imm Gran PDL1+ C1 moyenne (IMF)	4.15 (±2.07)	3.86 (±1.55)	18	1	Mann-Whitney
Imm Gran PDL1+ C2 moyenne (IMF)	3.63 (±1.88)	3.29 (±1.96)	7	1	Mann-Whitney
Mature Gran PDL1+ diag moyenne (IMF)	10.7 (±12.0)	5.95 (±3.61)	22	0.4	Mann-Whitney
Mature Gran PDL1+ C1 moyenne (IMF)	7.71 (±4.73)	8.95 (±5.29)	18	0.56	Mann-Whitney
Mature Gran PDL1+ C2 moyenne (IMF)	5.05 (±1.73)	3.84 (±2.17)	7	0.38	Mann-Whitney

V.3. Evaluation de la survie après une chimiothérapie de première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 sur les MDSC et sous-populations au diagnostic

Nous avons considéré les niveaux d'expression médians de PD-L1 au diagnostic sur les cellules myéloïdes et les sous-populations.

Le pourcentage de M-MDSC et granulocytes immatures au diagnostic est associé à pronostic clinique péjoratif. En revanche, une forte expression de PD-L1 sur les M-MDSC au diagnostic est associée à un meilleur pronostic clinique.

Les patients ayant présenté un pourcentage de M-MDSC et granulocytes immatures élevé au diagnostic ont révélé une moindre survie globale (Tableau 15 : médiane de survie globale 6.5 mois vs 11.4 mois en fonction de M-MDSC \geq 2.02 %, 5.3 mois vs 11.3 mois en fonction de Imm Gran \geq 0,89 % ; p = 0.01 et 0.042).

A l'inverse, le niveau d'expression de PDL1 à la surface des M-MDSC s'est révélé être un indicateur de meilleure survie sans progression. En effet, les patients ayant présenté un haut niveau d'expression de PD-L1 sur la sous-population M-MDSC supérieur ou égal à 5.90 ont progressé plus tardivement sous traitement (Tableau 15, Annexe 7 : médiane de survie sans progression 6.5 mois vs 3.3 mois soit un gain de **3.2 mois** ; p = 0.028).

Tableau 15: Survie globale et survie sans progression des patients traités par chimiothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 sur les MDSC et sous populations.

Groupe « Chimiothérapie 1 ^{ière} ligne » N = 24				
	Myeloïd PDL1+ diag < 8.34 IMF	Myeloïd PDL1+ diag ≥ 8.34 IMF	p	Test
Survie globale médiane mois (IC95)	10.6 (4.33; -)	8.37 (6.50; -)	0.71	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)	3.70 (3.03; -)	6.33 (4.10; -)	0.36	Logrank
	MMDSC PDL1+ diag < 5.90 IMF	MMDSC PDL1+ diag ≥ 5.90 IMF	p	Test
Survie globale médiane mois (IC95)	5.27 (4.13; -)	9.20 (8.30; -)	0.092	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)	3.30 (2.30; -)	6.50 (4.10; -)	0.028	Logrank
	Imm Gran PDL1+ diag < 3.21 IMF	Imm Gran PDL1+ diag ≥ 3.21 IMF	p	Test
Survie globale médiane mois (IC95)	10.9 (4.33; -)	8.33 (5.27; -)	0.34	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)	4.50 (3.03; -)	5.55 (2.67; -)	0.73	Logrank
	Mature Gran PDL1+ diag < 5.13 IMF	Mature Gran PDL1+ diag ≥ 5.13 IMF	p	Test
Survie globale médiane mois (IC95)	9.20 (4.13; -)	8.65 (6.50; -)	0.63	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)	3.50 (2.33; -)	6.42 (4.10; -)	0.25	Logrank
	Imm Gran % diag < 0.89 %	Imm Gran % diag ≥ 0.89 %	p	Test
Survie globale médiane mois (IC95)	11.3 (8.93; -)	5.27 (4.13; -)	0.042	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)	6.33 (4.10; -)	3.70 (2.30; -)	0.089	Logrank
	MMDSC % diag < 2.02 %	MMDSC % diag ≥ 2.02 %	p	Test
Survie globale médiane mois (IC95)	11.4 (10.6; -)	6.50 (4.13; -)	0.011	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)	6.13 (3.70; -)	4.10 (2.67; -)	0.13	Logrank

Les résultats sont illustrés par la *Figure 16*.

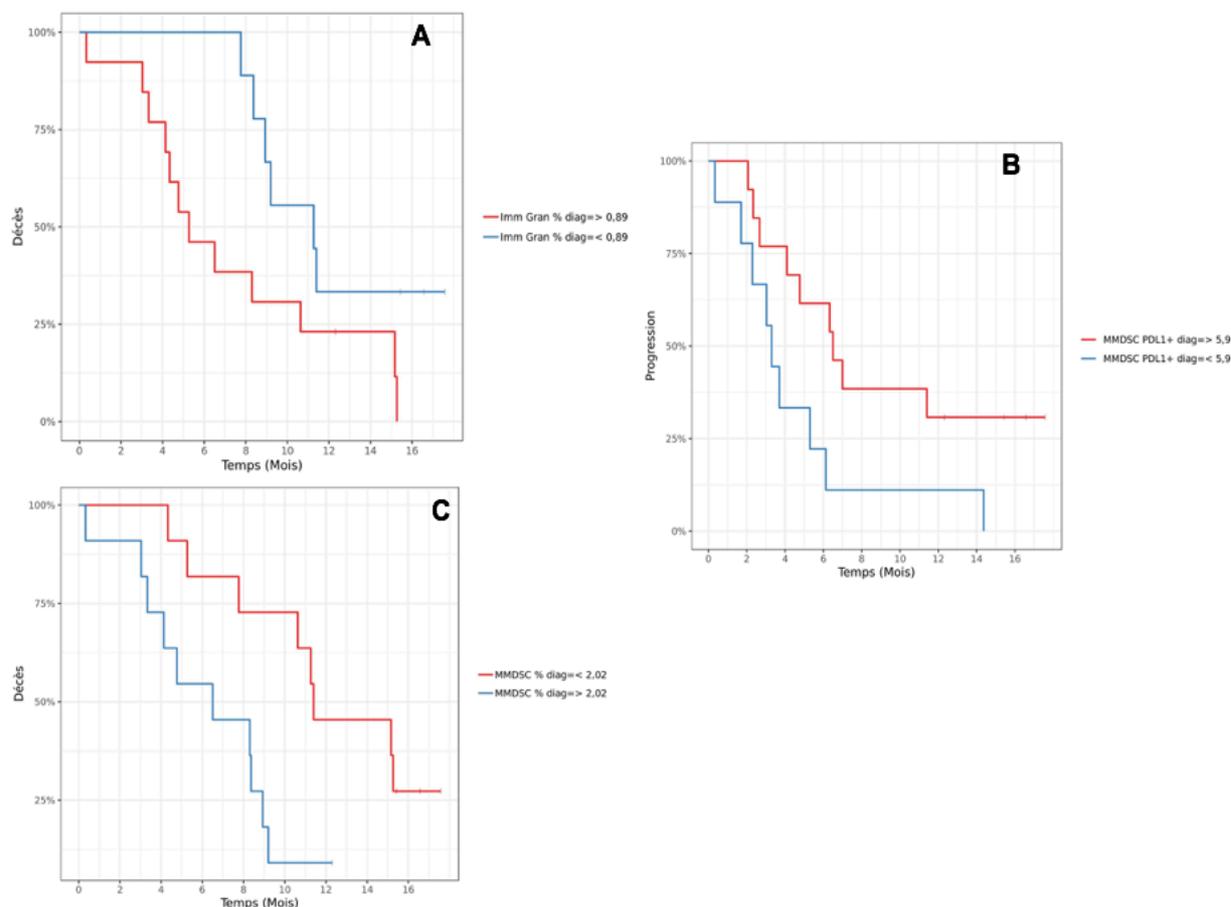


Figure 16: Courbes de survie globale (à gauche) et survie sans progression (à droite) des patients traités par chimiothérapie en première ligne en fonction du pourcentage de Imm Gran, MMDS et de l'expression de PD-1 sur les MMDSC au diagnostic.

A : Survie globale en fonction du pourcentage de Imm Gran au diagnostic (<0.89 % ou $\geq 0,89$ % ; 11.3 mois vs 5.27 mois, $p=0.042$). B : Survie sans progression en fonction du niveau d'expression de PD-L1 sur les M-MDSC au diagnostic (< 5.90 IMF ou ≥ 5.90 IMF ; 3.30 mois vs 6.50 mois ; $p=0.028$). C : Survie globale en fonction du pourcentage de M-MDSC au diagnostic (<2.02 % ou ≥ 2.02 % , 11.4 mois vs 6.50 mois ; $p= 0.011$).

V.4. Evaluation de la réponse à l'immunothérapie de première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 à la surface des MDSC circulantes au diagnostic

Nous nous sommes intéressés au lien entre le pourcentage de MDSC, l'expression de PD-L1 à la surface des MDSC au diagnostic et la réponse à l'immunothérapie en première ligne. Sur les 11 patients qui ont bénéficié d'une immunothérapie, nous disposons des résultats relatifs aux MDSC pour 10 d'entre eux (*Tableau 16, Annexe 8*).

Pour cette partie de l'étude, l'analyse des données a pu être réalisée de manière prospective. En effet, à l'inverse du marquage lymphocytaire PD1 rendu invisible par la fixation de l'anticorps thérapeutique anti-PD-1, l'analyse de l'expression de PD-L1 a pu être réalisée à

l'issue des cures d'immunothérapie. Toutefois, les effectifs étant faibles à deux cures, nous avons concentré nos résultats sur l'analyse de l'expression de PD-L1 au diagnostic et après une cure.

Tableau 16: Expression de PD-L1 à la surface des MDSC circulantes au diagnostic chez les patients traités par immunothérapie anti-PD-1.

	Moyenne (écart-type)	Médiane [Q25-75]	min	max	n
Myeloïd PDL1+ diag (IMF)	7.25 (6.19)	3.63 [2.98; 11.7]	1.54	19.4	10
MMDSC PDL1+ diag (IMF)	5.63 (4.59)	3.16 [2.82; 9.30]	1.29	14.1	10
Imm Gran PDL1+ diag (IMF)	3.21 (1.04)	3.12 [2.31; 3.92]	1.94	4.88	10
Mature Gran PDL1+ diag (IMF)	4.43 (2.70)	3.65 [2.83; 5.97]	0.290	8.83	10

L'expression de PD-L1 sur les granulocytes immatures au diagnostic est associée à la réponse aux anti-PD-1 en première ligne.

Un haut niveau d'expression de PD-L1 sur les M-MDSC semblait associé à la réponse à l'immunothérapie en première ligne. En effet, les patients « Répondeurs » ont présenté une médiane d'expression de PD-L1 sur les M-MDSC statistiquement supérieure au groupe « Non répondeurs » à deux cures (3.80 IMF vs 2.33 IMF ; p=0.038).

Même si cette même tendance semblait apparaître pour les autres sous-populations (Imm Gran et Mature Gran), celle-ci n'a pas atteint pas le seuil de significativité espéré (Tableau 17, Annexe 10).

Tableau 17: Comparaison des niveaux d'expression de PD-L1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic et à C1 entre les patients répondeurs et non répondeurs à deux cures d'immunothérapie anti-PD-1

	Répondeurs (n = 6)	Non répondeurs (n = 5)	n	p	Test
Myeloïd PDL1+ diag moyenne (IMF)	9.89 (±6.92)	3.29 (±0.432)	10	0.35	Mann-Whitney
Myeloïd PDL1+ C1 moyenne (IMF)	9.26 (±4.70)	4.56 (±2.38)	8	0.39	Mann-Whitney
MMDSC PDL1+ diag moyenne (IMF)	7.37 (±5.37)	3.03 (±0.201)	10	0.48	Mann-Whitney
MMDSC PDL1+ C1 moyenne (IMF)	6.64 (±2.59)	4.63 (±1.51)	8	0.25	Mann-Whitney
Imm Gran PDL1+ diag moyenne (IMF)	3.80 (±0.908)	2.33 (±0.341)	10	0.038	Mann-Whitney
Imm Gran PDL1+ C1 moyenne (IMF)	3.42 (±1.15)	2.44 (±0.516)	8	0.14	Mann-Whitney
Mature Gran PDL1+ diag moyenne (IMF)	5.20 (±3.35)	3.29 (±0.517)	10	0.35	Mann-Whitney
Mature Gran PDL1+ C1 moyenne (IMF)	5.52 (±1.80)	3.77 (±0.491)	8	0.25	Mann-Whitney

Ces résultats sont illustrés par la Figure 17.

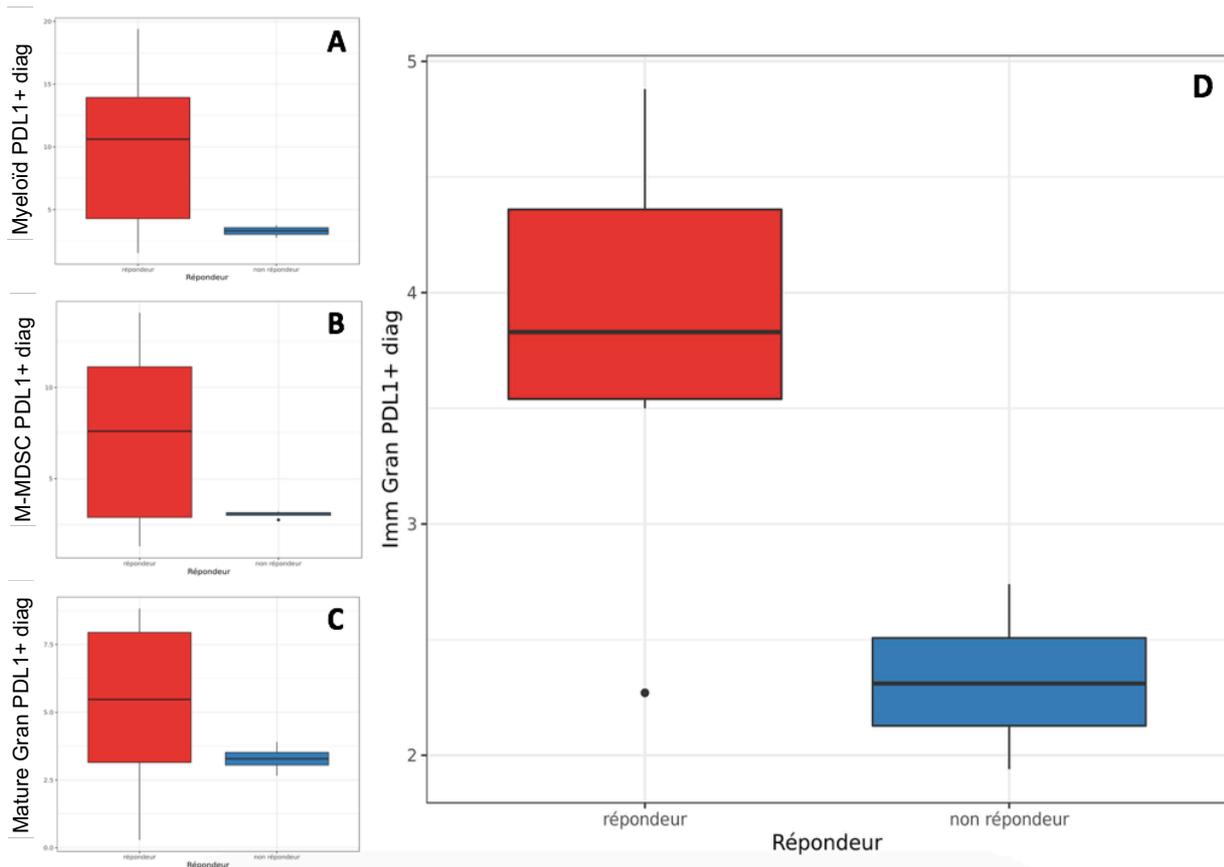


Figure 17: Comparaison des niveaux d'expression de PD-L1 sur les MDSC au diagnostic entre les patients répondeurs et non répondeurs à l'immunothérapie de première ligne.

A : Myeloïd PD-L1+ au diagnostic, Répondeurs à gauche versus Non répondeurs à droite ($p=0.35$). B : MMDSC PD-L1+ au diagnostic, Répondeurs à gauche versus Non répondeurs à droite ($p=0.48$). C : Mature Gran PD-L1+ au diagnostic, Répondeurs à gauche versus Non répondeurs à droite ($p=0.35$). D : Imm Gran PD-L1+ au diagnostic, Répondeurs à gauche versus Non répondeurs à droite ($p=0.038$).

V.5. Evaluation de la survie après une immunothérapie de première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 sur les MDSC circulantes au diagnostic

Un haut niveau d'expression de PD-L1 sur les MDSC au diagnostic est associé à un meilleur pronostic clinique.

Les patients ayant révélé de hauts niveaux d'expression de PD-L1 à la surface des cellules myéloïdes et des sous populations de MDSC au diagnostic ont dévoilé de meilleurs résultats de survie sans progression (Tableau 18, Annexe 11).

En effet, les patients ayant présenté des niveaux d'expression de PD-L1 élevés sur les cellules myéloïdes, les M-MDSC, les granulocytes immatures et matures au diagnostic ont démontré des résultats de survie sans progression supérieurs à ceux ayant exprimés des niveaux

respectivement inférieurs (médiane de survie sans progression 11.0 à 13.3 mois vs 1.8 mois soit un gain de **9.2 à 11.5 mois**, $p=0.04$, $p=0.032$, $p=0.022$ et $p=0.032$).

Notons que la clôture de cette étude au 1^{er} août 2019 n'a pas permis d'obtenir le recul nécessaire à une analyse de survie globale optimale (*).

Tableau 18: : Survie globale et survie sans progression des patients traités par immunothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 sur les MDSC et sous populations.

Groupe « Immunothérapie 1 ^{ère} ligne » N = 11				
	Myeloïd PDL1+ diag < 8.34 IMF	Myeloïd PDL1+ diag ≥ 8.34 IMF	p	Test
Survie globale médiane mois (IC95)	- (-; -)*	13.3 (9.50; -)	0.95	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)	1.77 (0.767; -)**	11.0 (8.27; -)	0.041	Logrank
	MMDSC PDL1+ diag < 5.90 IMF	MMDSC PDL1+ diag ≥ 5.90 IMF	p	Test
Survie globale médiane mois (IC95)	- (-; -)*	13.3 (9.50; -)	0.47	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)	1.77 (0.767; -)**	13.3 (8.77; -)	0.032	Logrank
	Imm Gran PDL1+ diag < 3.21 IMF	Imm Gran PDL1+ diag ≥ 3.21 IMF	p	Test
Survie globale médiane mois (IC95)	- (-; -)*	13.3 (9.50; -)	0.95	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)	1.77 (0.767; -)**	11.0 (8.27; -)	0.022	Logrank
	Mature Gran PDL1+ diag < 5.13 IMF	Mature Gran PDL1+ diag ≥ 5.13 IMF	p	Test
Survie globale médiane mois (IC95)	- (-; -)*	13.3 (9.50; -)	0.47	Logrank
Survie sans progression médiane mois (IC 95)	1.77 (0.767; -)**	13.3 (8.77; -)	0.032	Logrank

*: Nous interprétons ces résultats comme consécutif à une durée de suivi insuffisante (données censurées survenant à la fin de la période de suivi correspondant aux patients vivant à la date de point). **: Résultats de survie sans progression correspondant à une progression après deux cures, soit au moment de l'évaluation scannographique.

Les résultats sont illustrés par la *Figure 18*.

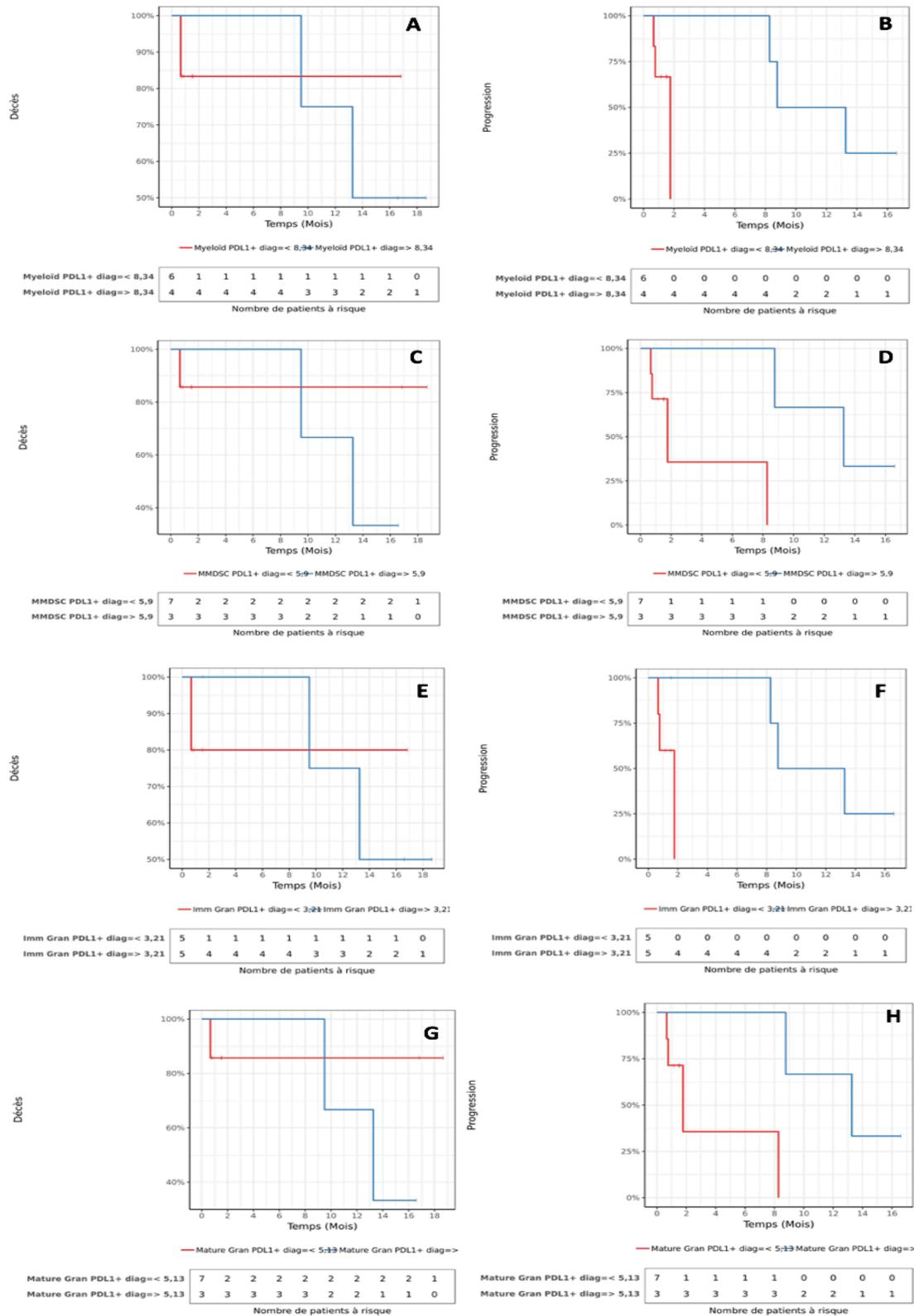


Figure 18: Courbes de survie globale (à gauche) et survie sans progression (à droite) des patients traités par immunothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 à la surface des cellules myéloïdes, MMDSC, Imm Gran et Mature Gran. A : Survie globale en fonction du niveau d'expression de PD-L1 sur les cellules myéloïdes au diagnostic (<8.34 IMF ou ≥8.34 IMF ; p=0.95). B : Survie sans progression en fonction du niveau d'expression de PD-L1 sur les cellules myéloïdes au diagnostic (1.7 mois vs 11 mois ; p=0.041). C : Survie globale en fonction du niveau d'expression de PD-L1 sur les MDSC au diagnostic (<5.9 IMF ou ≥5.9 IMF ; p= 0.47). D : Survie sans progression en fonction du niveau d'expression de PD-L1 sur les MDSC au diagnostic (1.8 mois vs 13.3 mois ; p=0.032). E : Survie sans progression en fonction du niveau d'expression de PD-L1 sur les Imm Gran au diagnostic (<3.21 IMF ou ≥3.21 IMF ; p=0.095). F : Survie globale en fonction du niveau d'expression de PD-L1 sur les Imm Gran au diagnostic (1.8 vs 11 mois ; p= 0.022). G : Survie sans progression en fonction du niveau d'expression de PD-L1 sur les Mature Gran au diagnostic (<5.13 IMF ou ≥5.13 IMF ; p=0.47). H : Survie globale en fonction du niveau d'expression de PD-L1 sur les Mature Gran au diagnostic (1.8 vs 13.3 mois ; p= 0.032)

VI. DISCUSSION

VI.1. Faisabilité de l'analyse de l'expression de PD-1 et PD-L1 à la surface des lymphocytes et MDSC circulants

Grâce à cette étude préliminaire, nous avons confirmé la faisabilité de la mesure de l'expression de PD-1 et PD-L1 dans le sang périphérique des patients atteints de CBNPC métastatiques. Nous nous sommes, pour se faire, intéressés à l'expression de la protéine et son ligand à la surface des populations cellulaires circulantes impliquées dans la réponse immunitaire anti-tumorale, à savoir les lymphocytes T et les MDSC.

Bien que cette méthode s'adresse aujourd'hui à un opérateur entraîné dans un laboratoire mettant à disposition un cytomètre de flux, sa fiabilité, sa rapidité, sa reproductibilité et son faible coût ont permis de répéter les résultats pour 37 patients au cours des traitements systémiques administrés.

VI.2. Comparaison de l'expression de PD-1 et PD-L1 obtenue par cytométrie de flux avec l'expression de PD-L1 obtenue par immunohistochimie

Sur la simple hypothèse, pourtant contredite, que l'expression de PD-1 et PD-L1 au niveau du sang périphérique pourrait être corrélée à l'expression tumorale de PD-L1, nous avons comparé nos analyses à celles obtenues par le laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Limoges. Aucune corrélation statistiquement significative n'a été mise en évidence entre le marquage immuno-histochimique et les résultats de cytométrie de flux, à la fois sur les lymphocytes T et les MDSC. Conformément à de précédents travaux, la piste première de la substitution du statut tumoral PD-L1, obtenu au moyen d'une biopsie tissulaire parfois invasive, par ce marquage obtenu à partir de simples prélèvements sanguins ne peut être retenue [70].

VI.3. Intérêt de la cytométrie de flux dans la prédiction de la réponse à la chimiothérapie de première ligne et de la survie après traitement

VI.3.1. Intérêt prédictif de l'évaluation de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 au diagnostic

Chez les 24 patients traités par chimiothérapie en première ligne, nous avons démontré qu'une expression PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 inférieure à 43% au diagnostic est associée de manière significative à la réponse au traitement. Cette démonstration diffère d'un travail précédent effectué auprès d'un effectif similaire de patients. En effet, une étude américaine exposait une association entre une faible expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et la réponse au traitement, sans résultat significatif à la surface des lymphocytes CD8 [4]. A l'inverse, nous avons prouvé, chez les répondeurs à deux cures, un niveau d'expression plus élevé de PD-1 à la surface des lymphocytes TCD4. Dans l'étude comparable, l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 semblait associée à un mauvais pronostic en termes de survie globale et survie sans progression. Toutefois, ces investigations ont été menées au sein d'une population de patients hétérogène (stades IIIB et IV) et les résultats ont été rendus pour tous l'ensemble des traitements confondus (chimiothérapie, thérapie ciblée, immunothérapie).

VI.3.2. Intérêt pronostique de l'étude des MDSC au diagnostic

Nous n'avons pas révélé de lien entre la répartition des MDSC et des différentes sous-populations au niveau du compartiment sanguin au diagnostic et la réponse à la chimiothérapie en première ligne. Toutefois, une tendance à une diminution de la sous-population MMDSC a été observée chez les patients répondeurs. Ce constat semble en accord avec la littérature. En effet, plusieurs études ont démontré une augmentation de la proportion de MDSC voire de la sous-population MMDSC chez les patients non répondeurs à la chimiothérapie [5, 68-70]. Notre étude a mis en évidence un lien entre une proportion de M-MDSC et granulocytes immatures élevée au diagnostic et des résultats cliniques péjoratifs. En effet, un allongement de la survie globale de 4.9 mois et 6 mois a été observé chez les patients présentant des proportions de M-MDSC et Imm Gran moindres au diagnostic.

Ces constats confortent des travaux récents ayant démontré l'intérêt pronostique propres aux M-MDSC et PMN-MDSC [6, 69].

Parallèlement, nous avons mis en évidence un lien entre une expression élevée de PD-L1 à la surface des M-MDSC au diagnostic et un pronostic clinique plus favorable. Un allongement de la survie sans progression de près de 12 mois a été observé chez les individus ayant présenté des intensités moyennes de fixation élevées au diagnostic. Aucune différence n'a

toutefois été mise en évidence sur la réponse au traitement. Nous supposons l'impact du faible effectif de patients encore en vie ou suivis à deux cures (n=7).

VI.4. Intérêt de la cytométrie de flux dans la prédiction de la réponse à la l'immunothérapie de première ligne et de la survie après traitement

VI.4.1. Intérêt prédictif de l'évaluation de PD-L1 à la surface des granulocytes immatures

Malgré un effectif de patients traités par immunothérapie en première ligne de petite taille, nous avons démontré l'intérêt d'évaluer l'expression de PD-L1 sur la sous-population Imm Gran au diagnostic. En effet, nous avons affirmé, chez les 11 patients concernés, un lien significatif entre un niveau d'expression de PD-L1 à la surface des granulocytes immatures supérieur ou égal à 3,21 et la réponse à deux cures de Pembrolizumab. A notre connaissance, aucune étude ne s'est, jusqu'à aujourd'hui, intéressée au statut PD-L1 sur cette sous-population et à son intérêt prédictif de la réponse à l'immunothérapie en première ligne. Bien qu'une étude ait démontré le lien entre une proportion élevée de PMN-MDSC au diagnostic et une meilleure réponse au traitement, celle-ci a concerné un panel de 53 patients traités en seconde ligne par Nivolumab (73). Parallèlement, une étude récente a conclu à une réduction de la proportion de MDSC chez les patients répondeurs à l'Atezolizumab, anti-PD-L1, sur un panel de 10 patients [74].

VI.4.2. Intérêt pronostique de l'évaluation de PD-L1 à la surface des MDSC

A travers notre étude, nous avons souligné l'intérêt pronostique de l'évaluation de l'expression de PD-L1 à la surface des MDSC. En effet, des niveaux d'expression de PD-L1 élevés à la surface des cellules myéloïdes, des M-MDSC, des granulocytes immatures et matures, ont pu être corrélés à un allongement de la survie sans progression de plus de 9 mois. Aucune différence de survie globale entre les groupes n'a pu être mise en évidence en raison du manque de recul admis entre l'inclusion des patients traités par immunothérapie et la date de point.

VI.5. Prédiction de la réponse aux traitements de première ligne au regard de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 et de PD-L1 à la surface des granulocytes immatures

VI.5.1. Patients traités par chimiothérapie en première ligne

Sur les 24 patients traités par chimiothérapie de première ligne, 13 ont présenté une réponse objective et 11 ont présenté une progression à deux cures.

Sur la simple analyse de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 au diagnostic ($< 43\%$ ou $\geq 43\%$), nous aurions pu prédire la réponse pour 9 patients sur 13 et la progression pour 8 patients sur 11. Nous avons ainsi obtenu une concordance entre nos prédictions et la réponse objective de **71%** (Tableau 19).

Sur les 11 patients non répondeurs à la chimiothérapie de première ligne, nous nous sommes intéressés à l'expression de PD-L1 sur la sous-population Imm Gran afin de supposer une éventuelle réponse à l'immunothérapie si celle-ci avait été appliquée en première ligne (Tableau 19). Nous avons supposé les patients répondeurs à l'immunothérapie en première ligne si leur expression de PD-L1 à la surface des Imm Gran au diagnostic étaient supérieure à 3,21 (IMF). Ainsi, nous avons présumé, sur ces 11 patients réfractaires à la chimiothérapie, une réponse potentielle à l'immunothérapie en première ligne pour 5 d'entre eux. Toutefois, pour les 7 patients du groupe ayant bénéficié d'une chimiothérapie de deuxième ligne, nos prédictions ne se sont confirmées que pour 3 d'entre eux. Cette faible concordance entre nos prédictions de la réponse à l'immunothérapie de première ligne et la réponse objective sous immunothérapie de deuxième ligne ne nous semble pas étonnant. En effet, d'après nos analyses statistiques, nous n'avons trouvés aucune différence d'expression de PD-L1 sur les MDSC entre les patients répondeurs et non répondeurs à l'immunothérapie de deuxième ligne. Conformément à ce constat, sur les 13 patients initialement répondeurs à la chimiothérapie de première ligne, 3 ont bénéficié d'une immunothérapie de seconde ligne à progression. Nos prédictions ne se sont pas confirmées.

En conclusion, nos prédictions ne restent applicables qu'en première ligne, sans possibilité d'extrapolation en seconde ligne.

VI.5.2. Patients traités par immunothérapie en première ligne

Sur les 11 patients traités par immunothérapie de première ligne, 9 présentaient une expression de PD-L1 mesurée par immuno-histochimie supérieure ou égale à 50 % au diagnostic. Au regard du taux de réponse thérapeutique, soit 55 % (6 patients sur 11 contre 9 sur 11 supposés par le statut PD-L1), nous soulignons de nouveau le caractère prédictif imparfait de la mesure immuno-histochimique. Parallèlement à ce constat, un patient ayant présenté une expression de PD-L1 à 1 % a répondu à l'immunothérapie.

Sur la simple analyse de l'expression de PD-L1 à la surface de la sous-population Imm Gran ($<3,21$ IMF ou $\geq 3,21$ IMF), nous aurions pu prédire la réponse au traitement pour 5 patients sur 6 et la progression pour 4 patients sur 5 en raison du manque de résultat pour 1 patient concerné, soit une concordance entre nos prédictions et la réponse objective de **82%** (*Tableau 20*).

Sur les 5 patients non répondeurs à l'immunothérapie de première ligne, nous nous sommes intéressés à l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 au diagnostic afin de supposer une éventuelle réponse à la chimiothérapie s'il celle-ci avait été appliquée en première ligne. A ce titre, nous avons présumé les patients répondeurs à la chimiothérapie si leur expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 au diagnostic étaient inférieure à 43%. En procédant à cette analyse, nous avons supposé que 2 des patients sur 5 auraient potentiellement répondu à la chimiothérapie de première ligne. Il s'avère que le suivi prospectif de ces patients sous chimiothérapie de deuxième ligne a révélé une stabilité et une réponse partielle (stabilité à 9 cures dont 5 cures de maintenance pour le premier patient, stabilité à 16 cures dont 12 cures de maintenance pour le second).

Sur les 6 patients initialement répondeurs à l'immunothérapie de première ligne, 4 ont bénéficié d'une chimiothérapie à progression. En appliquant ce même raisonnement chez ces patients, nous avons suspecté ces 4 patients répondeurs à la chimiothérapie en regard de leur expression de PD1 à la surface des LT CD8 inférieure à 43%. Ces hypothèses se sont toutes confirmées sous chimiothérapie de deuxième ligne.

Tableau 19: Comparaison de la prédiction de la réponse au traitement avec la réponse objective chez les patients traités par chimiothérapie en première ligne

Patient	PDL1 IHC (%)	Imm Gran PD-L1+ (IMF)	LT CD8 PD1+ (%)	Réponse chimiothérapie prédite	Réponse chimiothérapie confirmée	Immunothérapie deuxième ligne	Réponse Immunothérapie prédite	Réponse immunothérapie 2ème ligne confirmée ou commentaire.
1	40	3,18	40,9	Répondeur	Répondeur	Non	Non répondeur	Stabilité après 4 cures de carboplatine alimta et 6 cures de maintenance alimta
2	10	2,21	30,53	Répondeur	Répondeur	Non	Non répondeur	Stabilité à 4 cures de cisplatine alima, stabilité à 11 cures de maintenance
3	5	7,23	63,19	Non répondeur	Répondeur	Non	Répondeur	Réponse complète à 2 cures cisplatine alimta, traitement chirurgical cisplatine navelbine. Suspicion cT3N3M1a, pT1N2M0
4	0	1,26	24,27	Répondeur	Répondeur	Non	Non répondeur	Réponse partielle à 4 cycles de carboplatine alimta, progression à 2 cycles de maintenance alimta
5	0	?	48,25	Non répondeur	Répondeur	Non	?	Réponse partielle à 4 cures de cisplatine alimta avastin, stabilité à 5 cures d'alimta avastin maintenance
6	80	22,67	33,3	Répondeur	Répondeur	Non	Répondeur	Réponse partielle à 4 cures de carboplatine alimta, progression à 4 cures de maintenance alimta, AEG, pas d'immunothérapie
7	0	3,81	43,45	Non répondeur	Répondeur	Non	Répondeur	Stable à 4 cures cisplatine alimta, stable à 6 cures maintenance alimta
8	0	2,13	63,17	Non répondeur	Répondeur	Non	Non répondeur	Stabilité à 4 cures de cisplatine gemzar, progression à 6 cures de gemzar maintenance
9	0	2,78	34,72	Répondeur	Répondeur	Non	Non répondeur	Stabilité à 4 cures de cisplatine alimta et 6 cures d'alimta maintenance
10	0	3,92	27,63	Répondeur	Répondeur	Non	Répondeur	Réponse partielle à 4 cures de cisplatine gemzar, progression à 3 cures de maintenance gemzar
11	0	9	15,33	Répondeur	Répondeur	Oui	Répondeur	Non répondeur: progression à 3 cures de cisplatine alimta avastin, progression à 2 cures de Nivolumab
12	0	1,69	42,8	Répondeur	Répondeur	Oui	Non répondeur	Répondeur : Stabilité à 4 cures de cisplatine alimta, progression à 9 cures de maintenance, stabilité à 2 cures de Nivolumab
13	0	?	24,73	Répondeur	Répondeur	Oui	?	Non répondeur : Réponse partielle après 4 cures de carboplatine alimta, progression à 2 cures de maintenance alimta, hyperprogression sous Nivolumab
14	0	1,8	39,66	Répondeur	Non répondeur	Non	Non répondeur	Réponse partielle à 2 cures de carboplatine alimta. Décédé après 3 cures (syndrome hémorragique sur aplasie)
15	0	3,93	43,15	Non répondeur	Non répondeur	Non	Répondeur	Non répondeur à 2 cures de carboplatine alimta avastin. Patient trop altéré pour immunothérapie
16	0	6,38	54,04	Non répondeur	Non répondeur	Non	Répondeur	Non répondeur à 2 cures de carboplatine navelbine puis refus du patient de la poursuite de tout traitement systémique
17	5	2,09	69,46	Non répondeur	Non répondeur	Non	Non répondeur	Non répondeur à 2 cures de carboplatine alimta. Patient trop altéré pour immunothérapie
18	2	3,21	70,49	Non répondeur	Non répondeur	Oui	Répondeur	Répondeur : non répondeur à 2 cures de carboplatine alimta, stabilité à 4 cures de nivolumab
19	0	6,33	43,92	Non répondeur	Non répondeur	Oui	Répondeur	Non répondeur : non répondeur à 2 cures de cisplatine navelbine, non répondeur à 2 cures de nivolumab
20	0	3,02	50,91	Non répondeur	Non répondeur	Oui	Non répondeur	Non répondeur : non répondeur à 2 cures de cisplatine alimta, non répondeur à 2 cures de nivolumab
21	5	2,47	32,35	Répondeur	Non répondeur	Oui	Non répondeur	Répondeur : non répondeur à 2 cures de cisplatine alimta, stabilité à 7 cures de nivolumab
22	1	2,58	38,42	Répondeur	Non répondeur	Oui	Non répondeur	Non répondeur : non répondeur à 2 cures de carboplatine alimta, non répondeur à 2 cures de nivolumab
23	1	4,45	49,77	Non répondeur	Non répondeur	Oui	Répondeur	Non répondeur : non répondeur à 2 cures de cisplatine gemzar, non répondeur à 2 cures de nivolumab
24	30	2,64	63,76	Non répondeur	Non répondeur	Oui	Non répondeur	Répondeur : non répondeur à 2 cures de cisplatine alimta, non répondeur à 2 cures de pembrolizumab
				Concordance: 17/24 (71%)		Concordance : 3/10 (30%) 2 données manquantes		

Tableau 20: Comparaison de la prédiction de la réponse au traitement avec la réponse objective chez les patients traités par immunothérapie en première ligne

Patient	PDL1 IHC (%)	Imm Gran PD-L1+ (IMF)	LT CD8 PD1+ (%)	Réponse immunothérapie prédite	Réponse immunothérapie confirmée	Chimiothérapie deuxième ligne	Réponse chimiothérapie prédite	Réponse chimiothérapie 2ème ligne confirmée ou commentaire
26	1	4,48	48,09	Répondeur	Répondeur	Non	Non répondeur	Poursuite réponse immuno à 4 cures, DCD à 13,5 mois IDM
27	70	4,88	70,41	Répondeur	Répondeur	Non	Non répondeur	Poursuite réponse immuno à 10 cures (vérifier), en vie
28	80	2,27	35,58	Non répondeur	Répondeur	Non	Répondeur	Poursuite 2 cures de plus, en attente TDM
29	51	3,5	49,44	Répondeur	Répondeur	Non	Non répondeur	Poursuite 2 cures de plus, en attente TDM
30	70	3,66	33,97	Répondeur	Répondeur	Oui	Répondeur	Répondeur : poursuite stabilité 8 cures puis progression, réponse partielle 4 cures de chimiothérapie puis progression à 3 cures de maintenance, reprise immuno
31	70	4	34,36	Répondeur	Répondeur	Oui	Répondeur	Répondeur : progression après 5 cures soit 4,8 mois, réponse à 4 cures de chimiothérapie carbo alimta (stabilité), pas de maintenance devant age > 70 ans, décédé pendant surveillance 5 mois, AEG
32	60	2,74	67,82	Non répondeur	Non répondeur	Non	Non répondeur	Poursuite 2 cures de plus, patient trop altéré pour chimio
33	80	1,94	47,14	Non répondeur	Non répondeur	Non	Non répondeur	Patient trop altéré pour chimiothérapie
34	60	2,43	51,69	Non répondeur	Non répondeur	Non	Non répondeur	Décédé après 2 cures d'immunothérapie
35	30	?	29,99	?	Non répondeur	Oui	Répondeur	Répondeur : stable à 4 cures de chimiothérapie, stable à 5 cures de maintenance puis progression puis décès (mort)
36	50	2,19	41,09	Non répondeur	Non répondeur	Oui	Répondeur	Répondeur : réponse partielle puis stabilité à 4 cures carbo alimta avastin, stable à 12 cures de maintenance alimta avastin puis progression pulmonaire à 12 mois du début
				Concordance: 9/11 (82%) 1 donnée manquante				Concordance : 4/4 (100%)

VI.6. Proposition d'un algorithme décisionnel

La prise en considération de l'ensemble des résultats de cette étude nous a permis de proposer un algorithme décisionnel (*Figure 19*). Afin de définir le meilleur choix stratégique face à un patient atteint d'un CBNPC métastatique éligible à un traitement systémique de première ligne, nous avons retenu l'usage de l'expression de PD-L1 à la surface des granulocytes immatures et l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 au diagnostic.

Sur ce principe, il est licite de proposer une chimiothérapie de première ligne pour les patients exprimant faiblement PD-L1 sur les Imm Gran et faiblement PD-1 sur les lymphocytes T CD8 (*Figure 19 situation A*). A l'inverse, il est rationnel de proposer une immunothérapie de première ligne pour les individus exprimant fortement PD-L1 sur les Imm Gran et fortement PD-1 sur les lymphocytes T CD8 (*Figure 19 situation D*).

La question reste toutefois en suspend pour deux cas de figures.

Chez les patients présentant un niveau d'expression de PD-L1 sur les granulocytes immatures inférieur à 3,21 et une expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 supérieure à 43%, notre raisonnement prédit l'absence de réponse aux deux traitements (*Figure 19 situation B*). Le défaut de proposition thérapeutique n'étant pas recevable d'un point de vue éthique, notre choix s'orienterait probablement vers une chimiothérapie de première ligne, bien que 3 patients des 7 cas exposés n'aient pas répondu à cette thérapie.

Chez les patients présentant un niveau d'expression de PD-L1 élevé jugé prédictif de réponse à l'immunothérapie et un niveau d'expression de PD-1 inférieur à 43 % favorable à l'initiation d'une chimiothérapie, nous nous posons également la question de la meilleure alternative thérapeutique (*Figure 19 situation C*). Les 5 patients illustrant ce cas de figure semblent toutefois présenter un profil de réponse en faveur de la chimiothérapie.

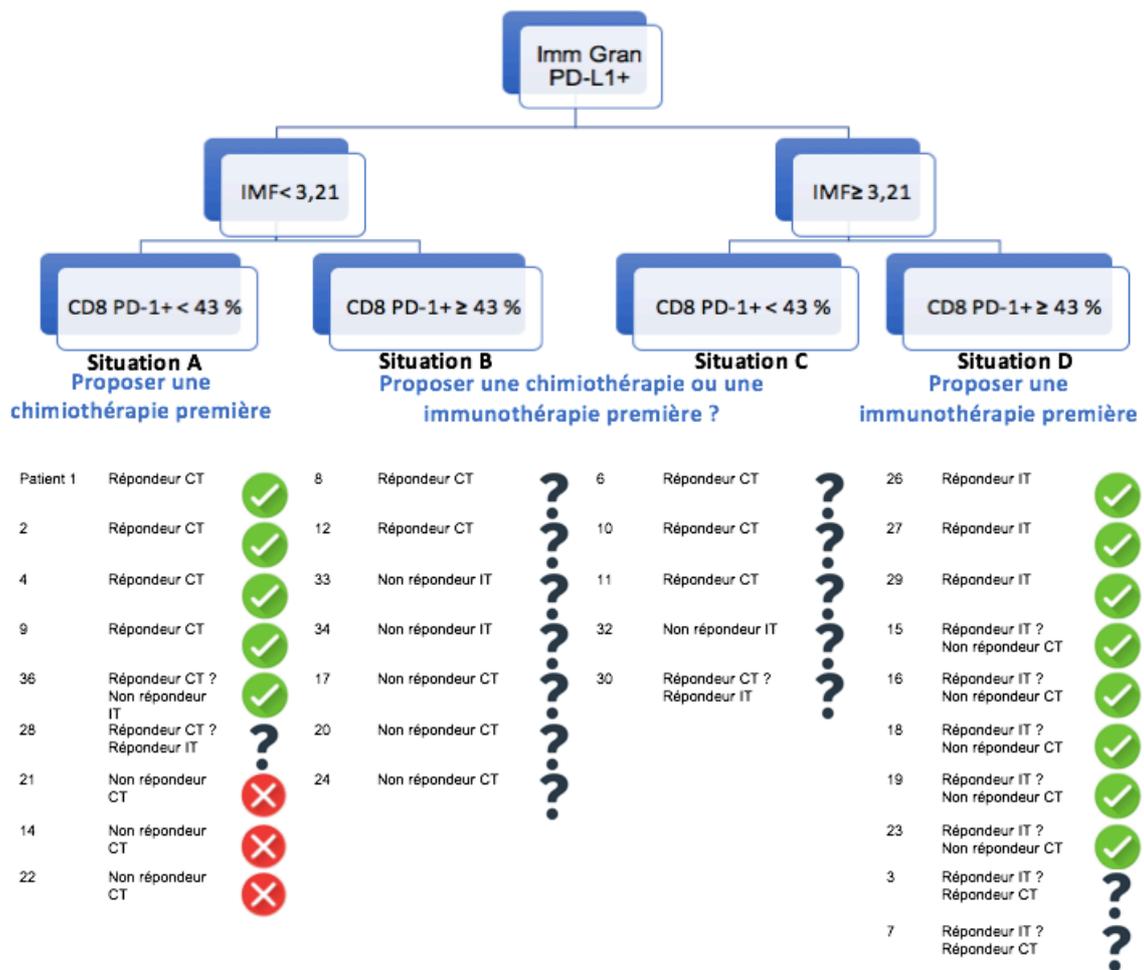


Figure 19: Arbre décisionnel proposé pour le traitement de première ligne des patients atteints de CBNPC métastatiques. IMF : intensité moyenne de fixation. CT : chimiothérapie. IT : immunothérapie.

VI.7. Limites de l'étude

D'un point de vue méthodologique, nous retenons le nombre restreint de patients, notamment dans le groupe recevant une immunothérapie première (N=11). L'inclusion parfois tardive des patients dans ce groupe a par ailleurs réduit la période de suivi nécessaire au rendu des données de survies globales et survies sans progression. Les analyses statistiques ont ainsi été limitées par ce manque de suivi.

Au-delà des faibles effectifs, 11 patients inclus dans cette étude présentent un Performans status supérieur à 1, contrairement à la plupart des études cliniques. Toutefois, ce score n'étant pas un critère d'inclusion, nous estimons que notre population de patients reflète davantage les conditions de vie réelles des patients suivis en oncologie thoracique.

Concernant les résultats, l'analyse de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8 et de PD-L1 sur la sous-population Imm Gran semble prédictive de la réponse à la chimiothérapie

et à l'immunothérapie en première ligne. La représentativité des niveaux d'expression seuils, définis à partir des médianes de notre cohorte, est discutable. Afin de mieux prédire la réponse aux traitements et de rendre les résultats de survie plus conformes, il conviendrait de définir ces seuils à partir d'une plus large cohorte en utilisant une courbe ROC.

VII. CONCLUSION

La prédiction de la réponse aux chimiothérapies et immunothérapies est un défi majeur dans le domaine de l'oncologie thoracique, notamment dans le traitement des CBNPC métastatiques.

Les constats cités dans la première partie de ce travail tendent à remettre en question l'apport prédictif du marquage immunohistochimique PD-L1 dans la prédiction de la réponse à l'immunothérapie. D'autre part, la sous-estimation actuelle de l'abord du micro-environnement tumoral et des cellules immunitaires circulantes suscite de nombreuses hypothèses, non encore parfaitement élucidées.

A travers notre étude préliminaire observationnelle et prospective, nous avons confirmé la faisabilité de l'analyse de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 circulants et de PD-L1 à la surface des MDSC et sous-populations circulantes par cytométrie de flux à partir de simples échantillons de sang. Nous avons pu élaborer un arbre décisionnel en considérant l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T et PD-L1 à la surface des MDSC au diagnostic puisque ces deux marquages se sont avérés prédictifs de la réponse à la chimiothérapie et l'immunothérapie de première ligne pour les 41 patients assignés à l'étude. Nous ne disposons pas ce jour du recul nécessaire pour appliquer ce raisonnement aux données de survie.

Afin de renforcer l'apport scientifique de nos résultats préliminaires, il conviendrait de proposer une étude prospective semblable à plus large échelle. Dans l'avenir, il serait possible de comparer dans chaque groupe défini par des seuils d'expression de PD-1 et PD-L1 plus conformes, l'efficacité d'un traitement par immunothérapie versus chimiothérapie.

VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cree IA, Booton R, Cane P, Gosney J, Ibrahim M, Kerr K, et al. PD-L1 testing for lung cancer in the UK: recognizing the challenges for implementation. *Histopathology*. août 2016;69(2):177-86.
2. Reck M. Pembrolizumab as first-line therapy for metastatic non-small-cell lung cancer. *Immunotherapy*. 2018;10(2):93-105.
3. 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*. 2016;27(10):1953-8.
4. Zheng H, Liu X, Zhang J, Rice SJ, Wagman M, Kong Y, et al. Expression of PD-1 on CD4+ T cells in peripheral blood associates with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 12 mai 2016;7(35):56233-40.
5. Wang S, Fu Y, Ma K, Liu C, Jiao X, Du W, et al. The significant increase and dynamic changes of the myeloid-derived suppressor cells percentage with chemotherapy in advanced NSCLC patients. *Clin Transl Oncol*. juill 2014;16(7):616-22.
6. Barrera L, Montes-Servín E, Hernandez-Martinez J-M, Orozco-Morales M, Montes-Servín E, Michel-Tello D, et al. Levels of peripheral blood polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells and selected cytokines are potentially prognostic of disease progression for patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. sept 2018;67(9):1393-406.
7. Meyer C, Cagnon L, Costa-Nunes CM, Baumgaertner P, Montandon N, Leyvraz L, et al. Frequencies of circulating MDSC correlate with clinical outcome of melanoma patients treated with ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother*. mars 2014;63(3):247-57.
8. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 9 juill 2015;373(2):123-35.
9. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 22 oct 2015;373(17):1627-39.
10. 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*. avr 2016;387(10027):1540-50.
11. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 21 mai 2015;372(21):2018-28.
12. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, Creelan B, Horn L, Steins M, et al. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 22 juin 2017;376(25):2415-26.
13. Langer CJ, Gadgeel SM, Borghaei H, Papadimitrakopoulou VA, Patnaik A, Powell SF, et al. Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: a randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study. *Lancet Oncol*. nov 2016;17(11):1497-508.
14. El-Osta H, Jafri S. Predictors for clinical benefit of immune checkpoint inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Immunotherapy*. 2019;11(3):189-99.
15. Pardoll D. Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention. *Semin Oncol*. août 2015;42(4):523-38.
16. 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.
17. Kerr KM, Tsao M-S, Nicholson AG, Yatabe Y, Wistuba II, Hirsch FR, et al. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? *J Thorac Oncol*. juill

2015;10(7):985-9.

18. Hofman V, Ilie M, Long E, Butori C, Lassalle S, Washetine K, et al. [Issues and current limits for immunohistochemical assessment of PD-L1 status in bronchial biopsies]. *Bull Cancer*. avr 2016;103(4):368-80.
19. Ratcliffe MJ, Sharpe A, Midha A, Barker C, Scott M, Scorer P, et al. Agreement between Programmed Cell Death Ligand-1 Diagnostic Assays across Multiple Protein Expression Cutoffs in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 15 juill 2017;23(14):3585-91.
20. Calles A, Liao X, Sholl LM, Rodig SJ, Freeman GJ, Butaney M, et al. Expression of PD-1 and Its Ligands, PD-L1 and PD-L2, in Smokers and Never Smokers with KRAS-Mutant Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. déc 2015;10(12):1726-35.
21. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet*. 2 avr 2016;387(10026):1415-26.
22. Ilie M, Long-Mira E, Bence C, Butori C, Lassalle S, Bouhlef L, et al. Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann Oncol*. janv 2016;27(1):147-53.
23. Takamori S, Toyokawa G, Okamoto I, Takada K, Kozuma Y, Matsubara T, et al. Discrepancy in Programmed Cell Death-Ligand 1 Between Primary and Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res*. 2017;37(8):4223-8.
24. Cho JH, Sorensen SF, Choi Y-L, Feng Y, Kim T-E, Choi H, et al. Programmed Death Ligand 1 Expression in Paired Non-Small Cell Lung Cancer Tumor Samples. *Clin Lung Cancer*. 2017;18(6):e473-9.
25. McLaughlin J, Han G, Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, Pelekanou V, Rehman J, et al. Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. janv 2016;2(1):46-54.
26. Maloberti L. Analyse de l'expression de PD-L1 par les carcinomes non à petites cellules pulmonaires et de CD103 par le microenvironnement tumoral : analyse clinique, histologique et immunohistochimique d'une cohorte de 70 patients traités par nivolumab et de 74 patients opérés d'un adénocarcinome pulmonaire. 25 avr 2018 [cité 31 août 2019]; Disponible sur: <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01806274>
27. Kolahian S, Öz HH, Zhou B, Griessinger CM, Rieber N, Hartl D. The emerging role of myeloid-derived suppressor cells in lung diseases. *European Respiratory Journal*. 1 mars 2016;47(3):967-77.
28. Weber R, Fleming V, Hu X, Nagibin V, Groth C, Altevogt P, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol*. 2018;9:1310.
29. Yamauchi Y, Safi S, Blattner C, Rathinasamy A, Umansky L, Juenger S, et al. Circulating and Tumor Myeloid-derived Suppressor Cells in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 4 avr 2018;198(6):777-87.
30. Qu P, Wang L-Z, Lin PC. Expansion and functions of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Cancer Lett*. 28 2016;380(1):253-6.
31. Ballbach M, Dannert A, Singh A, Siegmund DM, Handgretinger R, Piali L, et al. Expression of checkpoint molecules on myeloid-derived suppressor cells. *Immunol Lett*. 2017;192:1-6.
32. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest*. janv 2014;94(1):107-16.
33. Yang C-Y, Lin M-W, Chang Y-L, Wu C-T, Yang P-C. Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. *Eur J Cancer*. mai 2014;50(7):1361-9.
34. Cooper WA, Tran T, Vilain RE, Madore J, Selinger CI, Kohonen-Corish M, et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer*. août 2015;89(2):181-8.

35. Pyo J-S, Kang G, Kim JY. Prognostic role of PD-L1 in malignant solid tumors: a meta-analysis. *Int J Biol Markers*. 2 mars 2017;32(1):e68-74.
36. Wang A, Wang HY, Liu Y, Zhao MC, Zhang HJ, Lu ZY, et al. The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. avr 2015;41(4):450-6.
37. Pan Z-K, Ye F, Wu X, An H-X, Wu J-X. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand1 (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *J Thorac Dis*. mars 2015;7(3):462-70.
38. Passiglia F, Bronte G, Bazan V, Natoli C, Rizzo S, Galvano A, et al. PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: a pooled analysis. *Oncotarget*. 12 avr 2016;7(15):19738-47.
39. Abdel-Rahman O. PD-L1 expression and outcome of advanced melanoma patients treated with anti-PD-1/PD-L1 agents: a meta-analysis. *Immunotherapy*. 2016;8(9):1081-9.
40. Gandini S, Massi D, Mandalà M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. avr 2016;100:88-98.
41. Schalper KA, Kaftan E, Herbst RS. Predictive Biomarkers for PD-1 Axis Therapies: The Hidden Treasure or a Call for Research. *Clin Cancer Res*. 01 2016;22(9):2102-4.
42. Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, Patel SP, Frampton GM, Miller V, et al. Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(11):2598-608.
43. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med*. 21 2017;377(25):2500-1.
44. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, Hellmann MD, Awad MM, Gainor JF, et al. STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discov*. juill 2018;8(7):822-35.
45. Sanmamed MF, Perez-Gracia JL, Schalper KA, Fusco JP, Gonzalez A, Rodriguez-Ruiz ME, et al. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*. août 2017;28(8):1988-95.
46. Cabel L, Riva F, Servois V, Livartowski A, Daniel C, Rampanou A, et al. Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: a proof-of-concept study. *Ann Oncol*. 1 août 2017;28(8):1996-2001.
47. Derosa L, Hellmann MD, Spaziano M, Halpenny D, Fidelle M, Rizvi H, et al. Negative association of antibiotics on clinical activity of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced renal cell and non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 1 juin 2018;29(6):1437-44.
48. Arbour KC, Mezquita L, Long N, Rizvi H, Auclin E, Ni A, et al. Impact of Baseline Steroids on Efficacy of Programmed Cell Death-1 and Programmed Death-Ligand 1 Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 1 oct 2018;36(28):2872-8.
49. El Sissy C, Marliot F, Haicheur N, Kirilovsky A, Scripcariu D, Lagorce-Pagès C, et al. [Focus on the Immunoscore and its potential clinical implications]. *Ann Pathol*. févr 2017;37(1):29-38.
50. Ilie M, Falk AT, Butori C, Chamorey E, Bonnetaud C, Long E, et al. PD-L1 expression in basaloid squamous cell lung carcinoma: Relationship to PD-1⁺ and CD8⁺ tumor-infiltrating T cells and outcome. *Modern Pathology*. déc 2016;29(12):1552-64.
51. Conde E, Caminoa A, Dominguez C, Calles A, Walter S, Angulo B, et al. Aligning digital CD8+ scoring and targeted next-generation sequencing with programmed death ligand 1 expression: a pragmatic approach in early-stage squamous cell lung carcinoma. *Histopathology*. janv 2018;72(2):270-84.
52. 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.

53. 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*. 2017;25(7):453-9.
54. Adam J, Planchard D, Marabelle A, Soria J-C, Scoazec J-Y, Lantuéjoul S. [PD-L1 expression: An emerging biomarker in non-small cell lung cancer]. *Ann Pathol*. janv 2016;36(1):94-102.
55. Ilié M, Szafer-Glusman E, Hofman V, Chamorey E, Lalvée S, Selva E, et al. Detection of PD-L1 in circulating tumor cells and white blood cells from patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 01 2018;29(1):193-9.
56. Okuma Y, Hosomi Y, Nakahara Y, Watanabe K, Sagawa Y, Homma S. High plasma levels of soluble programmed cell death ligand 1 are prognostic for reduced survival in advanced lung cancer. *Lung Cancer*. 2017;104:1-6.
57. Cheng S, Zheng J, Zhu J, Xie C, Zhang X, Han X, et al. PD-L1 gene polymorphism and high level of plasma soluble PD-L1 protein may be associated with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers*. 11 nov 2015;30(4):e364-368.
58. Lianidou ES, Markou A, Strati A. The Role of CTCs as Tumor Biomarkers. *Adv Exp Med Biol*. 2015;867:341-67.
59. Kallergi G, Vetsika E-K, Aggouraki D, Lagoudaki E, Koutsopoulos A, Koinis F, et al. Evaluation of PD-L1/PD-1 on circulating tumor cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2018;10:1758834017750121.
60. Guibert N, Delaunay M, Lusque A, Boubekour N, Rouquette I, Clermont E, et al. PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *Lung Cancer*. 2018;120:108-12.
61. Strati A, Koutsodontis G, Papaxoinis G, Angelidis I, Zavridou M, Economopoulou P, et al. Prognostic significance of PD-L1 expression on circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol*. 1 août 2017;28(8):1923-33.
62. Nicolazzo C, Raimondi C, Mancini M, Caponnetto S, Gradilone A, Gandini O, et al. Monitoring PD-L1 positive circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients treated with the PD-1 inhibitor Nivolumab. *Sci Rep*. 24 2016;6:31726.
63. Wu Y, Yan Y, Su Z, Bie Q, Chen X, Barnie PA, et al. Enhanced circulating ILC2s and MDSCs may contribute to ensure maintenance of Th2 predominant in patients with lung cancer. *Mol Med Rep*. juin 2017;15(6):4374-81.
64. Tian T, Gu X, Zhang B, Liu Y, Yuan C, Shao L, et al. Increased circulating CD14(+)HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells are associated with poor prognosis in patients with small-cell lung cancer. *Cancer Biomark*. 2015;15(4):425-32.
65. Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan K-X, Guo Y-J. Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. sept 2013;62(9):1439-51.
66. Sharma S, Dubinett S, Salgia R. CD14(+)S100A9(+) myeloid-derived suppressor cells portend decreased survival in patients with advanced lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 nov 2012;186(10):940-1.
67. Liu C-Y, Wang Y-M, Wang C-L, Feng P-H, Ko H-W, Liu Y-H, et al. Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14-/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. janv 2010;136(1):35-45.
68. Koinis F, Vetsika EK, Aggouraki D, Skalidaki E, Koutoulaki A, Gkioulmpasani M, et al. Effect of First-Line Treatment on Myeloid-Derived Suppressor Cells' Subpopulations in the Peripheral Blood of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 1 août 2016;11(8):1263-72.
69. Vetsika E-K, Koinis F, Gioulbasani M, Aggouraki D, Koutoulaki A, Skalidaki E, et al. A circulating subpopulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells as an independent prognostic/predictive

factor in untreated non-small lung cancer patients. *J Immunol Res.* 2014;2014:659294.

70. Feng P-H, Lee K-Y, Chang Y-L, Chan Y-F, Kuo L-W, Lin T-Y, et al. CD14(+)S100A9(+) monocytic myeloid-derived suppressor cells and their clinical relevance in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 nov 2012;186(10):1025-36.

71. Gebhardt C, Sevko A, Jiang H, Lichtenberger R, Reith M, Tarnanidis K, et al. Myeloid Cells and Related Chronic Inflammatory Factors as Novel Predictive Markers in Melanoma Treatment with Ipilimumab. *Clin Cancer Res.* 15 déc 2015;21(24):5453-9.

72. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Geukes Foppen M, Yuan J, Postow MA, Wong P, et al. Baseline Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Clin Cancer Res.* 15 2016;22(12):2908-18.

73. Passaro A, Mancuso P, Gandini S, Spitaleri G, Labanca V, Guerini-Rocco E, et al. Gr-MDSC-linked asset as a potential immune biomarker in pretreated NSCLC receiving nivolumab as second-line therapy. *Clin Transl Oncol.* 28 juin 2019;

74. Zhuo M, Chen H, Zhang T, Yang X, Zhong J, Wang Y, et al. The potential predictive value of circulating immune cell ratio and tumor marker in atezolizumab treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Cancer Biomark.* 2018;22(3):467-76.

IX. ANNEXES

Annexe 1. Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T et PD-L1 à la surface des MDSC circulants au diagnostic.....	89
Annexe 2. Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T et PD-L1 à la surface des MDSC circulants au diagnostic et précision de la relation avec les variables cliniques et histo-pathologiques des individus (analyses univariées).....	90
Annexe 3. Corrélation positive entre l'expression de Pd-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic	91
Annexe 4. Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 et PD-L1 à la surface des MDSC circulants au diagnostic, après une et deux cures de chimiothérapie .	92
Annexe 5. Comparaison des niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 et PD-L1 sur les MDSC circulants au diagnostic et au cours de la chimiothérapie de première ligne, entre les patients répondeurs et non répondeurs au traitement	93
Annexe 6. Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 circulants au diagnostic et au cours de la chimiothérapie de première ligne. Précision de la relation avec les variables cliniques et histo-pathologiques des individus.....	94
Annexe 7. Survie globale et sans progression des patients traités par chimiothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes et PD-L1 sur les MDSC au diagnostic. Précision de la relation avec les variables cliniques et histo-pathologiques des individus.....	95
Annexe 8. Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 et PD-L1 à la surface des MDSC circulants au diagnostic et après une cure d'immunothérapie. Analyses post cures non réalisables pour le marquage de PD-1 sur les lymphocytes T. Résultats présentés au diagnostic et après une cure d'immunothérapie pour les MDSC en raison de la petite taille de l'effectif à deux cures (n=4).....	96
Annexe 9. Survie globale et survie sans progression des patients traités par immunothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic.....	97
Annexe 10. Comparaison des niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 et PD-L1 sur les MDSC circulants au diagnostic et au cours de l'immunothérapie de première ligne, entre ls patients répondeurs et non répondeurs au traitement	98
Annexe 11. Survie globale et survie sans progression des patients traités par immunothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 sur les MDSC et sous-populations au diagnostic	99

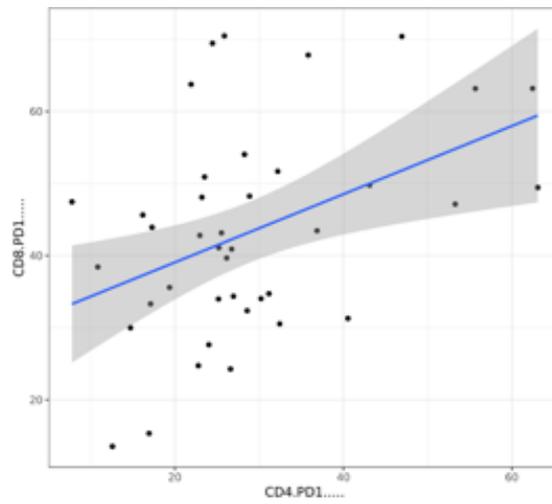
Annexe 1. Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T et PD-L1 à la surface des MDSC circulants au diagnostic.

	Moyenne (écart-type)	Médiane [Q25-75]	min	max	n
CD4 PD1+ diagnostic (%)	28.8 (13.0)	26.0 [22.6; 32.3]	7.78	63.1	40
CD8 PD1+ diagnostic (%)	43.2 (14.4)	43.0 [33.8; 50.1]	13.5	70.5	40
Myeloïd PDL1+ diag (IMF)	13.5 (13.2)	8.34 [4.33; 17.5]	1.54	61.1	37
MMDSC PDL1+ diag (IMF)	9.18 (8.87)	5.90 [3.11; 11.2]	1.29	40.2	37
Imm Gran PDL1+ diag (IMF)	4.68 (4.39)	3.21 [2.27; 4.48]	1.26	22.7	37
Mature Gran PDL1+ diag (IMF)	8.02 (8.26)	5.13 [3.05; 9.63]	0.290	42.7	37
Myeloïd % diag (%)	7.97 (12.4)	4.34 [2.61; 8.52]	1.40	76.0	36
Myeloïd cells %CD45 diag (%)	7.97 (12.4)	4.34 [2.61; 8.52]	1.40	76.0	36
MMDSC % diag (%)	6.46 (14.0)	2.02 [0.580; 3.69]	0.0300	63.5	37
M-MDSC %CD45 diag (%)	0.468 (1.37)	0.0696 [0.0300; 0.160]	0	7.57	37
Granulocytes %CD45 diag (%)	51.2 (21.9)	51.6 [36.9; 70.6]	8.76	88.0	36
Imm Gran % diag (%)	3.14 (11.9)	0.890 [0.400; 1.71]	0.0100	73.5	37
Imm Gran %CD45 diag (%)	0.505 (0.472)	0.370 [0.120; 0.780]	0.0100	1.62	36

Annexe 2. Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T et PD-L1 à la surface des MDSC circulants au diagnostic et précision de la relation avec les variables cliniques et histo-pathologiques des individus (analyses univariées)

		CD4 PD-1+ au diagnostic (%)						
		Médiane [Q25-75]	min	max	n	p	test	Coeff. de corrélation
Age		26.0 [22.6; 32.3]	7.78	63.1	40	-	-	-
Histologie	Adénocarcinome	25.7 [22.1 - 29.9]	7.78	63.1	40	0.11	Pearson	0.254 (-0.0627; 0.524)
	Epidermoïde	39.5 [32.9 - 46.2]	24.0	55.7	34	0.083	Mann-Whitney	-
PS	1	26.6 [23.2 - 32.4]	7.78	63.1	29	0.35	Mann-Whitney	-
	2	24.5 [16.6 - 31.2]	10.8	55.7	11	-	-	-
Sexe	H	26.9 [23.0 - 35.8]	7.78	63.1	29	0.19	Mann-Whitney	-
	F	25.2 [17.1 - 26.1]	14.7	46.9	11	-	-	-
Statut tabagique	Sevré	26.1 [22.9 - 32.3]	7.78	62.5	31	0.23	Mann-Whitney	-
	Actif	23.2 [16.0 - 25.6]	10.8	63.1	7	-	-	-
		CD8 PD-1+ au diagnostic (%)						
		Médiane [Q25-75]	min	max	n	p	test	Coeff. de corrélation
Age		43.0 [33.8; 50.1]	13.5	70.5	40	-	-	-
Histologie	Adénocarcinome	41.0 [33.5 - 49.1]	13.5	70.5	40	0.28	Pearson	-
	Epidermoïde	56.5 [44.2 - 64.3]	27.6	67.8	34	0.32	Mann-Whitney	-
PS	1	43.1 [34.0 - 49.4]	15.3	70.5	29	0.95	Mann-Whitney	-
	2	39.7 [33.7 - 57.4]	13.5	69.5	11	-	-	-
Sexe	H	43.5 [34.0 - 51.7]	13.5	70.5	29	0.47	Mann-Whitney	-
	F	41.1 [32.2 - 44.8]	15.3	70.4	11	-	-	-
Statut tabagique	Sevré	43.1 [33.6 - 50.3]	15.3	70.5	31	0.97	Mann-Whitney	-
	Actif	40.9 [37.0 - 48.8]	13.5	69.5	7	-	-	-
		Myeloïd PDL1+ diag (IMF)						
		Médiane [Q25-75]	min	max	n	p	test	Coeff. de corrélation
Age		8.34 [4.33; 17.5]	1.54	61.1	37	-	-	-
Histologie	Adénocarcinome	8.34 [4.90 - 19.1]	1.54	61.1	37	0.64	Pearson	0.0794 (-0.251; 0.393)
	Epidermoïde	6.73 [2.96 - 11.1]	2.49	13.2	31	0.21	Mann-Whitney	-
PS	1	11.6 [5.42 - 17.3]	1.54	30.3	4	-	-	-
	2	5.16 [3.92 - 22.9]	2.49	61.1	26	0.71	Mann-Whitney	-
Sexe	H	5.82 [3.34 - 16.3]	1.54	61.1	11	-	-	-
	F	5.82 [3.34 - 16.3]	1.54	61.1	27	0.084	Mann-Whitney	-
Statut tabagique	Sevré	8.34 [4.64 - 17.4]	3.75	28.3	10	-	-	-
	Actif	5.58 [3.02 - 19.5]	2.49	52.2	29	0.7	Mann-Whitney	-
		MMDSC PDL1+ diag (IMF)						
		Médiane [Q25-75]	min	max	n	p	test	Coeff. de corrélation
Age		5.90 [3.11; 11.2]	1.29	40.2	37	-	-	-
Histologie	Adénocarcinome	5.90 [3.16 - 11.2]	1.29	40.2	37	0.42	Pearson	0.138 (-0.195; 0.442)
	Epidermoïde	5.52 [2.86 - 8.20]	2.74	8.40	31	0.36	Mann-Whitney	-
PS	1	8.31 (±5.84)	7.13 [3.	1.29	21.9	26	0.89	-
	2	11.2 (±13.8)	4.04 [3.	2.71	40.2	11	-	-
Sexe	H	5.03 [2.86 - 11.2]	1.29	40.2	27	0.21	Mann-Whitney	-
	F	10.5 [4.69 - 10.9]	3.11	20.6	10	-	-	-
Statut tabagique	Sevré	5.90 [3.12 - 11.2]	2.71	40.2	29	0.48	Mann-Whitney	-
	Actif	4.04 [2.57 - 12.4]	1.29	36.9	7	-	-	-
		Imm Gran PDL1+ diag (IMF)						
		Médiane [Q25-75]	min	max	n	p	test	Coeff. de corrélation
Age		3.21 [2.27; 4.48]	1.26	22.7	37	-	-	-
Histologie	Adénocarcinome	3.21 [2.35 - 4.68]	1.26	22.7	37	0.24	Pearson	0.200 (-0.133; 0.492)
	Epidermoïde	3.33 [2.59 - 4.05]	2.13	4.45	31	0.86	Mann-Whitney	-
PS	1	3.58 [2.54 - 4.47]	1.26	15.2	4	-	-	-
	2	2.58 [2.12 - 4.84]	1.80	22.7	26	0.5	Mann-Whitney	-
Sexe	H	2.78 [2.20 - 4.42]	1.26	22.7	11	-	-	-
	F	3.79 [3.06 - 5.19]	2.19	9.00	27	0.3	Mann-Whitney	-
Statut tabagique	Sevré	3.21 [2.21 - 4.45]	1.26	22.7	10	-	-	-
	Actif	3.18 [2.42 - 3.99]	2.09	15.4	29	1	Mann-Whitney	-
		Mature Gran PDL1 diag (IMF)						
		Médiane [Q25-75]	min	max	n	p	test	Coeff. de corrélation
Age		5.13 [3.05; 9.63]	0.290	42.7	37	-	-	-
Histologie	Adénocarcinome	5.29 [3.01 - 10.7]	0.290	42.7	37	0.28	Pearson	0.181 (-0.152; 0.477)
	Epidermoïde	4.26 [3.13 - 5.67]	2.37	7.29	31	0.47	Mann-Whitney	-
PS	1	5.88 [3.39 - 9.52]	0.290	20.7	4	-	-	-
	2	3.18 [2.49 - 9.11]	2.00	42.7	26	0.3	Mann-Whitney	-
Sexe	H	4.07 [2.84 - 8.06]	0.290	42.7	11	-	-	-
	F	9.04 [5.00 - 11.5]	2.66	20.7	27	0.072	Mann-Whitney	-
Statut tabagique	Sevré	5.13 [3.18 - 10.6]	2.00	42.7	10	-	-	-
	Actif	4.07 [2.64 - 7.71]	0.290	27.3	29	0.56	Mann-Whitney	-

Annexe 3. Corrélation positive entre l'expression de Pd-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic



	Coefficient de corrélation (IC95)	n	p
CD4 PD1+ (%)	0.427 (0.133; 0.651)	40	<0.01
CD8 PD1+ (%)			

Annexe 4. Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 et PD-L1 à la surface des MDSC circulants au diagnostic, après une et deux cures de chimiothérapie

	Moyenne (écart-type)	Médiane [Q25-75]	Min	Max	n
CD4 PD1+ diagnostic (%)	28.3 (11.6)	26.0 [22.9; 29.4]	10.8	62.5	24
CD4 PD1+ C1 (%)	28.4 (11.7)	27.3 [20.9; 33.5]	9.45	63.3	20
CD4 PD1+ C2 (%)	35.8 (14.6)	33.1 [25.9; 41.8]	17.2	66.3	11
CD8 PD1+ diagnostic (%)	43.7 (14.9)	43.0 [33.1; 51.7]	15.3	70.5	24
CD8 PD1+ C1 (%)	40.1 (12.6)	39.5 [28.4; 49.3]	23.1	62.5	20
CD8 PD1+ C2 (%)	44.2 (12.6)	41.2 [35.8; 51.4]	29.4	64.7	11
Myeloïd PDL1+ diag (IMF)	12.9 (11.2)	9.02 [5.36; 17.3]	2.49	52.2	22
Myeloïd PDL1+ C1 (IMF)	14.7 (6.42)	15.8 [9.60; 19.6]	2.81	24.4	18
Myeloïd PDL1+ C2 (IMF)	7.93 (5.26)	7.30 [3.78; 10.8]	2.19	16.9	7
MMDSC PDL1+ diag (IMF)	8.99 (8.63)	6.02 [3.28; 10.8]	2.71	40.2	22
MMDSC PDL1+ C1 (IMF)	8.96 (4.48)	7.96 [5.50; 12.0]	3.06	16.9	18
MMDSC PDL1+ C2 (IMF)	6.61 (4.48)	6.76 [2.80; 8.45]	2.35	14.7	7
Imm Gran PDL1+ diag (IMF)	4.49 (4.51)	3.10 [2.27; 4.32]	1.26	22.7	22
Imm Gran PDL1+ C1 (IMF)	4.02 (1.81)	3.92 [2.47; 4.94]	1.75	8.17	18
Imm Gran PDL1+ C2 (IMF)	3.53 (1.74)	4.44 [1.84; 4.67]	1.50	5.74	7
Mature Gran PDL1+ diag (IMF)	8.34 (8.96)	5.21 [3.13; 10.3]	2.00	42.7	22
Mature Gran PDL1+ C1 (IMF)	8.26 (4.88)	6.38 [4.87; 9.44]	3.64	20.2	18
Mature Gran PDL1+ C2 (IMF)	4.70 (1.77)	5.38 [3.20; 6.24]	2.31	6.37	7
Myeloïd % diag (%)	11.0 (8.72)	8.91 [5.28; 11.1]	2.96	38.9	22
Myeloïd % C1 (%)	14.0 (9.98)	10.3 [8.16; 17.8]	1.60	35.2	18
Myeloïd % C2 (%)	246 (621)	9.87 [7.42; 21.7]	1.11	1654	7
Myeloïd cells %CD45 diag (%)	9.86 (15.7)	4.25 [2.48; 12.4]	1.40	76.0	22
Myeloïd cells %CD45 C1 (%)	5.19 (3.28)	4.74 [3.13; 6.58]	1.29	13.5	17
Myeloïd cells %CD45 C2 (%)	9.30 (6.83)	7.79 [5.82; 11.7]	0.710	23.0	8
MMDSC % diag (%)	4.67 (10.7)	1.92 [0.490; 3.31]	0.0300	51.1	22
MMDSC % C1 (%)	5.97 (10.1)	2.30 [0.868; 4.33]	0.330	39.2	18
MMDSC % C2 (%)	1.36 (1.33)	0.900 [0.310; 2.15]	0.180	3.50	7
M-MDSC %CD45 diag (%)	0.200 (0.452)	0.0600 [0.0250; 0.100]	0	1.98	23
M-MDSC %CD45 C1 (%)	0.186 (0.267)	0.0900 [0.0300; 0.170]	0.0100	1.10	17
M-MDSC %CD45 C2 (%)	0.165 (0.158)	0.105 [0.0450; 0.292]	0.0200	0.380	6
Granulocytes %CD45 diag (%)	47.0 (22.7)	42.9 [33.9; 68.2]	8.76	88.0	22
Granulocytes %CD45 C1 (%)	44.1 (22.0)	42.2 [25.2; 58.9]	4.45	78.6	17
Granulocytes %CD45 C2 (%)	64.4 (9.98)	61.1 [57.3; 71.0]	53.8	79.0	8
Imm Gran % diag (%)	4.55 (15.5)	0.935 [0.360; 1.99]	0.0100	73.5	22
Imm Gran % C1 (%)	4.55 (12.1)	1.33 [0.862; 2.94]	0.150	52.6	18
Imm Gran % C2 (%)	1.60 (2.31)	0.820 [0.320; 1.54]	0.0300	6.65	7
Imm Gran %CD45 diag (%)	0.547 (0.688)	0.185 [0.0975; 0.853]	0.0100	2.57	22
Imm Gran % CD45 C1 (%)	2.27 (6.45)	0.520 [0.170; 1.20]	0.0400	27.1	17
Imm Gran %CD45 C2 (%)	0.815 (1.18)	0.395 [0.125; 0.840]	0.0200	3.57	8

Annexe 5. Comparaison des niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 et PD-L1 sur les MDSC circulants au diagnostic et au cours de la chimiothérapie de première ligne, entre les patients répondeurs et non répondeurs au traitement

	Répondeurs (n = 13)	Non répondeurs (n = 11)	n	p	Test
CD4 PD1+ (%)diagnostic, moyenne (%)	31.1 (±13.7)	25.0 (±7.91)	24	0.3	Mann-Whitney
CD4 PD1+ C1, moyenne (%)	32.2 (±12.4)	22.8 (±8.40)	20	0.13	Mann-Whitney
CD4 PD1+ C2, moyenne (%)	41.9 (±12.2)	19.5 (±2.05)	11	0.012	Mann-Whitney
CD8 PD1+ diagnostic, moyenne (%)	37.9 (±14.5)	50.5 (±12.8)	24	0.026	Mann-Whitney
CD8 PD1+ C1, moyenne (%)	36.9 (±11.2)	45.1 (±13.7)	20	0.16	Mann-Whitney
CD8 PD1+ C2, moyenne (%)	41.7 (±12.6)	50.8 (±12.3)	11	0.38	Mann-Whitney
Myeloïd PDL1+ diag moyenne (IMF)	15.5 (±14.2)	10.3 (±6.93)	22	0.44	Mann-Whitney
Myeloïd PDL1+ C1 moyenne (IMF)	13.2 (±5.68)	16.6 (±7.17)	18	0.32	Mann-Whitney
Myeloïd PDL1+ C2 moyenne (IMF)	7.13 (±3.82)	9.92 (±9.81)	7	0.86	Mann-Whitney
MMDSC PDL1+ diag moyenne (IMF)	11.2 (±11.0)	6.79 (±4.95)	22	0.39	Mann-Whitney
MMDSC PDL1+ C1 moyenne (IMF)	8.93 (±4.25)	8.99 (±5.05)	18	0.97	Mann-Whitney
MMDSC PDL1+ C2 moyenne (IMF)	7.38 (±5.04)	4.69 (±2.93)	7	0.57	Mann-Whitney
Imm Gran PDL1+ diag moyenne (IMF)	5.44 (±6.19)	3.54 (±1.59)	22	0.95	Mann-Whitney
Imm Gran PDL1+ C1 moyenne (IMF)	4.15 (±2.07)	3.86 (±1.55)	18	1	Mann-Whitney
Imm Gran PDL1+ C2 moyenne (IMF)	3.63 (±1.88)	3.29 (±1.96)	7	1	Mann-Whitney
Mature Gran PDL1+ diag moyenne (IMF)	10.7 (±12.0)	5.95 (±3.61)	22	0.4	Mann-Whitney
Mature Gran PDL1+ C1 moyenne (IMF)	7.71 (±4.73)	8.95 (±5.29)	18	0.56	Mann-Whitney
Mature Gran PDL1+ C2 moyenne (IMF)	5.05 (±1.73)	3.84 (±2.17)	7	0.38	Mann-Whitney
Myeloïd % diag moyenne (%)	10.2 (±6.01)	11.7 (±11.1)	22	0.9	Mann-Whitney
Myeloïd % C1 moyenne (%)	14.8 (±10.4)	12.9 (±10.0)	18	0.76	Mann-Whitney
Myeloïd % C2 moyenne (%)	13.2 (±10.4)	9.84 (±0.0354)	7	0.86	Mann-Whitney
Myeloïd cells %CD45 diag moyenne (%)	6.42 (±4.82)	13.3 (±21.7)	22	0.97	Mann-Whitney
Myeloïd cells %CD45 C1 moyenne (%)	5.61 (±4.21)	4.59 (±1.19)	17	0.89	Mann-Whitney
Myeloïd cells %CD45 C2 moyenne (%)	10.3 (±7.80)	6.42 (±0.0495)	8	0.64	Mann-Whitney
MMDSC % diag moyenne (%)	6.30 (±15.1)	3.03 (±2.67)	22	0.27	Mann-Whitney
MMDSC % C1 moyenne (%)	6.69 (±12.2)	5.06 (±7.44)	18	0.46	Mann-Whitney
MMDSC % C2 moyenne (%)	1.67 (±1.47)	0.580 (±0.453)	7	0.57	Mann-Whitney
M-MDSC %CD45 diag moyenne (%)	0.312 (±0.615)	0.0773 (±0.0559)	23	0.73	Mann-Whitney
M-MDSC %CD45 C1 moyenne (%)	0.148 (±0.161)	0.229 (±0.359)	17	0.92	Mann-Whitney
M-MDSC %CD45 C2 moyenne (%)	0.228 (±0.160)	0.0400 (±0.0283)	6	0.27	Mann-Whitney
Granulocytes %CD45 diag moyenne (%)	49.3 (±24.4)	44.8 (±21.9)	22	0.67	Mann-Whitney
Granulocytes %CD45 C1 moyenne (%)	43.9 (±23.7)	44.2 (±21.0)	17	1	Mann-Whitney
Granulocytes %CD45 C2 moyenne (%)	67.2 (±9.96)	55.9 (±3.03)	8	0.14	Mann-Whitney
Imm Gran % diag moyenne (%)	7.37 (±22.0)	1.73 (±1.45)	22	0.076	Mann-Whitney
Imm Gran % C1 moyenne (%)	1.70 (±1.48)	8.11 (±18.0)	18	0.51	Mann-Whitney
Imm Gran % C2 moyenne (%)	0.866 (±0.704)	3.45 (±4.53)	7	0.86	Mann-Whitney
Imm Gran %CD45 diag moyenne (%)	0.429 (±0.782)	0.665 (±0.592)	22	0.087	Mann-Whitney
Imm Gran % CD45 C1 moyenne (%)	4.15 (±2.07)	3.86 (±1.55)	18	1	Mann-Whitney
Imm Gran %CD45 C2 moyenne (%)	3.63 (±1.88)	3.29 (±1.96)	7	1	Mann-Whitney

Annexe 6. Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 circulants au diagnostic et au cours de la chimiothérapie de première ligne. Précision de la relation avec les variables cliniques et histo-pathologiques des individus (analyses univariées)

		Répondeurs (n = 13)	Non répondeurs (n = 11)	n	p	Test
CD4 PD1+ (%)diagnostic, moyenne (%)		31.1 (±13.7)	25.0 (±7.91)	24	0.3	Mann-Whitney
CD4 PD1+ C1 , moyenne (%)		32.2 (±12.4)	22.8 (±8.40)	20	0.13	Mann-Whitney
CD4 PD1+ C2 , moyenne (%)		41.9 (±12.2)	19.5 (±2.05)	11	0.012	Mann-Whitney
CD8 PD1+ diagnostic, moyenne (%)		37.9 (±14.5)	50.5 (±12.8)	24	0.026	Mann-Whitney
CD8 PD1+ C1 , moyenne (%)		36.9 (±11.2)	45.1 (±13.7)	20	0.16	Mann-Whitney
CD8 PD1+ C2 , moyenne (%)		41.7 (±12.6)	50.8 (±12.3)	11	0.38	Mann-Whitney
Age , moyenne		65.9 (±8.59)	65.6 (±9.83)	24	0.86	Mann-Whitney
Histologie , n	Adénocarcinome	11 (85%)	9 (90%)	20	1	Fisher
	Epidermoïde	2 (15%)	1 (10%)	3	-	-
PS , n	1	11 (85%)	7 (64%)	18	0.36	Fisher
	2	2 (15%)	4 (36%)	6	-	-
Sexe , n	H	10 (77%)	8 (73%)	18	1	Fisher
	F	3 (23%)	3 (27%)	6	-	-
Statut tabagique , n	sevré	12 (92.3%)	8 (80%)	20	0.56	Fisher
	actif	1 (7.7%)	2 (20%)	3	-	-

Annexe 7. Survie globale et sans progression des patients traités par chimiothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes et PD-L1 sur les MDSC au diagnostic. Précision de la relation avec les variables cliniques et histopathologiques des individus

		Survie globale (mois)					
		Médiane (IC95)	Suivi max	n	n événements	p	Test
CD4 PD-1+	< 26 %	8.33 (4.77; -)	15.16667	12	12	0.01	Logrank
	≥ 26 %	15.2 (7.77; -)	17.56667	12	7	-	-
CD8 PD-1+	< 43 %	10.2 (7.77; -)	17.56667	12	9	0.37	Logrank
	≥ 43 %	8.65 (5.27; -)	16.56667	12	10	-	-
Myeloïd PDL1+ diag	< 8.34 IMF	10.6 (4.33; -)	15.43333	11	10	0.71	Logrank
	≥ 8.34 IMF	8.37 (6.50; -)	17.56667	11	8	-	-
MMDSC PDL1+ diag	< 5.90 IMF	5.27 (4.13; -)	15.26667	9	9	0.092	Logrank
	≥ 5.90 IMF	9.20 (8.30; -)	17.56667	13	9	-	-
Imm Gran PDL1+	< 3.21 IMF	10.9 (4.33; -)	17.56667	12	9	0.34	Logrank
	≥ 3.21 IMF	8.33 (5.27; -)	16.56667	10	9	-	-
Mature Gran PDL1+	< 5.13 IMF	9.20 (4.13; -)	15.43333	10	9	0.63	Logrank
	≥ 5.13 IMF	8.65 (6.50; -)	17.56667	12	9	-	-
Imm Gran % diag	< 0.89 %	11.3 (8.93; -)	17.56667	9	6	0.042	Logrank
	≥ 0.89 %	5.27 (4.13; -)	15.26667	13	12	-	-
MMDSC % diag	< 2.02 %	11.4 (10.6; -)	17.56667	11	8	0.011	Logrank
	≥ 2.02 %	6.50 (4.13; -)	12.30000	11	10	-	-
Sexe	H	8.33 (4.77; 15.3)	16.56667	18	15	0.45	Logrank
	F	9.92 (8.93; -)	17.56667	6	4	-	-
Histologie	Adénocarcinome	9.20 (7.77; -)	17.56667	20	15	0.34	Logrank
	Epidermoïde	4.77 (3.33; -)	15.16667	3	3	-	-
Statut tabagique	Sevré	8.93 (7.77; 15.2)	17.56667	20	16	0.62	Logrank
	Actif	4.13 (0.333; -)	12.30000	3	2	-	-
Score PS	1	10.6 (8.37; -)	17.56667	18	13	0.015	Logrank
	2	4.23 (3.03; -)	15.16667	6	6	-	-
		Survie sans progression (mois)					
		Médiane (IC95)	Suivi max	n	n événements	p	Test
CD4 PD-1+	< 26 %	3.50 (2.33; -)	8.60000	12	12	<0.01	Logrank
	≥ 26 %	11.4 (6.13; -)	17.56667	12	7	-	-
CD8 PD-1+	< 43 %	5.72 (4.10; -)	17.56667	12	9	0.59	Logrank
	≥ 43 %	5.02 (2.33; -)	16.56667	12	10	-	-
Myeloïd PDL1+ diag	< 8.34 IMF	3.70 (3.03; -)	15.43333	11	10	0.36	Logrank
	≥ 8.34 IMF	6.33 (4.10; -)	17.56667	11	8	-	-
MMDSC PDL1+ diag	< 5.90 IMF	3.30 (2.30; -)	14.36667	9	9	0.028	Logrank
	≥ 5.90 IMF	6.50 (4.10; -)	17.56667	13	9	-	-
Imm Gran PDL1+	< 3.21 IMF	4.50 (3.03; -)	17.56667	12	9	0.73	Logrank
	≥ 3.21 IMF	5.55 (2.67; -)	16.56667	10	9	-	-
Mature Gran PDL1+	< 5.13 IMF	3.50 (2.33; -)	15.43333	10	9	0.25	Logrank
	≥ 5.13 % IMF	6.42 (4.10; -)	17.56667	12	9	-	-
Imm Gran % diag	< 0.89 %	6.33 (4.10; -)	17.56667	9	6	0.089	Logrank
	≥ 0.89 %	3.70 (2.30; -)	14.36667	13	12	-	-
MMDSC % diag	< 2.02 %	6.13 (3.70; -)	17.56667	11	8	0.13	Logrank
	≥ 2.02 %	4.10 (2.67; -)	12.30000	11	10	-	-
Sexe	H	5.72 (3.30; 14.4)	16.56667	18	15	0.7	Logrank
	F	5.22 (2.33; -)	17.56667	6	4	-	-
Histologie	adénocarcinome	5.72 (3.30; -)	17.56667	20	15	0.63	Logrank
	carcinome	4.77 (2.07; -)	14.36667	3	3	-	-
Statut tabagique	sevré	6.13 (3.70; 14.4)	17.56667	21	17	0.65	Logrank
	actif	1.70 (0.333; -)	12.30000	3	2	-	-
Score PS	1	6.23 (4.10; -)	17.56667	18	13	0.15	Logrank
	2	3.37 (1.70; -)	14.36667	6	6	-	-

Annexe 8. Expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 et PD-L1 à la surface des MDSC circulants au diagnostic et après une cure d'immunothérapie. Analyses post cures non réalisables pour le marquage de PD-1 sur les lymphocytes T. Résultats présentés au diagnostic et après une cure d'immunothérapie pour les MDSC en raison de la petite taille de l'effectif à deux cures (n=4)

	Moyenne (écart-type)	Médiane [Q25-75]	min	max	n
CD4 PD1+ diagnostic (%)	33.3 (15.1)	26.9 [24.2; 41.4]	14.7	63.1	11
CD8 PD1+ diagnostic (%)	46.3 (13.4)	47.1 [35.0; 50.6]	30.0	70.4	11
Myeloïd PDL1+ diag (IMF)	7.25 (6.19)	3.63 [2.98; 11.7]	1.54	19.4	10
Myeloid PDL1+ C1 (IMF)	7.50 (4.49)	6.68 [3.19; 11.2]	2.83	14.2	8
MMDSC PDL1+ diag (IMF)	5.63 (4.59)	3.16 [2.82; 9.30]	1.29	14.1	10
MMDSC PDL1+ C1 (IMF)	5.88 (2.36)	5.90 [4.60; 7.28]	2.62	9.39	8
Imm Gran PDL1+ diag (IMF)	3.21 (1.04)	3.12 [2.31; 3.92]	1.94	4.88	10
Imm Gran PDL1+ diag (IMF)	3.05 (1.05)	3.00 [2.44; 3.45]	1.86	5.13	8
Mature Gran PDL1+ diag (IMF)	4.43 (2.70)	3.65 [2.83; 5.97]	0.290	8.83	10
Mature Gran PDL1+ C1 (IMF)	4.86 (1.65)	4.87 [3.83; 6.15]	2.42	6.89	8
Myeloïd % diag (%)	11.0 (4.73)	10.9 [9.94; 11.8]	1.96	21.0	10
Myeloid cells %CD45 diag (%)	7.20 (2.74)	7.37 [6.11; 8.52]	3.08	11.9	10
MMDSC % diag (%)	11.7 (21.7)	1.77 [0.630; 4.80]	0.180	63.5	10
M-MDSC %CD45 diag (%)	1.35 (2.60)	0.108 [0.0434; 0.440]	0.0110	7.57	10
Granulocytes %CD45 diag (%)	55.7 (24.4)	63.4 [31.8; 75.4]	22.4	83.9	10
Imm Gran % diag (%)	1.01 (0.911)	0.730 [0.517; 1.22]	0.100	3.21	10
Imm Gran %CD45 diag (%)	1.35 (2.60)	0.108 [0.0434; 0.440]	0.0110	7.57	10

Annexe 9. Survie globale et survie sans progression des patients traités par immunothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic

		Survie globale (mois)					
		Médiane (IC95)	Suivi max	n	n événements	p	Test
CD4 PD-1+ diagnostic	< 26 %	13.3 (8.93; -)	18.66667	5	2	0.62	Logrank
	≥ 26 %	9.50 (9.50; -)	16.60000	6	2	-	-
CD8 PD-1+ diagnostic	< 43 %	9.50 (8.93; -)	18.66667	4	2	0.61	Logrank
	≥ 43 %	- (13.3; -)	16.83333	7	2	-	-
		Survie sans progression (mois)					
CD4 PD-1+ diagnostic	< 26 %	5.32 (1.77; -)	13.266667	5	4	0.73	Logrank
	≥ 26 %	8.77 (0.767; -)	16.600000	6	3	-	-
CD8 PD-1+ diagnostic	< 43 %	8.27 (2.37; -)	8.766667	4	3	0.8	Logrank
	≥ 43 %	1.77 (0.767; -)	16.600000	7	4		

Annexe 10. Comparaison des niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 et PD-L1 sur les MDSC circulants au diagnostic et au cours de l'immunothérapie de première ligne, entre les patients répondeurs et non répondeurs au traitement

	Répondeurs (n = 6)	Non répondeurs (n = 5)	n	p	Test
CD4 PD1+ diagnostic, moyenne	34.1 (±17.1)	32.3 (±14.2)	11	0.93	Mann-Whitney
CD8 PD1+ diagnostic, moyenne	45.3 (±14.1)	47.5 (±13.9)	11	0.93	Mann-Whitney
Myeloïd PDL1+ diag moyenne (IMF)	9.89 (±6.92)	3.29 (±0.432)	10	0.35	Mann-Whitney
Myeloid PDL1+ C1 moyenne (IMF)	9.26 (±4.70)	4.56 (±2.38)	8	0.39	Mann-Whitney
MMDSC PDL1+ diag moyenne (IMF)	7.37 (±5.37)	3.03 (±0.201)	10	0.48	Mann-Whitney
MMDSC PDL1+ C1 moyenne (IMF)	6.64 (±2.59)	4.63 (±1.51)	8	0.25	Mann-Whitney
Imm Gran PDL1+ diag moyenne (IMF)	3.80 (±0.908)	2.33 (±0.341)	10	0.038	Mann-Whitney
Imm Gran PDL1+ C1 moyenne (IMF)	0.0859 (±0.126)	1.60 (±2.74)	7	1	Mann-Whitney
Mature Gran PDL1+ diag moyenne (IMF)	5.20 (±3.35)	3.29 (±0.517)	10	0.35	Mann-Whitney
Mature Gran PDL1+ C1 moyenne (IMF)	5.52 (±1.80)	3.77 (±0.491)	8	0.25	Mann-Whitney
Myeloïd % diag moyenne (%)	9.60 (±3.78)	13.1 (±5.80)	10	0.76	Mann-Whitney
Myeloïd % C1 moyenne (%)	12.6 (±10.5)	13.6 (±10.4)	8	1	Mann-Whitney
Myeloid cells %CD45 diag moyenne (%)	6.18 (±2.72)	8.48 (±2.50)	9	0.46	Mann-Whitney
Myeloid cells %CD45 C1 moyenne (%)	6.95 (±5.84)	8.65 (±3.26)	7	0.63	Mann-Whitney
MMDSC % diag moyenne (%)	8.22 (±15.1)	16.9 (±31.1)	10	0.91	Mann-Whitney
MMDSC % C1 moyenne (%)	1.36 (±1.34)	20.1 (±34.3)	8	0.79	Mann-Whitney
M-MDSC %CD45 diag moyenne (%)	0.849 (±1.54)	1.98 (±3.73)	9	0.73	Mann-Whitney
M-MDSC %CD45 C1 moyenne (%)	0.0859 (±0.126)	1.60 (±2.74)	7	1	Mann-Whitney
Granulocytes %CD45 diag moyenne (%)	48.5 (±20.9)	64.8 (±28.5)	9	0.29	Mann-Whitney
Granulocytes %CD45 C1 moyenne (%)	40.3 (±26.5)	66.0 (±27.4)	7	0.23	Mann-Whitney
Imm Gran % diag moyenne (%)	0.628 (±0.438)	1.57 (±1.21)	10	0.17	Mann-Whitney
Imm Gran % C1 moyenne (%)	0.868 (±0.758)	0.367 (±0.244)	8	0.45	Mann-Whitney
Imm Gran %CD45 diag moyenne (%)	0.358 (±0.333)	0.782 (±0.383)	9	0.29	Mann-Whitney
Imm Gran % CD45 C1 moyenne (%)	0.495 (±0.578)	0.213 (±0.140)	7	0.86	Mann-Whitney

Annexe 11. Survie globale et survie sans progression des patients traités par immunothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-L1 sur les MDSC et sous-populations au diagnostic

		Survie globale (mois)					
		Médiane (IC95)	Suivi max	n	n événements	p	Test
Myeloïd PDL1+ diag	< 8.34 IMF	- (-; -)*	16.833333	6	1	0.95	Logrank
	≥ 8.34 IMF	13.3 (9.50; -)	18.666667	4	2	-	-
MMDSC PDL1+ diag	< 5.90 IMF	- (-; -)*	18.666667	7	1	0.47	Logrank
	≥ 5.90 IMF	13.3 (9.50; -)	16.600000	3	2	-	-
Imm Gran PDL1+ diag	< 3.21 IMF	- (-; -)*	16.833333	5	1	0.95	Logrank
	≥ 3.21 IMF	13.3 (9.50; -)	18.666667	5	2	-	-
Mature Gran PDL1+	< 5.13 %	- (-; -)*	18.666667	7	1	0.47	Logrank
	≥ 5.13 %	13.3 (9.50; -)	16.600000	3	2	-	-
MMDSC % diag	< 2.02 %	- (13.3; -)	18.666667	6	2	0.22	Logrank
	≥ 2.02 %	- (0.667; -)	1.533333	4	1	-	-

		Survie sans progression (mois)					
		Médiane (IC95)	Suivi max	n	n événements	p	Test
Myeloïd PDL1+ diag	< 8.34 IMF	1.77 (0.767; -)	1.766667	6	3	0.041	Logrank
	≥ 8.34 IMF	11.0 (8.27; -)	16.600000	4	3	-	-
MMDSC PDL1+ diag	< 5.90 IMF	1.77 (0.767; -)	8.266667	7	4	0.032	Logrank
	≥ 5.90 IMF	13.3 (8.77; -)	16.600000	3	2	-	-
Imm Gran PDL1+ diag	< 3.21 IMF	1.77 (0.767; -)	1.766667	5	3	0.022	Logrank
	≥ 3.21 IMF	11.0 (8.27; -)	16.600000	5	3	-	-
Mature Gran PDL1+	< 5.13 %	1.77 (0.767; -)	8.266667	7	4	0.032	Logrank
	≥ 5.13 %	13.3 (8.77; -)	16.600000	3	2	-	-
MMDSC % diag	< 2.02 %	8.52 (1.77; -)	16.600000	6	5	0.69	Logrank
	≥ 2.02 %	- (0.667; -)	1.533333	4	1	-	-

* :Les données exprimées par –(-.-) révèlent que plus de 50 % des patients sont toujours en vie à la fin de l'étude

X. ARTICLE SCIENTIFIQUE

Intérêt prédictif et pronostique de l'analyse de PD-1 et PD-L1 sur les lymphocytes T et MDSC circulants par cytométrie de flux chez les patients atteints de CBNPC métastatiques : étude préliminaire prospective.

Nellie DELACOURT 1, Robin JEANNET 2, Matthieu DUSSELIER 1, Romain DAVID 3, Hélène ORLIAC 4, Julia BALLOUHEY 1, Elise DELUCHE 5, Jean FEUILLARD 2, Alain VERGNENEGRE 1.

1 Université de Limoges, CHU Limoges, Service de Pneumologie, Limoges – France.

2 Université de Limoges, UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Limoges – France.

3 Université de Limoges, CHU Limoges, Service de Médecine Physique et Réadaptation, Limoges – France.

4 Université de Limoges, CHU Limoges, Service de Radiothérapie, Limoges – France.

5 Université de Limoges, CHU Limoges, Service d'Oncologie médicale, Limoges – France.

Introduction : Depuis l'avènement de l'immunothérapie, l'axe PD-1/PD-L1 demeure une voie d'application majeure dans le traitement des Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules (CBNPC). Le lien suggéré dans certaines études entre l'expression PD-L1 à la surface des cellules tumorales et la prédiction de l'efficacité de l'immunothérapie a permis l'application d'un anti-PD-1 en première ligne. L'exploration de PD-1 et PD-L1 au sein de la tumeur ou de son micro-environnement est complexe et la sélection des patients potentiellement répondeurs à l'immunothérapie, supposée par la mesure immuno-histochimique de l'expression de PD-L1, est désormais remise en question par l'existence d'un bénéfice clinique significatif chez des patients dont la tumeur n'exprime pas la protéine, et inversement. Des études récentes soulignent l'intérêt prédictif et pronostique des cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et de la mesure de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T circulants chez les patients traités par chimiothérapie ou immunothérapie. Les résultats de peu d'études, obtenus par cytométrie de flux à partir de prélèvements sanguins, restent aujourd'hui contradictoires et l'impact des thérapies incertaine.

Matériel et méthodes : Nous avons mesuré, par cytométrie de flux, l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 et PD-L1 à la surface des MDSC circulantes chez 41 patients porteurs d'un CBNPC métastatique traités par chimiothérapie ou immunothérapie de première voire deuxième ligne.

Résultats : Une expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 circulants inférieure à 43% est prédictive de la réponse à la chimiothérapie de première ligne. Une forte expression de PD-L1 à la surface de l'ensemble des sous-populations de MDSC est associée à un meilleur pronostic et une expression de PD-L1 supérieure ou égale à 3.21 (IMF) à la surface des Granulocytes immatures est reliée à la réponse à l'immunothérapie de première ligne.

Conclusion : A travers cette étude préliminaire prospective, nous avons démontré l'intérêt prédictif et pronostique de la mesure de l'expression de PD-1 et PD-L1 à la surface des lymphocytes et MDSC circulants chez les patients atteints d'un CBNPC métastatiques.

Mots-clés: CBNPC, PD-1, PD-L1, lymphocyte T, MDSC, cytométrie de flux, chimiothérapie.

Predictive and prognostic interest of PD-1 and PD-L1 analysis on circulating T-cells and MDSC by flow cytometry analysis in patients with metastatic NSCLC: preliminary prospective study.

Nellie DELACOURT 1, Robin JEANNET 2, Matthieu DUSSELIER 1, Romain DAVID 3, H el ene ORLIAC 4, Julia BALLOUHEY 1, Elise DELUCHE 5, Jean FEUILLARD 2, Alain VERGNENEGRE 1.

1 University of Limoges, CHU of Limoges, Pulmonology Department, Limoges - France.

2 University of Limoges, UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Limoges – France.

3 University of Limoges, Limoges University Hospital, Physical and Rehabilitation Medicine Department, Limoges - France.

4 University of Limoges, Limoges University Hospital, Radiotherapy Department, Limoges - France.

5 University of Limoges, Limoges University Hospital, Oncology Department, Limoges - France.

Introduction: Since the advent of immunotherapy, the PD-1 / PD-L1 axis remains a major route of application in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). The suggested link in some studies between PD-L1 expression on the tumor cells surface and the prediction of the efficacy of immunotherapy has allowed the application of anti-PD-1 in first line. The exploration of PD-1 and PD-L1 within the tumor or its microenvironment is complex and the selection of patients potentially responsive to immunotherapy, presumed by the immunohistochemical measurement of PD- L1 expression, is now questioned by the existence of a significant clinical benefit in patients whose tumor does not express the protein, and vice versa. Recent studies highlight the predictive and prognostic interest of suppressive myeloid cells (MDSCs) and the measurement of PD-1 expression on the surface of circulating T cells in patients treated with chemotherapy or immunotherapy. The results of few studies, obtained by flow cytometry analysis from blood samples, remain contradictory and the impact of therapies is uncertain.

Materials and methods: We measured, by flow cytometry, the expression of PD-1 on the surface of CD4 and CD8 and PD-L1 T cells on the surface of circulating MDSCs in 41 patients with metastatic NSCLC treated with chemotherapy or immunotherapy first or second line.

Results: Less than 43% PD-1 expression on the surface of circulating CD8 T cells is predictive of the response to first-line chemotherapy. Strong expression of PD-L1 on the surface of all MDSC subpopulations is associated with better prognosis and PD-L1 expression greater than or equal to 3.21 (IMF) on the surface of immature Granulocytes is related to the answer to first-line immunotherapy.

Conclusion: Through this preliminary prospective study, we demonstrated the predictive and prognostic value of measuring the expression of PD-1 and PD-L1 on the surface of circulating lymphocytes and MDSCs in patients with metastatic NSCLC.

Keywords: NSCLC, PD-1, PD-L1, T-cell, MDSC, flow cytometry, chemotherapy.

Auteur correspondant :

Nellie DELACOURT, Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, 2 avenue Martin Luther King, 87 000 Limoges

Nellie.DELACOURT@chu-limoges.fr

Introduction

L'essor de l'immunothérapie et le ciblage de l'axe PD-1/PD-L1 a suscité beaucoup d'enthousiasme dans le domaine de l'oncologie thoracique, notamment dans le traitement des Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules (CBNPC) avancés. Ces derniers se placent au premier rang national des causes de mortalité par cancer.

L'axe PD-1/PD-L1, impliquant la protéine PD-1 (Programmed cell Death Protein 1) et son ligand PD-L1, est un point de contrôle majeur du système immunitaire anti-tumoral [1-3].

L'expression de PD-L1 par les cellules cancéreuses permettrait d'échapper à la cytotoxicité des lymphocytes T exprimant PD-1 à leur surface. Le lien suggéré dans certaines études entre l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales et la prédiction de l'efficacité de l'immunothérapie a permis l'application d'un anticorps anti-PD-1 en première ligne [4-6].

L'exploration de PD-1 et PD-L1 au sein de la tumeur et de son micro-environnement est complexe et la sélection des patients potentiellement répondeurs à l'immunothérapie, supposée par la mesure immuno-histochimique de l'expression de PD-L1, est désormais remis en question par l'existence d'un bénéfice clinique significatif chez les patients dont la tumeur n'exprime pas la protéine, et inversement [7-11].

Les cellules immunitaires circulantes, ont fait l'objet d'études pilotes prometteuses depuis l'amorçage de la cytométrie de flux à partir de simples échantillons de sang périphérique. Certaines d'entre elles se sont intéressées aux cellules myéloïdes suppressives (MDSC), population hétérogène de précurseurs de granulocytes (G-MDSC) et monocytes (M-MDSC) impliqués dans la suppression de la réponse T face aux antigènes tumoraux [12]. Leur activité

anti-lymphocytaire s'opère au moyen d'une variété de mécanismes incluant la production de cytokines et d'espèces réactives de l'oxygène. Au-delà de la reconnaissance de l'expression de PD-L1 à leur surface, des fréquences de détection accrues de MDSC au niveau du sang périphérique ont été révélées chez les patients atteints de CBNPC. Leur potentiel intérêt prédictif et pronostique a même été souligné chez les patients traités par chimiothérapie et immunothérapie [13,14].

D'autres études se sont intéressées aux populations lymphocytaires T et au lien entre une expression accrue de PD-1 à la surface de la sous-population CD4+ et un pronostic clinique médiocre objectivé par une progression précoce de la maladie sous chimiothérapie, immunothérapie et thérapie ciblée [15-16].

Malgré ces constats, l'impact des traitements systémiques sur ces populations cellulaires et l'éventuelle prédiction de la réponse aux traitements ne semblent pas parfaitement élucidés dans le CBNPC.

A travers notre étude préliminaire, observationnelle, nous avons cherché à analyser les populations lymphocytaires et MDSC circulantes de 41 patients atteints de CBNPC métastatiques par cytométrie de flux. Nous avons tenté de corrélérer, de manière prospective, leurs niveaux d'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 et PD-L1 à la surface des sous-populations de MDSC, à la réponse à la chimiothérapie et l'immunothérapie de première ligne, afin d'en déduire un éventuel intérêt prédictif. Enfin, notre approche s'est attardée sur l'analyse des survies globale et sans progression des sujets afin de démontrer l'éventuel intérêt pronostique de nos marquages.

Matériels et méthodes

Patients et données cliniques

Quarante et un patients porteurs d'un CBNPC métastatique sans addiction oncogénique, exceptée KRAS, ont été assignés à l'étude au diagnostic initial entre le 1^{er} janvier 2018 et le 1^{er} juillet 2019.

Ces sujets ont bénéficié, en première ligne, d'une chimiothérapie (associée ou non au Bevacizumab) ou d'une immunothérapie par anti-PD-1 conditionnelle au statut PD-L1 immuno-histochimique, en accord avec les recommandations en vigueur (seuil ≥ 50 % sauf protocole). Sur la base des critères RECIST 1.0, les patients ont pu être définis « Répondeurs » ou « Non répondeurs » à deux cures. Par définition, les patients « Répondeurs » démontraient une réponse partielle ou une stabilité de la maladie après deux cures. A l'inverse, les patients « Non répondeurs » annonçaient une progression objective clinique ou scannographique. Ces derniers ont par la suite bénéficié d'une immunothérapie ou d'une chimiothérapie de deuxième ligne selon le schéma thérapeutique initial.

Avant leur inclusion, tous les patients ont signé, de manière éclairée, un consentement écrit approuvé par le comité d'éthique du CHU de Limoges (référence n° 287-2018-53).

Analyse de PD-L1 sur tissu tumoral par immuno-histochimie (IHC) au diagnostic

L'expression de PD-L1 sur tissu a été évaluée au sein du laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Limoges, à partir des prélèvements biopsiques frais ayant permis le diagnostic histologique. L'analyse immuno-histochimique a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin anti-PD-L1 (clone QR1, technologie Diagnostics®). Les contrôles positifs et négatifs étaient respectivement des tissus amygdaliens sur lame et des tampons dépourvus d'anticorps primaires. La quantification de l'expression de la protéine, rendue en pourcentage de cellules tumorales marquées (PCT), a été déterminée à l'issue de la révélation de l'immuno-marquage membranaire et cytoplasmique.

Analyse de PD-1 et PD-L1 sur sang périphérique par cytométrie de flux (CMF)

Le délai moyen entre l'analyse immuno-histochimique, rendue au diagnostic, et l'analyse cytométrique de flux, réalisée avant traitement, était en moyenne de 18 jours. Il s'agissait, en pratique, du temps nécessaire au déroulement de la consultation d'annonce, à la pose d'un site implantable et l'organisation d'une hospitalisation de jour. Les échantillons de sang

périphérique ont été fraîchement recueillis au diagnostic chez les patients naïfs de tout traitement puis avant chaque cycle de chimiothérapie ou immunothérapie de première voire seconde ligne, à savoir tous les 15 ou 21 jours. Ces échantillons correspondaient à des reliquats de tubes de NFS (Numération Formule Sanguine) dont les résultats étaient nécessaires à la validation médicale des cures, afin de ne pas imposer de prélèvement subsidiaire.

La suite du protocole a été réalisée au sein du laboratoire INSERM U1262/CNRS 7276. Les échantillons sanguins ont été soumis à une lyse des globules rouges par ajout d'une solution tampon hypotonique. Des cocktails d'anticorps monoclonaux, anti PD-1 et anti PD-L1, conjugués à des fluorochromes, ont été utilisés pour permettre l'expression des marqueurs de surface. Ce marquage a été effectué à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min. Après lavage, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS pour permettre l'analyse à l'aide d'un cytomètre de flux (Navios Beckman Coulter®). Le traitement des données relatives aux cellules identifiées a été réalisée à l'aide du logiciel Kaluza® (Beckman Coulter®). Les sous-populations de lymphocytes T et MDSC ont été mise en évidence selon l'expressions des marqueurs de surface respectif : CD3, CD8, CD4, CD127, CD38 et HLA DR pour les lymphocytes, CD11b, CD14, CD16, CD33 et Lin pour les MDSC (*Figure 1*). Nous avons, sur ce principe, isolé les populations suivantes : lymphocytes T CD4, CD8, cellules myéloïdes, M-MDSC, Granulocytes immatures (Imm Gran) et Granulocytes matures (Mature Gran). Le résultat des marquages a pu être rendu sous 2 heures dans chaque unité (expression de PD-1 à la surface des lymphocytes en pourcentage, expression de PD-L1 à la surface des MDSC en intensité moyenne de fixation IMF).

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à partir des Logiciels GraphPad Prism® et Pvalue.io®. Devant la petite taille des échantillons indépendants, nous avons utilisé un test non paramétrique de Mann-Whitney. Nous avons opté pour un coefficient de corrélation de

Pearson pour démontrer une relation linéaire significative entre deux variables quantitatives. Les courbes de survie ont été comparées sur la base du test du Logrank. Nous avons considéré nos résultats comme étant statistiquement significatifs pour des valeurs de p inférieures à 0.05.

Financement de l'étude

Ces travaux et analyses ont été financés grâce à l'obtention de la Bourse Boehringer Ingelheim® en 2018 (15 000 euros). A titre indicatif, le coût matériel d'une analyse cytométrique sur un échantillon est de l'ordre de 35 euros.

Résultats

Patients et données cliniques

Les patients ont été séparés en deux groupes selon le schéma thérapeutique instauré: «Chimiothérapie première ligne» (N=24) et «Immunothérapie première ligne» (N=11). Le *Tableau 1* compare les effectifs, les caractéristiques cliniques et histo-pathologiques, les séquences thérapeutiques, les réponses à deux cycles et les données de survie de chacun des groupes.

Evaluation de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 et de PD-L1 à la surface des MDSC et sous-populations au diagnostic

Au diagnostic, nos analyses cytométriques ont pu rendre l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 pour 40 patients. Les médianes d'expression respectives étaient de 26 % [22.6-32.6] et 43 % [33.8-50.1] (*Tableau 2*). Nous avons pu observer une corrélation linéaire et statistiquement significative entre l'expression de PD-1 à la surface des CD4 et des CD8 ($p < 0.01$, coefficient de corrélation de Pearson 0.427 ; IC95 [0.133-0.651]). L'expression de PD-L1 sur les MDSC et sous-populations a pu être déterminée pour 37 patients. L'intensité moyenne de fluorescence (IMF) variait entre les cellules myéloïdes

(8.34 [4.33; 17.5]) et les sous-populations M-MDSC (5.90 [3.11; 11.2]), Granulocytes immatures (3.21 [2.27; 4.48]) et Granulocytes matures (5.13 [3.05; 9.63]). Comme précédemment, nous avons pu observer une corrélation statistiquement significative entre les données. En effet, l'intensité du marquage PD-L1 sur une sous-population était reliée de manière linéaire et positive au marquage annoncé sur une autre sous-population ($p < 0.01$, coefficient de corrélation 0.94 [0.777 ; 0.981]).

Les valeurs médianes énumérées ont été retenues pour définir des niveaux seuils d'expression pour chacune des sous-populations lymphocytaire ou MDSC (*Tableau 2*).

Comparaison entre les résultats obtenus par IHC et CMF au diagnostic

Au diagnostic initial, la mesure de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 et de PD-L1 sur les différentes sous population de MDSC n'était pas comparable avec la mesure immuno-histochimique du pourcentage de cellules tumorales exprimant PD-L1 ($p > 0.05$).

Analyse de PD-1 et PD-L1 à la surface des lymphocytes T et MDSC circulants et réponse à l'immunothérapie de première ligne

Nous avons observé un lien significatif entre une forte expression de PD-L1 sur la sous-population des Granulocytes immatures au diagnostic et la réponse aux anti-PD-1, indépendamment de l'âge, du sexe, du statut tabagique et de l'histologie (*Figure 2, Tableau 2*). En effet, les patients « Répondeurs » présentaient un niveau d'expression de PD-L1 au diagnostic supérieur aux « Non répondeurs ». A l'inverse, aucune tendance n'a été observée entre l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 et la réponse à l'immunothérapie.

Analyse de PD-1 et PD-L1 à la surface des lymphocytes T et MDSC circulants et évaluation de la survie globale et sans progression après une immunothérapie de première ligne

L'expression de PD-L1 à la surface des cellules myéloïdes, des MDSC et sous-populations au diagnostic a révélé un intérêt pronostique chez les patients traités par anti-PD1 en première ligne (*Tableau 3*). En effet, la survie sans progression semblait modulée par l'expression de PD-L1 à leur surface. Les patients ayant présenté des niveaux d'expression de PD-L1 inférieurs aux médianes au diagnostic ont dévoilé une moindre survie sans progression (1.77 mois vs 11.0 à 13.3 mois), sans que la proportion des MDSC totales n'ait eu d'influence sur l'évolution clinique.

Analyse de PD-1 et PD-L1 à la surface des lymphocytes T et MDSC circulants et réponse à la chimiothérapie de première ligne

Au diagnostic, les patients « Répondeurs » à la chimiothérapie de première ligne exposaient des niveaux d'expression moyens de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8+ inférieurs aux patients « Non Répondeurs » (37.9 +/-14.5 vs 50.5 +/- 12.8, *Figure 3, Tableau 2*). Après deux cures, la tendance a semblé s'inverser en ce qui concerne l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4. En effet, les patients « Répondeurs » révélaient des niveaux d'expression moyens supérieurs aux patients « Non Répondeurs » (41.9 +/- 12.2 % vs 19.5 +/- 2.05 %).

Quant au niveau d'expression de PD-L1 à la surface des MDSC et des sous-populations, il n'était pas associé à la réponse à la chimiothérapie de première ligne.

Analyse de PD-1 et PD-L1 à la surface des lymphocytes T et MDSC circulants et évaluation de la survie globale et sans progression après une chimiothérapie de première ligne

La survie globale des patients traités par chimiothérapie de première ligne était statistiquement différente suivant l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4+ au diagnostic (*Figure 4*,

Tableau 3). En effet, un niveau d'expression de PD-1 inférieur à 26% au diagnostic était associé à un pronostic clinique péjoratif et une progression plus précoce de la maladie, indépendamment de l'âge, du sexe, du statut tabagique et de l'histologie (médiane de survie globale 8.3 mois vs 15.2 mois, soit une différence de 6.9 mois ; médiane de survie sans progression 3.5 mois vs 11.4 mois, soit une différence de 7.9 mois). L'ajustement des résultats au score Performance Status (PS) a confirmé le caractère protecteur du facteur indépendant « PD-1 supérieur ou égal à 26 % » sur la survenue du décès (HR 0.312 [0.119 ; 0.815], p=0.017).

Concernant les sous-populations MDSC, un pourcentage élevé de M-MDSC et Granulocytes immatures au diagnostic était associé à un pronostic clinique péjoratif (médiane de survie globale 6.5 mois vs 11.4 mois en fonction du pourcentage de M-MDSC supérieur ou égal à 2%, p=0.01; 5.3 mois vs 11.3 mois en fonction du pourcentage de Imm Gran supérieur ou égal à 0.89%, p=0.042).

A l'inverse, un haut niveau d'expression de PD-L1 sur les M-MDSC au diagnostic était associé à un meilleur pronostic. En effet, les patients présentant un niveau d'expression de PD-L1 sur la sous-population M-MDSC au diagnostic supérieur ou égale à 5.90 ont illustré une progression plus lente sous chimiothérapie de première ligne (médiane de SSP 6.5 mois vs 3.3 mois soit un gain de survie sans progression de 3.2 mois).

Discussion

Faisabilité de l'analyse de l'expression de PD-1 et PD-L1 à la surface des lymphocytes et MDSC circulants

A travers cette étude préliminaire, nous avons confirmé la faisabilité de la mesure de l'expression de PD-1 et PD-L1 dans le sang périphérique des patients atteints de CBNPC métastatiques. Nous nous sommes, pour se faire, intéressés à l'expression de la protéine et son ligand à la surface des populations cellulaires circulantes impliquées dans la réponse immunitaire anti-tumorale, à savoir les lymphocytes T et les MDSC. Bien que méthode

s'adresse aujourd'hui à un opérateur entraîné dans un laboratoire mettant à disposition un cytomètre de flux, sa fiabilité, sa rapidité, sa reproductibilité et son faible coût ont permis de répéter les résultats pour 37 patients au cours des traitements systémiques administrés.

Comparaison de l'expression de PD-1 et PD-L1 obtenue par cytométrie de flux avec l'expression de PD-L1 obtenue par immuno-histochimie

Sur la simple hypothèse, pourtant contredite, que l'expression de PD-1 et PD-L1 au niveau du sang périphérique pourrait être corrélée à l'expression tumorale de PD-L1, nous avons comparé nos analyses à celles obtenues par le laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Limoges. Aucune corrélation statistiquement significative n'a été mise en évidence entre le marquage immunohistochimique et le marquage cytométrique, à la fois sur les lymphocytes T et les MDSC. Conformément à de précédents travaux, la piste première de la substitution du statut tumoral PD-L1, obtenu au moyen d'une biopsie tissulaire parfois invasive, par ce marquage cytométrique obtenu à partir de simples prélèvements sanguins, ne peut être retenue [17].

Prédiction de la réponse aux anti-PD-1 de première ligne au regard de l'expression de PD-L1 à la surface des granulocytes immatures circulants

Sur les 11 patients traités par immunothérapie de première ligne, 9 ont présenté un statut PD-L1 obtenu par immuno-histochimie au diagnostic supérieur ou égal à 50 %. Au regard du taux de réponse thérapeutique, soit 55 % (6 patients sur 11 contre 9 sur 11 supposés par le statut PD-L1), nous soulignons de nouveau le caractère prédictif imparfait de la mesure immunohistochimique. Parallèlement à ce constat, un patient ayant présenté une expression de PD-L1 à 1 % a répondu à l'immunothérapie.

Malgré un effectif de patients traités par immunothérapie de petite taille, nous avons démontré l'intérêt d'évaluer l'expression de PD-L1 sur la sous-population des granulocytes immatures au diagnostic. En effet, nous avons souligné un lien significatif entre un niveau d'expression

de PD-L1 à la surface des granulocytes immatures circulants supérieur ou égal à 3,21 et la réponse à deux cures de Pembrolizumab. A notre connaissance, aucune étude ne s'est, jusqu'à aujourd'hui, intéressée au statut PD-L1 sur cette sous-population et à son intérêt prédictif dans la réponse à l'immunothérapie en première ligne. Bien qu'une étude récente ait démontré le lien entre une proportion élevée de PMN-MDSC au diagnostic et une meilleure réponse au traitement, celle-ci a concerné un panel de 53 patients traités par Nivolumab en seconde ligne [18]. Parallèlement, une autre étude a conclu à une réduction de la proportion de MDSC chez les patients répondeurs à l'Atezolizumab, anti-PD-L1, sur un panel de 10 patients [19].

Sur la simple analyse de l'expression de PD-L1 à la surface de la sous-population des granulocytes immatures (< 3.21 ou ≥ 3.21), nous aurions pu prédire la réponse au traitement pour 5 patients sur 6 et la progression pour 4 patients sur 5 en raison du manque de résultat pour 1 patient concerné, soit une concordance entre nos prédictions et la réponse objective de 82%.

Chez les 5 patients non répondeurs, nous nous sommes intéressés à l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 au diagnostic afin de supposer une éventuelle réponse à la chimiothérapie s'il celle-ci avait été appliquée en première ligne. A ce titre, nous avons supposé les patients répondeurs à la chimiothérapie si l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 au diagnostic n'excédait pas 43%. En procédant à cette analyse, nous avons supposé que 2 des 5 patients auraient potentiellement répondu à la chimiothérapie. Il s'avère que le suivi prospectif de ces 2 patients, traités ultérieurement par une chimiothérapie de deuxième ligne, a révélé une réponse partielle et une stabilité de la maladie.

Sur les 6 patients initialement répondeurs à l'immunothérapie de première ligne, 4 ont bénéficié d'une chimiothérapie à progression. En appliquant le raisonnement précédent, nous avons supposés ces 4 patients répondeurs à la chimiothérapie en regard de l'expression de PD1 à la surface des lymphocytes T CD8 circulants inférieure à 43%. Ces hypothèses se sont toutes confirmées sous chimiothérapie de deuxième ligne.

Intérêt pronostique de l'évaluation de PD-L1 à la surface des MDSC chez les patients traités par anti-PD-1 de première ligne

A travers notre étude, nous avons souligné l'intérêt pronostique de l'évaluation de l'expression de PD-L1 à la surface des MDSC circulantes au diagnostic. En effet, des niveaux d'expression de PD-L1 élevés à la surface des cellules myéloïdes, des M-MDSC, des granulocytes matures et immatures, ont pu être corrélée à un allongement de la survie sans progression de plus de 9 mois. Aucune différence de survie globale entre les groupes n'a pu être mise en évidence en raison du manque de recul admis entre l'inclusion des patients traités par immunothérapie en première ligne et la date de point.

Prédiction de la réponse à la chimiothérapie de première ligne en regard de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 circulants

Chez les 24 patients atteints de CBNPC métastatiques traités par chimiothérapie en première ligne, nous avons démontrés qu'une expression PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 inférieure à 43% au diagnostic était associée à la réponse thérapeutique. Cette démonstration diffère d'un travail précédent effectué auprès d'un effectif similaire de patients. En effet, une étude américaine exposait une association entre une faible expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et la réponse au traitement, sans résultat significatif à la surface des lymphocytes CD8 [15]. A l'inverse, nous avons prouvé, chez les répondeurs à deux cures, un niveau d'expression de PD-1 plus élevé à la surface des lymphocytes TCD4.

Nous n'avons pas révélé de lien entre la répartition des MDSC et des différentes sous-populations circulantes au diagnostic et la réponse à la chimiothérapie en première ligne. Toutefois, une tendance à une diminution de la sous-population MMDSC a été observée chez les patients répondeurs. Ce constat semble en accord avec la littérature. En effet, plusieurs études ont démontré une augmentation de la proportion de MDSC voire de la sous-population M-MDSC chez les patients non répondeurs à la chimiothérapie [17,20,21].

Sur la simple analyse de l'expression de PD-1 à la surface des LT CD8 au diagnostic ($< 43\%$ ou $\geq 43\%$), nous aurions pu prédire la réponse pour 9 patients sur 13 et la progression pour 8 patients sur 11. Nous avons ainsi obtenu une concordance entre nos prédictions et la réponse objective de 71% .

Chez les 11 patients non répondeurs à la chimiothérapie, nous nous sommes intéressés à l'expression de PD-L1 sur la sous-population des granulocytes immatures afin de supposer une éventuelle réponse à l'immunothérapie si celle-ci avait été appliquée en première ligne. Nous avons supposé les patients répondeurs à l'immunothérapie en première ligne si leur expression de PD-L1 à la surface des granulocytes immatures au diagnostic dépassait 3,21 (IMF). Ainsi, nous avons présumé, sur ces 11 patients réfractaires à la chimiothérapie, une réponse potentielle à l'immunothérapie en première ligne pour 5 d'entre eux. Toutefois, pour les 7 patients du groupe ayant bénéficié d'une immunothérapie de deuxième ligne, nos prédictions ne se sont confirmées que pour 3 d'entre eux. Cette faible concordance entre nos prédictions de la réponse à l'immunothérapie de première ligne et la réponse objective sous immunothérapie de deuxième ligne ne nous semble pas étonnant. En effet, d'après nos analyses statistiques, nous n'avons trouvés aucune différence d'expression de PD-L1 sur les MDSC entre les patients répondeurs et non répondeurs à l'immunothérapie de deuxième ligne ($p>0.05$). Conformément à ce constat, sur les 13 patients initialement répondeurs à la chimiothérapie de première ligne, 3 ont bénéficié d'une immunothérapie de seconde ligne à progression. Nos prédictions ne se sont pas confirmées. Ces dernières ne restent applicables qu'en première ligne, sans possibilité d'extrapolation en seconde ligne.

Intérêt pronostique de l'évaluation de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 et de la proportion de MDSC au diagnostic chez les patients traités par chimiothérapie en première ligne

Nous avons démontrés qu'une expression PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 inférieure à 26% au diagnostic était associée de manière significative à un pronostic défavorable. Dans

l'étude comparable sus-citée, l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 semblait associée à un mauvais pronostic en termes de survie globale et survie sans progression [15]. Toutefois, ces investigations ont été menées au sein d'une population de patients hétérogènes (stades IIIB et IV) et les résultats ont été rendus pour tous l'ensemble des traitements confondus (chimiothérapie, thérapie ciblée, immunothérapie).

Notre étude a par ailleurs mis en évidence un lien entre une proportion de M-MDSC et Granulocytes Immatures élevée au diagnostic et des résultats cliniques péjoratifs. En effet, un allongement de la survie globale de 4.9 mois et 6 mois a été observé chez les patients présentant des proportions de M-MDSC et Imm Gran respectives moindres au diagnostic. Ces constats confortent des travaux récents ayant démontré l'intérêt pronostique propres aux M-MDSC et PMN-MDSC [13,14].

Enfin, nous avons mis en évidence un lien entre une expression élevée de PD-L1 à la surface des M-MDSC au diagnostic et un pronostic clinique plus favorable. Un allongement de la survie sans progression de près de 12 mois a été observé chez les individus ayant présenté des intensités moyennes de fixation élevées au diagnostic. Aucune différence n'a toutefois été mise en évidence par rapport à la réponse au traitement. Nous supposons l'impact du faible effectif de patients encore vivants ou suivis à deux cures (n=7) sur l'absence de significativité statistique.

Proposition d'un algorithme décisionnel

La prise en considération de l'ensemble des résultats de cette étude nous a permis de proposer un algorithme décisionnel (*Figure 5*). Afin de définir le meilleur choix stratégique face à un patient atteint d'un CBNPC métastatique éligible à un traitement systémique de première ligne, nous avons retenu l'usage de l'expression de PD-L1 à la surface des granulocytes immatures et l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 au diagnostic.

Sur ce principe, il est licite de proposer une chimiothérapie de première ligne pour les patients exprimant faiblement PD-L1 à la surface des granulocytes immatures et faiblement PD-1 sur

les lymphocytes T CD8. A l'inverse, il est rationnel de proposer une immunothérapie de première ligne pour les individus exprimant fortement PD-L1 sur les granulocytes immatures et fortement PD-1 sur les lymphocytes T CD8.

La question reste toutefois en suspens pour deux cas de figures. Chez les patients présentant un niveau d'expression de PD-L1 sur les granulocytes immatures inférieur à 3,21 et une expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 supérieure à 43%, notre raisonnement prédit l'absence de réponse aux deux traitements. Le défaut de proposition thérapeutique n'étant pas recevable d'un point de vue éthique, notre choix s'orienterait probablement vers une chimiothérapie de première ligne, bien que 3 patients sur 7 concernés n'aient pas répondu à cette thérapie.

Chez les patients présentant un niveau d'expression de PD-L1 élevé jugé prédictif de réponse à l'immunothérapie et un niveau d'expression de PD-1 inférieur à 43 % favorable à l'initiation d'une chimiothérapie, nous nous posons également la question de la meilleure alternative thérapeutique. Les 5 patients illustrant ce cas de figure ont toutefois présenté un profil de réponse en faveur de la chimiothérapie.

Limites de l'étude

D'un point de vue méthodologique, nous retenons le nombre restreint de patients, notamment dans le groupe recevant une immunothérapie première (N=11). L'inclusion parfois tardive des patients dans ce groupe a par ailleurs réduit la période de suivi nécessaire au rendu des données de survies globales et survies sans progression. Les analyses statistiques ont ainsi été limitées.

Au-delà des faibles effectifs, certains patients inclus dans cette étude présentaient un Performans status supérieur à 1, contrairement à la plupart des études cliniques. Toutefois, ce score n'étant pas un critère d'inclusion, nous estimons que notre population de patients reflète davantage les conditions de vie réelles des patients suivis en oncologie thoracique.

Conclusion

La prédiction de la réponse aux chimiothérapies et immunothérapies est un défi majeur dans le domaine de l'oncologie thoracique, notamment dans le traitement des CBNPC métastatiques.

Les constats cités dans la première partie de ce travail tendent à remettre en question l'apport prédictif du marquage immunohistochimique PD-L1 dans la prédiction de la réponse à l'immunothérapie. D'autres part, la sous-estimation actuelle de l'abondance du micro-environnement tumoral et des cellules immunitaires circulantes suscite de nombreuses hypothèses, non encore parfaitement élucidées.

A travers notre étude préliminaire observationnelle et prospective, nous avons confirmé la faisabilité de l'analyse de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 circulants et de PD-L1 à la surface des MDSC et sous-populations circulantes par cytométrie de flux à partir de simples échantillons de sang périphérique. Afin de renforcer l'apport scientifique de nos résultats, il conviendrait d'élaborer une étude similaire à plus large échelle. Dans l'avenir, il serait possible de comparer dans chaque groupe défini par des seuils d'expression de PD-1 et PD-L1 plus conformes, l'efficacité d'un traitement par immunothérapie versus chimiothérapie.

Conflits d'intérêts

L'intégralité des auteurs a déclaré ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Figures

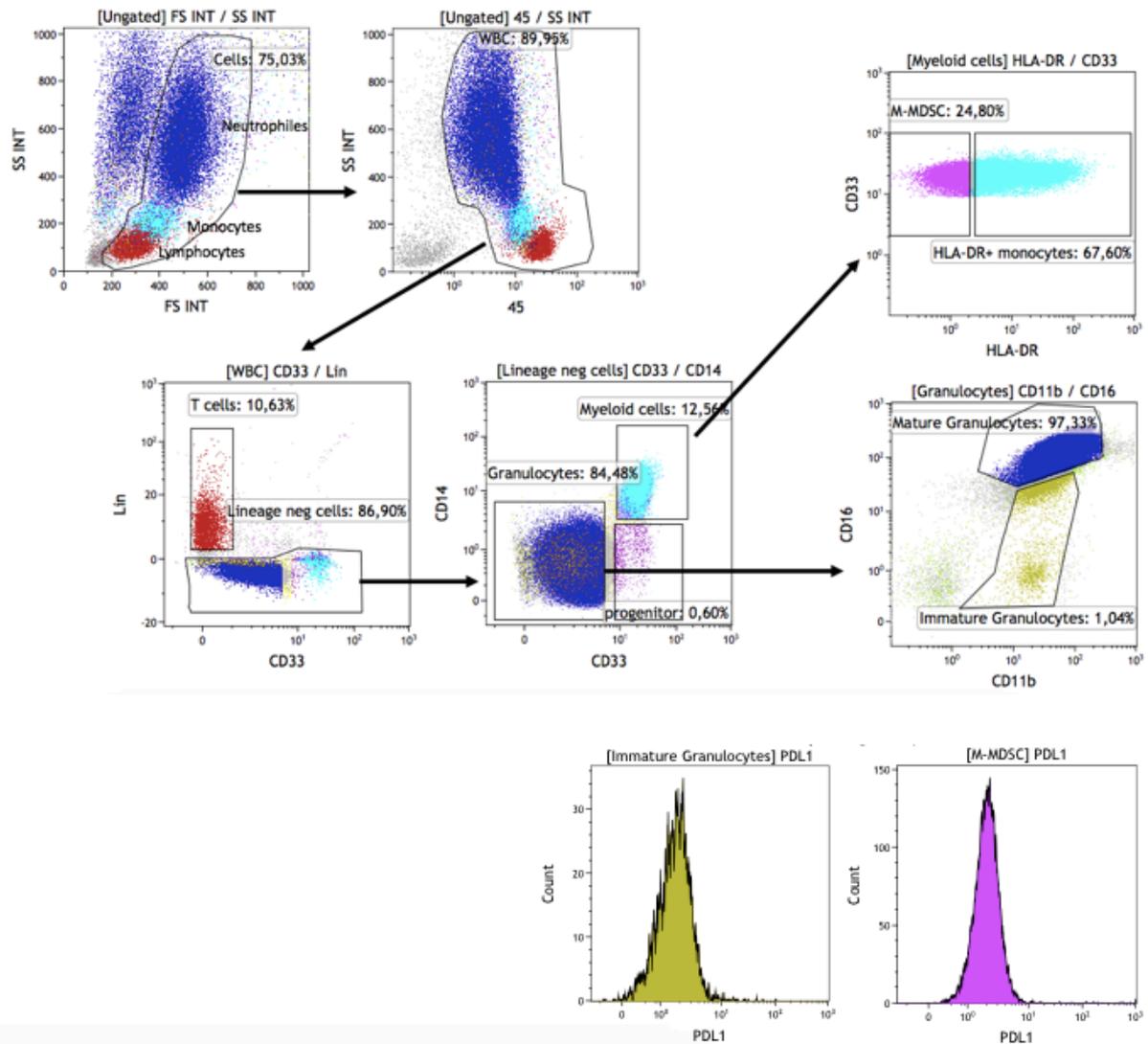


Figure 1 : Stratégie de fenêtrage des différentes sous-populations de MDSC mises en évidence par cytométrie de flux. Exemple de mesure de l'expression de PD-L1 à la surface des granulocytes immatures et des M-MDSC (IMF). Isolement de la population lymphocytaire et de la population Linéage négative (CD33-, CD19-, CD20-, CD123-, CD56-). Mise en évidence des M-MDSC (CD33-, HLA DR-) parmi les cellules myéloïdes (CD33+, CD14+). Mise en évidence des granulocytes matures (CD16+, CD11b+) et des granulocytes immatures (CD11b+) parmi la population granulocytaire (CD33-, CD14-).

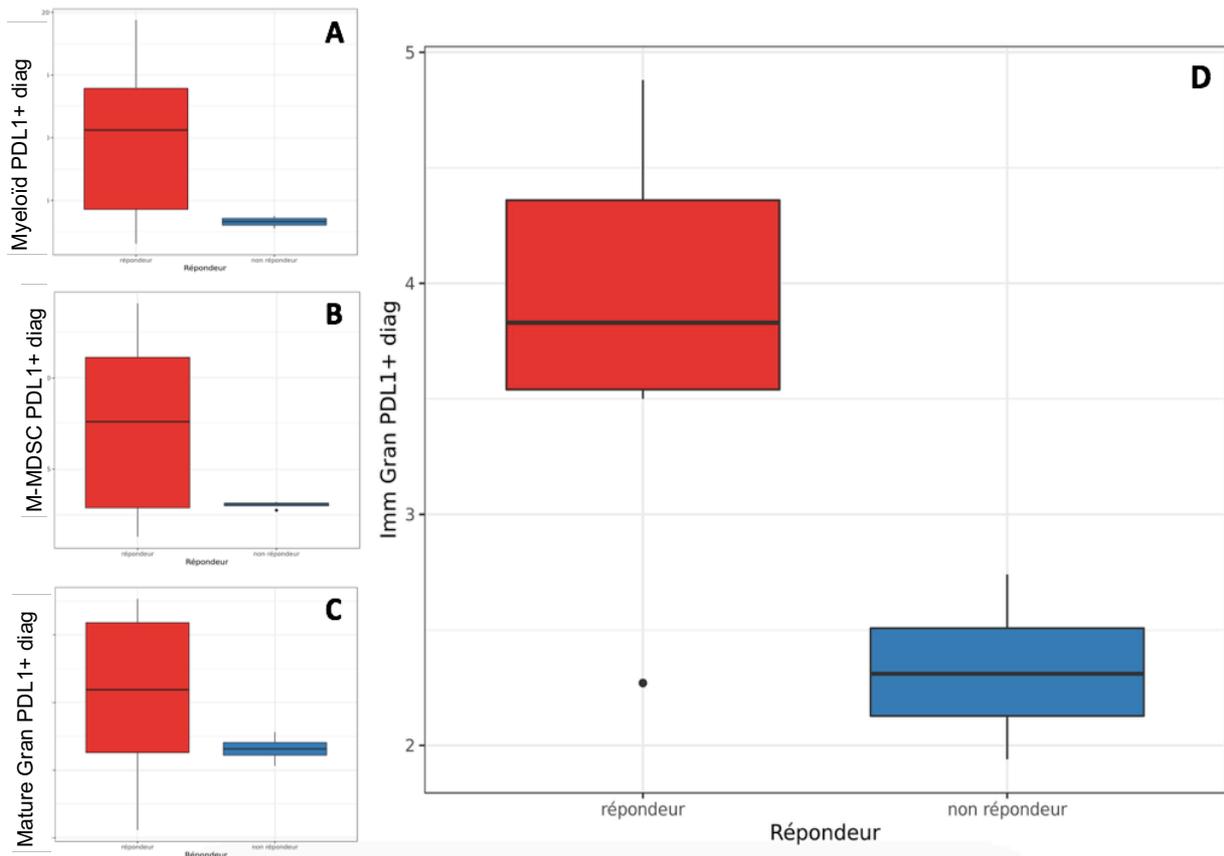


Figure 2 : Comparaison des niveaux d'expression de PD-L1 sur les MDSC au diagnostic entre les patients répondeurs et non répondeurs à l'immunothérapie de première ligne. A : Myeloïd PD-L1+ au diagnostic, Répondeurs à gauche versus Non répondeurs à droite ($p=0.35$). B : MMDSC PD-L1+ au diagnostic, Répondeurs à gauche versus Non répondeurs à droite ($p=0.48$). C : Mature Gran PD-L1+ au diagnostic, Répondeurs à gauche versus Non répondeurs à droite ($p=0.35$). D : Imm Gran PD-L1+ au diagnostic, Répondeurs à gauche versus Non répondeurs à droite ($p=0.038$).

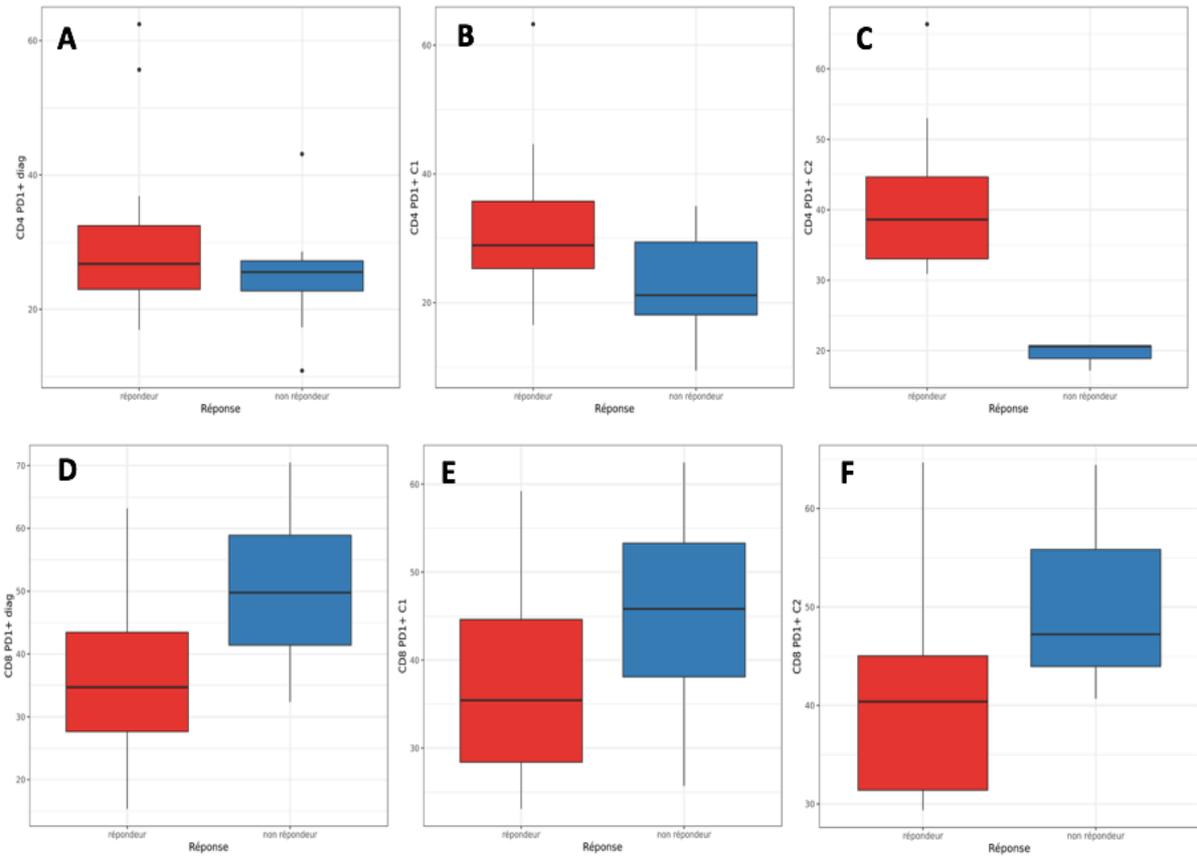
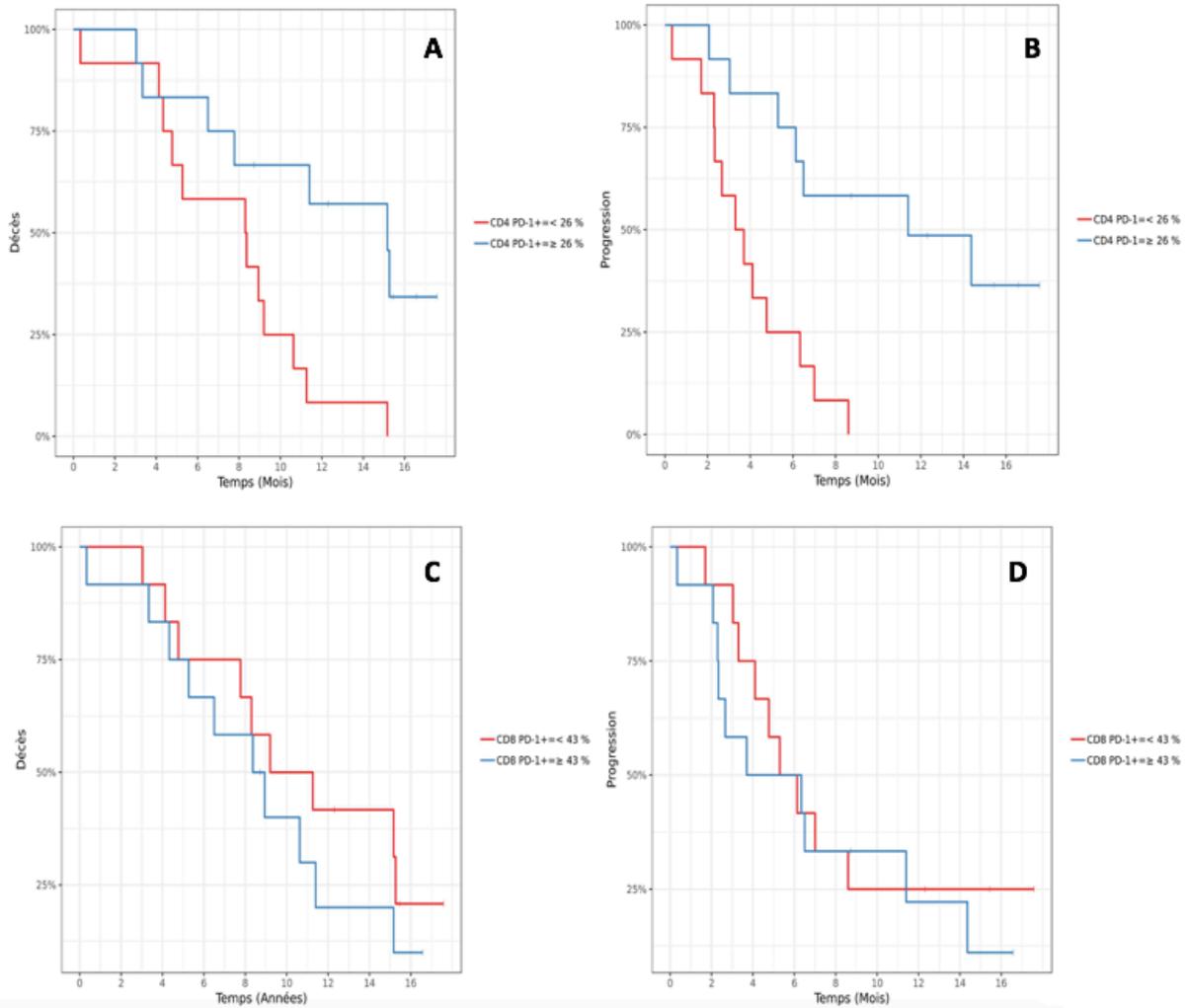


Figure 3 : Comparaison des niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 au diagnostic et au cours de la chimiothérapie de première ligne, entre les patients répondeurs et non répondeurs au traitement. A : CD4 PD-1+ au diagnostic, Répondeurs à gauche versus Non répondeurs à droite. B : CD4 PD-1+ après une cure de chimiothérapie. C : CD4 PD-1+ après 2 cures de chimiothérapie ($p=0.012$). D : CD8 PD-1+ au diagnostic ($p=0.026$). E : CD8 PD-1+ après une cure de chimiothérapie. F : CD8 PD-1+ après 2 cures de chimiothérapie.



Figures 4 : Courbes de survie globale (à gauche) et survie sans progression (à droite) des patients traités par chimiothérapie en première ligne en fonction de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes au diagnostic. A : Survie globale en fonction du niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes CD4 au diagnostic (<26 % ou ≥26 % ; 8.3 mois vs 15.2 mois, $p=0.01$). B : Survie sans progression en fonction du niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes CD4 au diagnostic (3.5 mois vs 11.4 mois ; $p<0.01$). C : Survie globale en fonction du niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes CD8 au diagnostic (<43 % ou ≥43 %, 10.2 mois vs 8.6 mois, $p=0.37$). D : Survie sans progression en fonction du niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes CD8 au diagnostic (5.7 mois vs 5.0 mois ; $p=0.59$).

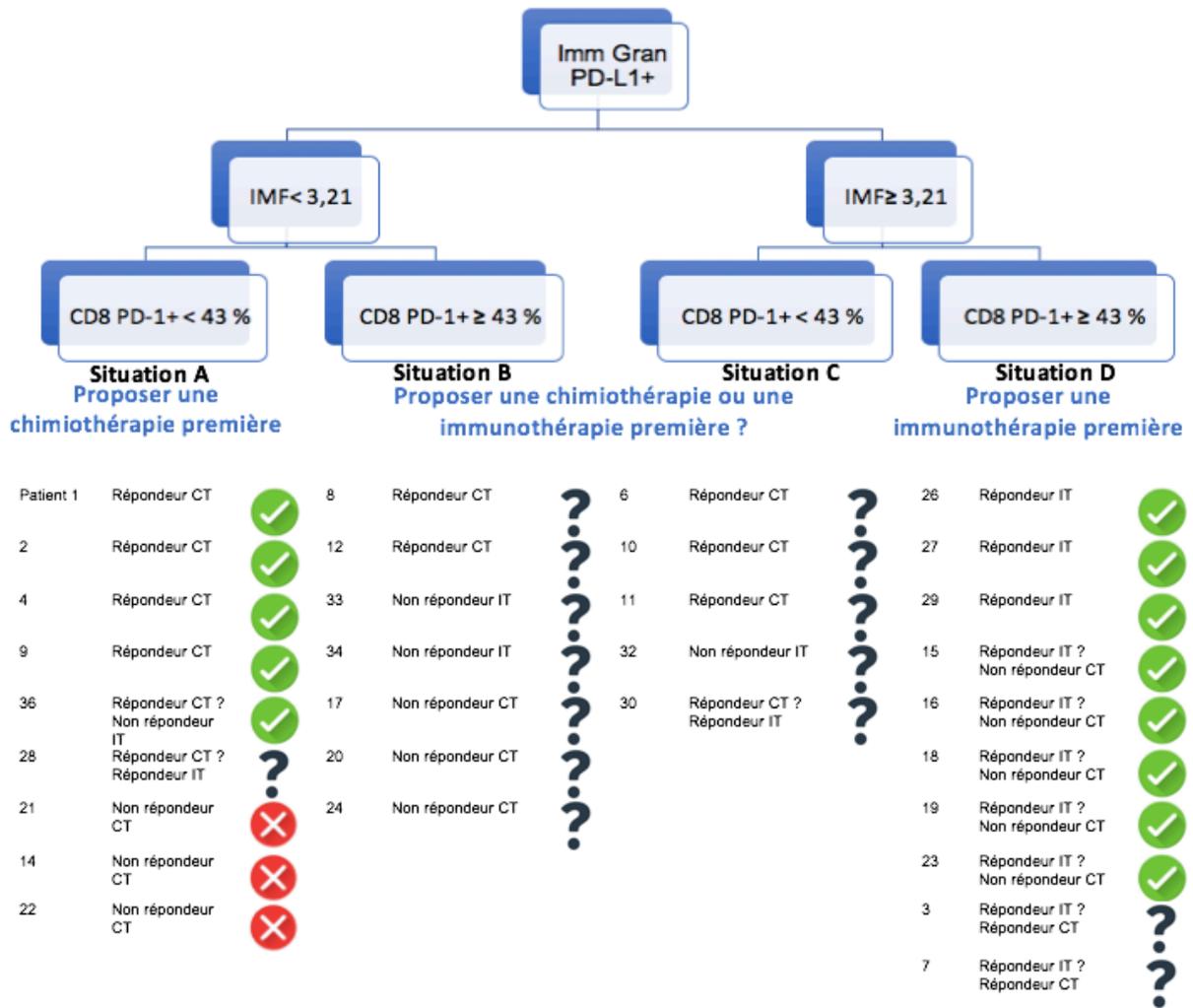


Figure 5 : Arbre décisionnel proposé pour le traitement de première ligne des patients atteints de CBNPC métastatiques. IMF : intensité moyenne de fixation.

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques, histo-pathologiques, séquences thérapeutiques, réponses à deux cycles et données de survie propres aux patients assignés à l'étude. *** patients assignés à des protocoles permettant un traitement par anti-PD-1 malgré un statut PD-L1 < 50 %.

	COHORTE (N = 41)	CHIMIOTHÉRAPIE PREMIERE LIGNE (N = 24)	IMMUNOTHÉRAPIE PREMIERE LIGNE (N = 11)
Age			
Age médian +/- SD	67 +/- 8	67 +/- 8	68 +/- 7
Sexe			
Homme, n (%)	29 (71)	21 (75)	8 (67)
Femme, n (%)	12 (29)	7 (25)	4 (33)
Statut tabagique			
Sevré, n (%)	33 (80)	24 (86)	8 (67)
Nombre Paquets-Années médian +/- SD	35 +/- 21	40 +/- 22	30 +/- 9
Actif, n (%)	7 (17)	4 (14)	3 (25)
Nombre Paquets-Années médian +/- SD	40 +/- 35	35	40 +/- 12
Non fumeur, n (%)	1 (3)	0 (0)	1 (8)
Exposition professionnelle			
Non exposé, n (%)	39 (95)	27 (96)	11 (92)
Exposé, n (%)	2 (5)	1 (4)	1 (8)
Score OMS			
0, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1, n (%)	30 (73)	18 (64)	11 (92)
2, n (%)	11 (27)	10 (36)	1(8)**
Comorbidités extra-pulmonaires			
Aucune, n (%)	13 (32)	8 (29)	3 (26)
Cardio-vasculaire, n (%)	25 (61)	16 (57)	8 (67)
Cancer en rémission > 5 ans, n (%)	9 (22)	7 (25)	2 (17)
Nombre de sites métastatiques			
1, n (%)	21 (51)	18 (64)	3 (25)
2, n (%)	14 (34)	7 (25)	6 (50)
≥3, n (%)	6 (15)	3 (11)	3 (25)
Sites métastatiques			
Os, n (%)	19 (46)	15 (54)	4 (33)
Poumon ou plèvre, n (%)	13 (32)	8 (29)	5 (42)
Cerveau, n (%)	9 (22)	6 (21)	3 (25)
Surrénale, n (%)	9 (22)	4 (14)	5 (42)
Foie, n (%)	8 (20)	5 (18)	2 (17)
Ganglion sus-clav. ou sous-diaphragmatique, n (%)	4 (10)	2 (7)	3 (25)
Tissu mou, n (%)	2 (5)	2 (7)	0 (0)
Pancréas, n (%)	1 (2)	0 (0)	1 (8)
Type de prélèvement			
Biopsie endo-bronchique, n (%)	16 (40)	10 (36)	5 (42)
Biopsie site métastatique, n (%)	9 (22)	8 (29)	1 (8)
Biopsie pulmonaire trans-pariétale, n (%)	9 (22)	8 (29)	1 (8)
Biopsie exérèse ganglionnaire, n (%)	3 (7)	0 (0)	3 (25)
Cytoponction ganglionnaire, n (%)	2 (5)	2 (7)	0 (0)
Ponction pleurale, n (%)	1 (2)	0 (0)	1 (8)
Biopsie pleurale, n (%)	1 (2)	0 (0)	1 (8)
Histologie			
Adénocarcinome, n (%)	35 (85)	24 (86)	10 (84)
Carcinome épidermoïde, n (%)	4 (10)	3 (11)	1 (8)
Carcinome indifférencié, n (%)	2 (5)	1 (4)	1 (8)
Statut mutationnel			
Non muté KRAS, n (%)	30 (73)	20 (71)	9 (75)
Muté KRAS, n (%)	11 (27)	8 (29)	3 (25)
Statut PD-L1 tumoral (IHC)			
Négatif, n (%)	17 (42)	17 (61)	0 (0)
Positif (≥1 %), n (%)	24 (58)	11 (39)	12 (100)
1 ≤ PD-L1 < 5 %	5 (12)	4 (14)	1(8)***
5 ≤ PD-L1 < 25 %	5 (12)	4 (14)	0 (0)
25 ≤ PD-L1 < 50 %	3 (7)	2 (7)	1(8)***
PDL1 ≥ 50 %	11 (27)	1 (4)	10 (84)
Séquence de traitement validée en RCP			
Immunothérapie 1ière ligne, n (%)	12 (29)		12 (100)
Immunothérapie seule, n (%)	7 (17)		7 (58)
Immunothérapie puis chimiothérapie à progression, n (%)	4 (10)		4 (34)
Traitement non reçu, n (%) *	1 (2)		1 (8)
Chimiothérapie 1ière ligne, n (%)	29 (71)	28 (100)	
Chimiothérapie seule, n (%)	14 (34)	14 (50)	
Chimiothérapie puis immunothérapie à progression, n (%)	11 (27)	10 (36)	
Traitement non reçu, n (%) *	4 (10)	4 (14)	
Traitement administré			
Chimiothérapie, n (%)	29 (71)	24 (86)	4 (33)
Sel de platine + pemetrexed, n (%)	24 (59)	20 (71)	4 (33)
Sel de platine + gemcitabine, n (%)	2 (5)	2 (7)	0 (0)
Sel de platine + vinorelbine, n (%)	2 (5)	2 (7)	0 (0)
Sel de platine + paclitaxel, n (%)	1 (2)	0 (0)	0 (0)
Bevacizumab, n (%)	9 (22)	7 (25)	2 (17)
Immunothérapie, n (%)	22 (54)	10 (42)	11 (92)
Nivolumab, n (%)	11 (27)	10 (42)	0 (0)
Pembrolizumab, n (%)	11 (27)	0 (0)	11 (92)

Tableau 2 : Résultats de l'analyse de PD-1 à la surface des lymphocytes et PD-L1 à la surface des MDSC chez les patients traités par immunothérapie et chimiothérapie de première ligne. Comparaison entre les patients « Répondeurs » et « Non répondeurs » à deux cycles de traitement.

IMMUNOTHERAPIE PREMIERE LIGNE (N=11)					
	Moyenne (écart-type)	Médiane [Q25-75]	min	max	n
CD4 PD1+ diagnostic (%)	33.3 (15.1)	26.9 [24.2; 41.4]	14.7	63.1	11
CD8 PD1+ diagnostic (%)	46.3 (13.4)	47.1 [35.0; 50.6]	30.0	70.4	11
Myeloïd PDL1+ diag (IMF)	7.25 (6.19)	3.63 [2.98; 11.7]	1.54	19.4	10
MMDSC PDL1+ diag (IMF)	5.63 (4.59)	3.16 [2.82; 9.30]	1.29	14.1	10
Imm Gran PDL1+ diag (IMF)	3.21 (1.04)	3.12 [2.31; 3.92]	1.94	4.88	10
Mature Gran PDL1+ diag (IMF)	4.43 (2.70)	3.65 [2.83; 5.97]	0.290	8.83	10
	Répondeurs (N = 6)	Non répondeurs (N = 5)	n	p	Test
CD4 PD1+ diagnostic, moyenne	34.1 (±17.1)	32.3 (±14.2)	11	0.93	Mann-Whitney
CD8 PD1+ diagnostic, moyenne	45.3 (±14.1)	47.5 (±13.9)	11	0.93	Mann-Whitney
Myeloïd PDL1+ diag moyenne (IMF)	9.89 (±6.92)	3.29 (±0.432)	10	0.35	Mann-Whitney
MMDSC PDL1+ diag moyenne (IMF)	7.37 (±5.37)	3.03 (±0.201)	10	0.48	Mann-Whitney
Imm Gran PDL1+ diag moyenne (IMF)	3.80 (±0.908)	2.33 (±0.341)	10	0.038	Mann-Whitney
Mature Gran PDL1+ diag moyenne (IMF)	5.20 (±3.35)	3.29 (±0.517)	10	0.35	Mann-Whitney
CHIMIOOTHERAPIE PREMIERE LIGNE (N=24)					
	Moyenne (écart-type)	Médiane [Q25-75]	min	max	n
CD4 PD1+ diagnostic (%)	28.3 (11.6)	26.0 [22.9; 29.4]	10.8	62.5	24
CD8 PD1+ diagnostic (%)	43.7 (14.9)	43.0 [33.1; 51.7]	15.3	70.5	24
Myeloïd PDL1+ diag (IMF)	12.9 (11.2)	9.02 [5.36; 17.3]	2.49	52.2	22
MMDSC PDL1+ diag (IMF)	8.99 (8.63)	6.02 [3.28; 10.8]	2.71	40.2	22
Imm Gran PDL1+ diag (IMF)	4.49 (4.51)	3.10 [2.27; 4.32]	1.26	22.7	22
Mature Gran PDL1+ diag (IMF)	8.34 (8.96)	5.21 [3.13; 10.3]	2.00	42.7	22
	Répondeurs (n = 13)	Non répondeurs (n = 11)	n	p	Test
CD4 PD1+ (%)diagnostic, moyenne (%)	31.1 (±13.7)	25.0 (±7.91)	24	0.3	Mann-Whitney
CD4 PD1+ C1, moyenne (%)	32.2 (±12.4)	22.8 (±8.40)	20	0.13	Mann-Whitney
CD4 PD1+ C2, moyenne (%)	41.9 (±12.2)	19.5 (±2.05)	11	0.012	Mann-Whitney
CD8 PD1+ diagnostic, moyenne (%)	37.9 (±14.5)	50.5 (±12.8)	24	0.026	Mann-Whitney
CD8 PD1+ C1, moyenne (%)	36.9 (±11.2)	45.1 (±13.7)	20	0.16	Mann-Whitney
CD8 PD1+ C2, moyenne (%)	41.7 (±12.6)	50.8 (±12.3)	11	0.38	Mann-Whitney
Myeloïd PDL1+ diag moyenne (IMF)	15.5 (±14.2)	10.3 (±6.93)	22	0.44	Mann-Whitney

Tableau 3 : Données de survie globale et survie sans progression en fonction de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T et PD-L1 à la surface des MDSC chez les patients traités par immunothérapie et chimiothérapie en première ligne.

IMMUNOTHERAPIE PREMIERE LIGNE (N=11)											
		Survie globale (mois)					Survie sans progression (mois)				
		n	Médiane (IC95)	Suivi max	n events	p	Médiane (IC95)	Suivi max	n événements	p	Test
CD4 PD-1+	< 26 %	5	13.3 (8.93; -)	18.66667	2	0.62	5.32 (1.77; -)	13.26667	4	0.73	Logrank
	≥ 26 %	6	9.50 (9.50; -)	16.60000	2	-	8.77 (0.767; -)	16.60000	3	-	-
CD8 PD-1+	< 43 %	4	9.50 (8.93; -)	18.66667	2	0.61	8.27 (2.37; -)	8.76667	3	0.8	Logrank
	≥ 43 %	7	-(13.3; -)	16.83333	2	-	1.77 (0.767; -)	16.60000	4		
Myeloïd PDL1+	< 8.34 IMF	6	- (-; -)*	16.83333	1	0.95	1.77 (0.767; -)	1.76667	3	0.041	Logrank
	≥ 8.34 IMF	4	13.3 (9.50; -)	18.66667	2	-	11.0 (8.27; -)	16.60000	3	-	-
MMDSC PDL1+	< 5.90 IMF	7	- (-; -)*	18.66667	1	0.47	1.77 (0.767; -)	8.26667	4	0.032	Logrank
	≥ 5.90 IMF	3	13.3 (9.50; -)	16.60000	2	-	13.3 (8.77; -)	16.60000	2	-	-
Imm Gran PDL1+	< 3.21 IMF	5	- (-; -)*	16.83333	1	0.95	1.77 (0.767; -)	1.76667	3	0.022	Logrank
	≥ 3.21 IMF	5	13.3 (9.50; -)	18.66667	2	-	11.0 (8.27; -)	16.60000	3	-	-
Mature Gran PDL1+	< 5.13 IMF	7	- (-; -)*	18.66667	1	0.47	1.77 (0.767; -)	8.26667	4	0.032	Logrank
	≥ 5.13 IMF	3	13.3 (9.50; -)	16.60000	2	-	13.3 (8.77; -)	16.60000	2	-	-
CHIMIOTHERAPIE PREMIERE LIGNE (N=24)											
		Survie globale (mois)					Survie sans progression (mois)				
		n	Médiane (IC95)	Suivi max	n événements	p	Médiane (IC95)	Suivi max	n événements	p	Test
CD4 PD-1+	< 26 %	12	8.33 (4.77; -)	15.16667	12	0.01	3.50 (2.33; -)	8.60000	12	<0.01	Logrank
	≥ 26 %	12	15.2 (7.77; -)	17.56667	7	-	11.4 (6.13; -)	17.56667	7	-	-
CD8 PD-1+	< 43 %	12	10.2 (7.77; -)	17.56667	9	0.37	5.72 (4.10; -)	17.56667	9	0.59	Logrank
	≥ 43 %	12	8.65 (5.27; -)	16.56667	10	-	5.02 (2.33; -)	16.56667	10	-	-
Myeloïd PDL1+	< 8.34 IMF	11	10.6 (4.33; -)	15.43333	10	0.71	3.70 (3.03; -)	15.43333	10	0.36	Logrank
	≥ 8.34 IMF	11	8.37 (6.50; -)	17.56667	8	-	6.33 (4.10; -)	17.56667	8	-	-
MMDSC PDL1+	< 5.90 IMF	9	5.27 (4.13; -)	15.26667	9	0.092	3.30 (2.30; -)	14.36667	9	0.028	Logrank
	≥ 5.90 IMF	13	9.20 (8.30; -)	17.56667	9	-	6.50 (4.10; -)	17.56667	9	-	-
Imm Gran PDL1+	< 3.21 IMF	12	10.9 (4.33; -)	17.56667	9	0.34	4.50 (3.03; -)	17.56667	9	0.73	Logrank
	≥ 3.21 IMF	10	8.33 (5.27; -)	16.56667	9	-	5.55 (2.67; -)	16.56667	9	-	-
Mature Gran PDL1+	< 5.13 IMF	10	9.20 (4.13; -)	15.43333	9	0.63	3.50 (2.33; -)	15.43333	9	0.25	Logrank
	≥ 5.13 IMF	12	8.65 (6.50; -)	17.56667	9	-	6.42 (4.10; -)	17.56667	9	-	-

Bibliographie

1. Sorensen SF, Demuth C, Weber B, Sorensen BS, Meldgaard P. Increase in soluble PD-1 is associated with prolonged survival in patients with advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer treated with erlotinib. *Lung Cancer*. 2016;100:77-84.
2. Cree IA, Booton R, Cane P, Gosney J, Ibrahim M, Kerr K, et al. PD-L1 testing for lung cancer in the UK: recognizing the challenges for implementation. *Histopathology*. août 2016;69(2):177-86.
3. Reck M. Pembrolizumab as first-line therapy for metastatic non-small-cell lung cancer. *Immunotherapy*. 2018;10(2):93-105.
4. Passiglia F, Bronte G, Bazan V, Natoli C, Rizzo S, Galvano A, et al. PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: a pooled analysis. *Oncotarget*. 12 avr 2016;7(15):19738-47.
5. Abdel-Rahman O. PD-L1 expression and outcome of advanced melanoma patients treated with anti-PD-1/PD-L1 agents: a meta-analysis. *Immunotherapy*. 2016;8(9):1081-9.
6. Remon J, Pardo N, Martinez-Martí A, Cedrés S, Navarro A, Martinez de Castro AM, et al. Immune-checkpoint inhibition in first-line treatment of advanced non-small cell lung cancer patients: Current status and future approaches. *Lung Cancer*. 2017;106:70-5.
7. Gandini S, Massi D, Mandalà M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. avr 2016;100:88-98.
8. Haragan A, Field JK, Davies MPA, Escriu C, Gruver A, Gosney JR. Heterogeneity of PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Implications for specimen sampling in predicting treatment response. *Lung Cancer*. août 2019;134:79-84.
9. Brody R, Zhang Y, Ballas M, Siddiqui MK, Gupta P, Barker C, et al. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer*. 2017;112:200-15.
10. Thunnissen E, de Langen AJ, Smit EF. PD-L1 IHC in NSCLC with a global and methodological perspective. *Lung Cancer*. 2017;113:102-5.
11. Shien K, Papadimitrakopoulou VA, Wistuba II. Predictive biomarkers of response to PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2016;99:79-87.
12. Kolahian S, Öz HH, Zhou B, Griessinger CM, Rieber N, Hartl D. The emerging role of myeloid-derived suppressor cells in lung diseases. *European Respiratory Journal*. 1 mars 2016;47(3):967-77.
13. Barrera L, Montes-Servín E, Hernandez-Martinez J-M, Orozco-Morales M, Montes-Servín E, Michel-Tello D, et al. Levels of peripheral blood polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells and selected cytokines are potentially prognostic of disease progression for patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. sept 2018;67(9):1393-406.
14. Vetsika E-K, Koinis F, Gioulbasani M, Aggouraki D, Koutoulaki A, Skalidaki E, et al. A circulating subpopulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells as an independent prognostic/predictive factor in untreated non-small lung cancer patients. *J Immunol Res*. 2014;2014:659294.
15. Zheng H, Liu X, Zhang J, Rice SJ, Wagman M, Kong Y, et al. Expression of PD-1 on CD4+ T cells in peripheral blood associates with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 12 mai 2016;7(35):56233-40.
16. Mazzaschi G, Facchinetti F, Missale G, Canetti D, Madeddu D, Zecca A, et al. The circulating pool of functionally competent NK and CD8+ cells predicts the outcome of anti-PD1 treatment in advanced NSCLC. *Lung Cancer*. 2019;127:153-63.
17. Feng P-H, Lee K-Y, Chang Y-L, Chan Y-F, Kuo L-W, Lin T-Y, et al. CD14(+)S100A9(+) monocytic myeloid-derived suppressor cells and their clinical relevance in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 nov 2012;186(10):1025-36.
18. Passaro A, Mancuso P, Gandini S, Spitaleri G, Labanca V, Guerini-Rocco E, et al. Gr-MDSC-linked asset as a potential immune biomarker in pretreated NSCLC receiving nivolumab as second-line therapy. *Clin Transl Oncol*. 28 juin 2019;
19. Zhuo M, Chen H, Zhang T, Yang X, Zhong J, Wang Y, et al. The potential predictive value of circulating immune cell ratio and tumor marker in atezolizumab treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Cancer Biomark*. 2018;22(3):467-76.
20. Wang S, Fu Y, Ma K, Liu C, Jiao X, Du W, et al. The significant increase and dynamic changes of the myeloid-derived suppressor cells percentage with chemotherapy in advanced NSCLC patients. *Clin Transl Oncol*. juill 2014;16(7):616-22.
21. Koinis F, Vetsika EK, Aggouraki D, Skalidaki E, Koutoulaki A, Gkioulmpasani M, et al. Effect of First-Line Treatment on Myeloid-Derived Suppressor Cells' Subpopulations in the Peripheral Blood of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 1 août 2016;11(8):1263-72.

Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Mesure de l'expression de PD-1 et PD-L1 à la surface des cellules immunitaires circulantes par cytométrie de flux chez les patients atteints de CBNPC métastatiques

Introduction : Depuis l'avènement de l'immunothérapie, l'axe PD-1/PD-L1 demeure une voie d'application majeure dans le traitement des Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules (CBNPC). Le lien suggéré dans certaines études entre l'expression PD-L1 à la surface des cellules tumorales et la prédiction de l'efficacité de l'immunothérapie a permis l'application d'un anti-PD-1 en première ligne. L'exploration de PD-1 et PD-L1 au sein de la tumeur ou de son micro-environnement est complexe et la sélection des patients potentiellement répondeurs à l'immunothérapie, supposée par la mesure immuno-histochimique de l'expression de PD-L1, est désormais remise en question par l'existence d'un bénéfice clinique significatif chez des patients dont la tumeur n'exprime pas la protéine, et inversement. Des études récentes soulignent l'intérêt prédictif et pronostique des cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et de la mesure de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T circulants chez les patients traités par chimiothérapie ou immunothérapie. Les résultats de peu d'études, obtenus par cytométrie de flux à partir de prélèvements sanguins, restent aujourd'hui contradictoires et l'impact des thérapies incertaine.

Matériel et méthodes : Nous avons mesuré, par cytométrie de flux, l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 et PD-L1 à la surface des MDSC circulantes chez 41 patients porteurs d'un CBNPC métastatique traités par chimiothérapie ou immunothérapie de première voire deuxième ligne.

Résultats : Une expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 circulants inférieure à 43% est prédictive de la réponse à la chimiothérapie de première ligne. Une forte expression de PD-L1 à la surface de l'ensemble des sous-populations de MDSC est associée à un meilleur pronostic et une expression de PD-L1 supérieure ou égale à 3.21 (IMF) à la surface des Granulocytes immatures est reliée à la réponse à l'immunothérapie de première ligne.

Conclusion : A travers cette étude préliminaire prospective, nous avons démontré l'intérêt prédictif et pronostique de la mesure de l'expression de PD-1 et PD-L1 à la surface des lymphocytes et MDSC circulants chez les patients atteints d'un CBNPC métastatiques.

Mots-clés: CBNPC, PD-1, PD-L1, lymphocyte T, MDSC, cytométrie de flux, chimiothérapie, immunothérapie.

Measurement of PD-1 and PD-L1 expressions on the surface of circulating immune cells by flow cytometry analysis in patients with metastatic NSCLC

Introduction: Since the advent of immunotherapy, the PD-1 / PD-L1 axis remains a rational application in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). The suggested link in some studies between PD-L1 expression on the tumor cell surface and the prediction of the efficacy of immunotherapy has allowed the application of anti-PD-1 in first line. The exploration of PD-1 and PD-L1 within the tumor or its microenvironment is complex and the selection of patients potentially responsive to immunotherapy, presumed by the immunohistochemical measurement of PD-L1, is now questioned by the existence of a significant clinical benefit in patients whose tumor does not express the protein. Recent studies highlight the predictive and prognostic value of suppressive myeloid cells (MDSC) and the measurement of PD-1 expression on the surface of circulating T cells in patients treated with chemotherapy or immunotherapy. The results of few studies, obtained by flow cytometry analysis from blood samples, remain contradictory today and the impact of therapies is uncertain.

Materials and methods: We measured, by flow cytometry, the expression of PD-1 on the surface of CD4 and CD8 and PD-L1 T cells on the surface of circulating MDSCs in 41 patients with metastatic NSCLC treated with chemotherapy or immunotherapy first or second line.

Results: PD-1 expression on the surface of circulating CD8 T cells less than 43% predicts the response to first-line chemotherapy. Strong expression of PD-L1 on the surface of all MDSC subpopulations is associated with a better prognosis and PD-L1 expression greater than or equal to 3.21 (IMF) on the surface of the population Immature Granulocytes is related to the response to first-line immunotherapy.

Conclusion: Through this preliminary prospective study, we demonstrated the predictive and prognostic value of measuring the expression of PD-1 and PD-L1 on the surface of circulating lymphocytes and MDSCs in patients with metastatic NSCLC.

Keywords: NSCLC, PD-1, PD-L1, T-cells, MDSC, flow cytometry analysis, chemotherapy, immunotherapy.

