



HAL
open science

Identification de biomarqueurs prédictifs de l'efficacité du nivolumab dans le traitement de patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules de stade avancé.

Corentin Richard

► To cite this version:

Corentin Richard. Identification de biomarqueurs prédictifs de l'efficacité du nivolumab dans le traitement de patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules de stade avancé.. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT : 2019UBFCI008 . tel-02399417

HAL Id: tel-02399417

<https://theses.hal.science/tel-02399417>

Submitted on 9 Dec 2019

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR

Délivré par : *l'Université de Bourgogne Franche-Comté*

Présentée et soutenue publiquement le 04/10/2019 par :

CORENTIN RICHARD

**IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS PRÉDICTIFS DE L'EFFICACITÉ DU
NIVOLUMAB DANS LE TRAITEMENT DE PATIENTS ATTEINTS DE CANCER
BRONCHIQUE NON À PETITES CELLULES DE STADE AVANCÉ**

JURY

| | | |
|--------------------------|-------------------------|-----------------------|
| DR ERIC LETOUZÉ | INSERM U1162 | Rapporteur |
| PR CHRISTOPHE MASSARD | Institut Gustave Roussy | Rapporteur |
| DR CARLO LUCCHESI | Institut Bergonié | Membre du Jury |
| PR PHILIPPE BONNIAUD | CHU Dijon-Bourgogne | Membre du Jury |
| DR CAROLINE TRUNTZER | Centre G-F Leclerc | Co-encadrant de thèse |
| PR FRANÇOIS GHIRINGHELLI | Centre G-F Leclerc | Directeur de thèse |

École doctorale :

Environnement - Santé (ED n°554)

Spécialité :

Médecine, oncologie, génétique, hématologie, immunologie

Discipline :

Mathématiques et leurs interactions

Unité de Recherche :

Lipides, Nutrition, Cancer (UMR 866)

REMERCIEMENTS

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur Christophe Massard, Professeur des universités et Directeur Département d'Innovation Thérapeutiques et des Essais Précoces à l'Institut Gustave Roussy, ainsi qu'à Monsieur Éric Letouzé, Chargé de Recherche à l'Inserm UMRS 1138, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

J'exprime ma gratitude à Monsieur Philippe Bonniaud, Professeur à l'Université de Bourgogne Franche-Comté et à Monsieur Carlo Lucchesi, Directeur d'équipe bioinformatique à l'Institut Bergonié, qui ont bien voulu être examinateurs.

Je tiens à remercier Monsieur François Ghiringhelli, Professeur à l'Université de Bourgogne Franche-Comté, qui m'a encadré tout au long de cette thèse et qui m'a initié à la Recherche clinique en oncologie. Qu'il soit aussi remercié pour les nombreux travaux collaboratifs auxquels j'ai été associé.

Je remercie Madame Caroline Truntzer, directeur de l'équipe bioinformatique du Centre Georges-François Leclerc, d'avoir accepté de m'encadrer depuis mon stage de Master lorsque j'étais de ses élèves, mais aussi pour m'avoir prodigué de nombreux conseils et connaissances dans ce troisième cycle universitaire dont cette thèse est l'accomplissement.

Je tiens aussi à remercier Monsieur Alain Viari, Directeur de Recherche à l'UMR CNRS 5558, et Monsieur Pierre Saintigny, Directeur du Laboratoire de recherche translationnelle du Centre Léon Bérard, d'avoir fait partie de mon comité scientifique de suivi de thèse et de m'avoir ainsi conseillé et orienté dans mes raisonnements.

Je désire aussi adresser mes sincères remerciements à la Ligue Nationale contre le Cancer pour m'avoir accordé leur confiance et le financement nécessaire pour mener à bien ces 3 années de travail.

J'adresse aussi un grand merci à Christel, Romain, Sandy, Fred et Laurent, pour m'avoir fait bénéficier de leurs connaissances dans chacun de leur domaine, mais aussi et surtout, pour m'avoir apporté un soutien moral indéfectible tout au long de ma démarche.

Un grand merci aussi à tous les membres de PTBC, du CGFL et l'équipe INSERM UMR 1231 et en particulier à Courèche, Julie, Cynthia, Fanny, Lisa, Aurélien, Amandine, Valou, Quentin, Samia, Romain, Antoine. Vous avez tous contribué à rendre ces 3 années de Recherche riches en bons moments et en amitié.

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille pour leur soutien et leur amour. En particulier Caro, Titine, Nico et Johan, qui ont écouté avec calme et patience mes problèmes quotidiens dont je les accablais. Merci infiniment pour votre soutien et votre amour.

RÉSUMÉ

L'arrivée récente de l'immunothérapie a bouleversé la prise en charge des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC). Le nivolumab, anticorps inhibiteur du point de contrôle immunitaire PD-1, a montré des résultats remarquables en deuxième ligne métastatique après échec des chimiothérapies standards de première intention. Cependant, seul un quart des patients tire un bénéfice durable de la prise de ce traitement. À ce jour, aucun biomarqueur prédictif de l'efficacité thérapeutique du nivolumab n'a pu être identifié de manière claire et consensuelle. La recherche de biomarqueurs prédictifs de bénéfice ou de résistance à ce traitement représente donc un enjeu majeur.

L'apparition du séquençage à haut débit au cours de la dernière décennie a eu un impact considérable sur la recherche clinique et fondamentale, permettant d'appréhender la génétique d'une tumeur dans son ensemble. Ces nouvelles techniques s'ajoutent à d'autres déjà éprouvées telles que l'immunophénotypage ou l'immunohistochimie à disposition des chercheurs pour une analyse extensive des caractéristiques de la tumeur et du patient.

L'objectif de ce travail a été d'identifier des marqueurs prédictifs d'efficacité du nivolumab dans le traitement des CBNPC avancés au moyen de ces différentes technologies. Pour cela, notre étude s'est alors intéressée à une cohorte multicentrique de 115 patients atteints de CBNPC et traités par nivolumab en deuxième ou troisième ligne métastatique après échec d'un doublet cytotoxique. Dans les limites de disponibilité et de qualité des échantillons, les profils génétique, transcriptomique et immunohistochimique de la tumeur ainsi que les profils clinique et immunologique des patients ont été analysés.

Nos résultats mettent en évidence des marqueurs prédictifs majeurs de réponse au nivolumab. Ainsi, une bonne réponse au doublet cytotoxique de première intention favorise une efficacité optimale du nivolumab en ligne ultérieure. Par ailleurs, un contrôle régulier de l'évolution des cellules myéloïdes immunosuppressives et des cellules cytotoxiques exprimant TIM-3 d'un patient permet de détecter une résistance primaire ou secondaire au traitement. D'autre part, l'estimation conjointe des expressions des protéines PD-L1 et CD8 par séquençage d'ARN constitue un marqueur prédictif majeur de réponse. Sa capacité prédictive surpasse celle de l'estimation de PD-L1 seule et celle d'autres signatures transcriptomiques précédemment établies et composées d'un nombre plus important de gènes. Enfin, l'étude des séquençages d'exome des tumeurs montre l'importance d'une analyse étendue de la génétique tumorale et la nécessité de ne pas se limiter à l'estimation de sa charge mutationnelle.

Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence des marqueurs prédictifs d'efficacité du nivolumab dans le traitement des CBNPC avancés. Nos résultats soulignent l'importance de l'utilisation de plusieurs technologies pour la caractérisation de la biologie tumorale et de l'immunité du patient dans une démarche de découverte de biomarqueurs et de construction de modèles prédictifs d'efficacité des immunothérapies.

Mots-clés : immunothérapie ; cancers bronchiques ; biomarqueurs ; séquençage nouvelle génération ; modèles prédictifs.

ABSTRACT

The recent introduction of immunotherapy has disrupted the management of non-small cell lung cancer (NSCLC). Nivolumab, an antibody targeting the immune checkpoint inhibitor PD-1, has shown remarkable results in second-line setting after failure of standard first-line chemotherapy. However, only a quarter of patients benefit from this therapy. To date, no predictive biomarker of the therapeutic efficacy of nivolumab has been identified in a clear and consensual manner. The research for predictive biomarkers of efficacy or resistance to this treatment is, therefore, a major challenge.

The emergence of high-throughput sequencing over the past decade has had a significant impact on clinical and fundamental research, making possible to understand the genetics of a tumor as a whole. In addition to other already proven techniques such as immunophenotyping or immunohistochemistry, these new techniques enable researchers to perform an extensive analysis of tumor and patient characteristics.

The objective of this work was to identify predictors of the efficacy of nivolumab in the treatment of advanced NSCLC using these different technologies. To do this, our study focused on a multicentre cohort of 115 NSCLC patients treated with nivolumab in the second- or third-line after failure of a cytotoxic doublet. Within the limits of sample availability and quality, the genetic, transcriptomic and immunohistochemical profiles of the tumor as well as the clinical and immunological profiles of the patients were analyzed.

Our results highlight major predictive markers of response to nivolumab. Thus, a good response to the first-line cytotoxic doublet promotes optimal efficacy of subsequent online nivolumab. In addition, regular monitoring of the evolution of a patient's immunosuppressive myeloid cells and cytotoxic cells expressing TIM-3 can detect primary or secondary resistance to treatment. On the other hand, the joint estimation of PD-L1 and CD8 protein expressions by RNA sequencing is a major predictive marker of response. Its predictive capacity surpasses that of the PD-L1 estimate alone and that of other previously established transcriptomic signatures composed of a larger number of genes. Finally, the study of tumor exome sequencing shows the importance of extensive analysis of tumor genetics and the need to not only focus on the estimation its mutational burden.

In this work, we were able to identify predictive markers of the efficacy of nivolumab in the treatment of advanced NSCLC. Our results highlight the importance of using several technologies for the characterization of tumor biology and patient immunity in a process of biomarker discovery and the construction of predictive models of the efficacy of immunotherapies.

Keywords : immunotherapy ; lung cancers ; biomarkers ; next-generation sequencing ; predictive models.

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| REMERCIEMENTS | 3 |
| RÉSUMÉ | 4 |
| ABSTRACT | 5 |
| SOMMAIRE | 6 |
| LISTE DES TABLEAUX | 8 |
| LISTE DES FIGURES | 9 |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 11 |
| | |
| INTRODUCTION | 12 |
| I. Les cancers broncho-pulmonaires | 13 |
| 1. Les principaux facteurs de risque | 13 |
| a. Le tabagisme actif et passif | 13 |
| b. Les expositions professionnelles | 13 |
| c. Les expositions environnementales | 14 |
| 2. Les différents types histologiques | 14 |
| a. Les cancers bronchiques non à petites cellules | 14 |
| b. Les cancers bronchiques à petites cellules | 16 |
| 3. Tendances et situation actuelle : incidence, mortalité et survie | 16 |
| a. Selon l'âge et le sexe du patient | 16 |
| b. Selon le type histologique et le stade tumoral | 18 |
| c. Selon la période de diagnostic | 20 |
| 4. Traitements des cancers bronchiques non à petites cellules | 20 |
| a. Prise en charge des stades localement avancés | 20 |
| b. Prise en charge des stades métastatiques | 21 |
| II. L'immunothérapie : une nouvelle ère dans le traitement des cancers. | 23 |
| 1. Immunoédition : de l'immunosurveillance à l'échappement tumoral | 23 |
| a. La suppression tumorale intrinsèque | 24 |
| b. L'élimination | 25 |
| c. L'équilibre | 28 |
| d. L'échappement | 28 |
| 2. Immunothérapie des cancers broncho-pulmonaires | 30 |
| a. Les points de contrôle de l'immunité | 30 |
| b. Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire | 31 |

| | | |
|---|--|------------|
| c. | Efficacité des inhibiteurs de PD-1 en monothérapie | 32 |
| d. | L'expression de PD-L1 comme biomarqueur prédictif de réponse | 36 |
| III. | Les apports des récentes avancées technologiques dans la recherche de biomarqueurs de réponse à l'immunothérapie | 39 |
| 1. | Le séquençage de nouvelle génération | 39 |
| a. | Principe du séquençage par synthèse | 40 |
| b. | Les applications du séquençage nouvelle génération | 44 |
| 2. | Perspectives dans la recherche de biomarqueurs de réponse aux anti-PD-1 | 46 |
| a. | Charge mutationnelle tumorale et antigènes associés aux tumeurs | 46 |
| b. | Altérations des voies de réparation à l'ADN | 47 |
| c. | Signatures mutationnelles | 48 |
| d. | Clonalité du récepteur des cellules T | 50 |
| e. | Expression des protéines CD8 et PD-L1 | 50 |
| f. | Cellules immunitaires circulantes | 50 |
| IV. | Objectifs du travail de thèse | 52 |
| RÉSULTATS | | 54 |
| | <u>ARTICLE 1</u> : « Response to first line chemotherapy regimen is associated with efficacy of nivolumab in non-small-cell lung cancer. » | 55 |
| | <u>ARTICLE 2</u> : « Tim-3/galectin-9 pathway and mMDSC control primary and secondary resistances to PD-1 blockade in lung cancer patients. » | 67 |
| | <u>ARTICLE 3</u> : « Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy. » | 92 |
| | <u>ARTICLE 4</u> : « Exome analysis reveals genomic markers associated with better efficacy of nivolumab in lung cancer patients. » | 119 |
| DISCUSSION | | 142 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | | 148 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | | 151 |
| PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS | | 163 |

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|------------------|---|----|
| Tableau 1 | Évolution de l'incidence et de la mortalité des CBP selon le sexe en France entre 1980 et 2012. | 16 |
| Tableau 2 | Nombre de nouveaux cas et de décès liés aux cancers du poumon selon l'âge et le sexe en France métropolitaine au cours de l'année 2017. | 17 |
| Tableau 3 | Taux de survie globale à 1 et 5 ans selon le sexe et l'âge pour la période de diagnostic 2005-2010. | 18 |
| Tableau 4 | Taux de survie globale à 1 et 5 ans selon l'histologie tumorale. | 19 |
| Tableau 5 | Taux de survie globale observés à 1 et 5 ans selon la période de diagnostic. | 20 |
| Tableau 6 | Taux de réponse, de survie sans progression et de survie globale en fonction de l'expression de PD-L1 mesurée avant traitement chez des patients atteints de CBNPC traités par nivolumab en monothérapie. | 37 |
| Tableau 7 | Comparaison de différentes approches possibles par séquençage nouvelle génération. | 45 |
| Tableau 8 | Liste des principaux algorithmes de détection de mutations somatiques pour le séquençage de génome et d'exome. | 47 |

LISTE DES FIGURES

| | | |
|------------------|--|----|
| Figure 1 | Analyse histologique de différents types de tumeur du poumon par colorations HES et par marquages IHC. | 15 |
| Figure 2 | Taux d'incidence et de mortalité selon l'âge et le sexe en France pour l'année 2012. | 17 |
| Figure 3 | Évolution des taux d'incidence standardisés selon l'histologie tumorale et le sexe dans l'Isère pour la période 1980-2010. | 18 |
| Figure 4 | Courbes de survie des patients selon le stade de la maladie et l'histologie tumorale sur la base de 10 départements français en 2004. | 19 |
| Figure 5 | Immunoédition du cancer : le rôle du système immunitaire dans la suppression et la promotion du cancer. | 23 |
| Figure 6 | Les mécanismes de réponse cellulaire aux dommages à l'ADN : les voies de réparation de l'ADN, la sénescence et l'apoptose. | 24 |
| Figure 7 | Cycle de l'immunité cellulaire antitumorale. | 26 |
| Figure 8 | Traitement et présentation de l'antigène par les cellules dendritiques. | 27 |
| Figure 9 | La perte du CMH de classe I, d'expression antigénique et de réponse à l'IFN γ comme mécanismes de l'immunosélection. | 29 |
| Figure 10 | Le rôle des voies biologiques de CTLA-4 et PD-1 dans l'inhibition de la réponse des cellules T. | 31 |
| Figure 11 | Illustration du mécanisme de blocage de l'interaction PD-1/PD-L1 à l'aide d'immunothérapie α PD-1. | 32 |
| Figure 12 | Courbes de la survie globale pour tous les patients et selon la posologie de nivolumab reçue. | 33 |
| Figure 13 | Courbes de la survie globale pour des patients atteints d'un carcinome épidermoïde ou d'un adénocarcinome bronchique ayant reçu soit du nivolumab soit du docétaxel. | 34 |
| Figure 14 | Courbes de la survie globale et de la survie sans progression pour selon l'expression tumorale de PD-L1 et le traitement reçu. | 35 |
| Figure 15 | Association entre l'expression tumorale de PD-L1 et la réponse clinique au nivolumab. | 36 |
| Figure 16 | Courbes de la survie sans progression et de la survie globale de 356 CBNPC traités par pembrolizumab et classés selon l'expression IHC de PD-L1. | 37 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figure 17 | Taux de survie globale à 2 ans selon le niveau d'expression de PD-L1 chez des CBNPC traités par nivolumab ou par docétaxel. | 38 |
| Figure 18 | Évolution du coût moyen du séquençage d'un millions de nucléotides depuis 2001. | 39 |
| Figure 19 | Fragment d'intérêt après préparation de librairie pour un séquençage Illumina. | 41 |
| Figure 20 | Formation de <i>clusters</i> par amplification bridge. | 42 |
| Figure 21 | Principe du séquençage par synthèse. | 43 |
| Figure 22 | Traitement des données brutes post-séquençage. | 44 |
| Figure 23 | Concept de signature mutationnelle. | 49 |
| Figure 24 | Procédure de phénotypage de cellules par cytométrie en flux. | 51 |
| Figure 25 | Protocole de suivi et de collection biologique pour les analyses génétiques, histologiques et immunitaires des patients atteints de CBNPC et traités par nivolumab. | 53 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|-------------------------------|---|
| ADNc | ADN complémentaire |
| ALK | Anaplastic Lymphoma Kinase |
| AMM | Autorisation de mise sur le marché |
| ASCO | American Society of Clinical Oncology - Société américaine d'oncologie clinique |
| APC | Cellule présentatrice d'antigène |
| BRAF | B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase |
| CBP | Cancer broncho-pulmonaire |
| CBNPC | Cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules |
| CBPC | Cancer broncho-pulmonaire à petites cellules |
| CD | <i>Cluster</i> de différenciation |
| CIRC | Centre international de recherche sur le cancer |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| CTL | Cytotoxic T lymphocyte - lymphocyte T cytotoxique |
| DC | Dendritic cell - cellule dendritique |
| EGFR | Epidermal Growth Factor |
| IFNγ | Interféron gamma |
| HES | Hématéine-Eosine-Safran |
| IHC | Immunohistochimie |
| IL | Interleukine |
| Indel | Insertion-délétion |
| InVS | Institut de Veille Sanitaire |
| KRAS | V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog |
| MET | MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase |
| MDSC | Cellules myéloïdes suppressives |
| NGS | Next-generation sequencing - séquençage nouvelle génération |
| PCI | Point de contrôle de l'immunité |
| PD-1 | Programmed cell death 1 |
| PD-L1 | Programmed death-ligand 1 |
| ROS1 | ROS Proto-Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase |
| SBS | Séquençage par synthèse |
| SG | Survie globale |
| SSP | Survie sans progression |
| TAA | Tumor-associated antigens - antigène associé à la tumeur |
| TCR | T-cell receptor - récepteur des cellules T |
| TGF-β | Facteur de croissance transformant β |
| Th | Lymphocyte T-helper |
| T-reg | Lymphocyte T régulateur |
| VEGF | Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire |

INTRODUCTION

I. Les cancers broncho-pulmonaires

Le cancer broncho-pulmonaire (CBP) est l'un des cancers les plus répandus à travers le monde. Il est responsable à lui seul du décès de plus de 1,8 millions de personnes chaque année dont environ 30 000 en France. Il est ainsi la première cause de décès par cancer et se hisse à la 6ème place toutes causes confondues. La majorité des cas peut être imputée au tabac ou à des expositions professionnelles et environnementales. Malgré de récentes avancées dans leur prise en charge avec l'arrivée des thérapies ciblées et de l'immunothérapie, le diagnostic souvent tardif de la maladie ne laisse qu'un pronostic sombre pour les malades.

1. Les principaux facteurs de risque

a. Le tabagisme actif et passif

Le tabagisme est la cause principale de CBP (GANDINI *et al.* 2008 ; MALHOTRA *et al.* 2016). En effet, d'après le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), 8 cancers du poumon sur 10 chez les hommes et 7 sur 10 chez les femmes seraient dûs à la consommation de tabac. Depuis les années 50, de nombreuses études ont démontré qu'un fumeur avait un risque accru de contraction d'un CBP comparé à un non-fumeur, pouvant aller d'un facteur 10 à 50 (DOLL *et al.* 1956). Ce risque est d'autant plus élevé que l'exposition est longue et régulière (DOLL *et al.* 2004).

La causalité entre une exposition passive à la fumée de cigarette et le risque de CBP chez les personnes non-fumeuses a été mise en évidence dès les années 90 (TREDANIEL *et al.* 1994 ; HACKSHAW *et al.* 1997). Plus récemment, une méta-analyse réalisée par le CIRC vient appuyer cette constatation. En effet, elle montre que cette association est statistiquement significative et consistante sur plus d'une cinquantaine d'études (IARC 2004). Ce risque est augmenté de 20% chez les femmes et de 30% chez les hommes par rapport à des personnes non-exposées. De manière similaire au tabagisme actif, le risque de contracter un CBP lié au tabagisme passif est d'autant plus grand que la durée d'exposition et la quantité de cigarettes fumées par l'entourage sont importantes (HACKSHAW *et al.* 1997).

b. Les expositions professionnelles

D'autres facteurs de risque majeurs sont liés aux expositions à des agents cancérigènes au cours de la carrière professionnelle d'un individu. Les relations dose-effet entre le risque de CBP et l'exposition à l'amiante (DELVA *et al.* 2016 ; GILHAM *et al.* 2016), aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (BOSETTI *et al.* 2007 ; ROTA *et al.* 2014), aux métaux lourds tels que le nickel ou le chrome (HAYES 1997 ; SEIDLER *et al.* 2013) ainsi qu'au radon ou aux radiations ionisantes (LUBIN 1994 ; LEURAUD *et al.* 2011) ont été établies dans de nombreuses études. Pour chacune de ces expositions, un effet conjoint avec le tabac, additif voire multiplicatif, a été mis en évidence (LUBIN 1994 ; WRAITH *et al.* 2008 ; DELVA *et al.* 2016). En France, la proportion de cas de CBP attribuables à ce type d'exposition est d'environ 13% (BOFFETTA *et al.* 2010).

c. Les expositions environnementales

Plusieurs expositions environnementales peuvent aussi être mises en cause dans la contraction d'un CBP. Parmi celles-ci, les expositions aux gaz d'échappement de moteur diesel et à la pollution atmosphérique industrielle ont été les plus étudiées (OLSSON *et al.* 2011 ; TSOI *et al.* 2012 ; RAASCHOU-NIELSEN *et al.* 2013). Le CIRC considère ainsi la pollution extérieure et les particules fines comme carcinogènes chez l'Homme, en particulier pour le poumon (LOOMIS *et al.* 2014). Le programme européen Clean Air For Europe a estimé à un peu moins d'un millier le nombre de décès par CBP par an en France liés à la pollution atmosphérique.

2. Les différents types histologiques

Les CBP sont dans une très grande majorité des carcinomes, c'est-à-dire développés à partir des cellules épithéliales. Il en existe 2 grandes classes du fait des différences dans leur évolution et leur prise en charge thérapeutique, mais aussi en fonction de la morphologie des cellules affectées : **les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC)** et **les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC)**.

a. Les cancers bronchiques non à petites cellules

Les CBNPC représentent 80 à 85% des CBP. La prise en charge thérapeutique de ce type de CBP était homogène jusqu'à l'arrivée récente des thérapies ciblées nécessitant pour leur attribution un sous-typage histologique¹ des carcinomes ainsi que l'analyse de leur profil mutationnel². Les formes les plus fréquentes de CBNPC sont :

- **L'adénocarcinome.** C'est la forme la plus courante depuis une vingtaine d'années avec environ 40% des cas. Bien qu'il soit associé à une consommation de tabac, il est aussi la forme qui affecte le plus fréquemment les non-fumeurs. Il se développe majoritairement dans les régions périphériques et est reconnaissable morphologiquement par la présence de glandes et/ou d'une mucosécrétion. Il peut aussi être confirmé par un marquage immuno-histochimique³ (IHC) par un anticorps α TTF-1 (anti-TTF-1) (Figures 1A-B).
- **Le carcinome épidermoïde.** Représentant environ 35% des cas, il s'agit de la deuxième forme histologique la plus fréquente de CBNPC. Le carcinome épidermoïde se développe généralement dans une région proximale péri- ou endo-bronchique et est reconnaissable par la présence de ponts d'union ou de kératine (Figures 1C-D). Il est aussi détectable par marquage IHC à l'aide d'un anticorps α P40.
- **Le carcinome à grandes cellules.** Ce type de carcinome représente environ 15% des cas de CBNPC. Ces tumeurs sont très invasives, notamment pour les structures adjacentes. C'est aussi la forme de CBNPC de plus mauvais pronostic. Cette classe de carcinomes comprend les carcinomes indifférenciés à grandes cellules et les carcinomes neuroendocrines. Les carcinomes indifférenciés à grandes cellules sont caractérisés par l'absence de mucosécrétion

1. Se rapporte à la structure des tissus vivants.

2. Ensemble des altérations du matériel génétique (ADN ou ARN) d'une cellule.

3. Méthode de détection de protéines ou d'antigènes dans des sections de tissu.

et de différenciation épidermoïde. Les carcinomes neuroendocrines, quant à eux, présentent une prolifération de cellules de grandes tailles associée à l'expression de marqueurs nerveux et à une production d'hormones. Un marquage IHC est obligatoire pour le diagnostic pour prouver la différenciation neuroendocrine. Les marqueurs IHC utilisés pour repérer ces cellules sont les anticorps α Synaptophysine, α Chromatogranine A et α CD56 (Figure 1E).

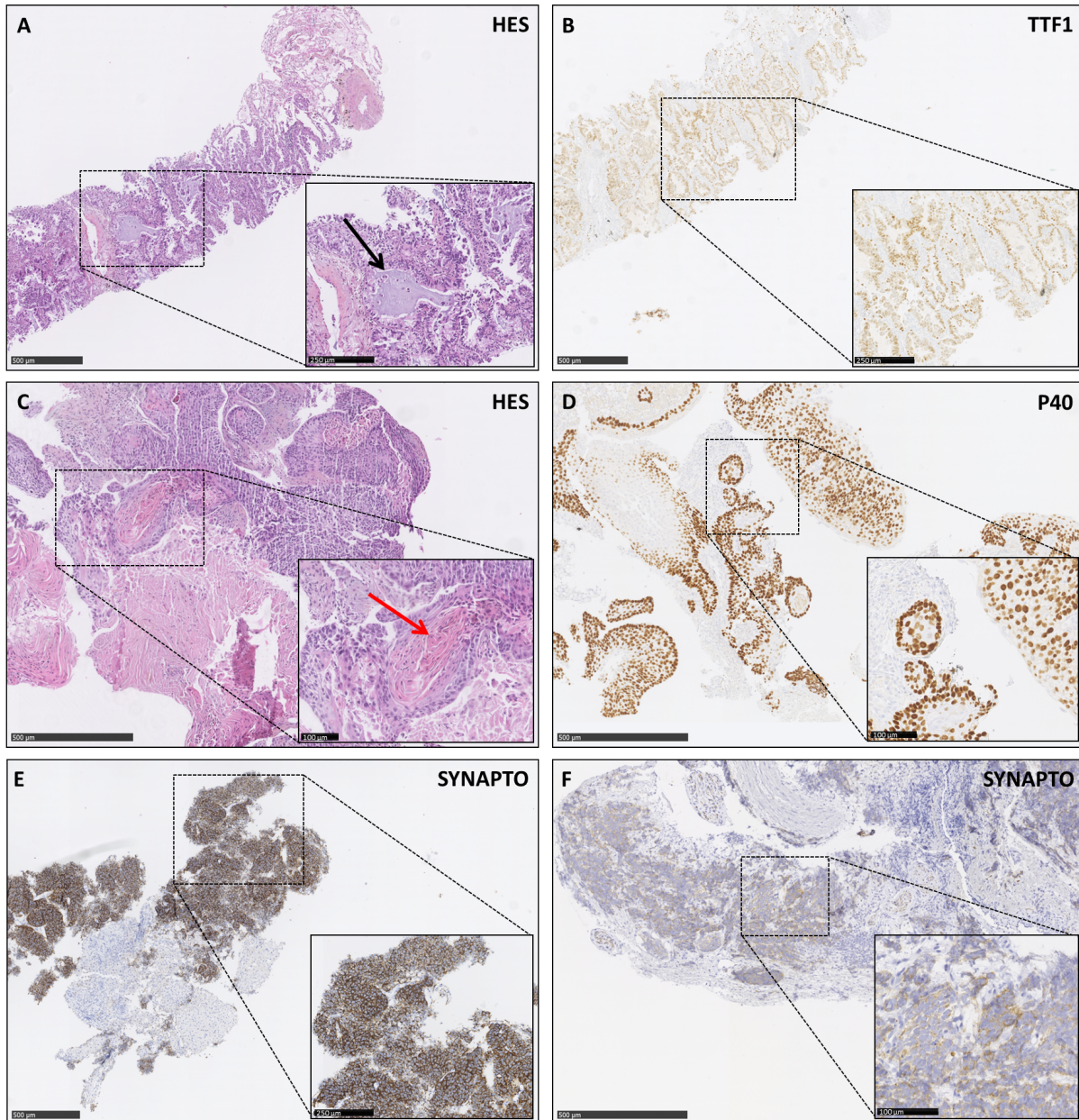


FIGURE 1. Analyse histologique de différents types de tumeur du poumon par colorations Hématéine-Eosine-Safran et par marquages immunohistochimiques. **Adénocarcinome** : coloration Hématéine-Eosine-Safran (HES) mettant en évidence la production de mucus (flèche noire)(A) et marquage IHC α TTF-1 mettant en évidence les cellules de type adénocarcinome (B). **Carcinome épidermoïde** : coloration HES mettant en évidence des cellules dyskératosiques (flèche rouge)(C) et marquage IHC α P40 mettant en évidence les cellules de type carcinome épidermoïde (D). **Carcinome neuroendocrine à grandes et petites cellules** : marquage IHC α Synaptophysine mettant en évidence les cellules de type neuroendocrine à grandes cellules (E) et à petites cellules (F).

b. Les cancers bronchiques à petites cellules

Cette forme représente 15 à 20% des CBP. C'est aussi l'histologie présentant le pronostic le plus péjoratif de par son fort potentiel métastatique. Sa localisation est le plus souvent médiastino-hilaire. Ce carcinome présente une architecture neuroendocrine peu différenciée et est composé de petites cellules en fréquentes mitoses et à noyau volumineux (Figure 1F). Ces cellules sont détectables par un marquage IHC similaire à celui effectué pour les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules.

3. Tendances et situation actuelle : incidence, mortalité et survie

a. Selon l'âge et le sexe du patient

Le nombre de nouveaux cas et de décès par CBP a augmenté en France entre 1980 et 2017 chez les deux sexes (Tableau 1). Cette augmentation est particulièrement forte chez les femmes avec un rapport de +1 004 % pour l'incidence et +404 % pour la mortalité en près de 40 ans. Une étude de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) estime que cette augmentation du nombre de CBP chez les femmes est la conséquence directe de la forte hausse de leur consommation de tabac intervenue dans les années 60-70 (BINDER-FOUCARD *et al.* 2013).

Tableau 1. Évolution de l'incidence et de la mortalité des cancers broncho-pulmonaires selon le sexe en France entre 1980 et 2012 (JÉHANNIN-LIGIER *et al.* 2017).

| | Incidence | | | | Mortalité | | | |
|--|-----------|--------|----------|--------|-----------|--------|---------|--------|
| | Homme | | Femme | | Homme | | Femme | |
| | 1980 | 2012 | 1980 | 2012 | 1980 | 2012 | 1980 | 2012 |
| Nombre de cas | 16 877 | 32 260 | 1 526 | 16 849 | 15 160 | 20 815 | 2 020 | 10 176 |
| % de variation entre 1980 et 2017 | + 91 % | | +1 004 % | | + 37 % | | + 404 % | |
| Taux standardisé⁴(monde) | 50.0 | 53.7 | 3.5 | 25.8 | 43.2 | 32.6 | 4.0 | 14.1 |
| % de variation entre 1980 et 2017 | + 7 % | | + 637 % | | - 25 % | | + 253 % | |

La répartition du nombre de cas incidents et de décès liés au cancer du poumon en France en 2017 a été publiée dans un rapport technique de l'InVS (Tableau 2) (JÉHANNIN-LIGIER *et al.* 2017). Ces chiffres sont des projections réalisées à partir des données de l'année 2013.

Ainsi, l'InVS estime que le nombre de nouveaux cas de CBP s'élève à 16 849 chez les femmes et à 32 260 chez les hommes. Concernant la mortalité, l'estimation est portée à 10 176 et 20 815 décès respectivement. Chez les femmes, 67% des nouveaux cas et 61% des décès liés à un CBP interviennent dans la tranche d'âge 50-74 ans. Pour les hommes, ces proportions sont respectivement de 69% et 65%. La classe d'âge 65-74 ans est la classe d'âge modale chez les hommes en terme d'incidence et de mortalité tandis que chez les femmes, il s'agit de la classe d'âge 50-64 ans.

4. Standardisation des taux par rapport à une population de référence pour éliminer de potentiels facteurs confondants (âge, sexe...).

Tableau 2. Nombre de nouveaux cas et de décès liés aux cancers du poumon selon l'âge et le sexe en France métropolitaine au cours de l'année 2017 (JÉHANNIN-LIGIER *et al.* 2017).

| | | [00;14] | [15;49] | [50;64] | [65;74] | [75;84] | [85;++] | Total |
|------------------|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| Incidence | Homme | 5 | 1 463 | 10 578 | 11 847 | 6 348 | 2 019 | 32 260 |
| | | 0% | 5% | 33% | 36% | 20% | 6% | |
| | Femme | 9 | 1 139 | 6 373 | 4 971 | 2 885 | 1 502 | 16 849 |
| | | 0% | 7% | 38% | 29% | 17% | 9% | |
| Mortalité | Homme | 0 | 643 | 5 974 | 7 421 | 4 677 | 2 100 | 20 815 |
| | | 0% | 3% | 29% | 36% | 22% | 10% | |
| | Femme | 0 | 467 | 3 403 | 2 865 | 1 939 | 1 502 | 10 176 |
| | | 0% | 5% | 33% | 28% | 19% | 15% | |

Des données d'une étude de 2012 du même institut montrent une forte augmentation des taux d'incidence et de mortalité à partir de la classe d'âge 40-44 ans chez les hommes (Figure 2) (BINDER-FOUCARD *et al.* 2013). Le pic du taux est atteint respectivement à la tranche d'âge 70-74 ans et 80-84 ans avant de connaître une diminution. Chez les femmes, ces taux augmentent moins fortement à la même tranche d'âge puis connaissent une relative stabilisation de 55 à 74 ans. Cette tendance est ensuite suivie d'une légère augmentation de la mortalité et d'une diminution de l'incidence.

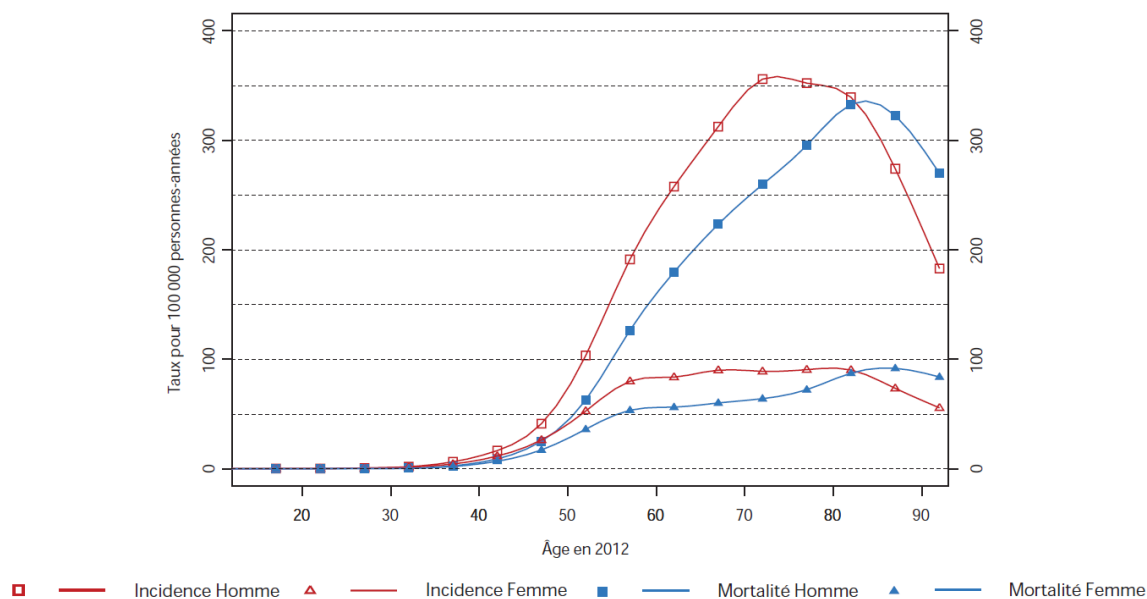


FIGURE 2. Taux d'incidence et de mortalité selon l'âge et le sexe en France pour l'année 2012 (BINDER-FOUCARD *et al.* 2013).

En terme de survie globale⁵ (SG), le CBP présente un pronostic très péjoratif avec un taux de SG à 1 an de 45% tous stades confondus (Tableau 3). Ce taux se dégrade jusqu'à 15% au bout de 5 ans. Il est supérieur de 5 points chez les femmes, et diminue de manière générale en fonction de l'âge. On observe le plus mauvais pronostic pour les patients diagnostiqués après 75 ans, avec un taux de SG de 33% et de 8% à 1 et 5 ans respectivement.

5. Temps écoulé entre le diagnostic de la maladie et le décès du patient, toutes causes confondues.

Tableau 3. Taux de survie globale (%) à 1 et 5 ans selon le sexe et l'âge pour la période de diagnostic 2005-2010. Chaque taux est donné avec son intervalle de confiance à 95% (COWPPLI-BONY *et al.* 2016).

| | Survie à 1 an | | Survie à 5 ans | |
|----------|---------------|-----------|----------------|-----------|
| Homme | 44 | [43 – 44] | 14 | [14 – 15] |
| Femme | 50 | [49 – 51] | 19 | [18 – 20] |
| [15; 45[| 53 | [50 – 56] | 25 | [22 – 28] |
| [45; 55[| 51 | [49 – 52] | 20 | [19 – 22] |
| [55; 65[| 51 | [50 – 52] | 18 | [17 – 19] |
| [65; 75[| 47 | [46 – 48] | 16 | [15 – 16] |
| [75; ++[| 33 | [32 – 34] | 8 | [7 – 8] |
| Tous | 45 | [45 – 46] | 15 | [15 – 16] |

b. Selon le type histologique et le stade tumoral

Une étude des taux d'incidence standardisés par histologie et par année dans le département de l'Isère pour la période 1980-2010 montre que le taux d'adénocarcinome est en forte hausse chez les femmes ces dernières années avec une stabilisation des autres types histologiques (Figure 3). Chez les hommes, ce sous-type est aussi en augmentation, mais dans une moindre mesure, avec une diminution presque symétrique des carcinomes épidermoïdes. Ce changement dans la répartition des différentes formes de CBP est imputé aux modifications dans la composition des cigarettes intervenues dans les années 60 (of HEALTH *et al.* 2014). Les adénocarcinomes représentent ainsi le type histologique le plus fréquent actuellement, quel que soit le sexe. Pour les hommes, cette constatation est valable seulement depuis les années 2002-2003; les carcinomes épidermoïdes étant le type histologique le plus représenté auparavant.

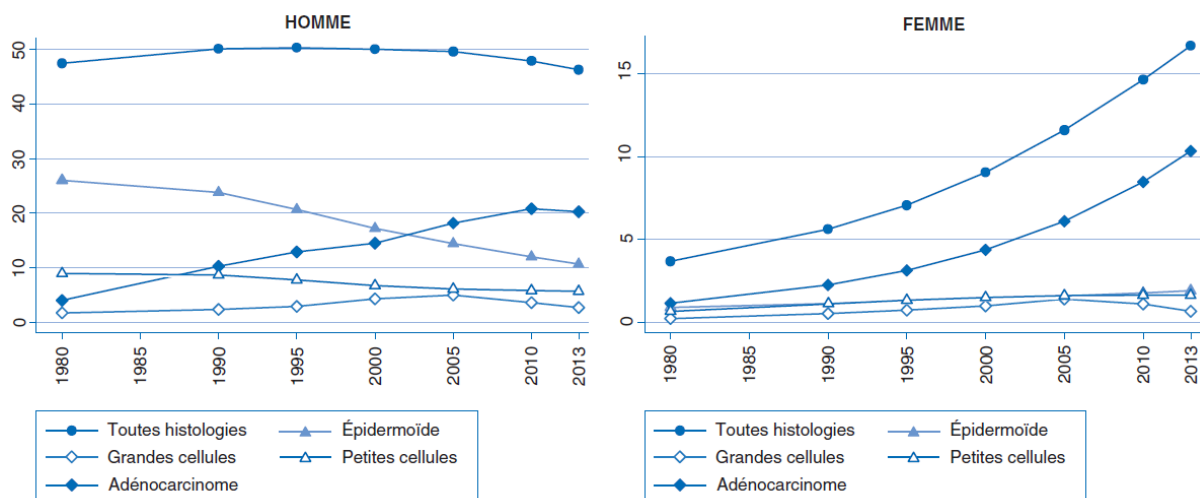


FIGURE 3. Évolution des taux d'incidence standardisés selon l'histologie tumorale et le sexe dans l'Isère pour la période 1980-2010 (COLONNA 2016).

Concernant le taux de SG à 1 an et 5 ans, tous stades confondus, trois groupes d'histologie sont mis en évidence : les tumeurs sans histologie de très mauvais pronostic, avec des taux de SG des malades respectivement de 14% et de 2% à 1 an et 5 ans; les cancers à grandes et petites cellules de pronostic intermédiaire avec 38% et 8% de survie respectivement et les carcinomes épidermoïdes et les adénocarcinomes de meilleur pronostic avec un taux de SG supérieur de 52% à 1 an et de 20% à 5 ans (Tableau 4).

Tableau 4. Taux de survie globale à 1 et 5 ans selon l'histologie tumorale (COLONNA 2016). IC : intervalle de confiance.

| | Effectif initial | Survie à un 1 an | | Survie à un 5 ans | |
|------------------|------------------|------------------|----------|-------------------|----------|
| | | % | IC à 95% | % | IC à 95% |
| Épidermoïde | 1473 | 52 | [50; 55] | 20 | [18; 22] |
| Adénocarcinome | 2252 | 53 | [51; 55] | 18 | [17; 20] |
| Grandes cellules | 533 | 38 | [34; 42] | 10 | [8; 13] |
| Petites cellules | 684 | 38 | [34; 42] | 6 | [4; 8] |
| Sans histologie | 442 | 14 | [11; 18] | 2 | [1; 4] |

Une analyse de la répartition par stade au diagnostic des adénocarcinomes et des carcinomes épidermoïdes portant sur 10 registres départementaux montre que le CBP est souvent diagnostiqué à un stade avancé voire très avancé (COLONNA 2016). Ainsi, le stade tumoral IV (métastatique) est le plus représenté avec 40% des cas chez les carcinomes épidermoïdes et 60% chez les adénocarcinomes alors que les stades précoces (stades I-II : tumeur locale) représentent moins de 15% des cas. De plus, la SG se dégrade drastiquement à mesure que le stade tumoral au diagnostic est avancé, et ce, quel que soit le type histologique de la tumeur (Figure 4). On observe en effet une médiane de survie pour les CBP de stades I-II de 83 mois pour les adénocarcinomes et de 51 mois chez les carcinomes épidermoïdes contre 6 mois seulement pour les deux types histologiques au stade IV.

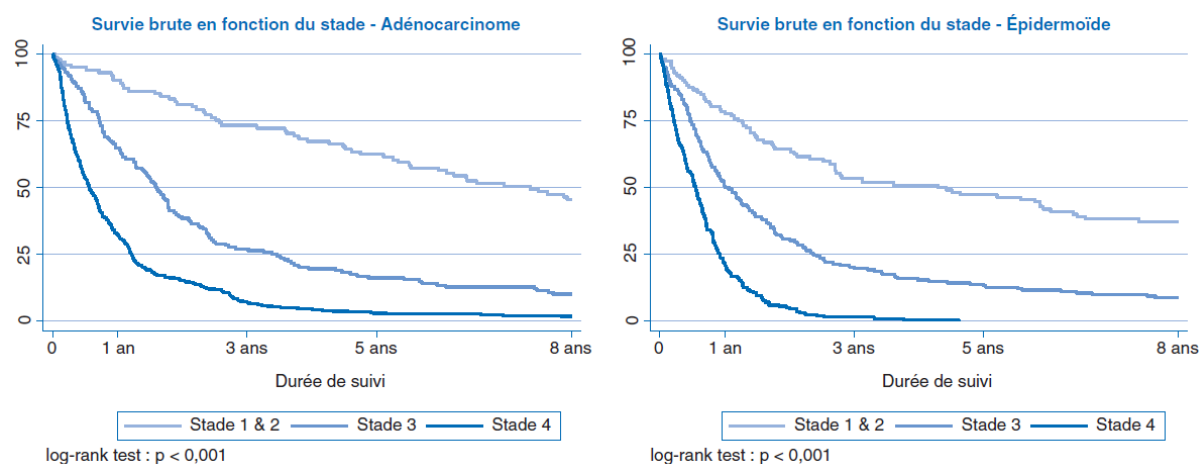


FIGURE 4. Courbes de survie des patients selon le stade de la maladie et l'histologie tumorale sur la base de 10 départements français en 2004 (COLONNA 2016).

c. Selon la période de diagnostic

Les taux de SG à 1 et 5 ans selon la période de diagnostic de la maladie sont donnés dans le tableau 5. Dans les années 1989-1993, ces taux étaient de 40% à 1 an et de 12% à 5 ans puis se sont discrètement améliorés récemment pour atteindre respectivement 46% et 15% dans les années 2005-2010.

Tableau 5. Taux de survie globale observés (%) à 1 et 5 ans selon la période de diagnostic (COWPPLI-BONY *et al.* 2016).

| | Survie à 1 an | | Survie à 5 ans | |
|-----------------|---------------|-----------|----------------|-----------|
| 1989-1993 | 40 | [39 – 41] | 12 | [11 – 12] |
| 1994-1998 | 42 | [41 – 43] | 12 | [11 – 13] |
| 1999-2004 | 43 | [42 – 43] | 13 | [13 – 14] |
| 2005-2010 | 46 | [45 – 47] | 15 | [15 – 16] |
| Toutes périodes | 43 | [43 – 43] | 13 | [13 – 14] |

4. Traitements des cancers bronchiques non à petites cellules

La diversité histologique et génétique des CBNPC ainsi que l'état général du patient et les toxicités éventuelles nécessitent un panel très divers de traitements. Cette section s'attachera à décrire brièvement les différentes thérapies disponibles en 2016 pour le traitement des CBNPC localement avancés non-accessibles à une chirurgie ou non médicalement opérables (stade IIIA non résécable ou stade IIIB) et métastatiques (stade IV).

a. Prise en charge des stades localement avancés

Lorsque l'état du patient le permet, il y a lieu de le traiter à l'aide de chimiothérapie et de radiothérapie concomitantes. Le traitement de chimiothérapie consiste en un doublet cytotoxique⁶ à base de sels de platine : le cisplatine ou le carboplatine. Les traitements les plus utilisés en association avec la radiothérapie sont :

- cisplatine et vinorelbine
- cisplatine et étoposide
- carboplatine et paclitaxel

Si le patient présente un état général altéré, est fragile ou est âgé (>70 ans), il est recommandé : soit d'avoir recours à cette association chimiothérapie-radiothérapie de manière séquentielle, soit d'employer seulement l'une ou l'autre des thérapies s'il existe une contre-indication, ou bien encore d'orienter le patient vers des soins de support pour tenter de le ramener vers un état général convenable pour une reprise des traitements.

6. Propriété de pouvoir éliminer des cellules.

b. Prise en charge des stades métastatiques

À leur stade le plus avancé, les CBNPC diffèrent dans leur prise en charge. En effet, la découverte dans les années 2000 d'altérations oncogéniques⁷ à l'origine du processus cancéreux de la cellule change radicalement la prise en charge de CBNPC présentant ces anomalies. En effet, la suppression de l'action d'un oncogène altéré par une thérapie dite "ciblée" induit une restauration partielle des propriétés natives de la cellule. Ces mutations sont présentes chez 15 à 18% des CBNPC et dans plus de 60% des CBNPC des non-fumeurs (PUJOL *et al.* 2006; BARLESI *et al.* 2016). De nombreuses altérations oncogéniques ont été étudiées telles que les altérations touchant les gènes KRAS (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), MET (*MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase*) et BRAF (*B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*). Cependant, seules les mutations affectant le gène EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) ou les ré-arrangements⁸ des gènes ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) ou ROS1 (*ROS Proto-Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase*) ont permis le développement de thérapies ciblées ayant reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France pour l'année 2016.

Ainsi, les CBNPC présentant une mutation activatrice sur le gène EGFR ou un ré-arrangement des gènes ALK ou ROS1 nécessitent un traitement différent des autres CBNPC. On distingue donc la première ligne de traitement des CBNPC pouvant être soit une thérapie ciblée, soit un doublet cytotoxique à base de sels de platine et les lignes de traitements ultérieures dont la plupart sont encore en cours d'essai clinique.

Tumeur avec mutation activatrice de l'EGFR

La voie de l'EGFR joue un rôle important dans l'apoptose⁹, la division cellulaire et l'angiogénèse tumorale¹⁰. Elle est surexprimée dans les CBNPC quelle que soit l'histologie de la tumeur. Les mutations du gène EGFR ont été découvertes par deux équipes en 2004 et concernent exclusivement les exons 18 à 21 codant pour le domaine tyrosine kinase de la protéine (LYNCH *et al.* 2004; PAEZ *et al.* 2004; B. E. JOHNSON *et al.* 2005). Des altérations situées dans ces régions ont pour conséquence une activation des voies biologiques sous-jacentes (PI3K-Akt et MAP-Kinases) et par suite l'envoi d'un signal incontrôlé excessif de survie et de prolifération cellulaire à l'origine de la croissance tumorale. Détectées dans 10 à 12% des CBNPC, elles sont retrouvées majoritairement dans les adénocarcinomes, chez les non-fumeurs et chez les femmes (BARLESI *et al.* 2016).

Quatre molécules de type inhibiteur de tyrosine kinase de l'EGFR ont reçu leur AMM en France pour le traitement des tumeurs présentant ce type d'altération : le géfitinib, l'erlotinib, l'afatinib et l'osimertinib. Plusieurs études ont montré l'efficacité de ces molécules comparée à celle des chimiothérapies de première ligne de traitement des CBNPC EGFR mutés en terme de taux de réponse et de survie sans progression (MOK *et al.* 2009; MAEMONDO *et al.* 2010; ROSELL *et al.* 2012). En cas de progression, une chimiothérapie à base de sels de platine peut être utilisée de manière similaire à une absence de mutation activatrice ou bien le patient peut se voir proposer l'intégration d'un protocole d'essai thérapeutique.

7. Altération d'un gène responsable de la transformation maligne d'une cellule.

8. Échange de segments entre deux chromosomes non homologues.

9. Autodestruction d'une cellule en réponse à divers signaux intra- ou extra-cellulaires.

10. Formation de nouveaux vaisseaux destinés à répondre aux besoins métaboliques de la tumeur.

Tumeur avec ré-arrangement des gènes ALK et ROS1

Les ré-arrangements du gène ALK ont été mis en évidence en 2007 et sont majoritairement observés dans les adénocarcinomes, chez les non-fumeurs et chez les hommes (SODA *et al.* 2007). Le crizotinib, thérapie ciblant cette altération, a démontré son efficacité comparée à celle des chimiothérapies de première ligne dans les études PROFILE 1005 et 1007 (SHAW *et al.* 2011; SHAW *et al.* 2013; SOLOMON *et al.* 2014). D'autres thérapies ciblées de seconde génération telles que le céritinib, l'alectinib et le brigatinib sont en cours de développement (SHAW *et al.* 2014; OU *et al.* 2016; SULLIVAN *et al.* 2016). Chacune a montré son efficacité chez les patients rencontrant une progression sous crizotinib, mais seul le céritinib obtint une AMM en 2016.

Concernant les ré-arrangements impliquant le gène ROS1, le crizotinib suivi de ceritinib en cas de progression peut être envisagé dans l'éventualité d'un échec d'une première ligne de traitement par doublet de chimiothérapie comprenant du pémétréxed.

Absence d'altérations moléculaires

Lorsqu'une tumeur ne présente aucune de ces altérations génétiques, une chimiothérapie à base de sels de platine pour les patients ayant un bon état général et adaptée pour les patients âgés de plus de 70 ans ou de mauvais état général est utilisée. Les différentes associations recommandées sont :

- cisplatine et vinorelbine, gemcitabine, docétaxel ou pémétréxed
- carboplatine et paclitaxel

Peu de différences d'efficacité ont été mises en évidence entre ces différents doublets (SCHILLER *et al.* 2002). Seule une meilleure efficacité des doublets à base de cisplatine a été mise en évidence pour le traitement des adénocarcinomes de stade IIIB (ARDIZZONI *et al.* 2007). Toutefois, l'ajout de bévacizumab à la chimiothérapie et sa poursuite en monothérapie jusqu'à progression ou toxicité a démontré un bénéfice en terme de SG et de survie sans progression (SSP) (D. H. JOHNSON *et al.* 2004; RECK *et al.* 2009; LOPEZ-CHAVEZ *et al.* 2012).

L'immunothérapie, traitement de ligne ultérieure

Chez les patients éligibles ayant répondu ou non à la première ligne de traitement métastatique, plusieurs thérapies pour les lignes ultérieures peuvent être proposées. Pour les CBNPC présentant des altérations oncogéniques, l'inclusion dans un essai thérapeutique est privilégiée. Pour les adénocarcinomes et carcinomes épidermoïdes ne présentant pas ces altérations, les récents essais cliniques étudiant l'utilisation de l'immunothérapie¹¹ par inhibiteur de point de contrôle de l'immunité en seconde ligne métastatique montrent un apport bénéfique considérable en terme de SG et de SSP comparé à celui d'autres thérapies de seconde ligne. Pouvant être donnée si l'état général du patient le permet et en l'absence de métastases cérébrales symptomatiques et de maladies auto-immunes¹², l'immunothérapie est devenue le traitement de seconde intention privilégié. Ses mécanismes d'action et son efficacité seront discutés dans la prochaine partie.

11. Thérapie visant à stimuler l'action antitumorale des cellules immunitaires ou à rendre les cellules tumorales plus facilement reconnaissables par le système immunitaire.

12. Système de réponses immunitaires d'un organisme contre ses propres cellules et tissus sains.

II. L'immunothérapie : une nouvelle ère dans le traitement des cancers.

La chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie ont été pendant de longues années les seuls outils disponibles pour tenter de contenir et de vaincre le cancer. La découverte des altérations oncogéniques et le développement des thérapies ciblées ces 15 dernières années ont marqué la nécessité d'une considération et d'une compréhension de la maladie à un niveau moléculaire. C'est dans cette situation que l'immunothérapie s'est développée et que les premières molécules pour le traitement des CBNPC métastatiques reçurent leur AMM en 2015. Ces nouvelles thérapies se basent sur l'entrave des mécanismes biologiques ayant permis l'apparition de la maladie et permettent un regain d'efficacité du système immunitaire dans son action antitumorale.

1. Immunoédition : de l'immunosurveillance à l'échappement tumoral

Les modifications génétiques subies par les cellules de l'organisme peuvent entraîner des changements dans les voies biologiques de signalisation intracellulaire ayant pour conséquence leur altération et le développement de tumeurs. Ce développement n'est rendu possible que par un échappement à la surveillance cellulaire et immunitaire de l'organisme. Bien que cette capacité des cellules tumorales soit connue depuis les années 1900 (KAUFMANN 2008), ces mécanismes n'ont été reconnus que plus récemment (SMYTH *et al.* 2006 ; ZITVOGEL *et al.* 2006). Ainsi, le concept d'immunoédition du cancer a été introduit pour théoriser les différentes étapes du développement d'une tumeur et ses différentes interactions avec les cellules du système immunitaire (Figure 5) (DUNN *et al.* 2002 ; DUNN *et al.* 2004 ; SCHREIBER *et al.* 2011).

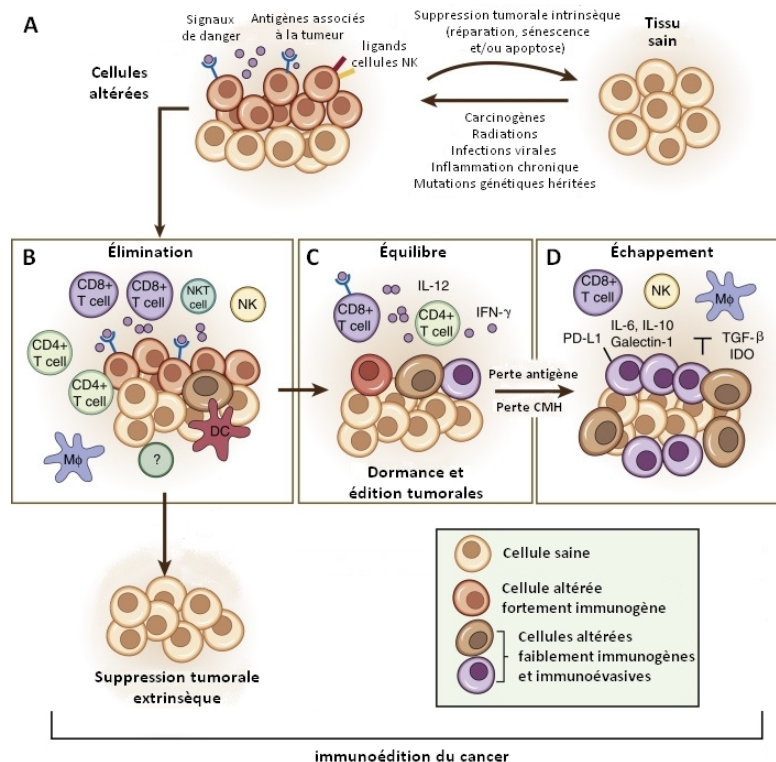


FIGURE 5. Immunoédition du cancer : le rôle du système immunitaire dans la suppression et la promotion du cancer. L'immunoédition intervient après l'échec des mécanismes de suppression tumorale intrinsèque (A) et est composée de trois étapes majeures : l'élimination (B), l'équilibre (C) et l'échappement (D).

Les cellules tumorales ayant réussi à échapper aux mécanismes de réparation et de **suppression tumorale intrinsèque** de l'organisme (Figure 5A) vont subir des modifications de leur immunogénicité¹³ dues à la pression antitumorale du système immunitaire pour voir émerger des cellules tumorales immunorésistantes. Ces changements surviennent au cours de trois phases principales : **l'élimination**, pendant laquelle les cellules de l'immunité innée et adaptative tentent de détruire les cellules mutées et de stopper leur prolifération (Figure 5B) ; **l'équilibre**, pendant lequel les cellules tumorales tendent à se stabiliser en nombre et perdurer dans l'organisme grâce à des signaux de rétro-contrôle, déjouant l'immunosurveillance (Figure 5C) et enfin **l'échappement** de la maladie, conséquence de la prolifération tumorale permise par le débordement des cellules immunitaires (Figure 5D).

a. La suppression tumorale intrinsèque

Un certain nombre d'évènements, telle une exposition à des agents carcinogènes, à des radiations ou des infections virales, peuvent entraîner l'apparition de mutations au sein du génome¹⁴ d'une cellule. Souvent bénignes, elles peuvent parfois être responsables de l'initiation de la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse.

Pour éviter une propagation dans l'organisme, les cellules ont développé différents moyens de réparation et d'obsolescence pour pallier les dommages subis (Figures 5A - 6). Ces processus majeurs de réponse cellulaire aux dommages à l'ADN permettent d'assurer l'intégrité du matériel génétique d'un individu et représentent la première barrière de l'organisme contre l'apparition de tumeur en son sein (LOWE *et al.* 2004). Ils sont au nombre de trois : **la réparation de l'ADN**, **la sénescence** et **l'apoptose** (Figure 6).

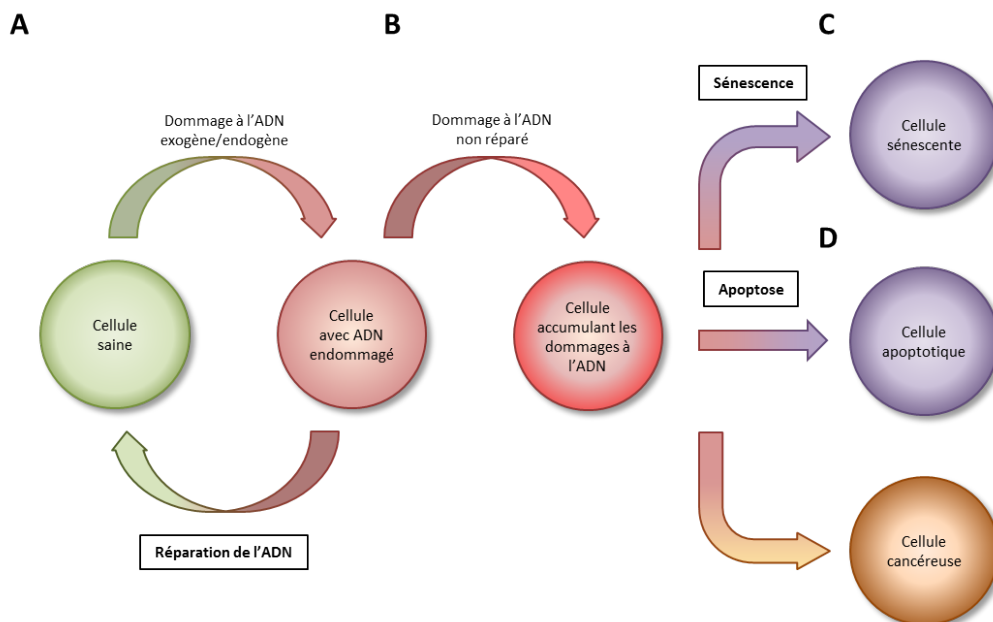


FIGURE 6. Les mécanismes de réponse cellulaire aux dommages à l'ADN : les voies de réparation de l'ADN, la sénescence et l'apoptose.

13. Capacité d'induire une réaction immunitaire.

14. Ensemble du matériel génétique d'un organisme.

Des mécanismes de **réparation de l'ADN** adaptés à chaque type de dommage ont été développés afin de réparer les lésions selon leur nature ou le moment du cycle cellulaire durant lequel s'est produit le dommage (Figure 6A). Ainsi, la voie biologique de réparation par excision de base (BER, *base excision repair*) permet l'élimination d'un unique nucléotide endommagé. La voie de réparation par excision de nucléotides (NER, **nucleotide excision repair**) se charge des dommages déformant l'ADN en éliminant un fragment de 20 à 30 nucléotides du brin d'ADN endommagé. La réparation des mésappariements (MMR, *mismatch repair*) permet de corriger l'incorporation d'un nucléotide incorrect lors de la réplication de l'ADN. Enfin, les cassures double brins pouvant entraîner la perte de fragment entier de chromosome peuvent être réparées par deux mécanismes : la jonction des extrémités non-homologues (NHEJ, *non-homologous end joining*) permettant la ligation des deux extrémités de la cassure et la recombinaison homologue (HR, *homologous recombination*) qui utilise une séquence homologue pour répliquer la région perdue lors de la cassure.

Une défaillance dans l'un de ces mécanismes peut potentiellement empêcher une réparation du matériel génétique des cellules et ainsi promouvoir la tumorigénèse par l'accumulation de mutations (Figure 6B) (RANCOULE *et al.* 2017). La cellule peut alors répondre par un processus irréversible d'altération de ses fonctions, de sa morphologie et d'un arrêt de sa croissance appelé **sénescence** (Figure 6C) (d'Adda di FAGAGNA *et al.* 2003; KUILMAN *et al.* 2009). Dans le cas particulier du cancer, l'activation d'un gène suppresseur de tumeur, une stimulation oncogénique ou encore des télomères¹⁵ défectueux peuvent activer ce processus irréversible au sein des cellules cancéreuses concernées permettant ainsi l'inhibition de leur prolifération (KUILMAN *et al.* 2009). Cependant, il semble aussi que les cellules en état de sénescence puissent avoir une action protumorale sur les cellules environnantes par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou de métalloprotéases (CAMPISI *et al.* 2007; BISCHOF *et al.* 2009; GAUMONT-LECLERC *et al.* 2009).

Enfin, **l'apoptose**, ou "mort programmée", est un mécanisme cellulaire permettant à une cellule de s'auto-détruire en réponse à un signal interne (Figure 6D). Ce mécanisme permet à la cellule d'éviter une lyse induite par des dommages trop importants. La lyse d'une cellule contaminée ou altérée aurait pour conséquence un relargage de son contenu dans le tissu environnant, contaminant ainsi les autres cellules. Lors de l'apoptose, le noyau cellulaire se fragmente et la cellule se fractionne en petites vésicules qui seront captées et éliminées par des macrophages.

Idéalement, toutes les cellules tumorales sont éliminées au cours de cette phase avant qu'une tumeur ne puisse être cliniquement observable. Le processus est alors complet. Cependant, si la présence de cellules tumorales persiste, les cellules du système immunitaire peuvent intervenir.

b. L'élimination

Lorsqu'un certain nombre de cellules altérées échappe à ces mécanismes de suppression tumorale intrinsèque pour proliférer, les cellules immunitaires innées et adaptatives débutent leur réponse antitumorale (D. S. CHEN *et al.* 2013). Cette phase est appelée phase d'élimination (Figure 5B).

Les cellules tumorales ayant échappé à la surveillance cellulaire sécrètent dans leur environnement des signaux de danger tels que des débris cellulaires ou des antigènes associés aux tumeurs (TAA, tumor-associated antigen) (Figure 7A).

15. Extrémité d'un chromosome participant à sa stabilité et aux processus de vieillissement cellulaire.

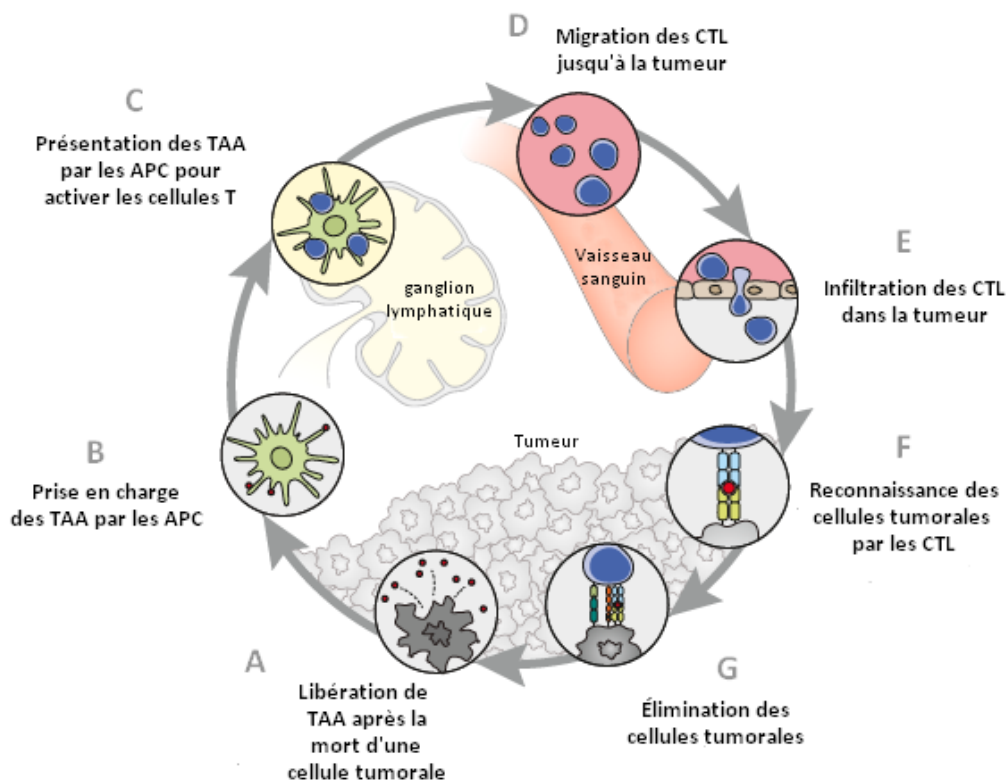


FIGURE 7. Cycle de l'immunité cellulaire antitumorale. APC : cellule présentatrice d'antigènes. CTL : lymphocytes T cytotoxiques. TAA : Antigène associé à la tumeur (D. S. CHEN *et al.* 2013).

Ces antigènes du non-soi¹⁶ sont la conséquence de centaines voire de milliers de mutations cumulées par la tumeur lorsque celles-ci affectent les régions codantes du génome et altèrent ainsi les protéines résultantes. Pour éviter l'auto-immunité, c'est-à-dire la production de lymphocytes T et/ou d'anticorps dirigés spécifiquement contre ses propres antigènes, le système immunitaire est capable de discriminer les TAA des antigènes du soi. Ces TAA, exprimés à la surface des cellules tumorales, peuvent activer les cellules effectrices de l'immunité innée que sont les macrophages, les cellules natural killers (NK) et les cellules dendritiques (DC, dendritic cells)(SCHUMACHER *et al.* 2015).

Les NK sont des cellules sentinelles ayant la capacité d'éliminer des cellules endommagées sans nécessité de prolifération ou de différenciation préalables. Leur action d'élimination des cellules tumorales libère dans l'organisme des fragments cellulaires pouvant être captés par les DC (Figure 7B). Ces débris sont entre autre composés de TAA résultant de l'instabilité génétique des cellules tumorales. D'autre part, les NK sécrètent des cytokines permettant le recrutement et l'activation de macrophages et de DC ainsi que la différenciation de certaines cellules de la réponse adaptative.

Les DC immatures, cellules présentatrices de l'antigène (APC), vont ingérer les TAA relargués lors de l'action des NK ou lors de l'apoptose de cellules tumorales grâce à leur fonction de phagocytose¹⁷ (Figure 8A) (STEINMAN 2012). Ces TAA vont être pris en charge par des vésicules, digérés par des enzymes¹⁸ et vont se lier aux molécules du complexe majeur d'histocompatibi-

16. Étranger à l'organisme (antigènes associés aux tumeurs p. ex.).

17. Capacité d'internaliser et de digérer des particules et molécules extérieures.

18. Protéine dotée de propriétés catalytiques.

lité (CMH) de classe II des APC permettant leur présentation aux autres cellules de l'organisme. Les DC ainsi chargées devenues "matures" migrent jusqu'aux ganglions lymphoïdes secondaires via les vaisseaux lymphatiques où elles pourront présenter ces TAA aux lymphocytes T-CD4⁺ et T-CD8⁺ (*clusters* de différenciation 4 et 8), cellules de l'immunité adaptative (Figure 7C).

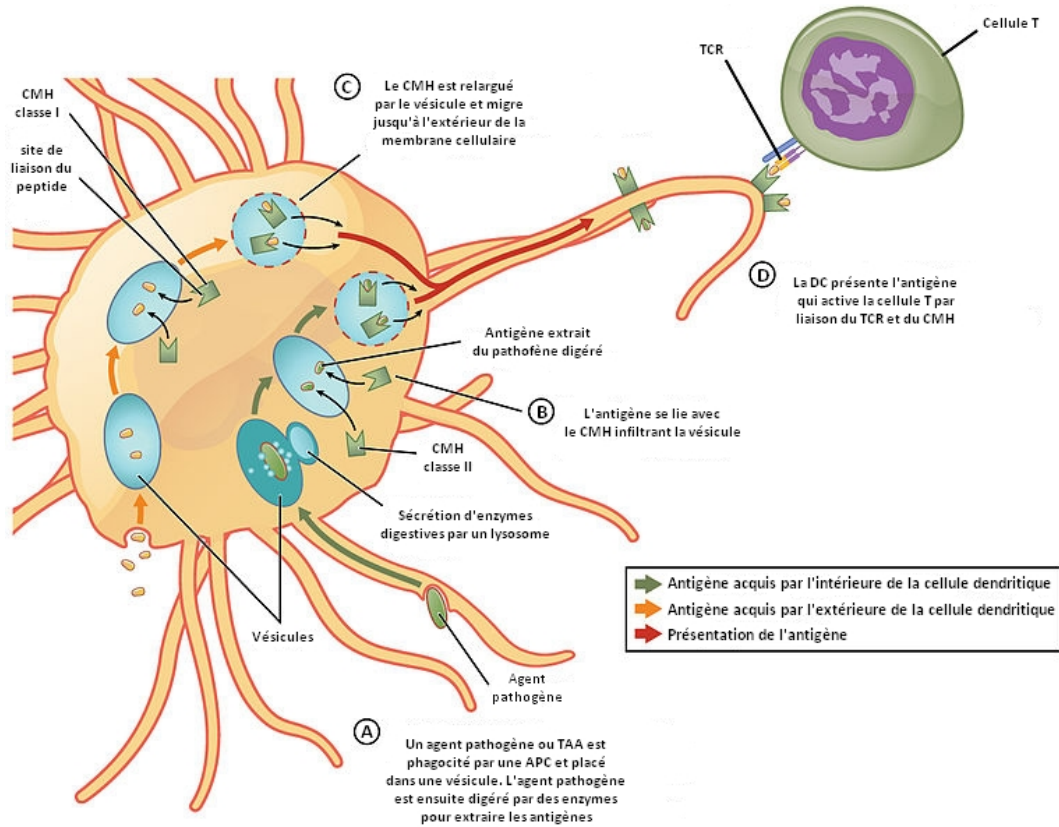


FIGURE 8. Traitement et présentation de l'antigène par les cellules dendritiques.

Les lymphocytes T-CD4⁺, produits dans le thymus, vont se lier aux TAA présentés par les molécules du (CMH) de classe II des APC via le récepteur de cellule T (TCR) se trouvant à leur surface (Figure 8D) (JOHANSSON *et al.* 2008). Ces lymphocytes T ainsi "activés" vont proliférer, rejoindre la circulation sanguine générale pour trouver les cellules tumorales présentant le même TAA pour lequel elles sont spécifiques et remplir leur rôle d'élimination (Figure 7D-G). Plusieurs sous-types de T-CD4⁺ auront différentes réponses lors de la reconnaissance de la cellule tumorale. On peut noter le sous-type Th1 (T-helper 1), qui, par sa sécrétion d'IFN γ (interféron gamma) inhibe l'angiogénèse, peut induire la sénescence des cellules tumorales et stimule les fonctions cytotoxiques des cellules de l'immunité innée ou adaptative. D'autres sous-types tels les Th2 et Th17 semblent avoir un effet protumoral. En effet, leur sécrétion d'interleukines 4 et 17 (IL-4 et IL-17) favorise l'angiogénèse tumorale et la résistance à l'apoptose (ASADZADEH *et al.* 2017; MANTOVANI *et al.* 2008; DE MONTE *et al.* 2011).

Les cellules T-CD8⁺ dites cytotoxiques (CTL), autre sous-type majeur des lymphocytes T, reconnaissent le TAA par la liaison de leur TCR avec le CMH de classe I présent à la surface des cellules tumorales, ce qui a pour conséquence une induction de leur fonction cytotoxique. Elles participent aussi à l'activation de la sénescence des cellules tumorales par sécrétion d'IFN γ .

c. L'équilibre

Lors de la phase d'élimination, le système immunitaire a permis la suppression d'une très grande partie des cellules en transition vers un état tumoral. Cependant, certains sous-groupes de cellules peuvent ne pas avoir été éliminés. Sans être cliniquement observables pour leur hôte, ils persistent dans l'organisme au sein d'un équilibre dynamique dans lequel le système immunitaire permet de contenir leur prolifération sans toutefois pouvoir les éradiquer (Figure 5C). Cette phase d'équilibre va sculpter l'immunogénécité des cellules tumorales résiduelles.

L'étude de la phase d'équilibre représente un challenge technique, sa modélisation et sa détection étant difficiles et peu décrites chez l'Homme (SCHREIBER *et al.* 2011). Cependant, plusieurs mécanismes pourraient expliquer cette période de dormance. Ceux-ci incluent une possible perturbation entre la sécrétion de facteurs de croissance et la signalisation cellulaire empêchant les cellules tumorales d'interagir avec leur micro-environnement ; une possible incapacité à stimuler l'angiogénèse pour assurer les apports nécessaires à une prolifération et enfin une immunosurveillance toujours active exerçant une pression constante sur les cellules résiduelles empêchant ainsi leur expansion (AGUIRRE-GHISO 2007 ; KOEBEL *et al.* 2007). En particulier, seuls les clones les plus immunoévasifs¹⁹ vont perdurer. Des cellules subissant des mutations altérant les voies biologiques de la présentation antigénique ou ayant une forte expression de marqueurs immunosuppresseurs (e.g. PD-L1) vont être favorisées (AGUIRRE-GHISO 2007 ; MITTAL *et al.* 2014).

En équilibre, le système immunitaire maintient alors les cellules tumorales résiduelles dans un état de dormance qui peut durer des années expliquant la potentielle longue période entre l'événement initiateur et la déclaration clinique de la maladie. On estime ainsi que l'équilibre est la phase la plus longue du processus d'immunoédition de la tumeur et pourrait perdurer jusqu'au décès de l'hôte sans manifestation clinique de la maladie.

d. L'échappement

Lorsqu'un nombre conséquent de cellules tumorales a acquis les moyens de contourner les mécanismes de réponse antitumorale mis en place par les cellules du système immunitaire, la tumeur peut se développer. Initiées lors de la phase d'équilibre, **l'immunosélection**, c'est-à-dire la sélection de clones tumoraux présentant des TAA non-immunogènes, et **l'immunosubversion**, c'est-à-dire la capacité à réprimer la réponse immunitaire, arrivent à leur apogée lors de la phase d'échappement et permettent aux cellules cancéreuses d'échapper à l'immunosurveillance pour pouvoir proliférer (Figure 5D).

L'immunosélection

Les mécanismes d'immunosélection interviennent tôt dans l'échappement tumoral. Ils regroupent de nombreuses stratégies mises en place par les cellules cancéreuses pour sélectionner les variants les moins propices à une reconnaissance par le système immunitaire.

La stratégie la plus commune est de développer des altérations dans les voies biologiques de traitement et de présentation des antigènes. Ces mutations ont pour conséquence une baisse voire

19. Capacité à passer inaperçue pour les cellules du système immunitaire.

une perte complète d'expression des molécules du CMH de classe I ou des gènes TAP-1 (Transporter associated with Antigen Processing 1) et LMP2 (Latent membrane protein 2) empêchant ainsi la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules de l'immunité adaptative qui ont été activées pour reconnaître des TAA spécifiques (Figure 9) (JAGER *et al.* 1996). Les cellules tumorales peuvent aussi devenir insensibles à tout signal d'induction de l'expression du CMH de classe I par la perte du récepteur à l'IFN γ . Faute de présentation antigénique viable et d'expression des antigènes dont elles sont spécifiques, les cellules lymphocytaires T ne sont alors plus efficaces dans leur reconnaissance et leur élimination des cellules tumorales (MATSUSHITA *et al.* 2012; ZITVOGEL *et al.* 2006).

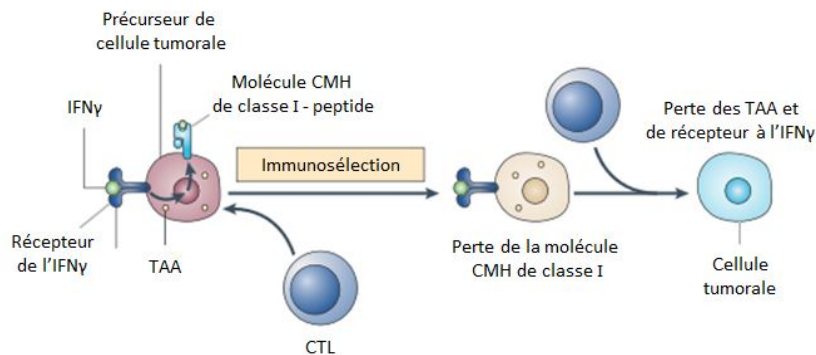


FIGURE 9. La perte du CMH de classe I, d'expression antigénique et de réponse à l'IFN γ comme mécanismes de l'immunosélection (ZITVOGEL *et al.* 2006).

De même, une perte ou diminution d'expression des ligands activateurs des cellules NK au profit des ligands inhibiteurs favorise la tolérance des cellules cancéreuses par les cellules de la réponse immunitaire innée (GROH *et al.* 2002; MASTAGLIO *et al.* 2018).

L'immunosubversion

Le deuxième grand mécanisme de l'échappement tumoral, appelé immunosubversion, consiste à instaurer un environnement immunosuppresseur aux abords des cellules tumorales (RADOJA *et al.* 2000; ZITVOGEL *et al.* 2006). Ainsi, plusieurs moyens sont déployés par les cellules tumorales pour éliminer les cellules immunitaires, les inhiber ou les amener à se différencier dans un sous-type protumoral.

Parmi ces moyens, différentes molécules sont détournées par la tumeur et son environnement à leur avantage. La sécrétion par les cellules tumorales de cytokines, telles que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance transformant β (TGF- β), promeut l'angiogenèse tumorale. Les cellules cancéreuses peuvent aussi recruter des cellules immunosuppressives incluant les lymphocytes T régulateurs (T-reg), les macrophages et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC). Lorsque celles-ci sont activées, elles sécrètent des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 ou le TGF- β , inhibant l'activité des lymphocytes T spécifiques. Elles peuvent aussi consommer de l'IL-2, cytokine essentielle au maintien de la fonction cytotoxique des lymphocytes. Les cellules tumorales peuvent aussi entraîner la différenciation de cellules immunitaires vers un sous-type ayant une action protumorale : d'une cellule T-CD4 naïve vers une cellule Th2 ou Th17 par exemple.

Enfin, les cellules tumorales peuvent accentuer l'expression de ligands membranaires, récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T aussi appelés "points de contrôle de l'immunité". Ces molécules présentes à la surface des cellules tumorales et de certaines cellules immunitaires ont la capacité d'inhiber ou de stimuler la réponse antitumorale cytotoxique des lymphocytes T. Ce mécanisme d'immunosubversion est ciblé par les immunothérapies par inhibiteur de point de contrôle composées d'anticorps monoclonaux bloquant les points de régulation du système immunitaire ; il sera développé dans la section suivante.

2. Immunothérapie des cancers broncho-pulmonaires

a. Les points de contrôle de l'immunité

Le maintien de l'homéostasie²⁰ du système immunitaire est essentiel à la survie de l'organisme. Une réponse immunitaire incontrôlée à des agents pathogènes, à des antigènes du soi²¹ sur-exprimés ou à des antigènes du non-soi peut provoquer des lésions inflammatoires des tissus affectés et des maladies auto-immunes dans les cas les plus sévères. Pour empêcher le système immunitaire d'attaquer les cellules de manière aveugle, l'organisme a la possibilité de réguler l'ampleur et l'intensité de la réponse immunitaire apportée à l'aide de signaux co-stimulateurs et co-inhibiteurs délivrés par des points de contrôle de l'immunité (PCI). Ces PCI sont des protéines trans-membranaires pouvant être exprimées à la surface de chaque cellule de l'organisme.

Dans le cadre d'une atteinte cancéreuse, les mécanismes de PCI sont très souvent activés pour réprimer une réponse immunitaire antitumorale. Les interactions entre récepteurs inhibiteurs et ligands peuvent intervenir lors de deux phases : lors de la phase d'activation des cellules T dans les ganglions (phase initiatrice) ou lors de la phase de réponse immunitaire spécifique au cœur de la tumeur et dans son micro-environnement (phase effectrice).

Plusieurs PCI inhibiteurs de la réponse immunitaire peuvent être exprimés par les lymphocytes T. Les plus importants sont la protéine de mort cellulaire programmée 1 (PD-1, programmed cell death protein 1), l'antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), la protéine du gène 3 d'activation des lymphocytes (LAG-3) ainsi que les molécules de la famille TIM comme TIM-3 (T-cell immunoglobulin-domain and mucin-domain-3) (PARDOLL 2012). Ces molécules peuvent être co-exprimées sur les lymphocytes T-helper et cytotoxiques (NIRSCHL *et al.* 2013). La place de la protéine PD-1 est centrale de par sa forte expression par les cellules T infiltrant la tumeur et de par son implication dans la plupart des cas de co-expression (PARDOLL 2012 ; NIRSCHL *et al.* 2013).

Dans le cadre du traitement des CBNPC, les interactions impliquant CTLA-4 et PD-1 avec leurs ligands ont été les premières cibles de l'immunothérapie.

La protéine PD-1 et ses ligands PD-L1 et PD-L2

La protéine PD-1 est exprimée par les lymphocytes T et dans une moindre mesure par les lymphocytes B, les CPA et les cellules NK. Elle régule principalement l'activité des CTL matures présents dans la tumeur et les tissus environnants. Lors de la phase effectrice, elle peut interagir avec ses deux ligands PD-L1 et PD-L2 (programmed cell death-ligand 1 and 2) encodés

20. Processus de régulation par lequel l'organisme maintient les différentes constantes du milieu intérieur à des niveaux proches de la normale.

21. Propre à l'organisme.

respectivement par les gènes CD274 et CD273. Cette interaction inhibe la voie de signalisation d'activation de la cellule T conduisant à une diminution de production de cytokines inflammatoires, de protéines de survie cellulaire ainsi que de l'expression du TCR (FREEMAN *et al.* 2000; PARRY *et al.* 2005). Le lymphocyte n'est alors plus à même d'exercer son action antitumorale spécifique (DONG *et al.* 2002; NIRSCHL *et al.* 2013). Il a aussi été montré que PD-L1 pouvait interagir avec les ligands de CTLA-4 pour inhiber la prolifération des lymphocytes T (BUTTE *et al.* 2007) (Figure 10).

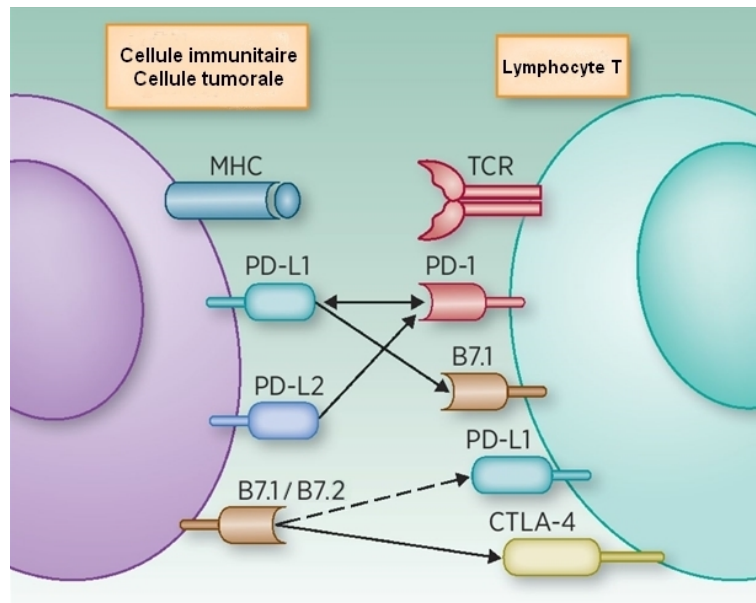


FIGURE 10. Le rôle des voies biologiques de CTLA-4 et PD-1 dans l'inhibition de la réponse des cellules T (SORIA *et al.* 2015).

La protéine CTLA-4 et ses ligands B7-1 et B7-2

La protéine trans-membranaire CTLA-4 régule l'activation des cellules T dans les organes lymphatiques secondaires grâce à l'interaction avec ses deux ligands B7-1 et B7-2 encodés par les gènes CD80 et CD86 respectivement (PARDOLL 2012). Elle joue un rôle essentiel dans la tolérance aux antigènes du soi en neutralisant l'action de la protéine de co-stimulation CD28 dont elle est homologue (RUDD *et al.* 2009). Après présentation de l'antigène au TCR lors de la phase initiatrice, CD28 fournit un second signal d'activation à la cellule T en se liant aux protéines B7-1 et B7-2 présentes sur les CPA. CTLA-4 ayant une affinité environ 20 fois supérieure avec ces ligands pourra se fixer préférentiellement afin d'endiguer le signal de CD28 et ainsi empêcher l'activation de la cellule T (E. S. KIM *et al.* 2016) (Figure 10).

b. Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire

La capacité des tumeurs à exprimer ces PCI inhibiteurs de la réponse immunitaire antitumorale représente un mécanisme émergent dans la compréhension des processus d'immunosubversion permettant aux cellules tumorales d'échapper à l'action des lymphocytes T. Ainsi, le développement de thérapies visant à bloquer les interactions entre les PCI et leurs ligands a été

un axe majeur de recherche ces 10 dernières années. A ce jour, ce sont les thérapies à base d'anticorps monoclonaux visant les interactions de CTLA-4 et PD-1 avec leurs ligands respectifs qui sont les plus étudiées et utilisées dans le traitement des CBNPC. On compte ainsi les α CTLA-4 tremelimumab et ipilimumab, les α PD-1 nivolumab et pembrolizumab et les α PD-L1 durvalumab et atézolizumab (BUQUE *et al.* 2015; BARBEE *et al.* 2015). Dans ce qui suit, seules les thérapies α PD-1 seront abordées.

Les anticorps α PD-1

La protéine PD-1 peut être exprimée par les lymphocytes infiltrant la tumeur ou dès leur activation dans les ganglions lymphatiques (SFANOS *et al.* 2009; AHMADZADEH *et al.* 2009). Quant à PD-L1, elle est exprimée à la surface des cellules d'un grand nombre de tumeurs (DONG *et al.* 2002; ZOU *et al.* 2008) ainsi que sur certaines cellules myéloïdes du micro-environnement (CURIEL *et al.* 2003; KUANG *et al.* 2009). L'expression des ligands de PD-1 permet à la tumeur d'instaurer un environnement immunosuppresseur à ses abords. Cet état est en partie réversible par le blocage de la voie PD-1 (Figure 11A) (BARBER *et al.* 2006). En effet, il a été montré que bloquer cette interaction par des anticorps α PD-1 ou α PD-L1 pouvait restaurer les fonctions antitumorales des lymphocytes T (DAY *et al.* 2006; SZNOL *et al.* 2013) (Figure 11B).

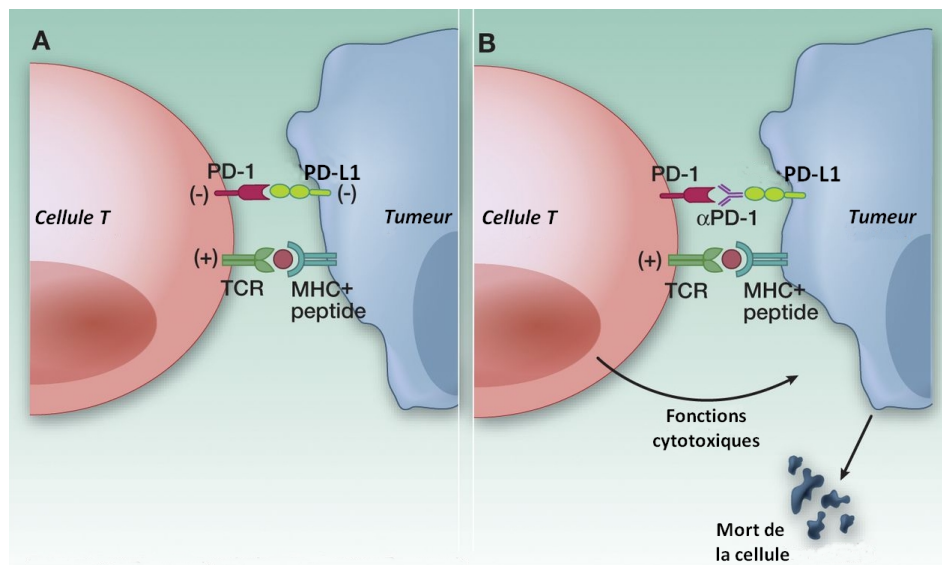


FIGURE 11. Illustration du mécanisme de blocage de l'interaction PD-1/PD-L1 à l'aide d'immunothérapie α PD-1 (RIBAS 2012).

c. Efficacité des inhibiteurs de PD-1 en monothérapie

Les premiers résultats sur l'efficacité du blocage de PD-1 par monothérapie pour le traitement de seconde ligne ou plus de CBNPC ont été publiés après présentation lors du congrès annuel de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) en 2012 (J. R. BRAHMER *et al.* 2012). Cette étude de phase I incluait 75 patients atteints de CBNPC intensément pré-traités : 57% avaient été pré-traités par chirurgie, 32% par radiothérapie, 41% par thérapies ciblées et 95% par chimiothérapie à base de sels de platine. Trois posologies de nivolumab étaient testées : 1, 3 et 10 mg/kg.

Quelle que soit la dose, l'étude souligne un taux de SG très encourageant de 24% à 2 ans et de 18% à trois ans et des survies sans progression très prolongées dont la plus longue était de 30.8 mois (Figure 12A). Le bras 3 mg/kg montrait toutefois les meilleurs résultats avec un taux de survie globale (SG) de 42% à 2 ans et de 27% à trois ans (Figure 12B). Les médianes et taux de SG étaient similaires quelle que soit l'histologie tumorale.

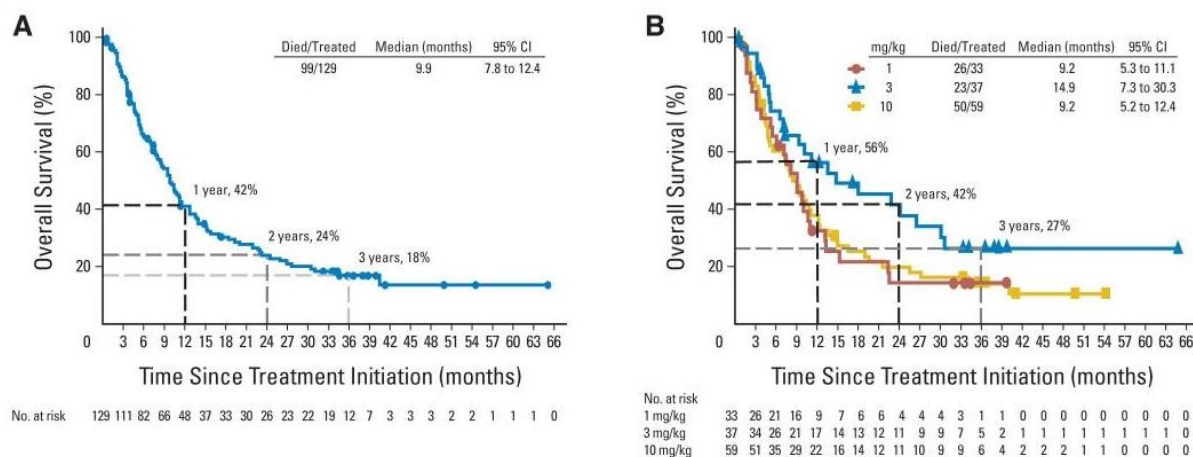


FIGURE 12. Courbes de survie globale (**A**) pour tous les patients ($N=129$) et (**B**) selon la posologie de nivolumab reçue : 1, 3 ou 10 mg/kg ($N = 33$, $N = 37$ et $N = 59$ respectivement). Les symboles sur les courbes représentent les évènements censurés. (GETTINGER *et al.* 2015).

L'étude de phase II Checkmate 063 s'est attachée à confirmer ces résultats (N. A. RIZVI *et al.* 2015b). Une cohorte de 117 patients pour la plupart lourdement pré-traités a reçu du nivolumab à la posologie de 3 mg/kg toutes les deux semaines jusqu'à progression. Les résultats de cette étude confirment une bonne réponse des patients avec une médiane de SG de 8.2 mois et une SG à 1 an de 41%.

Deux études de phase III se sont ensuite intéressées à l'efficacité du nivolumab en monothérapie comparée à la chimiothérapie standard docétaxel pour le traitement des carcinomes épidermoïdes (Checkmate 017) et des adénocarcinomes (Checkmate 057) (J. BRAHMER *et al.* 2015; BORGHAEI *et al.* 2015). Toutes deux portaient sur des cohortes prétraitées par un doublet de chimiothérapie à base de platine et randomisées à 1 pour 1 pour recevoir soit du nivolumab à la posologie 3 mg/kg toutes les 2 semaines, soit du docétaxel à $75\text{mg}/\text{m}^2$ toutes les 3 semaines.

Pour les carcinomes épidermoïdes, la SG à 12 mois sous docétaxel était de 24% contre 42% sous nivolumab (Figure 13A). Cette différence majeure est conservée à 18 mois avec un taux de SG de 13% et de 28% respectivement pour le docétaxel et pour le nivolumab.

Pour les adénocarcinomes, le gain en survie est significatif mais dans une moindre mesure avec une SG de 51% à 12 mois pour le nivolumab contre 39% pour le docétaxel (Figure 13B). Il semble exister deux groupes de patients : l'un tirerait bénéfice de la prise de nivolumab tandis que l'autre en subirait un effet délétère dès les premiers mois de traitement. Cette différence de bénéfice peut s'expliquer par un meilleur taux de réponse de certains adénocarcinomes au docétaxel.

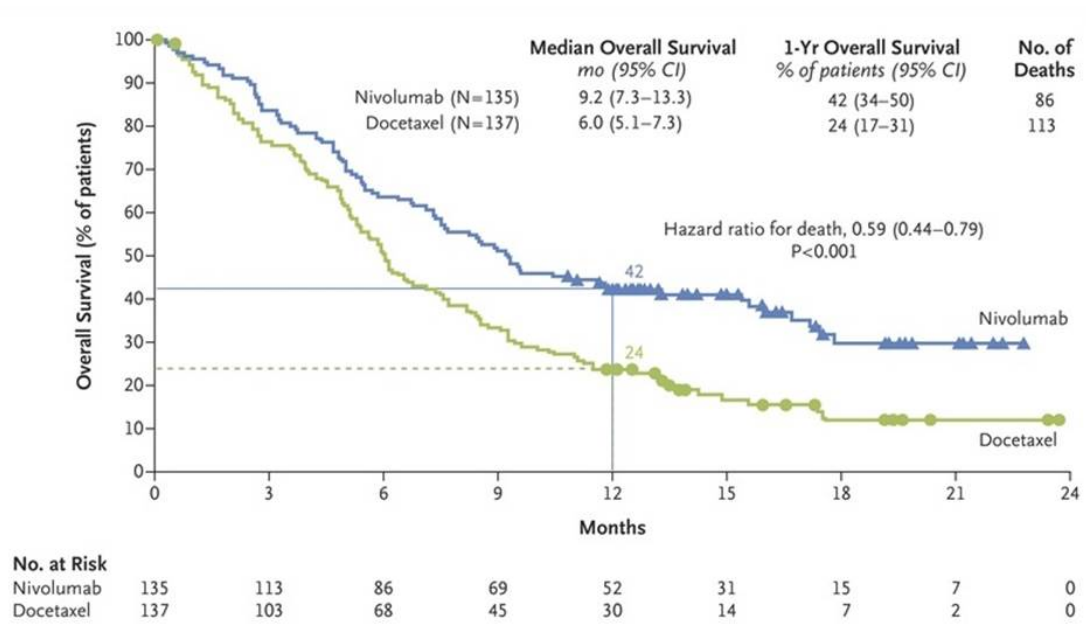
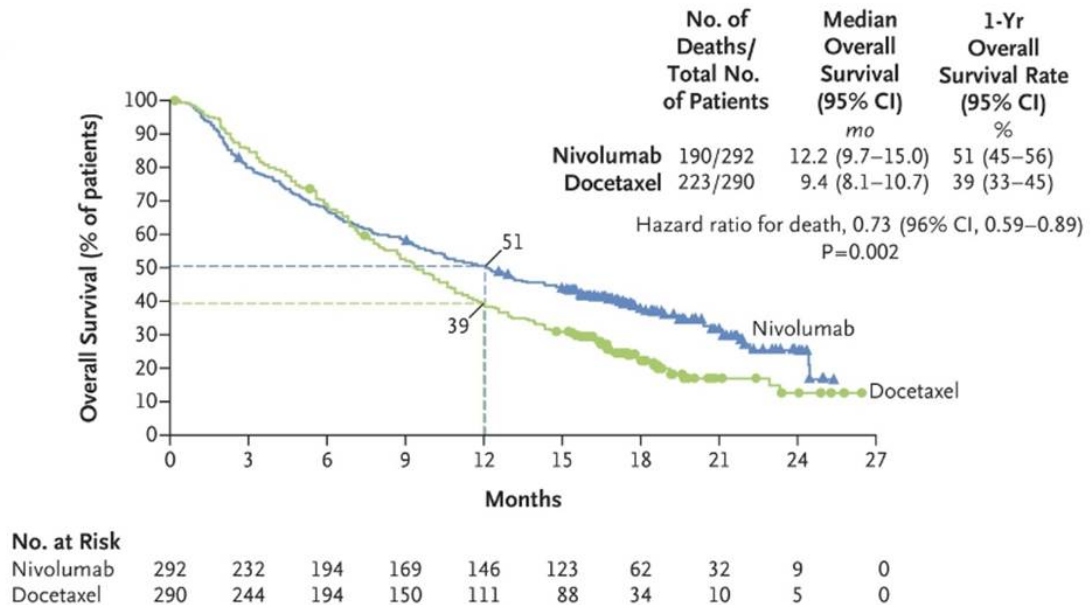
A**B**

FIGURE 13. Courbes de la survie globale pour des patients atteints (A) d'un carcinome épidermoïde (J. BRAHMER *et al.* 2015) ou (B) d'un adénocarcinome bronchique (BORGHAEI *et al.* 2015) ayant reçu soit du nivolumab (en bleu, $N = 135$ et $N = 292$ respectivement) soit du docétaxel (en vert, $N = 137$ et $N = 290$ respectivement). Les symboles sur les courbes représentent les événements censurés. (J. BRAHMER *et al.* 2015; BORGHAEI *et al.* 2015)

Concernant le pembrolizumab, l'étude de phase I KEYNOTE 010 a comparé l'efficacité du pembrolizumab pour les posologies 2 mg/kg et 10 mg/kg comparée à la chimiothérapie docétaxel sur une cohorte de 1034 CBNPC (HERBST *et al.* 2016). Pour l'intégralité des 1034 patients, aucune différence significative en terme de survie sans progression (SSP) n'a été observée entre les trois groupes (Figure 14A). Cependant, les patients traités par pembrolizumab ont montré une meilleure SG quelle que soit la posologie avec une médiane SG de 10.4 mois pour le pembrolizumab 2 mg/kg et 12.7 mois pour le pembrolizumab 10 mg/kg contre 8.5 mois pour le docétaxel

($p=0.0008$ et $p<0.0001$ respectivement)(Figure 14B). Lorsque ces résultats sont restreints aux patients présentant un fort taux de positivité au PD-L1 ($\geq 50\%$), la SG est significativement plus longue pour le pembrolizumab 2 mg/kg que le docétaxel (médiane SG : 14.9 mois vs 8.2 mois, $p=0.0002$) et pour le pembrolizumab 10 mg/kg que pour le docétaxel (médiane SG : 17.3 mois vs 8.2 mois, $p<0.0001$)(Figure 14C). De manière similaire, pour cette population de patients, la SSP est significativement plus longue pour le pembrolizumab 2 mg/kg que pour le docétaxel (médiane SSP : 5.0 mois vs 4.1 mois, $p=0.0001$) et pour le pembrolizumab 10 mg/kg que pour le docétaxel (médiane SSP : 5.2 mois vs 4.1 mois, $p<0.0001$)(Figure 14D).

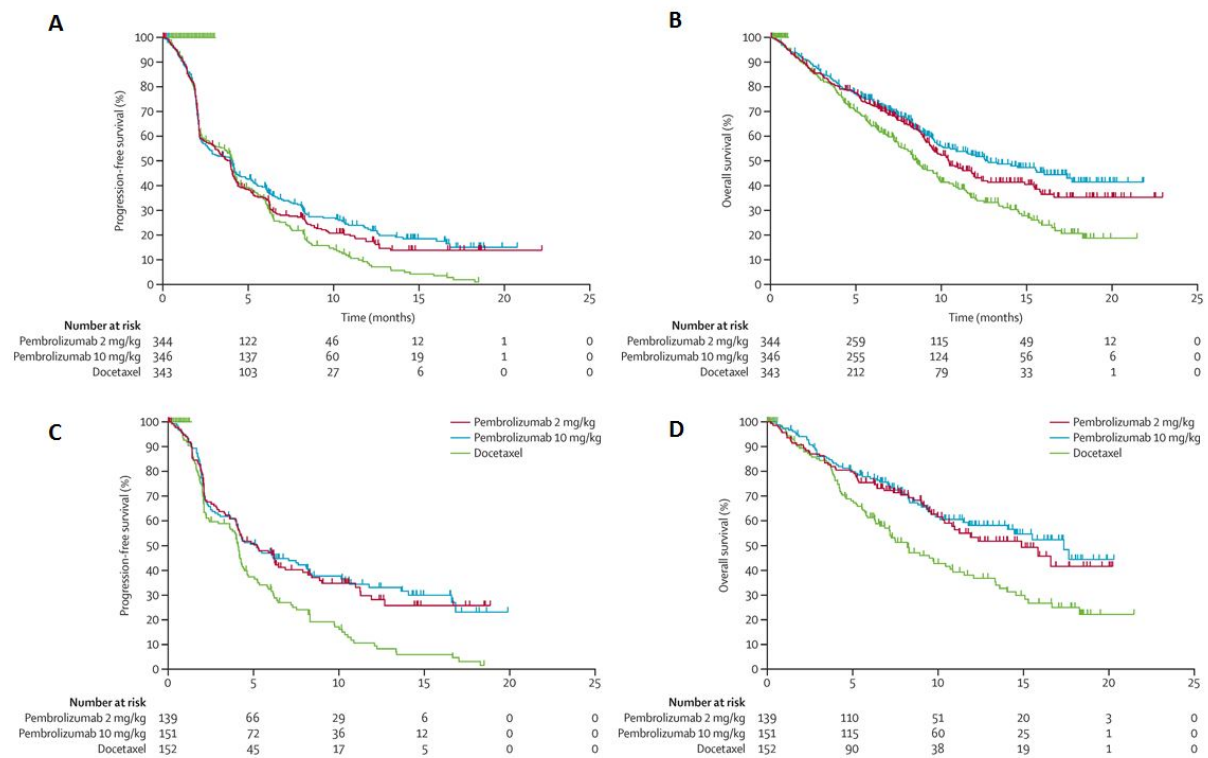


FIGURE 14. Courbes de la survie globale et de la survie sans progression pour tous les patients (A et B respectivement) et pour les patients ayant une expression tumorale de PD-L1 supérieure à 50% (C et D respectivement). Les patients ont été répartis selon le traitement reçu : pembrolizumab 2 mg/kg (en rouge, N=344 et N=139 respectivement), pembrolizumab 10 mg/kg (en bleu, N=346 et N=151 respectivement) et docétaxel (en vert, N=343 et N=152 respectivement). Les symboles sur les courbes représentent les évènements censurés. (HERBST *et al.* 2016).

Ces résultats montrent la supériorité des α PD-1 sur la chimiothérapie standard en seconde ligne de traitement des CBNPC. Cependant, une part non négligeable de patients ne répondent pas et peuvent même subir un effet délétère à la prise de ces traitements. Il est alors absolument nécessaire de rechercher des biomarqueurs prédictifs de la réponse ou de la résistance à ces thérapies afin de sélectionner les patients les plus à même d'en tirer un réel bénéfice. À cet égard, les résultats de l'étude KEYNOTE 010 suggèrent que l'efficacité des α PD-1 est accrue pour le sous-groupe de patients dont les cellules tumorales expriment fortement la protéine PD-L1. C'est pourquoi un marquage IHC de la protéine PD-L1 sur les cellules tumorales a été l'une des premières voies explorées pour tenter d'appréhender la réponse aux α PD-1.

d. L'expression de PD-L1 comme biomarqueur prédictif de réponse

Les premiers résultats concernant les inhibiteurs de PD-1 suggéraient que le niveau d'expression de PD-L1 pouvait être un marqueur prédictif de réponse très intéressant. En effet, l'étude NCT00730639 montrait un taux de réponse objective au nivolumab de 36% chez les patients PD-L1 positifs (> 5%) contre 0% chez les patients PD-L1 négatifs (Figure 15) (TOPALIAN *et al.* 2012). Bien que réalisée sur un faible nombre de patients, cette constatation était cohérente avec l'idée que l'action des inhibiteurs de PD-1 puisse être efficace uniquement sur les tumeurs exprimant le ligand PD-L1.

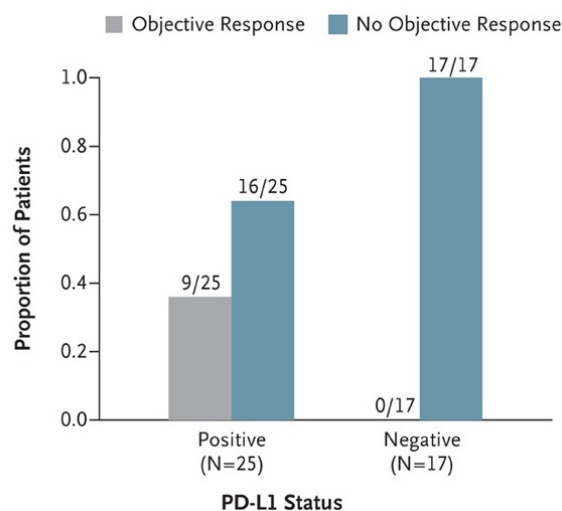


FIGURE 15. Association entre l'expression tumorale de PD-L1 et la réponse clinique au nivolumab. (TOPALIAN *et al.* 2012)

L'étude de phase I KEYNOTE 001 a quant à elle étudié l'efficacité du pembrolizumab dans une cohorte de 356 CBNPC catégorisés selon le niveau d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales estimé par IHC avec l'anticorps 22C3 (Dako). Trois groupes de patients ont été formés : PD-L1 négatif (< 1% de cellules marquées), PD-L1 positif intermédiaire (1-49%) et PD-L1 positif fort ($\geq 50\%$). Ainsi, les patients présentant une tumeur avec un niveau d'expression positif fort de PD-L1 ont montré des taux de SG et de SPP deux fois supérieurs par rapport aux patients présentant un taux faible ou modéré (GARON *et al.* 2015)(Figure 16).

Ces constatations ont mené l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA, *Food and Drug Administration*) à rendre obligatoire le test diagnostique de PD-L1 pour l'utilisation du pembrolizumab dans le traitement de première ligne métastatique des CBNPC. Cependant, ces observations ne sont pas consistantes d'une étude à l'autre (CARBOGNIN *et al.* 2015). Des résultats présentés au meeting ASCO 2014 confirment l'intérêt du traitement des tumeurs PD-L1 positives en terme de taux de réponse comparé aux tumeurs PD-L1 négatives (50% vs 0%). Cependant, ils font aussi l'état d'une efficacité des α PD-1 en terme de survie chez les tumeurs PD-L1 négatives. Ainsi, on peut observer un taux de SG à 1 an de 80% pour les tumeurs PD-L1 positives contre 71% pour les tumeurs PD-L1 négatives. De même, on constate un taux de SSP à 6 mois de 70% pour les tumeurs PD-L1 positives contre 57% pour les tumeurs PD-L1 négatives (Tableau 6) (GETTINGER *et al.* 2014). Ces taux de survie sont relativement proches.

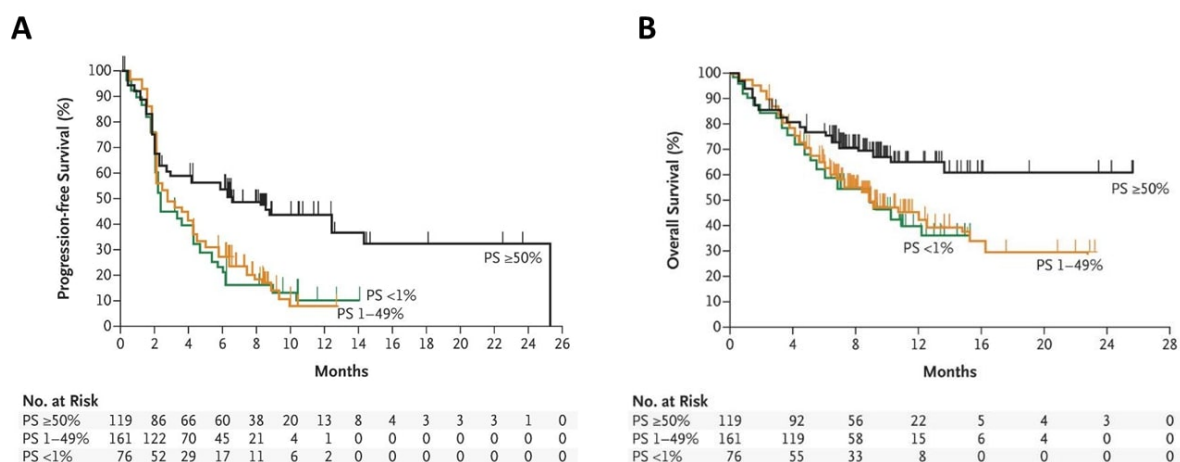


FIGURE 16. Courbes de la survie sans progression (A) et de la survie globale (B) de 356 CBNPC traités par pembrolizumab et classés selon l'expression IHC de PD-L1 : négatif (en vert, N=76), positif (en orange, N=161) ou positif fort (en noir, N=119). Les symboles sur les courbes représentent les événements censurés. (GARON *et al.* 2015)

On peut alors s'interroger sur la pertinence de l'utilisation d'un marquage IHC de PD-L1 pour sélectionner les patients pouvant tirer un bénéfice à long terme d'un traitement par α PD-1.

Tableau 6. Taux de réponse, de survie sans progression et de survie globale en fonction de l'expression de PD-L1 mesurée avant traitement chez des patients atteints de CBNPC traités par nivolumab en monothérapie. (GETTINGER *et al.* 2014).

| | Expression PD-L1 avant traitement | |
|--|-----------------------------------|------------|
| | PD-L1+ | PD-L1- |
| Échantillons suffisants pour l'analyse de PD-L1, n | 10 | 7 |
| Réponse objective, n (%) | 5 (50) | 0 |
| Taux de SPP à 6 mois, % (95%IC) | 70 (33-89) | 57 (17-84) |
| Taux de SG à 1 an, % (95%IC) | 80 (41-95) | 71 (26-92) |

Un autre argument à opposer à l'usage d'un marquage IHC de PD-L1 dans le choix des patients à traiter provient de l'étude CheckMate 057. Cette étude compare l'efficacité du nivolumab à celle de la chimiothérapie standard de 2^{ème} docétaxel selon l'expression tumorale de PD-L1. On peut observer que plus la tumeur exprime fortement PD-L1 plus la différence entre les taux de SG de ces deux traitements est importante. Toutefois, le nivolumab ne semble pas avoir d'effet délétère comparé au docétaxel pour les faibles expressions de PD-L1 (Figure 17) (J. BRAHMER *et al.* 2017). Ainsi, la négativité d'un marquage IHC de PD-L1 ne semble pas être suffisante pour exclure un patient d'un protocole de traitement par α PD-1.

L'utilisation de l'expression de PD-L1 mesurée en IHC présente aussi des limitations techniques et biologiques non négligeables. La diversité des anticorps utilisés, les différents seuils de positivité employés, l'hétérogénéité de la tumeur et de l'expression de PD-L1 ainsi que la fiabilité d'un marquage IHC réalisé sur des biopsies anciennes ou pré-thérapeutiques sont autant de facteurs pouvant mener à des estimations erronées (ILIE *et al.* 2016; GAGNE *et al.* 2018).

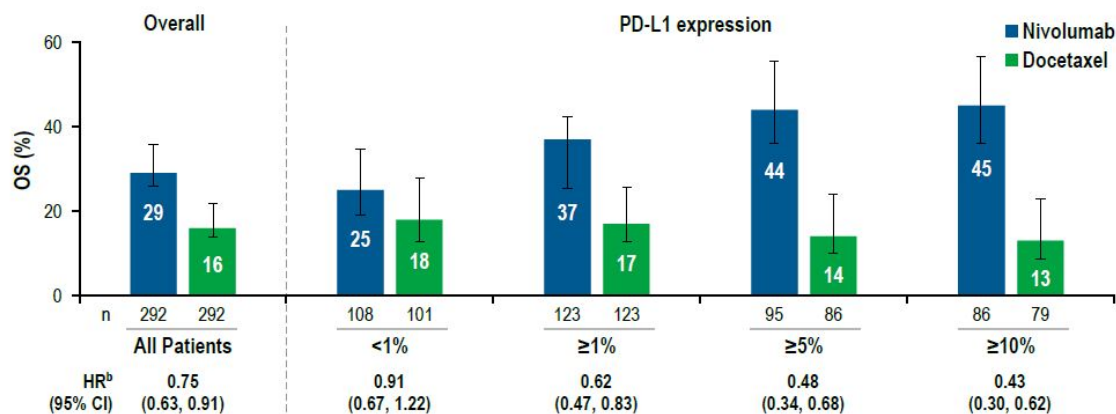


FIGURE 17. Taux de survie globale à 2 ans selon le niveau d'expression de PD-L1 chez des CBNPC traités par nivolumab (en bleu) ou par docétaxel (en vert) (J. BRAHMER *et al.* 2017).

Toutes ces difficultés ont poussé les scientifiques vers la recherche d'autres biomarqueurs. En particulier, les efforts se sont tournés vers une analyse génétique moléculaire extensive des tumeurs et du microenvironnement à l'aide des technologies de séquençage nouvelle génération. Ces nouvelles technologies offrent de nouveaux moyens essentiels pour une compréhension plus poussée de la maladie.

III. Les apports des récentes avancées technologiques dans la recherche de biomarqueurs de réponse à l'immunothérapie

Grâce aux avancées dans les sciences « omiques²² » permises par l'arrivée du séquençage de nouvelle génération (NGS, *next-generation sequencing*), il est aujourd'hui possible d'obtenir un profil étendu des caractéristiques d'une tumeur. Ces nouvelles technologies offrent ainsi une multitude de nouvelles possibilités pour la recherche de biomarqueurs. Elles peuvent être complémentaires de technologies déjà éprouvées telles que l'immunohistochimie et l'immunophénotypage par cytométrie en flux.

1. Le séquençage de nouvelle génération

Le NGS, aussi appelé séquençage à haut-débit, a révolutionné les études des systèmes biologiques complexes et dynamiques au cours des 10 dernières années. Cet ensemble de technologies permet un séquençage de l'ADN et de l'ARN beaucoup plus rapide et pour un coût par quantité de données générées bien moins élevé que le séquençage Sanger, technologie de référence jusqu'alors. En effet, le NGS a permis une baisse drastique des coûts de séquençage (Figure 18). Actuellement, il permet le séquençage d'un génome humain pour un coût avoisinant les 1 000 \$, soit moins de 0.05 \$ par mégabase séquencée contre 2 400 \$ par mégabase séquencée pour un séquençage par technologie Sanger (LIU *et al.* 2012). Par ailleurs, ces technologies évitent les longues étapes de clonage bactérien qu'imposait le séquençage Sanger et permettent le séquençage simultané de plusieurs échantillons. Ces avantages ont permis au NGS d'occuper une place centrale dans les analyses diagnostiques de routine en oncologie et oncogénique, mais aussi d'être employé dans un cadre de recherche.

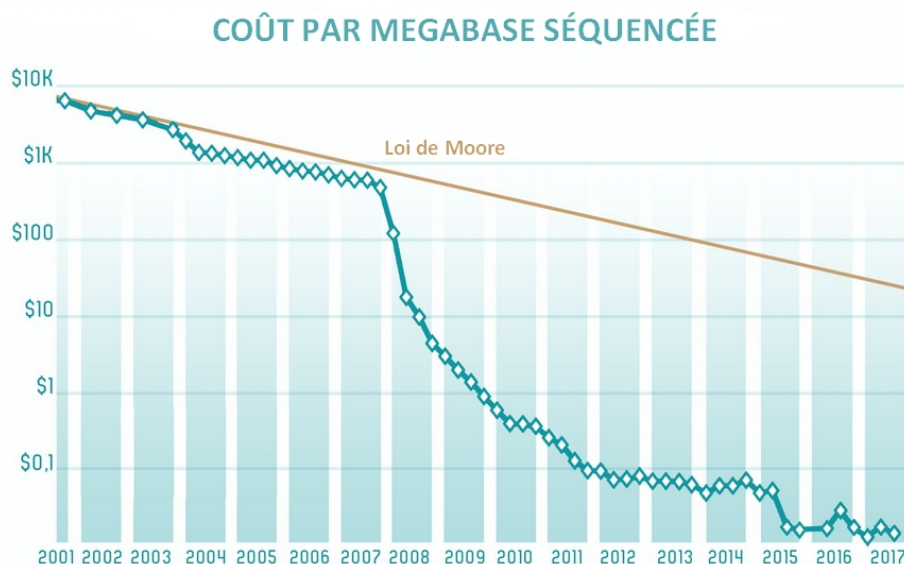


FIGURE 18. Évolution du coût moyen du séquençage d'un millions de nucléotides depuis 2001. Source : National Human Genome Research Institute.

22. Ensemble des disciplines étudiant dans leur globalité des systèmes biologiques complexes et dynamiques (fonctions et structures). Exemples : la génomique (étude du génome), la transcriptomique (étude des ARN messagers), la protéomique (étude des protéines), etc.

Il existe plusieurs méthodes de séquençage se partageant le marché du NGS :

- le séquençage par synthèse (Illumina[®], Solexa),
- le pyroséquençage (454[™], Roche),
- la ligation (SOLiD[®], Thermofisher),
- la détection des ions H⁺ (Ion Torrent[™], Thermofisher).

Elles présentent toutes de grandes similarités dans leur protocole de préparation des échantillons mais elles diffèrent à l'étape de séquençage. La technologie d'Illumina[®], appelée séquençage par synthèse (SBS, sequencing by synthesis), est celle qui a été le plus largement adoptée par la communauté scientifique pour les travaux de génomique de routine ou de recherche (BENTLEY *et al.* 2008). Elle représente aujourd'hui plus de 90% des données de séquençage générées à partir des technologies NGS dans le monde (Data calculations on file. Illumina, Inc. 2015). Cette technologie présente de nombreux avantages tels qu'un faible taux de faux positifs ($\approx 0.1\%$), une vitesse de séquençage élevée (≈ 1 génome en 3 jours), la possibilité d'analyser plusieurs échantillons simultanément (jusqu'à 96) mais aussi une compatibilité avec de nombreux protocoles de préparation des échantillons.

a. Principe du séquençage par synthèse

La technologie de SBS permet une détection dynamique de nucléotides par fluorescence (BENTLEY *et al.* 2008). Cette méthode de séquençage comporte quatre étapes :

- **la préparation de la librairie de séquençage**, c'est-à-dire la création d'une collection de fragments d'ADN ou d'ARN à séquencer,
- **la génération de *clusters***, amoncellement de fragments d'ADN clones des brins originels,
- **le séquençage**,
- **le traitement des données**.

La préparation de la librairie de séquençage

La préparation d'une librairie de séquençage, aussi appelée banque d'ADN, est la première étape d'un séquençage SBS. Elle permet la préparation des ADN et des ARN pour qu'ils puissent être identifiables et exploitables par le séquenceur.

L'ADN ou l'ARN est extrait de l'échantillon d'intérêt selon que l'on souhaite séquencer respectivement l'exome ou le génome, ou bien le transcriptome. À l'issue de cette extraction, les acides nucléiques se trouvent dans un mélange de débris cellulaires. Ils subissent alors une purification. Dans le cas d'un séquençage de transcriptome, les molécules d'ARN doivent subir une transcription inverse pour obtenir l'ADN complémentaire (ADNc) simple brin puis double brin correspondants. La synthèse de l'ADNc est essentielle car l'ADN est la matrice des prochaines réactions chimiques qui seront réalisées pour le séquençage. Cette étape est effectuée par l'intermédiaire d'enzymes appelées rétrotranscriptases ou transcriptases inverses.

Enfin, les fragments d'ADN subissent une fragmentation aléatoire afin de réduire leur taille à une longueur moyenne convenable pour cette technologie de séquençage. Cette fragmentation peut être effectuée de manière mécanique (p. ex. Covaris, Bioruptor) ou à l'aide de transposases²³ appelées tagmentases.

La dernière étape de cette préparation consiste à ajouter plusieurs courtes séquences nucléiques aux extrémités de chaque fragment d'ADN : les **séquences adaptatrices de synthèse**, les **index** et les **adaptateurs** (Figure 19). Cet ajout peut se dérouler pendant ou après la fragmentation selon que celle-ci est enzymatique ou mécanique respectivement. Les **séquences adaptatrices de synthèse** rendent possible la liaison d'amorces qui permettront l'initiation du séquençage. Les **index** sont uniques et identifient chaque échantillon de l'expérience et permettent ainsi de séquencer simultanément plusieurs échantillons. Les **adaptateurs** permettent la fixation des fragments au support physique de séquençage appelé cellule en flux ou *flowcell*. En effet, les séquences complémentaires des adaptateurs se situent en très grand nombre à la surface de chaque *flowcell*, permettant ainsi la fixation du fragment par hybridation. On compte deux types d'adaptateurs (appelés ici A et B), chacun se fixant à l'une ou l'autre des extrémités d'un même fragment. Suite à ces ajouts, chaque fragment est dénaturé en simple brin.

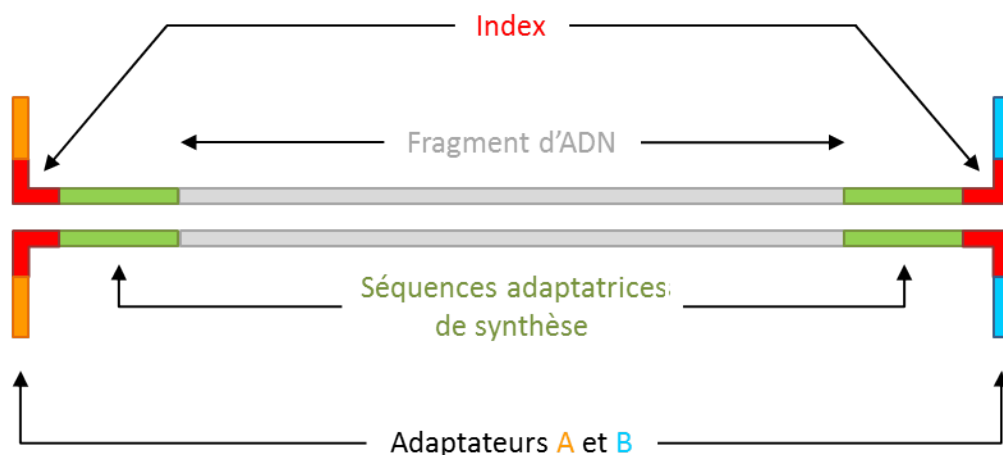


FIGURE 19. Fragment d'intérêt après préparation de librairie pour un séquençage Illumina.

La génération de clusters

Lors de cette étape, la librairie de séquençage est injectée sur une *flowcell*. Chaque fragment d'ADN peut alors se fixer à la *flowcell* par hybridation entre l'un des adaptateurs présents à ses extrémités et son complémentaire (Figure 20A). Une fois le fragment hybridé, une polymérase va permettre la création de son brin complémentaire (Figure 20B). La molécule double brin ainsi créée est alors dénaturée et le brin original est éliminé pour ne garder que celui physiquement fixé à la *flowcell* (Figure 20C). Le brin restant est ensuite cloné par amplification selon le principe des ponts (amplification *bridge*).

Lors d'une amplification *bridge*, le brin se courbe pour que l'adaptateur situé à son extrémité mobile s'hybride avec son complémentaire fixé à la *flowcell* (Figure 20D). Une polymérase génère

23. Enzymes permettant de couper l'ADN.

alors le brin complémentaire (Figure 20E). La molécule est ensuite dénaturée pour obtenir deux brins linéaires et complémentaires liés à la *flowcell* (Figure 20F). Ce processus est réitéré de nombreuses fois pour donner naissance à des milliers de fragments formant un groupe de brins semblables ou complémentaires appelé *cluster* (Figure 20E-H).

A la fin de cette série d'amplifications, les molécules doubles brins sont dénaturées puis les brins complémentaires sont clivés et éliminés par lavage ne laissant que les clones du brin originel fixés à la *flowcell* (Figure 20I-J). Cette étape est essentielle pour ne capter que le signal propre de chaque nucléotide d'intérêt sans être bruité par celui de son complémentaire lors de l'étape de séquençage.

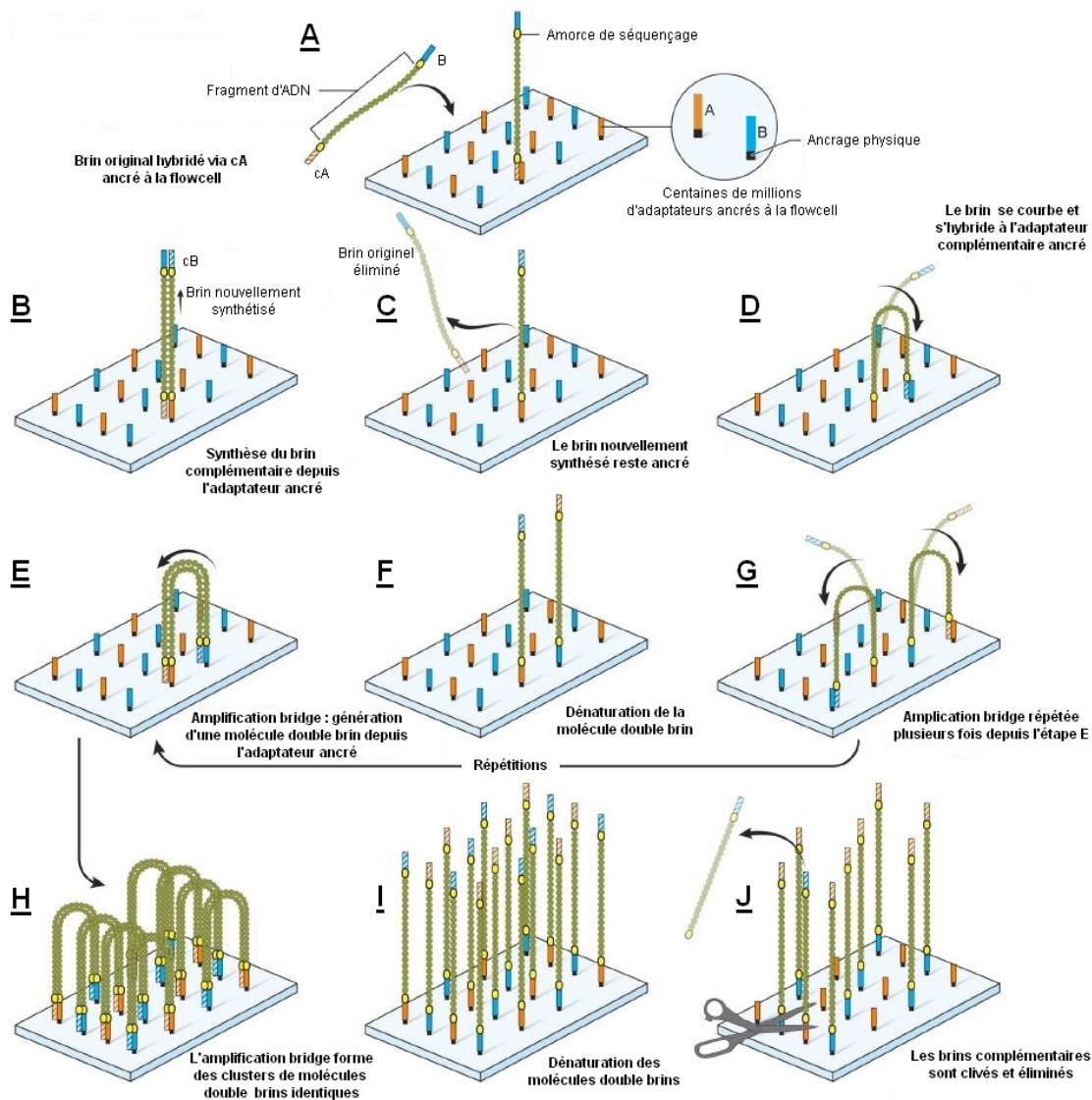


FIGURE 20. Formation de *clusters* par amplification bridge. (A-B) cA et cB : complémentaires des adaptateurs A et B respectivement.

Le séquençage

Le processus de séquençage est constitué d'un enchaînement de cycles visant à reconstituer le complémentaire de chaque brin d'intérêt à l'aide de polymérases et de nucléotides marqués par fluorophore.

La synthèse du brin complémentaire débute à l'extrémité mobile du brin d'intérêt. La polymérase permet l'hybridation d'un nucléotide marqué d'un fluorophore au premier nucléotide qui suit la séquence adaptatrice de synthèse. Après excitation par une source lumineuse émise par le séquenceur, le fluorophore va émettre en retour une lumière spécifique de la nature de l'acide nucléique auquel il est lié. Ainsi, une Adénine renverra une lumière bleue, une Thymine une lumière verte, une Cytosine une lumière rouge et une Guanine une lumière jaune. Ce signal lumineux, individuellement faible, est amplifié grâce à l'émission conjointe du même spectre par tous les fragments du même *cluster* afin d'en faciliter la détection. Les caméras du séquenceur capturent alors une image de la *flowcell* et le fluorophore est ensuite éliminé par lavage. Chaque fluorescence ainsi capturée va être traduite en nucléotide par le séquenceur.

Le séquenceur répète cette procédure un nombre de fois précisé par l'utilisateur. Ce nombre définit quelle portion du fragment d'intérêt sera séquencée (appelée lecture ou *read*). Des millions de *reads* sont ainsi générés au cours d'une expérience.

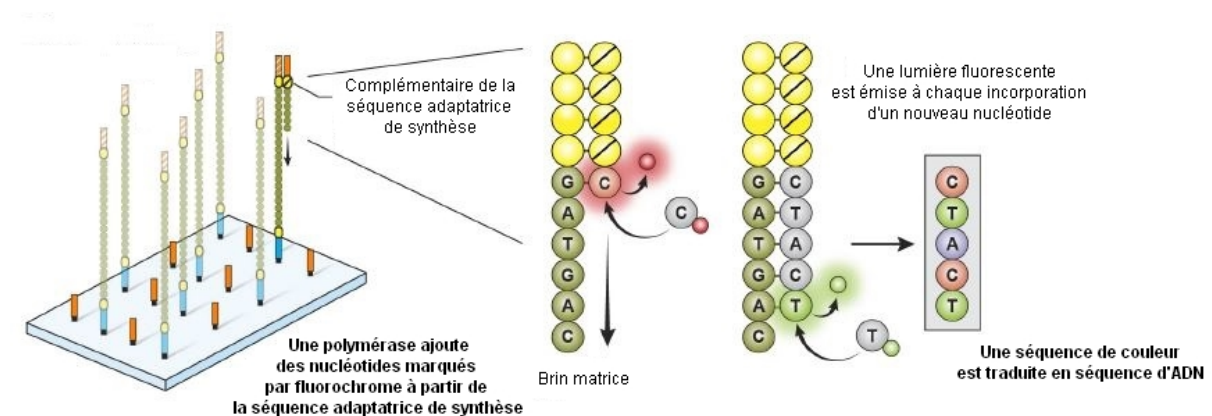


FIGURE 21. Principe du séquençage par synthèse.

Le traitement des données

Le séquençage a permis la génération d'un nombre colossal de *reads*, chacune identifiée par un index propre à un échantillon de l'expérience (Figure 22A). Ces séquences index vont permettre de regrouper chacune des *reads* appartenant à un échantillon au sein d'un même fichier informatique (extension *.fastq*) lors de l'étape de démultiplexage (Figure 22B).

Un contrôle de la qualité des *reads* de chacun de ces fichiers *.fastq* est ensuite effectué. Celui-ci peut comprendre, de manière non-exhaustive, un nettoyage des données de mauvaise qualité, une élimination des séquences adaptatrices, une sélection de taille minimale de *reads* et une recherche d'éventuelles contaminations (Figure 22C).

Les *reads* proprement nettoyées sont ensuite comparées à un génome de référence pour tenter de déterminer les portions génomiques qu'elles représentent : c'est la phase d'alignement (Figure 22D). Un génome de référence est une base de données de séquences d'acides nucléiques assemblées pour former un exemple représentatif du patrimoine génomique d'une espèce. Le fichier résultant de cet alignement (extension *.bam* ou *.sam*) va aussi subir des contrôles de qualité de l'alignement et des filtrations tels qu'un contrôle du nombre de *reads* proprement alignées, un calcul de scores qualités ou bien encore un marquage des duplicats et artefacts dûs à l'expérience.

Après cette étape d'alignement, beaucoup d'analyses sont possibles telles qu'une identification de mutations ponctuelles (substitutions d'un seul nucléotide), de variations de structures (translocations, variants du nombre de copies... etc) ou encore d'insertions-délétions (indels), un comptage de *reads* pour les méthodes d'analyses d'ARN ou encore des analyses métagénomiques²⁴ ou phylogénétiques²⁵.

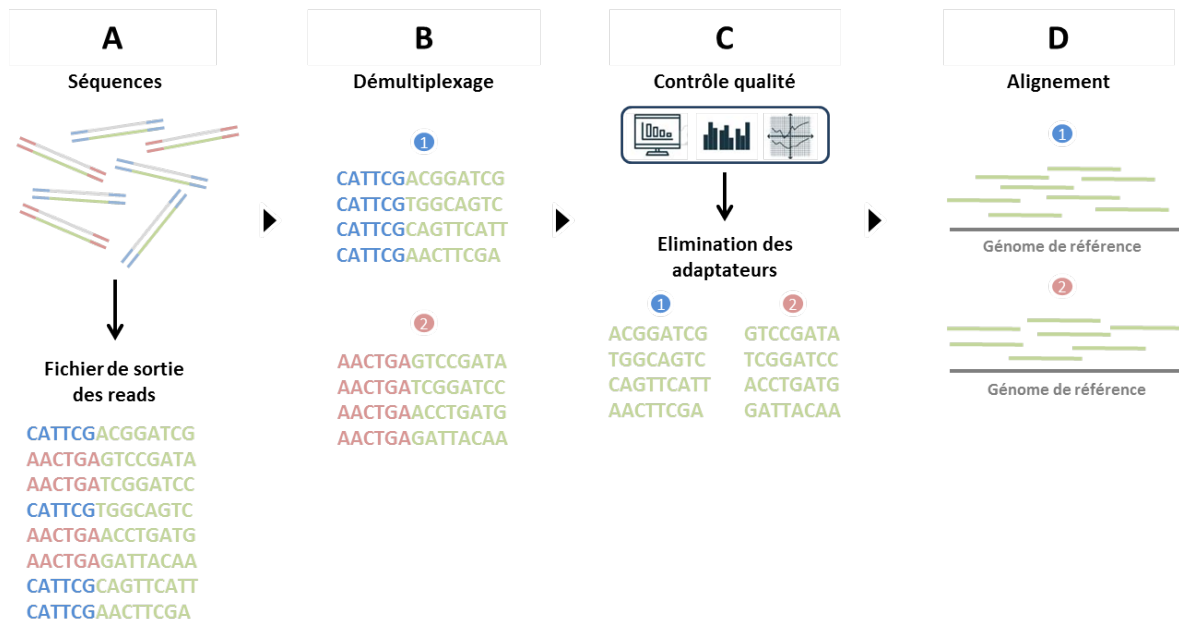


FIGURE 22. Traitement des données brutes post-séquençage.

b. Les applications du séquençage nouvelle génération

Le champ d'application de ces nouvelles méthodes de séquençage est très vaste. De par leur faible coût et de la rapidité de rendu des résultats, ces techniques sont en passe d'intégrer une routine d'analyse à visée diagnostique moléculaire et thérapeutique (METZKER 2005 ; MARINO *et al.* 2018 ; TURNBULL 2018). Ainsi, le **séquençage de génome** (WGS, *whole-genome sequencing*), **d'exome** (WES, *whole-exome sequencing*), **de transcriptome** (RNA-seq, *RNA sequencing*) et le **séquençage ciblé de régions spécifiques du génome** (TS - *targeted sequencing*) sont à l'heure actuelle les analyses les plus couramment utilisées en oncologie. Plusieurs facteurs entrent en considération dans le choix de l'approche à employer. Ce choix est conditionné par le coût de l'expérience, la qualité et la quantité d'échantillons mais aussi et surtout par la nature de la question posée (Table 7) (HAGEMANN *et al.* 2013).

L'approche par **séquençage de génome** est la plus complète. Le génome peut être séquencé de manière exhaustive permettant ainsi une détection d'un grand nombre d'évènements tels des mutations ponctuelles, des insertions-délétions (indels), des altérations en nombre de copies des gènes et d'autre variants structuraux chromosomiques (translocations, transvertions, inversion p. ex.). Ne se limitant pas aux régions codantes du génome, elle permet aussi de s'intéresser à des zones de régulation d'expression génique.

24. Étude par séquençage de l'ensemble des micro-organismes vivants dans un environnement spécifique.

25. Étude par séquençage de l'histoire évolutive des organismes vivants et de leurs liens de parenté.

Tableau 7. Comparaison de différentes approches possibles par séquençage nouvelle génération (PAOLILLO *et al.* 2016).

| | |
|--|---|
| <p>Séquençage de génome (WGS)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Analyse exhaustive • Détection de toutes les mutations du génome • Détection des variations de structures et des CNV • Découverte de nouveaux gènes • Faible profondeur de lecture • Complexité des données • Besoin d'échantillons de bonne qualité <p>Séquençage ciblé (TS)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Régions d'intérêt • Profondeur de lecture importante • Besoin d'hypothèses préalables • Analyse et stockage des données plus simples • Optimisé pour les échantillons de moins bonne qualité | <p>Séquençage d'exome (WES)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Régions codant des protéines • Rentabilité coût/nombre d'échantillons • Découverte de nouveaux gènes • Requièrè des échantillons de bonne qualité • Identification des variations structurales difficiles • Profondeur de lecture plus élevée que le WGS <p>Séquençage de transcriptome (RNA-seq)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Détection des mutations et des gènes de fusions • Analyse de l'édition de l'ARN • Analyse différentielle d'expression • Détection difficile des mutations dans les transcrits faiblement exprimés • Besoin d'échantillons de bonne qualité |
|--|---|

Cependant, le coût de génération d'un WGS de profondeur de séquençage²⁶ et de couverture²⁷ suffisantes reste problématique pour une majorité d'établissements dans un cadre de routine. De plus, la génération d'un tel volume de données est un véritable challenge bio-informatique. Elle nécessite en effet une quantité de ressources informatiques colossales pour leur stockage et leur traitement ajoutant un coût supplémentaire à l'expérience (MELDRUM *et al.* 2011).

En comparaison, les **séquençages ciblés WES et TS** offrent des approches moins coûteuses et plus spécifiques pour l'identification de mutations. Pour ces analyses, seuls les exons ou quelques régions spécifiques sont séquencés. Malgré la perte d'information sur les régions non-codantes du génome, ces approches présentent d'importants avantages comparés à un WGS. D'une part, seul un faible pourcentage du génome est d'intérêt (seul 1.2% du génome est codant). Ceci implique qu'un plus grand nombre d'échantillons peut être séquencé au cours d'une même expérience, à une profondeur de lecture plus importante et pour un coût réduit par échantillon. En outre, ces approches sont d'autant plus pertinentes que seule une faible partie des régions du génome est souvent nécessaire pour le diagnostic d'une maladie ou pour l'attribution d'un traitement. Le stockage et le traitement des données sont aussi moins coûteux en temps et en mémoire informatique. C'est pourquoi le WES et TS sont les deux approches de NGS les plus employées à l'heure actuelle (HAGEMANN *et al.* 2013; ROYCHOWDHURY *et al.* 2014).

Le **séquençage de transcriptome** permet d'effectuer des analyses d'expression différentielle de gènes, d'étudier l'expression d'isoformes, de rechercher des fusions de gènes mais aussi de détecter des mutations avec cependant plus de difficultés que les approches précédemment évoquées. Cette technique est similaire au WES en terme de ressources bio-informatiques.

On compte de nombreuses autres applications du NGS. Ainsi, la recherche des régions accessibles de la chromatine (ATAC-seq, *Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing*), l'analyse des interactions entre protéines et ADN (ChIP-seq) ou bien encore le séquençage après traitement de l'ADN au bisulfite permettant l'étude de la méthylation (Methyl-seq) sont quant à elles des applications employées essentiellement dans un cadre de recherche.

26. Nombre moyen de lectures couvrant une région déterminée.

27. Zone couverte par au moins un lecture.

2. Perspectives dans la recherche de biomarqueurs de réponse aux anti-PD-1

Les limitations à l'utilisation d'un marquage IHC de la protéine PD-L1 évoquées précédemment obligent la communauté scientifique à investiguer d'autres voies potentielles de réponse aux α PD-1. Pour cela, des techniques précédemment éprouvées tels l'immunophénotypage des cellules immunitaires par cytométrie en flux, le marquage IHC d'autres protéines ainsi que l'étude de la génétique des tumeurs rendue possible par l'arrivée du NGS doivent être investiguées.

a. Charge mutationnelle tumorale et antigènes associés aux tumeurs

La charge mutationnelle de la tumeur (TMB, *tumor mutational burden*) a été l'un des premiers marqueurs de réponse aux α PD-1 étudié par NGS. Celle-ci est le plus souvent définie comme le nombre de mutations non-synonymes (entraînant le changement d'un acide aminé) par megabase séquencée. La grande majorité des études tendent à montrer que plus une tumeur présente un fort TMB, meilleure sera la réponse aux α PD-1 (N. A. RIZVI *et al.* 2015a; SAMSTEIN *et al.* 2019). Ce résultat peut s'expliquer par la relation étroite qui existe entre TMB et le nombre d'antigènes associés à la tumeur (TAA). En effet, la formation de TAA est la conséquence directe de mutations non synonymes, non corrigées par les mécanismes de réparation de l'ADN et intervenant dans des régions codantes du génome. Ainsi, plus une tumeur présente de mutations, plus elle est susceptible de former des TAA. D'autres altérations génomiques ou anomalies transcriptionnelles peuvent aussi contribuer à la génération de TAA. On peut ainsi noter l'importance des fusions de gènes et des réarrangements, ainsi que la rétention d'intron lors de l'épissage de l'ADN messenger (WU *et al.* 2018; SMART *et al.* 2018). Un grand nombre de TAA associé à une levée de l'inhibition des cellules immunitaires par la prise d' α PD-1 facilite la reconnaissance tumorale et l'action cytotoxique des lymphocytes. Plusieurs publications montrent ainsi qu'un nombre élevé de TAA est associé à une bonne réponse aux α PD-1 (TUMEH *et al.* 2014; N. A. RIZVI *et al.* 2015a; SCHUMACHER *et al.* 2015; YARCHOAN *et al.* 2017). Ces résultats sont appuyés par une étude démontrant que certains patients ont pu acquérir une résistance aux α PD-1 par la perte d'un sous-clone présentant un fort taux de TAA ou par délétion de régions chromosomiques fortement altérées (ANAGNOSTOU *et al.* 2017).

Pour estimer le TMB, les WGS ou les WES d'un échantillon tumoral et d'un échantillon sain sont nécessaires afin de distinguer les mutations propres à la tumeur de celles appartenant au patrimoine génétique du patient. Après les étapes de traitement des données brutes, les biologistes moléculaires et bio-informaticiens ont à leur disposition de nombreux algorithmes de détection de mutations (Table 8). Aucun de ces algorithmes ne fait consensus au sein de la communauté bio-informatique. Cependant, le Broad Institute (Cambridge, États-Unis) a publié des recommandations de bonnes pratiques pour la détection de mutations somatiques²⁸ suivies intégralement ou en partie par un nombre important de laboratoires (VAN DER AUWERA *et al.* 2013). Ces recommandations visent à décrire en détail les principes clés des étapes de traitement et d'analyse nécessaires pour passer des lectures brutes provenant du séquenceur à un ensemble de mutations proprement filtré pour être utilisé dans de prochaines analyses.

28. Spécifiques de la tumeur.

Tableau 8. Liste des principaux algorithmes de détection de mutations somatiques pour le séquençage de génome et d'exome. SNV : mutation ponctuelle, indel : insertions-délétion, SV : variation de structure.

| Logiciel | Type de mutations | Besoin d'échantillon sain | Type d'algorithme |
|---------------|-------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| BAYSIC | SNV | Non | Apprentissage automatique |
| CaVEMan | SNV | Non | Analyse conjointe de génotypes |
| deepSNV | SNV | Non | Analyse des fréquences alléliques |
| EBCall | SNV, indel | Non | Analyse des fréquences alléliques |
| FaSD-somatic | SNV | Oui | Analyse conjointe de génotypes |
| FreeBayes | SNV, indel | Oui | Analyse des haplotypes |
| HapMuC | SNV, indel | Oui | Analyse des haplotypes |
| JointSNVMix2 | SNV | Non | Analyse conjointe de génotypes |
| LocHap | SNV, indel | Non | Analyse des haplotypes |
| LoFreq | SNV, indel | Oui | Analyse des fréquences alléliques |
| LoLoPicker | SNV | Non | Analyse des fréquences alléliques |
| MutationSeq | SNV | Non | Apprentissage automatique |
| MuSE | SNV | Non | Chaîne de Markov |
| MuTect | SNV | Oui | Analyse des fréquences alléliques |
| SAMtools | SNV, indel | Oui | Analyse conjointe de génotypes |
| Platypus | SNV, indel, SV | Oui | Analyse des haplotypes |
| RADIA | SNV | Non | Seuil heuristique |
| Seurat | SNV, indel, SV | Non | Analyse conjointe de génotypes |
| Shimmer | SNV, indel | Non | Seuil heuristique |
| SNooPer | SNV, indel | Oui | Apprentissage automatique |
| SNVSniffer | SNV, indel | Oui | Analyse conjointe de génotypes |
| SOAPsv | SNV | Non | Seuil heuristique |
| SomaticSeq | SNV | Non | Apprentissage automatique |
| SomaticSniper | SNV | Non | Analyse conjointe de génotypes |
| Strelka | SNV, indel | Non | Analyse des fréquences alléliques |
| VarDict | SNV, indel, SV | Oui | Seuil heuristique |
| VarScan2 | SNV, indel | Oui | Seuil heuristique |
| Virmid | SNV | Non | Analyse conjointe de génotypes |

Concernant l'analyse des TAA, leur détection peut s'effectuer à partir de séquençage d'ARN ou d'ADN (TAPPEINER *et al.* 2017; HUNDAL *et al.* 2016). Le logiciel pVAC-Seq prend en entrée la liste des mutations somatiques non-synonymes et le génotypage HLA²⁹ du patient. Les TAA résultant des mutations et de leur environnement sont prédits à l'aide de l'algorithme NetMHC (LUNDEGAARD *et al.* 2008).

Les affinités de ces TAA et des antigènes sauvages correspondants sont ensuite estimées et comparées pour ne conserver que les TAA les plus à même d'être reconnus par les cellules du système immunitaire.

b. Altérations des voies de réparation à l'ADN

Des analyses génomiques ont montré que les mutations affectant les voies biologiques de la réparation de l'ADN pouvaient influencer la réponse aux α PD-1 (LE *et al.* 2015; MOUW *et al.* 2017). Une altération de ces voies aurait pour conséquence une non-réparation des mutations facilitant la formation de TAA potentiellement immunogènes et ciblables par les CTL (GERMANO *et al.* 2017). En particulier, il a été montré que des patients dont la tumeur présentait des altérations dans la voie de la réparation des mésappariements et traités par α PD-1 en monothérapie avaient un taux de réponse de 40 à 70% et une SSP améliorée (LE *et al.* 2017).

29. Ensemble de gènes codant pour les CMH.

De plus, des modèles statistiques incluant les dommages aux voies de réparation de l'ADN ont montré une capacité prédictive de la survie des patients supérieure à celles de modèles incluant la charge mutationnelle seule (TEO *et al.* 2018). Ces données suggèrent ainsi que l'impact de ces altérations est majeure dans la réponse aux α PD-1.

Pour identifier les mutations pouvant impacter significativement le bon fonctionnement de ces voies biologiques, il est nécessaire de restreindre l'analyse à celles affectant les gènes impliqués dans les voies de la réparation de l'ADN et à celles potentiellement délétères. Plusieurs bases de données relatives aux voies métaboliques telles que Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KANEHISA *et al.* 2000) et Gene Ontology (ASHBURNER *et al.* 2000) peuvent être utilisées pour lister les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Concernant l'aspect délétère des mutations, plusieurs scores de prédiction de conséquence peuvent être employés tels que le score **SIFT** (NG *et al.* 2003) et le score **PolyPhen2** (I. A. ADZHUBEI *et al.* 2010). **SIFT** calcule la probabilité qu'une substitution d'un acide aminé par un autre puisse affecter la fonction de la protéine résultante. Pour cela, SIFT base ses calculs sur les similitudes des propriétés physico-chimiques des acides aminés et sur des scores de conservation par comparaison à des séquences homologues. Ainsi, une mutation sera prédite comme dommageable pour les fonctions de la protéine si son score SIFT est en dessous 0.05 et tolérable sinon. **PolyPhen2** utilise un algorithme de classification naïve bayésienne entraîné sur les bases de données HumDiv, regroupant les mutations connues pour causer des maladies mendéliennes et HumVar (I. A. ADZHUBEI *et al.* 2010; CAPPRIOTTI *et al.* 2006), regroupant les mutations associées à toutes sortes de maladies et pertes de fonction protéique. Ce score base ses prédictions sur l'homologie de séquence, sur les propriétés des domaines protéiques ainsi que sur des représentations 3D des protéines. Une mutation peut alors être classée comme de conséquence inconnue, bénigne, possiblement dommageable ou probablement dommageable.

c. Signatures mutationnelles

Une autre analyse possible des mutations consiste à s'intéresser aux différents motifs mutationnels. Un motif mutationnel est défini par **i**) le nucléotide précédant la mutation (A, C, G, T), **ii**) la mutation (substitution d'un C par un A notée C>A p. ex.) et **iii**) le nucléotide suivant la mutation (Figure 23A). On compte ainsi 96 motifs possibles. Les fréquences d'apparition de ces motifs ont permis de définir des combinaisons reliées à différents processus de métagènes telles les déficiences dans les voies de réparation de l'ADN ou dans la voie des enzymes d'édition d'ARN messagers de l'apolipoprotéine B³⁰ (APOBEC, *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*) (Figure 23B). Ces combinaisons sont appelées signatures mutationnelles (ALEXANDROV *et al.* 2013).

Ces signatures ont montré un intérêt dans la recherche de biomarqueurs de réponse aux α PD-1. En effet, parmi les patients présentant un CBNPC traité par α PD-1, ceux arborant une signature mutationnelle associée au tabac (signature 4) présentent un meilleur taux de réponse que les autres patients (N. A. RIZVI *et al.* 2015a; MIAO *et al.* 2018). La signature 2, associée à la voie APOBEC, a aussi montré des résultats probants d'association à une bonne réponse aux α PD-1 (S. WANG *et al.* 2018).

30. Famille de protéines de correction d'ARN et d'ADN

Plusieurs méthodes ont été développées pour estimer la part de chacune de ces signatures dans le profil mutationnel d'une tumeur. Par exemple, *deconstrucSigs* utilise une méthode de déconvolution avec contrainte (ROSENTHAL *et al.* 2016). Simplement, on cherche ici à estimer dans quelle proportion est présente chacune des signatures dans le profil mutationnel de la tumeur. Il suffit pour cela d'estimer les coefficients d'une régression linéaire multiple dont la variable dépendante est le profil mutationnel tumoral et les variables indépendantes sont les signatures. La résolution de ce problème est effectuée sous la contrainte que chaque coefficient doit être positif ou nul et que leur somme doit être égale à 1 (ROSENTHAL *et al.* 2016).

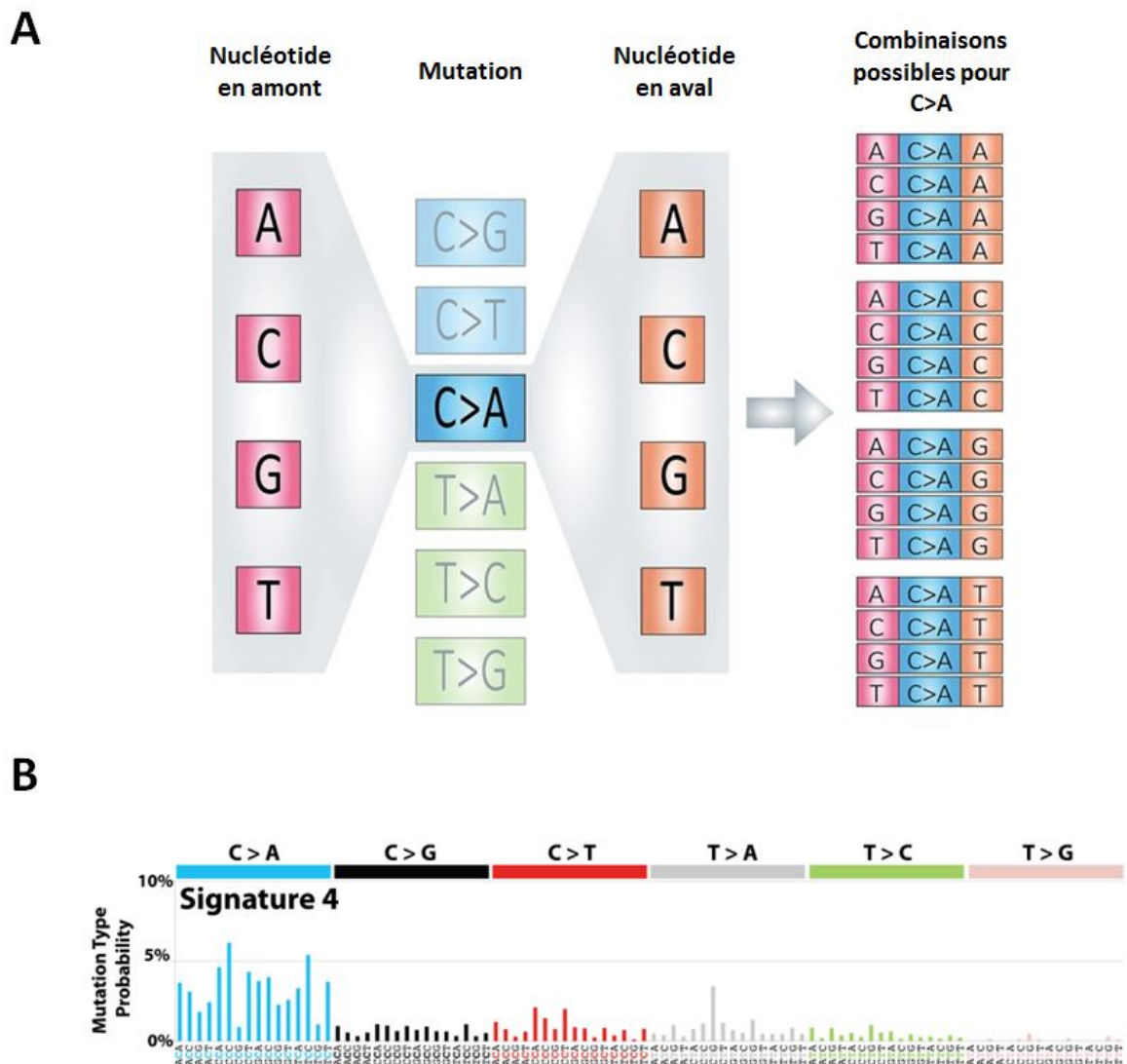


FIGURE 23. Concept de signature mutationnelle. (A) Exemple des 16 motifs mutationnels possibles pour une substitution d'un C en A. (B) Combinaison de motifs mutationnels définissant la signature 4 associée à la consommation de tabac.

d. Clonalité du récepteur des cellules T

Le complexe moléculaire du TCR présent à la surface des cellules lymphocytaires T permet la reconnaissance des complexes CMH-peptides. Chaque clone du TCR permet la liaison à un épitope spécifique entraînant l'activation du lymphocyte et sa réponse cytotoxique. L'intérêt de la diversité de clones du TCR infiltrant la tumeur a été mis en évidence dans la réponse aux α CTLA-4 dans les mélanomes et pour la SG des patients atteints de cancer du sein (POSTOW *et al.* 2015; MANUEL *et al.* 2012).

Plusieurs méthodes peuvent être employées pour estimer l'infiltration et la clonalité des cellules lymphocytaires T dans la tumeur. Cette estimation peut être réalisée à partir d'un séquençage tumoral de des régions hyper-variables complémentaires 1 et 3 (CDR1 et CDR2, *complementarity-determining region 1 a,d 3*), principales régions impliquées dans la reconnaissance de l'antigène. Les *reads* couvrant ces gènes sont regroupées par similitude de séquence. Le nombre de groupes de *reads* ainsi formés permet alors d'approximer le nombre de clones du TCR infiltrant la tumeur (BOLOTIN *et al.* 2015). Une autre possibilité peut être d'utiliser des protocoles de préparation de librairie spécifiques des gènes codant pour le TCR, nécessitant alors un séquençage spécifique dédié à cette analyse (MATOS *et al.* 2017). Cette procédure reste cependant peu utilisée car son coût peut être honéreux, son protocole difficile à impliquer et son analyse complexe (DEKOSKY *et al.* 2013; HOWIE *et al.* 2015).

e. Expression des protéines CD8 et PD-L1

Dans le cas d'une tumeur présentant un faible nombre de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dans son micro-environnement, un traitement par α PD-1 a peu de chance de déclencher une réponse immunitaire spécifique malgré une expression tumorale de PD-L1 (Q. WANG *et al.* 2017). Les CTL sont reconnaissables par la présence de la protéine CD8 à leur surface. Celle-ci permet de garder le TCR de la cellule T et le complexe CMH de la cellule cible proches pendant l'activation antigénique spécifique. Leur présence au sein de la tumeur avant introduction d'un α PD-1 est de bon pronostic dans le mélanome, ce qui suggère qu'elles jouent un rôle important dans la réponse au traitement (TUMEH *et al.* 2014). Les rôles pronostic et prédictif de la co-expression des protéines CD8 et PD-L1 n'ont cependant jamais été investigués.

L'expression de ces deux protéines au sein de la tumeur peut être quantifiée de deux façons. Un marquage IHC des deux protéines peut être réalisé sur un prélèvement tumoral à l'aide des anticorps spécifiques Sp142 (SpringBio, Ventana) ou 22C3 (Dako) pour PD-L1 et C8/144B (Dako) par exemple, ou bien, il est aussi possible de mesurer leur expression par le RNA-seq d'un échantillon tumoral.

f. Cellules immunitaires circulantes

L'immunothérapie vise à lever l'inhibition des cellules immunitaires induite par la tumeur. Il convient donc d'investiguer leur rôle dans la réponse ou la résistance aux α PD-1. Des données récentes soulignent l'implication possible des cellules MDSC dans l'inhibition des cellules T et NK et dans la stimulation des cellules T-reg, favorisant ainsi la progression tumorale (WEBER *et al.* 2018). Il a aussi été montré qu'un profilage multi-paramétrique des cellules immunitaires

circulantes avant traitement pouvait constituer un marqueur de réponse au pembrolizumab dans le traitement du mélanome (WEIDE *et al.* 2016). Plus récemment encore, pour le mélanome, une analyse de leucocytes circulants suggère qu'un fort taux de TMB associé à re-dynamisation des cellules T induite par blocage de PD-1 corrélait à une bonne réponse aux α PD-1.

L'étude des cellules et de leurs marqueurs peut être réalisée par cytométrie en flux. Apparue au milieu du 20ème siècle, cette technique permet le phénotypage de cellules et la détermination de leur état et de leurs fonctions au moyen de mesures de spectre lumineux. Des cellules en suspension passent une-à-une devant plusieurs rayons lasers de différentes couleurs et différents angles d'émission. Les spectres lumineux renvoyés par les cellules sont alors mesurés par des détecteurs pour obtenir plusieurs mesures qui seront traduites en caractéristiques physiques et propriétés fluorescentes *a posteriori*. Il est ainsi possible de distinguer leur état (morte ou vivante), leur fonction (cytotoxique, régulatrice, ou suppressive p. ex.) et l'expression de protéines membranaires (PD-1, PD-L1 ou TIM-3 p. ex.).

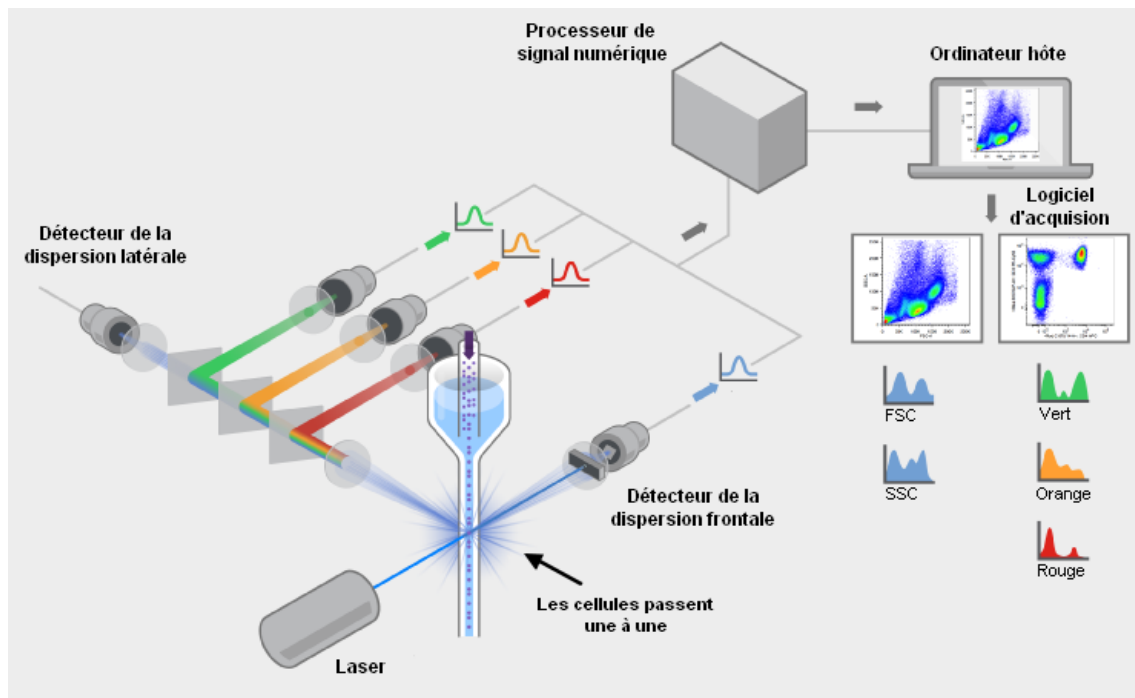


FIGURE 24. Procédure de phénotypage de cellules par cytométrie en flux. FSC : diffusion aux petits angles. SSC : diffusion aux grands angles.

IV. Objectifs du travail de thèse

L'arrivée de l'immunothérapie a bouleversé la prise en charge des cancers broncho-pulmonaires en démontrant tout son potentiel face aux chimiothérapies standards. Toutefois, il est maintenant nécessaire de rechercher des biomarqueurs d'efficacité ou de résistance pour sélectionner les patients les plus à même de tirer bénéfice de ces thérapies. La définition de marqueurs immunitaires sanguins, génomiques et transcriptionnelles permettant d'appréhender la réponse immunitaire et son évolution sous traitement représente ainsi un enjeu majeur pour la prise en charge des patients.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'identifier un profil prédictif de la réponse clinique, de la survie sans progression (SSP) et de la survie globale (SG) sous nivolumab utilisé en monothérapie pour le traitement de 2^{ème} ou 3^{ème} ligne de CBNPC de stade avancé. La réponse clinique a été évaluée selon le critère RECIST v1.2 par comparaison de deux scanners : l'un effectué avant introduction de l'immunothérapie et l'autre effectué deux mois après la première prise (SCHWARTZ *et al.* 2016). Les patients ont été classés selon l'évolution de leurs trois principales lésions :

- Progression : augmentation du volume des principales lésions de plus de 20%,
- Stabilité : évolution du volume des principales lésions entre plus ou moins 20%,
- Réponse : diminution du volume des principales lésions de plus de 20%.

La SSP a été définie comme la durée entre la première prise de nivolumab et la progression, constatée cliniquement ou à l'aide d'un scanner ; ou bien le décès avant mise en évidence d'une progression. La SG a été définie comme la durée entre la première prise de nivolumab et le décès. La prise de nivolumab a été considérée comme bénéfique pour le patient en terme de SSP si celle-ci dépassait 6 mois et en terme de SG si celle-ci dépassait 12 mois.

Plusieurs problématiques utilisant différentes technologies et techniques ont été soulevées :

- 1/ Le doublet de chimiothérapie à base de sels de platine reçu avant la prise du nivolumab a-t-il une influence sur la réponse à l'immunothérapie ?
- 2/ Existe-t-il un profil type de bonne réponse au nivolumab et ce profil est-il modifié par la prise du traitement ? Et plus simplement, peut-on définir un profil immunologique permettant de différencier un patient atteint de CBNPC d'une personne non-atteinte ?
- 3/ Une analyse des expressions géniques de PD-L1 et de CD8 par séquençage d'ARN permet-elle une meilleure prédiction de réponse que son expression protéique estimée par immunohistochimie ? Une signature transcriptionnelle simple de réponse au nivolumab peut-elle être définie ?
- 4/ L'étude des données de séquençage d'exomes d'un échantillon tumoral et d'un échantillon sain d'un patient permet-elle l'identification de biomarqueurs de résistance ou de bonne réponse au traitement par nivolumab ?

Afin de répondre à ces questions, l'étude s'est portée sur une cohorte unique, prospective et multicentrique (Centre George-François Leclerc, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon et Centre Léon Bérard). Ainsi, 115 patients atteints de CBNPC de stade IIIB ou IV traités par nivolumab en 2ème ou 3ème ligne de traitement dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation puis d'une AMM ont été inclus entre 2015 et 2018. Pour chacun de ces patients, plusieurs types de prélèvements et de données ont été récoltés dans les limites de disponibilité du matériel biologique, de sa qualité et de sa quantité (Figure 25) :

- 1/ **Données cliniques et pathologiques** : âge, sexe, consommation de tabac, état général, ligne(s) de traitement antérieure(s), histologie tumorale, stade de la maladie ou bien encore addictions oncéniques.
- 2/ Un prélèvement sanguin réalisé au moment de l'inclusion puis 15, 30, 60 et 90 jours après la mise en route du traitement et si possible à la progression pour effectuer une analyse élargie du **profil immunologique périphérique** du patient par cytométrie en flux le jour du prélèvement.
- 3/ Des **marquages par immunohistochimie** des protéines PD-L1 (clone Sp142, SpringBio Ventana) et CD8 (clone C8/144B, Dako) réalisés sur un prélèvement anatomopathologique de la tumeur.
- 4/ Le **profil transcriptomique tumoral** obtenu par une analyse bio-informatique d'un séquençage d'ARN extrait de la tumeur.
- 5/ Les **profils génétiques** d'un échantillon tumoral et d'un échantillon sain du patient obtenus par une analyse bio-informatique de séquençage d'exomes.

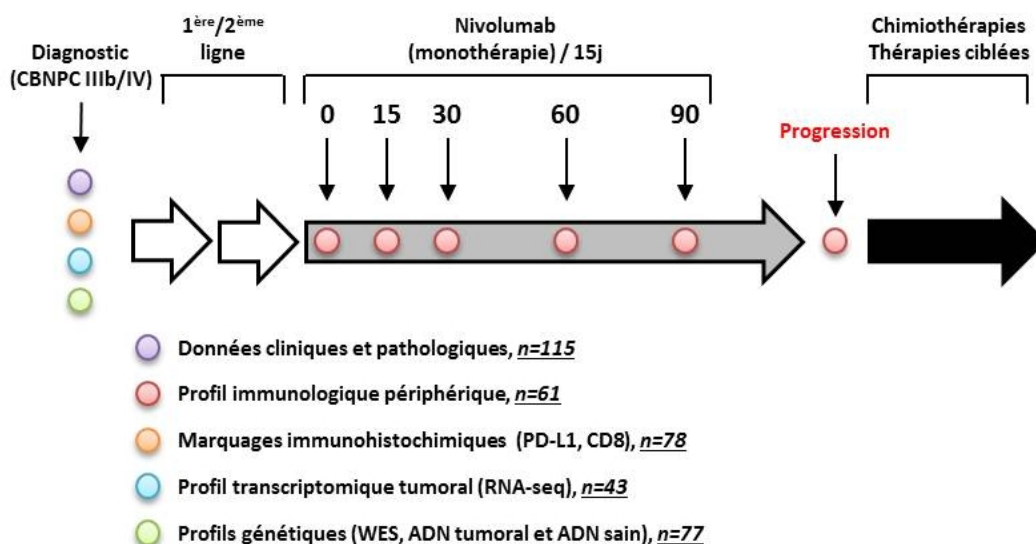


FIGURE 25. Protocole de suivi et de collection biologique pour les analyses génétiques, histologiques et immunitaires des patients atteints de cancer bronchiques non à petites cellules (CBNPC) et traités par nivolumab. n : nombre de patients pour lesquels la donnée est disponible.

Les analyses d'ADN et d'ARN tumoraux ont été réalisées à partir d'ADN et d'ARN extraits de tissus tumoraux fixés au formol et inclus dans la paraffine ou plus rarement congelés, tandis que l'ADN de l'échantillon sain a été extrait de leucocytes circulants issus d'un prélèvement sanguin. Pour l'analyse de l'ADN de l'échantillon sain, le consentement écrit du patient a été recueilli.

RÉSULTATS

ARTICLE 1 : « Response to first line chemotherapy regimen is associated with efficacy of nivolumab in non-small-cell lung cancer. »

Le nivolumab, anticorps monoclonal inhibiteur de la protéine PD-1, a démontré son efficacité dans le traitement de seconde ligne métastatique des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules après progression sous chimiothérapie standard. Outre leur capacité à éliminer de manière directe les cellules tumorales, les chimiothérapies cytotoxiques employées en première ligne de traitement pourraient aussi induire une réponse immune antitumorale (GALLUZZI *et al.* 2017).

L'objectif de l'étude présentée ci-après a été de déterminer si les types de sels de platine et de chimiothérapie reçus en première ligne de traitement ainsi que la réponse à ce doublet ont une influence sur le bénéfice clinique à la prise de nivolumab. Les données cliniques de première ligne de traitement ont pu être récoltées de manière rétrospective pour l'intégralité des 115 patients de notre cohorte de CBNPC traités par nivolumab en deuxième ou troisième ligne. Ces patients ont tous été traités par doublet cytotoxique avant prise de nivolumab : un sel de platine (cisplatine ou carboplatine) couplé à de la gemcitabine, du pemetrexed ou à un taxane.

On observe que ni le type de platine, ni la chimiothérapie associée n'ont d'impact statistiquement significatif sur la réponse au nivolumab dans cette cohorte. En revanche, les patients ayant vu une stabilisation ou une régression de leurs lésions sous doublet cytotoxique sont ceux ayant une meilleure réponse clinique au nivolumab, une meilleure survie sans progression et une meilleure survie globale. En effet, on observe que 60% des patients (54/90) ayant eu un bénéfice clinique (stabilisation ou réponse partielle) à la prise du doublet cytotoxique ont aussi eu un bénéfice clinique à la prise de nivolumab, contre seulement 8% (2/25) chez les patients n'ayant pas eu de bénéfice clinique à la première ligne de traitement. Ces constatations restent valables dans un modèle de régression multiple avec les paramètres cliniques communs que sont l'âge, le sexe, l'état général du patient, l'histologie tumorale, la consommation de tabac, le stade de la maladie et la ligne de traitement.

Ainsi, cette analyse suggère que l'efficacité du doublet cytotoxique employé en première intention peut être un bon marqueur de bénéfice à la prise de nivolumab en ligne ultérieure.

Ce travail a fait l'objet d'un poster au meeting annuel de l'ASCO 2017 à Chicago et d'une publication dans la revue *OncoImmunology* :

Kaderbhai, C. G., **Richard, C.**, Fumet, J. D., Aarnink, A., Ortiz-Cuaran, S., Response to first line chemotherapy regimen is associated with efficacy of nivolumab in non-small-cell lung cancer. *Oncoimmunology* **6**, e1339856 (2017).

Kaderbhai, C. G., **Richard, C.**, Fumet, J. D., Aarnink, A., Ortiz-Cuaran, S., Response to first-line chemotherapy regimen to predict efficacy of nivolumab in lung cancer. *Abstract #3026*, Présenté au congrès annuel de l'ASCO, Chicago, IL. USA (2017).

Response to first line chemotherapy regimen is associated with efficacy of nivolumab in non-small-cell lung cancer

Courèche-Guillaume Kaderbhai^{a,b}, Corentin Richard^{b,c}, Jean David Fumet^{a,b}, Anne Aarnink^a, Sandra Ortiz-Cuaran^d, Maurice Pérold^d, Pascal Foucher^e, Bruno Coudert^a, Laure Favier^a, Aurélie Lagrange^a, Emeric Limagne^{b,c}, Romain Boidot^{b,c}, Sylvain Ladoire^{a,b}, Michel Poudenx^f, Marius Ilie^{g,h,i}, Paul Hofman^{g,h,i}, Pierre Saintigny^d, and François Ghiringhelli^{a,b,c}

^aDepartment of Medical Oncology, Center GF Leclerc, Dijon, France; ^bPlatform Transfer in Biological Oncology, Dijon, France; ^cGIMI Genetic and Immunology Medical Institute, Dijon, France; ^dDepartment of Medical Oncology, Center Leon Berard, Lyon, France; ^eDepartment of Thoracic Oncology CHU, Dijon, France; ^fDepartment of Pulmonary Oncology, Antoine Lacassagne Comprehensive Cancer Center, FHU OncoAge, Nice, France; ^gLaboratory of Clinical and Experimental Pathology, FHU OncoAge, CHU de Nice, Université Côte d'Azur, Nice, France; ^hInstitute for Research on Cancer and Ageing, Nice (IRCAN), INSERM U1081/UMR CNRS 7284, FHU OncoAge, Université Côte d'Azur, Nice, France; ⁱHospital-Integrated Biobank (BB-0033-00025), FHU OncoAge, CHU de Nice, Université Côte d'Azur, Nice, France

ABSTRACT

Nivolumab, an anti PD-1 checkpoint inhibitor has demonstrated efficacy in metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients after failure to standard chemotherapy. Standard chemotherapy agents could promote antitumor immune response. We thus examined whether the response to first line chemotherapy could impact on nivolumab benefit. One hundred and 15 patients with NSCLC were included in this retrospective study from 4 different French centers. Forty-three squamous cell carcinomas (SCC), and 72 non-SCC received nivolumab between 2015 and 2016 (3 mg/kg IV Q2W). Response to first-line chemotherapy and to nivolumab was retrospectively assessed on CT-scan by central review. The association between RECIST response to first-line chemotherapy and nivolumab efficacy were determined using Fisher's exact test and Cox proportional hazard model. Respectively 46 (40%), 44 (38%) and 25 (22%) patients experienced partial response (PR), stable disease (SD), or progressive disease (PD) in response to first-line platinum- based chemotherapy. Twenty 5 (21%), 34 (30%), 56 (49%) respectively experienced PR, SD and PD in response to nivolumab. 60% (54/90) of patients who experienced clinical benefit (PR + SD) after first-line chemotherapy also had clinical benefit after nivolumab, while only 20% (5/25) of patients with initial PD subsequently experienced clinical benefit with nivolumab (Fisher's exact test, $P = 0.001$). The type of first-line doublet chemotherapy did not influence the response rate to nivolumab. Univariate and multivariate analyses showed that patients with clinical benefit from first-line chemotherapy had higher second-line PFS ($P = 0.003$) (median PFS on nivolumab of 5, 3.3 and 1.9 months for patients with PR, SD and PD in response to first-line therapy, respectively). Similar results were obtained for OS. Thus this study suggests that the efficacy of first-line chemotherapy may be a valuable surrogate marker of the benefit of nivolumab in terms of PFS and OS.

ARTICLE HISTORY

Received 8 May 2017
Revised 31 May 2017
Accepted 1 June 2017

KEYWORDS

First-line chemotherapy;
nivolumab; Non-small-cell
lung cancer

Introduction

Lung cancer is a major public health issue and the leading cause of cancer-related death worldwide. In 2012, 1.8 million of new cases were diagnosed worldwide, representing around 13% of all detected cancers.¹ Platinum-based doublet chemotherapy is the standard first-line treatment of patients with metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC) with no targetable oncogenic drivers, while tyrosine kinase inhibitors are the standard of care in first-line therapy for those harboring a genomic alteration of ALK, ROS1 or EGFR.²⁻⁴

Currently, it is well established that the immune system plays a key role in both the control of tumor induction, and tumor progression.^{5,6} Consequently, evasion of this immune surveillance mechanism by the tumor is a hallmark of cancer, and is a pre-requisite for tumor progression,⁷ especially in

NSCLC. Overexpression of inhibitory receptors of the immune response, for example Programmed cell Death-Ligand 1 (PD-L1), is one of the mechanisms involved in tumor immunosubversion.^{6,8} Interaction between PD-L1 and its receptor PD-1 (on CD8 T cells) blunts T-cell antitumor functions, thus leading to immunoescape. In this context, the management of cancer and particularly of NSCLC, has taken a major step forward with the emergence of new therapies targeting immune checkpoints.⁹ Nivolumab, a highly selective, fully human IgG4 antibody directed against PD-1, can disrupt the engagement of PD-1 with its ligands (PD-L1 and 2) and prevent inhibitory signals in T cells, thus promoting the function of cytotoxic T cell effectors against tumor cells. Two randomized phase 3 trials have demonstrated the superiority of nivolumab over docetaxel

as second-line treatment in advanced NSCLC patients,^{10,11} thus redefining the management of NSCLC patients. Anti-PD1 agents induce durable clinical responses regardless of the histological.¹² However, only 20 to 25% of NSCLC patients experience a sustainable response to immune-checkpoint inhibitors.¹³⁻¹⁵ Therefore, finding biologic or clinical biomarkers that could help to select patients who respond to immune checkpoint blockade remains a key challenge.¹⁶

In addition to their capacity to directly kill tumor cells, cytotoxic agents may also affect the immune response. Notably, by killing tumor cells, cytotoxic agents could induce an antitumor immune response.¹⁷ These data provide a rationale to consider that effective standard chemotherapy inducing immunogenic cell death may improve antitumor immune response, whereas chemotherapy that is unable to kill a sufficient amount of cancer cells may not impact anticancer immune response. A previous meta-analysis has shown that response to the first-line regimen impacted modestly, but significantly, the response to second-line therapy.¹⁸ However, to the best of our knowledge, there are no data in the literature assessing the potential association between the response to the first-line chemotherapy doublet to the benefit of immunotherapy. Here, we examined in a cohort of 115 patients treated with nivolumab as second-line or third-line, whether response to first line platinum-based chemotherapy is associated with the benefit, in terms of response, Progression-Free Survival (PFS) and Overall survival (OS) of nivolumab.

Material and methods

Patients

This retrospective cohort included 115 patients with locally advanced (stage IIIB) or metastatic (stage IV) NSCLC experiencing disease progression during or after platinum-based doublet in 4 French thoracic oncology centers (Dijon University Hospital, Dijon Cancer Center, Center Léon Bérard and Nice University Hospital Biobank – BB-0033–00025). All consecutive patients who received nivolumab at the recommended dose (3mg/kg q2 weeks), regardless of whether patients received nivolumab in a clinical trial or after its EMA approval, were retrospectively included. We excluded from the analysis the patients who received nivolumab as first-line, or who did not receive platinum-based doublets as first-line treatment, as well as the patients for whom response to first-line chemotherapy could not be determined with RECIST criteria (see flowchart in Fig. S1). The following data were collected from each patients' medical records: age, sex, smoking status, *EGFR* and *KRAS* mutational status, ECOG performance status at the time of nivolumab initiation, nature of first-line platinum-based doublet, best RECIST response to first-line chemotherapy, date of initiation of first-line chemotherapy, date of disease progression during or after first-line chemotherapy, number of treatment lines before nivolumab initiation, date of nivolumab initiation, best RECIST 1.1 response to nivolumab, date of progression during or after nivolumab and death from any cause or last follow-up. The database was closed on 1 February 2017. Three physicians (CK, JDF and AA) reviewed all CT-scans to validate response to first-line chemotherapy and to nivolumab.

Approval from the local ethics committees was not necessary in accordance with French legislation governing strictly observational studies. The clinical database was declared and approved by the French authorities for data protection (CNIL, CCTIRS). PD-L1 expression was assessed by immunohistochemistry using SP142 mAb

Statistical analysis

All patients were followed up until death or the end of data recording (1 February 2017). Progression-free survival (PFS) was calculated (for first-line chemotherapy and for nivolumab treatment) as the time from the date of the treatment start to the date of disease progression by the RECIST criteria or death. A maintenance regimen was not considered as a second line. Overall survival (OS) was calculated as the time from the date of the first-line treatment start for metastatic disease, to the date of death. Median follow-up, with a 95% confidence interval (CI), was calculated using the reverse Kaplan-Meier method. Patient and disease characteristics were examined using the Fisher's exact test for qualitative variables, and the Kruskal-Wallis test for continuous variables, as appropriate, to compare groups of patients presenting either partial response (PR), stable disease (SD) or progressive disease (PD) to first line chemotherapy. Response to treatment was determined on CT scans using RECIST version 1.1.¹⁹ Response rates to nivolumab were compared with the response rate to the first-line regimen using the Fisher's exact test. Survival probabilities were estimated using the Kaplan-Meier method and survival curves were compared using the log-rank test. A multivariate Cox proportional hazard model was used to estimate the impact of response to first-line regimen on PFS and OS, after adjusting for clinical and pathologic parameters that were significant in univariate analysis. Statistical analyses were performed using the R software. All tests were 2 sided, and *P* values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Patient characteristics

In the 4 participating centers, 151 patients were treated with second-line nivolumab monotherapy. When the database was closed, 101 patients were dead. Three patients who did not receive platinum-based chemotherapy as first-line and 3 patients who received nivolumab in first-line, were excluded from the analysis. Thirty patients additional were excluded because the radiological evaluation of response to first-line chemotherapy could not be performed (see flowchart of the study in Fig. S1). The final population included 115 patients, among whom 88 (77%) were men and 101 (87%) were smokers or former smokers. The most common histological type was adenocarcinoma (60%, *n* = 69), followed by squamous-cell carcinoma (36.4%, *n* = 43), large-cell neuroendocrine carcinoma (0.9%, *n* = 1), and large cell carcinomas (1.7%, *n* = 2). First-line regimen comprised carboplatin or cisplatin plus either gemcitabine (20 patients (17%)), docetaxel or paclitaxel [37 patients (32%)] and or pemetrexed [58 patients (50%)]. Only patients with adenocarcinoma received the platinum-

Table 1. Patient and tumor characteristics (n = 115).

| | | Response to first line | | | | p-value |
|--------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------|-------------|
| | | Partial response N=46 | Stable disease N=44 | Progressive disease N=25 | Overall N=115 | |
| Age (year) | median (min;max) | 66 [36;85] | 63 [43;84] | 66 [55;80] | 66 [36;85] | 0.28 |
| | mean(sd) | 66 (11) | 63 (10) | 65 (8) | 65 (10) | |
| Sex | Male | 36 (78%) | 33 (75%) | 19 (76%) | 88 (77%) | 0.93 |
| | Female | 10 (22%) | 11 (25%) | 6 (24%) | 27 (23%) | |
| WHO PS | 0 | 18 (39%) | 15 (34%) | 7 (28%) | 40 (35%) | 0.64 |
| | 1 | 28 (61%) | 29 (66%) | 18 (72%) | 75 (65%) | |
| Histology | Adenocarcinoma | 26 (57%) | 30 (68%) | 13 (52%) | 69 (60%) | 0.23 |
| | Epidermoid | 19 (41%) | 12 (27%) | 12 (48%) | 43 (37%) | |
| | Other | 1 (2%) | 2 (5%) | 0 (0%) | 3 (3%) | |
| EGFR | No | 26 (57%) | 30 (68%) | 13 (52%) | 69 (60%) | 0.41 |
| | Yes | 2 (4%) | 2 (5%) | 0 (0%) | 4 (3%) | |
| | Unknown | 18 (39%) | 12 (27%) | 12 (48%) | 42 (37%) | |
| KRAS | No | 15 (33%) | 24 (55%) | 10 (40%) | 49 (43%) | 0.17 |
| | Yes | 12 (26%) | 8 (18%) | 3 (12%) | 23 (20%) | |
| | Unknown | 19 (41%) | 12 (27%) | 12 (48%) | 43 (37%) | |
| PD-L1 | > 1% | 11 (24%) | 14 (32%) | 8 (32%) | 33 (29%) | 0.08 |
| | negative | 20 (43%) | 9 (20%) | 4 (16%) | 33 (29%) | |
| | Unknown | 15 (33%) | 21 (48%) | 13 (52%) | 49 (42%) | |
| Smoking | Yes | 42 (91%) | 38 (86%) | 21 (84%) | 101 (88%) | 0.62 |
| | No | 4 (9%) | 6 (14%) | 4 (16%) | 14 (12%) | |
| First line doublet | gemcitabine taxane | 7 (15%) | 9 (20%) | 4 (16%) | 20 (17%) | 0.55 |
| | pemetrexed | 17 (37%) | 10 (23%) | 10 (40%) | 37 (32%) | |
| | Carboplatin | 22 (48%) | 25 (57%) | 11 (44%) | 58 (51%) | |
| Type of platin | Cisplatin | 20 (43%) | 18 (41%) | 12 (48%) | 50 (43%) | 0.85 |
| | Cisplatin | 26 (57%) | 26 (59%) | 13 (52%) | 65 (57%) | |
| Line of nivolumab | Second | 24 (52%) | 23 (52%) | 15 (60%) | 62 (54%) | 0.79 |
| | Third | 22 (48%) | 21 (48%) | 10 (40%) | 53 (46%) | |

pemetrexed doublet. Only 9 patients received bevacizumab in addition to the platine-based first line doublet. The median age at diagnosis was 66.1 y. The clinical characteristics of the study population are listed in Table 1

Forty-six (40%) patients experienced radiological objective response, including 2 complete responses (CR) (1.7%); while 44 (38.3%) patients presented stable disease (SD) and 25 (21.7%) presented progressive disease (PD) as their best response during first-line chemotherapy. Sixty-two (54%) patients received nivolumab as second-line therapy and 53 (46%) as third-line. Best response to nivolumab was PR, SD and PD in 25 (21.7%), 34 (29.6%), 56 (48.7%) patients, respectively. Median PFS from start of nivolumab was 3 months (95%CI [2.1; 4.4]). Median OS after nivolumab initiation was 8.8 months (95%CI [7.2; NR]).

Association between nivolumab benefit and response to first line chemotherapy

We first investigated whether the type of chemotherapy received as first-line influenced the RECIST response rate (CR and PR) and PFS with nivolumab. We observed a similar response rate to nivolumab, irrespective of the type of doublet received as first-line (20%, 21.6% and 22.4% for gemcitabine, taxane, pemetrexed doublets, respectively, Fisher's exact test ($P = 0.52$)). Similarly, the type of doublet received in first-line did not influence nivolumab PFS (median PFS 4.4, 3.9 and 2.3 for gemcitabine, taxane, pemetrexed doublets, respectively; log-rank test $P = 0.37$) (Fig. S2). Similarly, we observed

comparable response rates and PFS under nivolumab, irrespective of the use of cisplatin or carboplatin (18.5% and 26% of responders, respectively, $P = 0.56$; median PFS 2.4 and 4.1 months respectively, log-rank test $P = 0.31$) (Fig. S3). The use of nivolumab as second- or third-line therapy did not influence the response rate or PFS (16.1% and 28.3% of responders in 2nd or 3rd line respectively, $P = 0.28$; median PFS of 2.8 and 3.3 months respectively, log-rank test $P = 0.55$) (Fig. S4). We then examined whether response to first-line therapy was associated with the response rate and PFS under nivolumab. Patients who had PR to first-line chemotherapy had an improved response rate to nivolumab. Interestingly, while 35% IC95% [0.21; 0.49] (16/46) of first line-responding patients (PR) obtained an objective response to nivolumab, the response rate was only 16% IC95% [0.05–0.27] (7/44) for patients with SD, and 8% IC95% [0.02–0.23] (2/25) for patients with PD during first-line chemotherapy, respectively (Fisher's exact test $P = 0.001$) (Fig. 1A). PFS from the initiation of nivolumab treatment was also significantly different according to best response to first-line treatment with a median PFS of 5, 3.3, and 1.9 months for patients with initial PR, SD or PD, respectively ($P = 0.003$, Fig. 1B). Response to first-line chemotherapy was significantly associated with the response rate and PFS in patients treated with nivolumab in the second-line setting. However, these results are not significant for patients treated with nivolumab in third-line setting (Fig. S5). No significant differences were observed for other clinico-pathological features between the 3 groups of patients (Table 1).

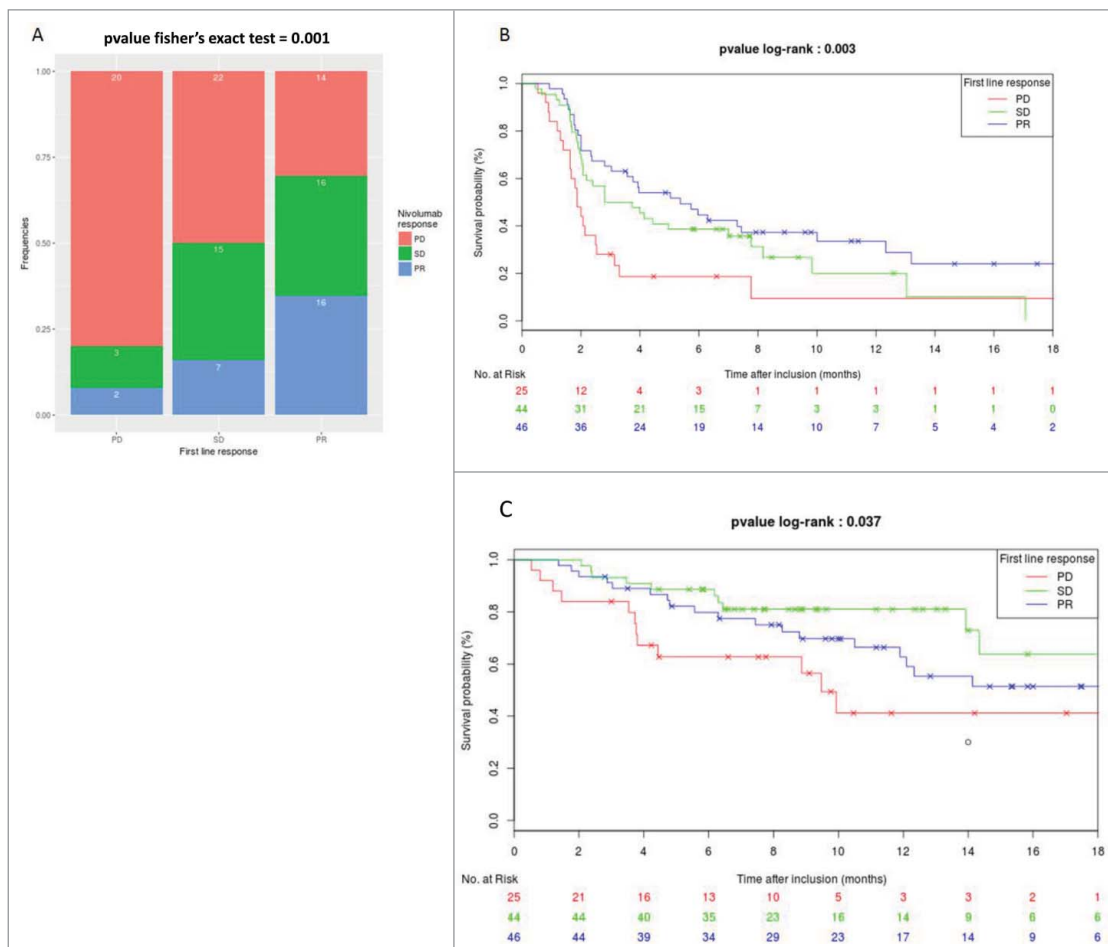


Figure 1. Association between response rate to first line regimen and efficacy of nivolumab. A. Repartition of response rate under nivolumab therapy in function of RECIST response to first line regimen therapy. B. Kaplan-meier curves of PFS under nivolumab therapy in function of RECIST response to first line regimen therapy. C. Kaplan-meier curves of OS under nivolumab therapy in function of RECIST response to first line regimen therapy.

Univariate Cox proportional hazard model indicated that an objective response to first-line therapy was significantly associated with improved PFS. In multivariate analyses, only gender and response to first-line were independently associated with improved PFS (Table 2). Similarly, a OS from the start of nivolumab treatment was significantly different in the 3 groups defined by best response to first-line treatment ($P = 0.04$), with median OS of 9.9, 8.6 and 6.6 months for patients with PR, SD and PD after first-line chemotherapy, respectively (Fig. 1C). Univariate and multivariate analyses also indicated that objective response to first-line therapy was significantly associated with an improvement of OS (Table 3).

Discussion

Monoclonal antibodies targeting PD-1 and PD-L1 have opened up a new field in thoracic oncology. Nivolumab, pembrolizumab and atezolizumab have demonstrated their superiority compared with chemotherapy in second-line setting, with median PFS of about 3 months, and median OS of approximately 12 months.^{10,11,20,21} The extent and durability of responses have revolutionized the conceptual approach to advanced lung cancer treatment. Pembrolizumab has demonstrated in first-line its superiority over platinum-based

chemotherapy in patients with NSCLC with a high level of PD-L1 expression.²² However, less than a quarter of patients experience a clinical benefit from anti-PD-1 or anti-PD-L1 monoclonal antibodies. Therefore, biomarkers that can reliably predict the efficacy of immune checkpoint blockade are still lacking.

Here, we provide evidence supporting the fact that the quality of the tumor response obtained on first-line platinum-based chemotherapy may be a surrogate marker of subsequent benefit to nivolumab as second- or third-line therapy. In particular, in patients with PD after first-line chemotherapy, only 2 patients (8%) experienced PR to nivolumab (3 and 6.6 months of PFS for this 2 patients), with a median PFS of less than 2 months for this group of patients, raising questions about the clinical relevance of such treatment in this subset of patients.

Tumor labeling with anti PD-L1 antibody has been associated with better response to immune checkpoint inhibitors.^{23,24} However, among patients whose tumor was negative for PD-L1 expression by immunohistochemistry, about 10% exhibit a PR to anti PD-1/PD-L1 mAb, with a median PFS of 4 months.²⁰ In addition, since PD-L1 expression is heterogeneous and variable of over time, PD-L1 is not considered a definitive biomarker.^{25,26} Thus, the identification of other markers remains a very active area of translational research.

Table 2. Univariate and multivariate analysis (Cox regression) for factors associated with PFS.

| | Univariate analysis | | | Multivariate analysis | | |
|------------------------|---------------------|--------------|--------------|-----------------------|---------------|---------------|
| | HR | 95%CI | p-value | HR | 95%CI | p-value |
| Age* | 0.98 | [0.96; 1.01] | 0.13 | 0.98 | [0.95; 1.01] | 0.18 |
| Sex | | | | | | |
| Female | 1 | | | 1 | | |
| Male | 1.26 | [0.76; 2.1] | 0.36 | 1.81 | [1.02; 3.20] | 0.04 |
| WHO PS | | | | | | |
| 0 | 1 | | | 1 | | |
| 1 | 1.02 | [0.66; 1.59] | 0.92 | 1.05 | [0.62; 1.79] | 0.85 |
| Histology | | | | | | |
| Adenocarcinoma | 1 | | | 1 | | |
| Epidermoid | 0.87 | [0.56; 1.34] | 0.52 | 1.03 | [0.46; 2.31] | 0.94 |
| Smoking | | | | | | |
| No | 1 | | | 1 | | |
| Yes | 0.88 | [0.48; 1.63] | 0.70 | 1.06 | [0.55; 2.03] | 0.87 |
| Stage | | | | | | |
| IIIB | 1 | | | 1 | | |
| IV | 0.87 | [0.53; 1.79] | 0.93 | 0.63 | [0.28; 1.40] | 0.25 |
| Line Nivolumab | | | | | | |
| 2 | 1 | | | 1 | | |
| 3 | 0.88 | [0.57; 1.34] | 0.55 | 0.89 | [0.55; 1.44] | 0.63 |
| Type of doublet | | | | | | |
| Pemetrexed | 1 | | | 1 | | |
| Gemcitabine | 0.66 | [0.36; 1.22] | 0.18 | 0.58 | [0.24; 1.46] | 0.25 |
| Taxane | 0.81 | [0.50; 1.30] | 0.38 | 0.70 | [0.029; 1.71] | 0.44 |
| Type of platin | | | | | | |
| carboplatin | 1 | | | 1 | | |
| cisplatin | 1.25 | [0.81; 1.92] | 0.31 | 1.13 | [0.64; 1.99] | 0.67 |
| Response to first line | | | | | | |
| PD | 1 | | | 1 | | |
| SD | 0.55 | [0.32; 0.95] | 0.03 | 0.43 | [0.23; 0.80] | 0.008 |
| PR | 0.39 | [0.26; 0.69] | 0.001 | 0.32 | [0.17; 0.59] | 2.6e-4 |
| KRAS | | | | | | |
| No | 1 | | | 1 | | |
| Yes | 0.65 | [0.35; 1.21] | 0.18 | | | |
| PD-L1 | | | | | | |
| Negative | 1 | | | 1 | | |
| >1% | 0.97 | [0.55; 1.69] | 0.90 | | | |

*hazard ratio for continuous variable was calculated for one unit.

First-line chemotherapy may affect patient's immune system. Recent evidence underlines that cell death induced by some cytotoxic agents could induce a process called "immunogenic cell death." In mice and humans, some drugs, such as anthracyclines, cyclophosphamide and oxaliplatin induce this particular type of cell death, which induces the translocation of calreticulin to the cell surface, and release of HMGB1, ATP and annexin 1.²⁷⁻²⁹ These molecules promote phagocytosis of dying cells by dendritic cells, as well as optimal presentation of tumor antigen, and recruitment and optimal polarization of CD8+ T cells. This activation in turn promotes stimulation of patient's anti-tumor immune response, and a durable adaptive T cells response that can then be amplified by checkpoint inhibitors.³⁰ Preclinical data in the context of spontaneous lung cancer reveals that the combination of cyclophosphamide and oxaliplatin is able to induce both immune response and tumor shrinkage, and may be synergic with checkpoint inhibitors.³¹

While carboplatin and cisplatin are usually considered to be non-immunogenic,^{32,33} it is currently unknown whether cytotoxics used in combination with cisplatin or carboplatin may be immunogenic. Indeed, while gemcitabine has been reported to induce immunogenic cell death,³⁴ the immune properties of pemetrexed and taxane are not fully described. In addition to its capacity to induce immune cell death, chemotherapy may

have other positive effects on the immune system. For example, gemcitabine can eliminate myeloid derived suppressor cells (MDSCs), a population of immune cells that blunt antitumor immune response.^{35,36} Furthermore, there is a strong rationale to consider that elimination of immunosuppressive cells may be a powerful tool to improve the efficacy of checkpoint inhibitors.³⁷ Additional studies are required to determine the effects of pemetrexed and taxanes on immunosuppressive cells, such as regulatory T cells and myeloid derived suppressor cells.

Previous data suggest that tumors with a high mutational load have high neoantigen levels, and are thus more prone to induce T-cell immune response.³⁸⁻⁴⁰ These tumors are also considered to be the best candidates for immunotherapy.^{41,42} Such high levels of genetic instability could also lead to better response to cytotoxic agents, because high tumor genetic instability negatively impacts on the capacity of cancer cells to support additional damage induced by cytotoxic chemotherapies. This hypothesis should be tested in biomarker studies, using tumor exome sequencing.

Our data raise the hypothesis that clinical response to platinum-based doublet may trigger response and prime the efficacy of subsequent immune checkpoint blockers. However, previous data also suggest that response to the first-line regimen is also associated with better outcome of second line classical cytotoxic

Table 3. Univariate and multivariate analysis (Cox regression) for factors associated with OS.

| | Univariate analysis | | | Multivariate analysis | | |
|------------------------|---------------------|--------------|-------------|-----------------------|--------------|-------------|
| | HR | 95%CI | p-value | HR | 95%CI | p-value |
| Age* | 1 | [0.97; 1.04] | 0.91 | 1 | [0.96;1.04] | 0.80 |
| Sex | | | | | | |
| Female | 1 | | | 1 | | |
| Male | 0.97 | [0.48; 2.00] | 0.94 | 1.18 | [0.55; 2.53] | 0.67 |
| WHO PS | | | | | | |
| 0 | 1 | | | 1 | | |
| 1 | 1.15 | [0.60; 2.22] | 0.66 | 1.23 | [0.57; 2.64] | 0.60 |
| Histology | | | | | | |
| ADK | 1 | | | 1 | | |
| CE | 0.87 | [0.46; 1.63] | 0.66 | 0.51 | [0.17; 1.59] | 0.25 |
| Smoking | | | | | | |
| No | 1 | | | 1 | | |
| Yes | 0.92 | [0.38; 2.19] | 0.84 | 0.82 | [0.32; 2.08] | 0.67 |
| Stage | | | | | | |
| IIIB | 1 | | | 1 | | |
| IV | 0.92 | [0.39; 2.20] | 0.85 | 0.63 | [0.57; 2.64] | 0.44 |
| Line Nivolumab | | | | | | |
| 2 | 1 | | | 1 | | |
| 3 | 1.32 | [0.71; 2.46] | 0.38 | 1.43 | [0.72; 2.83] | 0.30 |
| Type of doublet | | | | | | |
| Pemetrexed | 1 | | | 1 | | |
| Gemcitabine | 0.64 | [0.25; 1.62] | 0.35 | 0.91 | [0.27; 3.01] | 0.88 |
| Taxane | 1.15 | [0.58; 2.27] | 0.68 | 1.59 | [0.48; 5.26] | 0.45 |
| Type of platin | | | | | | |
| carboplatin | 1 | | | 1 | | |
| cisplatin | 1.12 | [0.59; 2.09] | 0.73 | 1.12 | [0.51; 2.47] | 0.78 |
| Response to first line | | | | | | |
| PD | 1 | | | 1 | | |
| SD | 0.34 | [0.15; 0.80] | 0.01 | 0.30 | [0.12; 0.76] | 0.01 |
| PR | 0.56 | [0.27; 1.17] | 0.13 | 0.48 | [0.21; 1.08] | 0.08 |
| KRAS | | | | | | |
| No | 1 | | | 1 | | |
| Yes | 0.71 | [0.28; 1.80] | 0.47 | | | |
| PD-L1 | | | | | | |
| Negative | 1 | | | 1 | | |
| >1% | 1.40 | [0.63; 3.09] | 0.40 | | | |

*hazard ratio for continuous variable was calculated for one unit.

drugs.¹⁸ Thus, we cannot exclude the possibility that response to first-line chemotherapy is an intrinsic factor of better prognosis, regardless of the type of treatment used in second-line.

Our study has several limitations. First, the retrospective design implies that results must be interpreted with caution and must be validated in larger prospective trials and/or other retrospective cohorts of lung cancer patients. Similar results could also be easily validated in other cancers, where checkpoint blockers are currently used in second-line therapy, such as bladder or head and neck cancer. In addition, mixing patients treated by nivolumab as second- or third-line may have biased our results. However, similar results were obtained in both cohorts, suggesting that second-line therapy with cytotoxic agents did not impact on immunotherapy outcomes.

In conclusion, our study shows that objective response to first-line chemotherapy may be a valuable surrogate marker of benefit to the subsequent use of nivolumab as second or third line treatment. It also raises the hypothesis that cell death-induced by chemotherapy may promote the efficacy of nivolumab. Further biologic studies are required to determine whether clinically effective chemotherapy could positively affect *in situ* immune response. Our data may be rapidly validated by independent retrospective exploration of clinical trials using checkpoint inhibitors, such as pembrolizumab, atezolizumab

and nivolumab in second-line therapy. Finally, our data also provide a rationale for the use of checkpoint inhibitor as maintenance therapy in case of good response to front-line chemotherapy.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

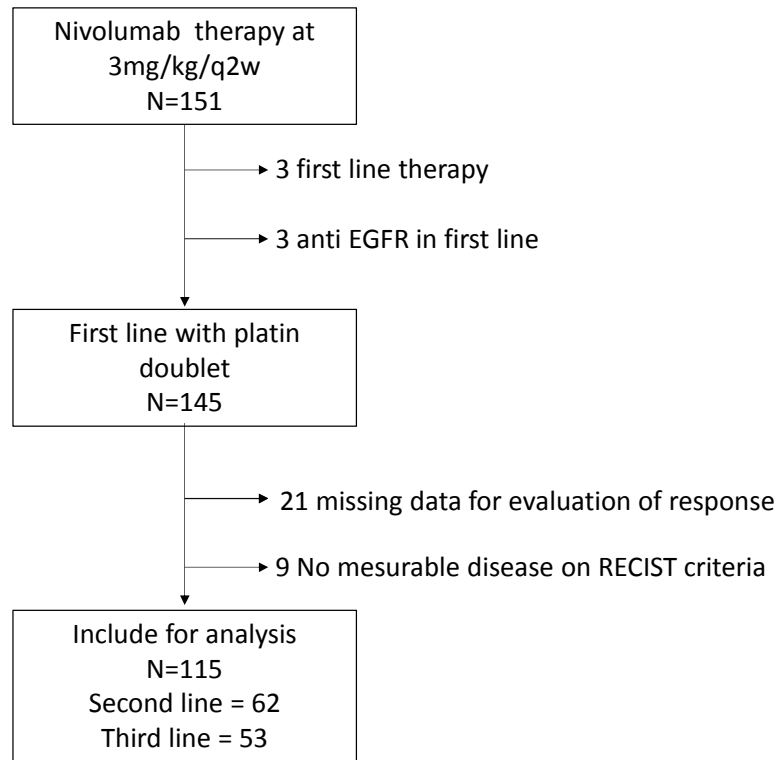
1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2):87-108; PMID:25651787
2. Leighl NB. Treatment paradigms for patients with metastatic non-small-cell lung cancer: first-, second-, and third-line. *Curr Oncol* 2012; 19(Suppl 1):S52-58; PMID:22787411
3. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, Serwatowski P, Gatzemeier U, Digumarti R, Zukin M, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(21):3543-51; PMID:18506025; <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0375>
4. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J, Johnson DH, Eastern Cooperative Oncology Group.

- Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Eng J Med* 2002; 346(2):92-8; PMID:11784875; <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011954>
5. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* 2013; 14(10):1014-22; PMID:24048123; <https://doi.org/10.1038/ni.2703>
 6. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331(6024):1565-70; PMID:21436444; <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
 7. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3(11):991-8; PMID:12407406; <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
 8. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Ann Rev Immunol* 2011; 29:235-71; PMID:21219185; <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>
 9. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4):252-64; PMID:22437870; <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
 10. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Eng J Med* 2015; 373(17):1627-39; PMID:26412456; <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507643>
 11. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Eng J Med* 2015; 373(2):123-35; PMID:26028407; <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504627>
 12. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 2015; 27(4):450-61; PMID:25858804; <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001>
 13. Gettinger S, Herbst RS. B7-H1/PD-1 blockade therapy in non-small cell lung cancer: current status and future direction. *Cancer J* 2014; 20(4):281-9; <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000063>
 14. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Eng J Med* 2012; 366(26):2455-65; PMID:22658128; <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200694>
 15. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Eng J Med* 2012; 366(26):2443-54; PMID:22658127; <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>
 16. Herbst RS, Soria JC, Kowanzet M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014; 515(7528):563-7; PMID:25428504; <https://doi.org/10.1038/nature14011>
 17. Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol* 2017; 17(2):97-111; PMID:27748397; <https://doi.org/10.1038/nri.2016.107>
 18. Di Maio M, Lama N, Morabito A, Smit EF, Georgoulas V, Takeda K, Quoix E, Hatzidaki D, Wachtors FM, Gebbia V, et al. Clinical assessment of patients with advanced non-small-cell lung cancer eligible for second-line chemotherapy: a prognostic score from individual data of nine randomised trials. *Euro J Cancer* 2010; 46(4):735-43; PMID:20045311; <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.12.013>
 19. Schwartz LH, Litere S, de Vries E, Ford R, Gwyther S, Mandrekar S, Shankar L, Bogaerts J, Chen A, Dancey J, et al. RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee. *Euro J Cancer* 2016; 62:132-7; PMID:27189322; <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.03.081>
 20. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Perez-Gracia JL, Han JY, Molina J, Kim JH, Arvis CD, Ahn MJ, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387(10027):1540-50; PMID:26712084; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01281-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01281-7)
 21. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanzet M, Vansteenkiste J, Mazieres J, Park K, Smith D, Artal-Cortes A, Lewanski C, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387(10030):1837-46; PMID:26970723; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00587-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00587-0)
 22. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Czoszi T, Fulop A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Eng J Med* 2016; 375(19):1823-33; PMID:27718847; <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>
 23. 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; PMID:27565919; <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.06.016>
 24. Grigg C, Rizvi NA. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction? *J Immunother Cancer* 2016; 4:48
 25. Gandini S, Massi D, Mandala M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 100:88-98; PMID:26895815; <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.02.001>
 26. Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, Yatabe Y, Wistuba, II, Hirsch FR, Committee IP. Programmed death-ligand 1 immunohistochemistry in lung cancer: in what state is this art? *J Thoracic Oncol* 2015; 10(7):985-9
 27. Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, inflammation, and immunity: A troika governing cancer and its treatment. *Cell* 2016; 166(2):288-98; PMID:27419869; <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.051>
 28. Luo M, Fu L. The effect of chemotherapy on programmed cell death 1/programmed cell death 1 ligand axis: some chemotherapeutic drugs may finally work through immune response. *Oncotarget* 2016; 7(20):29794-803; PMID:26919108
 29. Garg AD, Romano E, Rufo N, Agostinis P. Immunogenic versus tolerogenic phagocytosis during anticancer therapy: mechanisms and clinical translation. *Cell Death Differ* 2016; 23(6):938-51; PMID:26891691; <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.5>
 30. Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell* 2015; 28(6):690-714; PMID:26678337; <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.10.012>
 31. Pfirschke C, Engblom C, Rickelt S, Cortez-Retamozo V, Garris C, Pucci F, Yamazaki T, Poirier-Colame V, Newton A, Redouane Y, et al. Immunogenic chemotherapy sensitizes tumors to checkpoint blockade therapy. *Immunity* 2016; 44(2):343-54; PMID:26872698; <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.11.024>
 32. Martins I, Kepp O, Schlemmer F, Adjemian S, Tailler M, Shen S, Michaud M, Menger L, Gdoura A, Tajeddine N, et al. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* 2011; 30(10):1147-58; PMID:21151176; <https://doi.org/10.1038/onc.2010.500>
 33. Hato SV, Khong A, de Vries IJ, Lesterhuis WJ. Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics. *Clin Cancer Res* 2014; 20(11):2831-7; PMID:24879823; <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3141>
 34. Gujar SA, Clements D, Lee PW. Two is better than one: Complementing oncolytic virotherapy with gemcitabine to potentiate antitumor immune responses. *Oncoimmunology* 2014; 3(1):e27622; PMID:24804161; <https://doi.org/10.4161/onci.27622>
 35. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rebe C, Ghiringhelli F. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* 2010; 70(8):3052-61; PMID:20388795; <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3690>
 36. Bruchard M, Mignot G, Derangere V, Chalmin F, Chevriaux A, Vegran F, Boireau W, Simon B, Ryffel B, Connat JL, et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat*

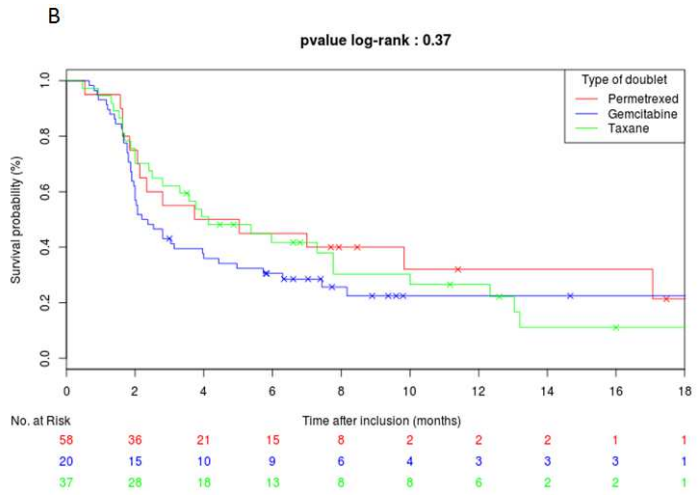
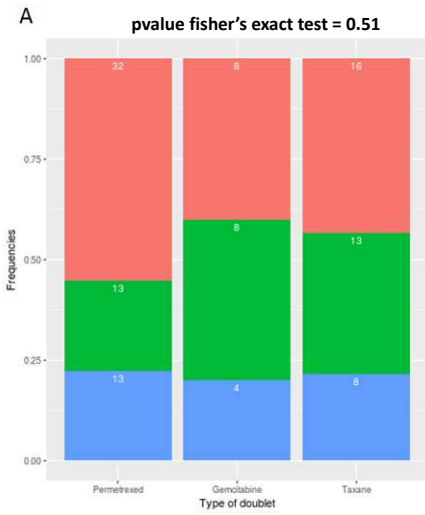
- Med 2013; 19(1):57-64; PMID:23202296; <https://doi.org/10.1038/nm.2999>
37. Aglietta M, Barone C, Sawyer MB, Moore MJ, Miller WH, Jr, Bagala C, Colombi F, Cagnazzo C, Gioeni L, Wang E, et al. A phase I dose escalation trial of tremelimumab (CP-675,206) in combination with gemcitabine in chemotherapy-naive patients with metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol* 2014; 25(9):1750-5; <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu205>
38. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R, Saini SK, Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Birnbak NJ, Hiley CT, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* 2016; 351(6280):1463-9; PMID:26940869; <https://doi.org/10.1126/science.aaf1490>
39. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, Sucker A, Hillen U, Geukes Foppen MH, Goldinger SM, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* 2015; 350(6257):207-11; PMID:26359337; <https://doi.org/10.1126/science.aad0095>
40. Braun DA, Burke KP, Van Allen EM. Genomic approaches to understanding response and resistance to immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2016; 22(23):5642-50; PMID:27698000; <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0066>
41. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015; 348(6230):124-8; PMID:25765070; <https://doi.org/10.1126/science.aaa1348>
42. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Lubner BS, Azad NS, Laheru D, et al. PD-1 Blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Eng J Med* 2015; 372(26):2509-20; PMID:26028255; <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500596>

Supplementary Figure 1

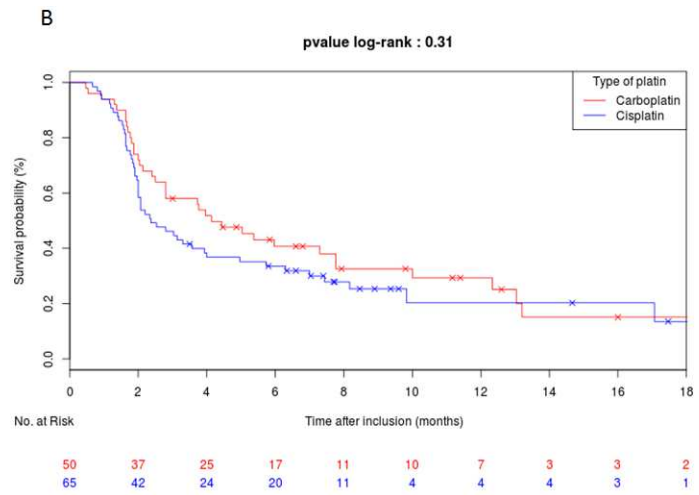
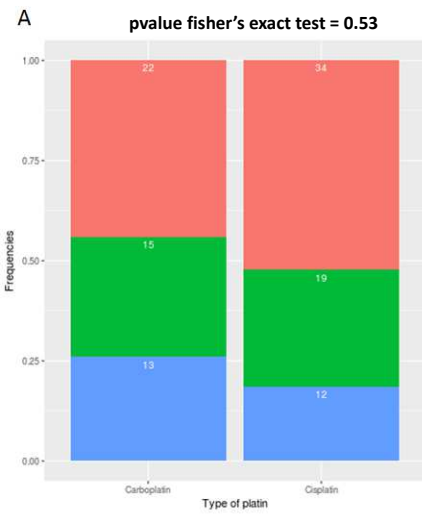
Flow Chart



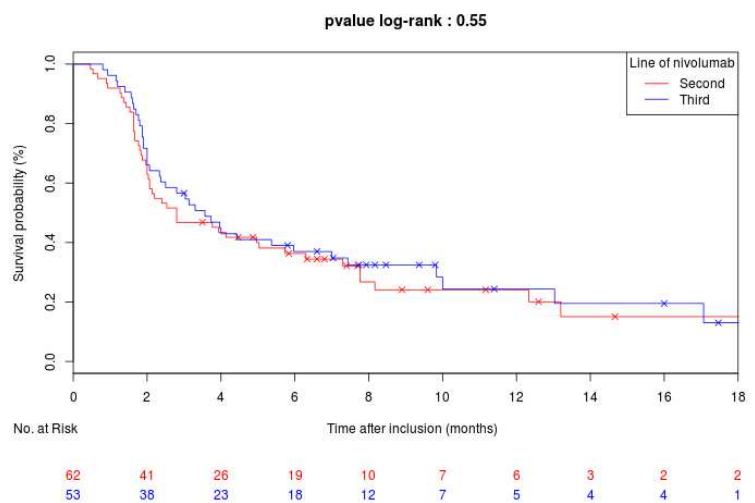
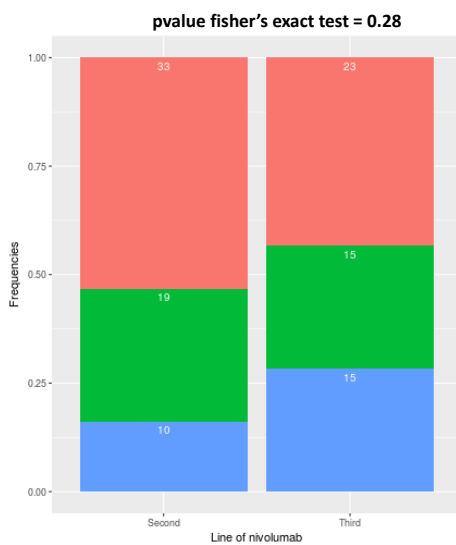
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3

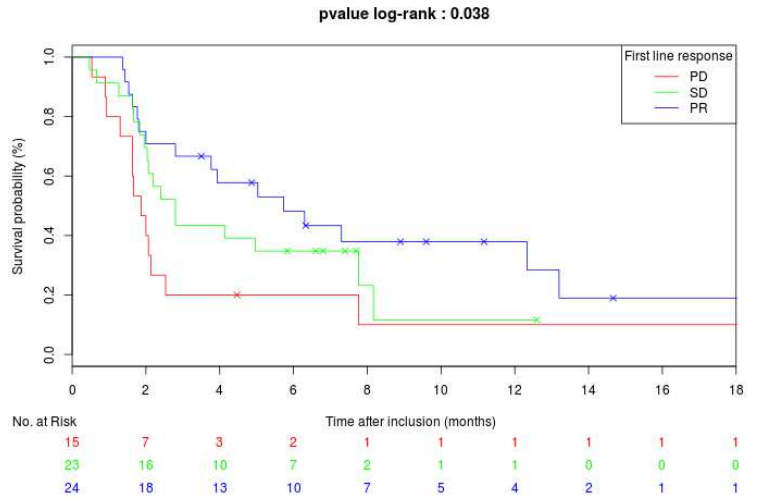
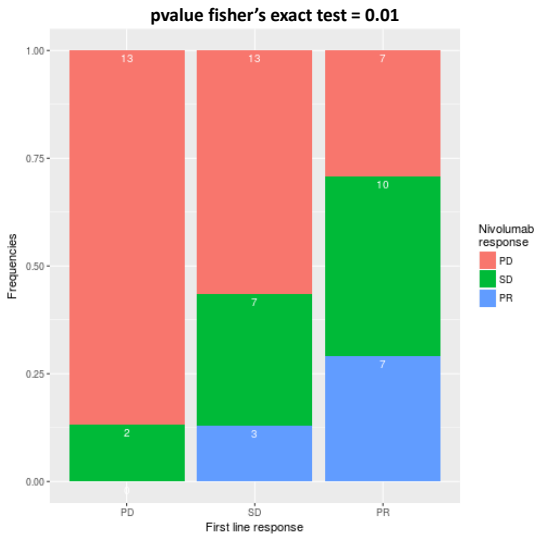


Supplementary Figure 4

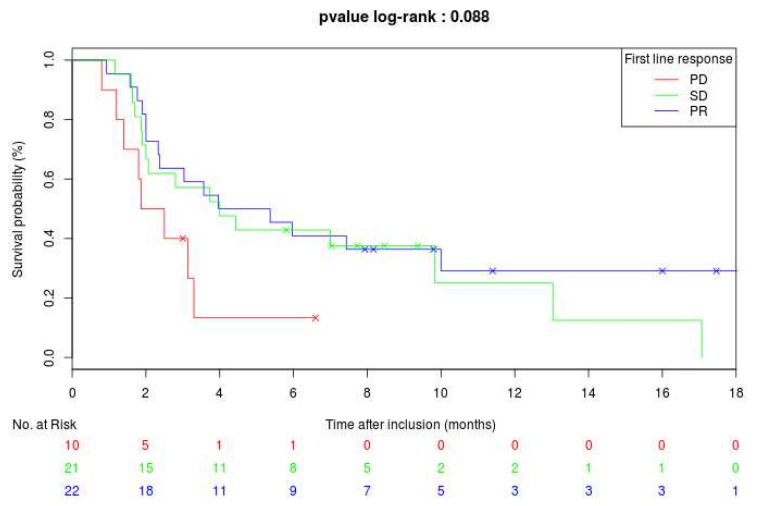
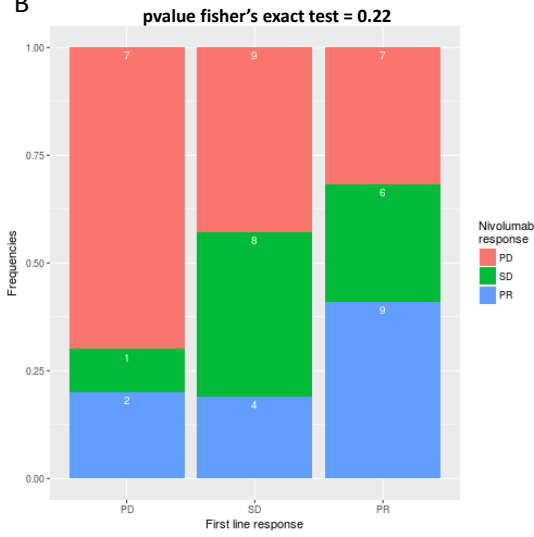


Supplementary Figure 5

A



B



ARTICLE 2 : « Tim-3/galectin-9 pathway and mMDSC control primary and secondary resistances to PD-1 blockade in lung cancer patients. »

La protéine PD-1 présente à la surface des cellules cancéreuses joue un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse immune antitumorale par liaison avec son ligand PD-L1 présent à la surface des lymphocytes cytotoxiques. Cependant, cette interaction n'est pas le seul moyen à disposition de la tumeur pour réprimer l'action antitumorale des cellules immunitaires. En effet, celle-ci a la possibilité d'instaurer un environnement immunosuppresseur à ses abords par recrutement de cellules immunosuppressives ou régulatrices, ou bien encore d'utiliser d'autres points de contrôle inhibiteurs tels que GAL-9 interagissant avec TIM-3 à la surface des lymphocytes (ZITVOGEL *et al.* 2006). La mise en place de ces mécanismes pourrait expliquer un échappement de la maladie.

Ce travail a eu plusieurs objectifs. Le premier a été de déterminer si la maladie affectait le profil immunitaire périphérique du patient. Le second objectif a été d'évaluer quels sous-types de cellules immunitaires jouaient un rôle dans la réponse au nivolumab et si ce profil immunologique évoluait au cours du traitement. Pour répondre à ces interrogations, plusieurs marqueurs des cellules myéloïdes, des lymphocytes, d'activation et de TIM-3 ont été analysés par cytométrie en flux à partir de prises de sang de 61 patients de notre cohorte et de 12 volontaire sains similaires en terme de répartition d'âge et de sexe. Les prises de sang des patients ont été réalisées avant la première prise de nivolumab ainsi que 15, 30 et 60 jours après la première injection.

Les immuno-phénotypages des 61 patients avant la première prise de traitement ont été comparés à ceux de 12 volontaires sains. Les résultats soulignent l'importance des marqueurs lymphocytaires dans la discrimination des patients atteints de CBNPC et des volontaires sains. En particulier, ils suggèrent que les cellules cancéreuses affectent la réponse immunitaire des lymphocytes T par accumulation du sous-type Th17 et une diminution du nombre de cellules NK et Th1. Concernant le rôle pronostique des cellules immunitaires et de l'expression des points de contrôle dans la réponse au nivolumab, aucun paramètre ne semble capable de prédire le bénéfice de la thérapie au moment de la prise du traitement. Cependant, une analyse univariée des paramètres immunitaires à 15 et 30 jours après la première injection montre qu'une forte expression de TIM-3 sur les cellules lymphocytaires et une accumulation de cellules myéloïdes immunosuppressives monocytaires (mMDSC) sont témoins d'un mauvais pronostic en terme de réponse et de survie sans progression. L'ajustement d'un modèle multivarié avec sélection de variables par un algorithme de *boosting* confirme l'importance de ces paramètres pour la prédiction de la survie sans progression sous nivolumab.

Cette étude suggère un échappement de la maladie par la voie biologique TIM-3/GAL-9 et par une accumulation de cellules mMDSC. Ainsi, la combinaison d'une immunothérapie anti-PD-1 et de thérapies bloquant l'interaction TIM-3/GAL-9 ou s'attaquant aux cellules immunosuppressives pourrait devenir une approche thérapeutique d'intérêt pour le traitement des CBNPC.

Ce travail a fait l'objet d'un poster au meeting annuel de l'AFC 2018 à Lyon et d'une publication dans la revue *OncoImmunology* :

Limagne, E., **Richard, C.**, Thibaudin, M., Fumet, J. D., Truntzer, C., Tim-3/galectin-9 pathway and mMDSC control primary and secondary resistances to PD-1 blockade in lung cancer patients. *Oncoimmunology* **8**, e1564505 (2019).

Limagne, E., **Richard, C.**, Thibaudin, M., Fumet, J. D., Truntzer, C., La voie TIM-3/Galectine-9 et les MDSC monocytaires (mMDSC) sont impliquées dans la résistance au Nivolumab dans les cancers bronchiques de stade III/IV. *Abstract SP11-44*, Présenté au 22ème congrès annuel de l'AFC, Lyon, France (2018).

Tim-3/galectin-9 pathway and mMDSC control primary and secondary resistances to PD-1 blockade in lung cancer patients

Emeric Limagne ^{a*}, Corentin Richard ^{a,b*}, Marion Thibaudin ^a, Jean-David Fumet ^{a,c}, Caroline Truntzer ^a, Aurélie Lagrange ^c, Laure Favier ^c, Bruno Coudert ^c, and François Ghiringhelli ^{a,b,c,d,e}

^aPlatform of Transfer in Cancer Biology, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France; ^b Univ. Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France; ^c Department of Medical Oncology, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France; ^d Centre de Recherche INSERM LNC-UMR1231, Dijon, France; ^e Genetic and Immunology Medical Institute, Dijon, France

ABSTRACT

Nivolumab, a monoclonal antibody targeting PD-1, is currently approved for metastatic non-small cell lung cancer (mNSCLC) treatment after failure of first-line chemotherapy. However, only a quarter of patients benefit from this therapy with objective clinical response. In this context, there is an unmet need for improved understanding of resistance mechanisms. Thus, we studied a prospective cohort of mNSCLC (n = 61) treated in second or third-line with nivolumab. We analyzed various blood myeloid and lymphoid markers by flow cytometry (176 variables) at baseline, and after 15 and 30 days of therapy. By attempting to link the evolution of peripheral lymphoid, myeloid cells and anti-PD-1 response, we observed that accumulation of lymphoid cells and monocytic MDSC (mMDSC) expressing, respectively, Tim-3 and galectin-9 is implicated in resistance to PD-1 blockade both for patients with primary or acquired secondary resistance to anti-PD-1. In vitro, anti-Tim-3 blocking antibody reverses resistance to anti-PD-1 in PBMC from lung cancer patients and high levels of blood mMDSC negatively impact on anti-PD-1 efficacy. Together, these data underline that the galectin-9/Tim-3 pathway and mMDSC are key mechanisms of primary or secondary resistance to anti-PD-1 and could be a new target for immunotherapy drug combinations.

ARTICLE HISTORY

Received 7 July 2018
Revised 5 November 2018
Accepted 6 November 2018

KEYWORDS

Lung cancer; immune checkpoint; nivolumab; anti-PD-1; Tim-3; MDSC

Introduction


Despite recent advances in the molecular classification of non-small cell lung cancer (NSCLC) and the development of targeted therapies, the prognosis for patients with advanced disease remains poor.¹ Baseline therapy mainly relies on platinum-based chemotherapy or therapies targeting Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutational status. Despite the effectiveness of these therapies, the prognosis remains poor due to the ineluctable escape of the disease. Monoclonal antibodies (mAb) targeting “immune” checkpoint inhibitors of the immune response revolutionized the treatment of lung cancer.^{2,3} The CheckMate 057 study⁴ was the first to demonstrate that an anti-PD-1 antibody (nivolumab) provided a better survival advantage than chemotherapy in lung adenocarcinomas that had progressed during or after first-line therapy. These data were further confirmed in squamous and non-squamous cell lung carcinoma treatment using another anti-PD-1 mAb, pembrolizumab,⁵ or the anti-PD-L1 mAb atezolizumab.⁶ Nivolumab, pembrolizumab, and atezolizumab are currently approved for the second- or third-line treatment of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. Despite the undeniable efficacy of these therapies, only a quarter of NSCLC patients experiment a clinical benefit with these new therapies.^{4,7} Consequently, there is an unmet

need for improved understanding of resistance mechanisms to PD-1 blockade, with a view to correctly identifying non-responders, and envisaging new drug combinations, based on a solid biological rationale.

Assessment of tumor PD-L1 expression by immunohistochemistry (IHC) is currently used to select patients. Under first-line therapy, expression of PD-L1 in more than 50% of the cancer cells is associated with better efficacy of pembrolizumab in comparison to chemotherapy.⁸ However, this marker is sub-optimal and does not predict the absence of anti-PD-1 efficacy.^{9,10} This difficulty could be explained by the failure to take account of the immune infiltrate profile, the presence of additional checkpoints such as Tim3, TIGIT or Lag3, the presence of immunosuppressive cells, or the presence of oncogenic induction of PD-L1. Recent data underline suggest a possible role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in cancer-related immunosuppression, which could mediate resistance to therapies. This population of immature myeloid cells can inhibit anti-tumor activities of T and NK cells and stimulate regulatory T cells (Treg), leading to tumor progression.¹¹ To improve the prediction of response, a growing number of studies have tested some tumor histological or genetic markers, but response prediction remains a conundrum. In contrast, few studies have analyzed peripheral blood. Baseline routine blood parameters were associated with pembrolizumab outcome in melanoma

CONTACT François Ghiringhelli  fghiringhelli@cgfl.fr  Georges-François Leclerc Cancer Center, 1 rue Professeur Marion, Dijon 21000, France

*These authors contributed equally to this work.

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2019 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

patients, suggesting that peripheral analysis could be an interesting tool for the identification of markers and biological mechanisms involved in immunotherapy resistance.¹² More recently, John Wherry's group demonstrated in melanoma patients treated with pembrolizumab that T cell invigoration to tumor burden ratio is associated with outcome using immune blood cytometric analysis and clinical data.¹³ We hypothesized that serial multiparametric cytometry analysis during therapy could be used to identify common mechanisms of resistance, and consequently, could be used to detect potential markers of response to anti-PD-1 in NSCLC patients. We prospectively analyzed blood immune parameters of NSCLC patients before and during nivolumab treatment, given as a second or third line. Using this strategy, we observed that early accumulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells (mMDSC) expressing galectin-9, and lymphoid cells with high Tim-3 expression is associated with both primary and secondary resistance.

Methods

Patient data

This study included consecutive stage IIIB and IV advanced NSCLC patients, treated at the Georges Francois Leclerc Center with nivolumab anti-PD-1 monotherapy in the second or third line of therapy after approval of nivolumab usage by the French health authorities. First or second line consisted of platinum-based chemotherapy with or without targeted therapy. Patients received nivolumab until progression or unacceptable toxicity. Written informed consent was obtained from all patients before enrollment. The hospital institutional review board approved the study in accordance with the principles of Good Clinical Practice, the Declaration of Helsinki, and other applicable local regulations. This study was declared as a sub-study of an ongoing project registered with ClinicalTrials.gov under the identifier NCT02281214.

Clinical data collection

Included patients received nivolumab at the recommended dose (3 mg/kg q2 weeks). The following data were collected from each patient's medical records: age, sex, smoking status, *EGFR* and *KRAS* mutational status, ECOG performance status at the time of nivolumab initiation, nature of first-line platinum-based doublet, number of treatment lines prior to nivolumab initiation, date of nivolumab initiation, best RECIST 1.1 response to nivolumab, date of progression during or after nivolumab, and death from any cause or last follow-up. The database was opened on 1 May 2015 and closed on 1 February 2017. Two physicians (JDF, AL) reviewed all CT-scans to validate response to nivolumab.

Whole blood of NSCLC patients was sampled before (D0) and after chemotherapy (D15, D30, and D60) on heparinized tubes for leucocyte phenotyping. All analyses were performed within 6 h after sampling. Review of pathology reports confirmed the diagnosis. Information regarding clinical, pathologic, and biological characters of patients and healthy volunteers are presented in Table 1. All data were collected

Table 1. Summary of clinical characteristics of the mNSCLC cohort. Gender, age, smoking status, WHO performance status, tumor histology, and tumor stage are detailed.

| Variables | | Number (%) |
|------------------------|------------------|------------|
| Gender | Female | 14 (23) |
| | Male | 47 (77) |
| Age-yr | median (range) | 66 (45–85) |
| | mean (sd) | 66.9 (9.2) |
| Smoker | No | 6 (10) |
| | yes | 55 (90) |
| WHO performance status | 0 | 26 (43) |
| | 1–2 | 35 (57) |
| | | |
| Tumor histology | Nonsquamous-cell | 36 (59) |
| | Squamous-cell | 24 (39) |
| | Other | 1 (2) |
| Tumor stage | IIIB | 8 (13) |
| | IV | 53 (87) |
| First line doublet | Gemcitabine | 16 (26) |
| | Taxane | 16 (26) |
| | Pemetrexed | 26 (44) |
| | Other | 3 (4) |
| Type of platin | Carboplatin | 29 (48) |
| | Cisplatin | 29 (48) |
| | | |
| | Other | 3 (4) |

prospectively, but analyses were performed retrospectively without predetermined hypotheses.

Immunomonitoring

Flow cytometry

Antibodies and cytometry procedure

For T helper identification, anti-CD4-VioGreen (VIT4), anti-CD45RA-APC-Vio770 (T6D11), anti-CD25-APC (3G10), anti-CCR6-PE (REA190), anti-CXCR3-PE-Vio700 (REA232) and anti-Tim-3-FITC (F38-3E2) were purchased from Miltenyi Biotec. Anti-CRTH2-Brilliant Violet 421 (BM16) was purchased from BD Biosciences and anti-PD-1-PerCP-eFluor700 (MIH4) was purchased from eBiosciences.

For T CD8⁺ identification, anti-CD8-VioGreen (BW135/80), anti-CD45RA-APC-Vio770 (T6D11), anti-CD44-APC (DB105), anti-CCR7-PE (REA547), anti-CD62L-PE-Vio770 (145/15), anti-CD3-VioBlue (BW264/56), and anti-Tim-3-FITC (F38-3E2) were purchased from Miltenyi Biotec. Anti-PD-1-PerCP-eFluor700 (MIH4) was purchased from eBiosciences.

For Treg and NK identification, anti-CD4-VioGreen (VIT4), anti-CD45RA-APC-Vio770 (T6D11), anti-CD25-APC (3G10), anti-Foxp3-PE (3G3), anti-CD56-PE-Vio770 (AF12-7H3), anti-CD3-VioBlue (BW264/56) and anti-Tim-3-FITC (F38-3E2) were purchased from Miltenyi Biotec. Anti-PD-1-PerCP-eFluor700 (MIH4) was purchased from eBiosciences.

For myeloid subpopulation identification, anti-CD15-VioGreen (VIMC6), anti-CD33-APC-Vio770 (AC104.3E3), anti-CD123-PE (AC145), anti-CD11c-PE-Vio770 (MJ4-27G12), anti-CD3-FITC (BW264/56), anti-CD19-FITC (LT19), anti-CD20-FITC (LT20), anti-CD56-FITC (REA136) and anti-HLA-DR-VioBlue (AC122) were purchased from Miltenyi Biotec. Anti-CD14-PerCP-eFluor700 (61D3) and anti-PD-L1-APC (MIH1) were purchased from eBiosciences.

Leucocyte population identification and numeration

For leucocyte identification by flow cytometry, whole blood removed to heparinized tubes (100 μ L) was stained with

different antibody cocktails for 15 min at room temperature. After surface staining, 2 mL of red blood cell lysis solution (BD Biosciences) was added for 10 min, centrifuged (350 g, 5 min), and then resuspended in flow cytometry buffer (eBioscience). Foxp3 staining was carried out according to the manufacturer's protocol using the fixation/permeabilization solution (eBioscience). All events were acquired on a BD LSR-II cytometer equipped with BD FACSDiva software (BD Biosciences), and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star). The gating strategy is described in Supplementary Figures 1–4.

For myeloid cells, gated on CD14⁺ CD15⁺ cells we select monocytes which are positive for HLA-DR and CD33 as monocytic MDSC (mMDSC), CD14⁺ CD15⁺ CD33⁺ HLA-DR⁻ were considered as granulocytic MDSC (gMDSC). CD15⁺ CD14⁻ are considered as granulocytes. For dendritic cells we select CD14⁻ CD15⁻ HLA-DR⁺ cells. Based on CD11c and CD123 labeling CD11c⁺ CD123⁻ are considered as type 1 classical dendritic cell population (DC1), CD11c⁺ CD123^{int} as type 2 classical dendritic cell population (DC2) and CD123⁺ CD11c⁻ as plasmacytoid dendritic cells (pDC).¹⁴

For T cells, subpopulations were classically defined using CD45RA and CCR7 labeling. CD45RA⁺ CCR7⁺ were considered as naïve cells, CD45RA⁺ CCR7⁻ as effector memory RA cells (EMRA), CD45RA^{low} CCR7⁻ as intermediate EMRA, CD45RA⁻ CCR7⁻ as effector memory cells and CD45RA⁻ CCR7⁺ as central memory cells.¹⁵

Helper T subsets were defined using chemokine receptor labeling. CCR6⁺ CXCR3⁻ cells were considered as Th17 cells, CCR6⁺ CXCR3⁺ cells as Th17-Th1 hybrid phenotype and CCR6⁻ CXCR3⁺ as Th1 cells. CCR6⁻ CXCR3⁻ CRTH2⁺ cells were considered as Th2 cells.¹⁶ Cells with CD45RA⁺ labeling were considered as effector cells and called eTh and CD45RA⁻ were considered as memory cells and called mTh. Regulatory T cells (Treg) were characterized upon CD25⁺ and intracellular Foxp3 labeling.

Human NK cells can be divided into two subsets based on their cell-surface density of CD56⁻CD56^{bright} and CD56^{dim}, each with distinct phenotypic properties. The CD56^{dim} NK-cell subset is more naturally cytotoxic and expresses higher levels of CD16 than the CD56^{bright} NK-cell subset. By contrast, the CD56^{bright} subset has the capacity to produce abundant cytokines following activation but has low natural cytotoxicity.¹⁷

In vitro human experiments

PBMC culture

Human PBMCs were first enriched from cancer patient blood using a separation gradient on a lymphocyte separation medium (Eurobio). After isolation, a small part of PBMCs (0.1.10⁶ cells) was stained to quantify by flow cytometry the expression of Tim-3, PD-1 and PD-L1, galectin-9 on CD8 T cells and mMDSC. Surface staining was carried out with the following antibodies for 15 min at room temperature in the dark. For T CD8 analysis, anti-CD8-VioGreen (BW135/80), anti-anti-CD3-VioBlue (BW264/56) and anti-Tim-3-FITC (F38-3E2) were purchased from Miltenyi Biotec. Anti-PD-1-PerCP-eFluor700 (MIH4) was purchased from eBioscience. For myeloid population

analysis, anti-CD33-APC-Vio770 (AC104.3E3), anti-Galectin-9-PE-Vio770 (RG9-35.7), anti-CD3-FITC (BW264/56), anti-CD19-FITC (LT19), anti-CD20-FITC (LT20), anti-CD56-FITC (REA136) and anti-HLA-DR-Vioblue (AC122) were purchased from Miltenyi Biotec. Anti-CD14-Krome Orange (RMO52) and anti-PD-L1-APC (PD-L1) were purchased from Beckman Coulter. All events were acquired by a CytoFlex cytometer equipped with CytExpert software (Beckman Coulter), and data were analyzed using CytExpert software.

The rest of the PBMC (0.25.10⁶ cells/well) were stimulated with plate-bound antibodies against CD3 (OKT3, 0.5 µg/mL, BioXcell) with or without anti-PD-1 (Nivolumab, 10 µg/mL) or anti-Tim-3 (Fisher Scientific, F38-2E2, 10 µg/mL) in 96-well plate flat bottom. Cells were classically harvested on day five (unless otherwise specified) for detection of cytokines by ELISA and surface staining analysis.

Measurement of cytokines

After 5 days of culture, cell culture supernatants were assessed by ELISA for human TNFα and IFNγ (BioLegend) according to the manufacturer's protocol.

Statistical methods

Data analysis was performed using the statistical software R (<http://www.R-project.org/>) and representations were made with Prism 7 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Progression-free survival (PFS) was defined as the time from the first day of treatment to the first recorded evidence of disease progression by the RECIST criteria, clinical evaluation or death. Survivors were censored after 6 months. Overall survival (OS) was calculated as the time from the date of the nivolumab treatment start to the date of death and censored after 24 months.

Each distribution of absolute counts of subpopulations of cells between patients and healthy volunteers were compared with Wilcoxon rank-sum test and all boxplots were drawn with median, quartiles and Tukey's whiskers. The distributions of proportions of immunosuppressive markers were compared using the test for the comparison of multicomponent distributions and pie charts were drawn based on the recommendation for graphical display, both developed in SPICE software.¹⁸

Univariate Cox proportional hazards models of all clinical and biological variables at baseline and at D15 were built to compute hazard ratios (HRs) with their 95% confidence intervals (CI). Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method and compared using log-rank tests. Median follow-up was calculated using the reverse Kaplan-Meier method or noted NR (Not Reached), as appropriate. The CoxBoost algorithm was used to fit a multivariate model. This algorithm is particularly adapted to the high dimensional setting where there are more variables than observations and fits a Cox proportional hazards model by component-wise likelihood-based boosting. It allows the selection of variables that are the most associated with survival. The model was estimated using the *CoxBoost*¹⁹ R package. A score was then computed for each patient based on the linear predictor

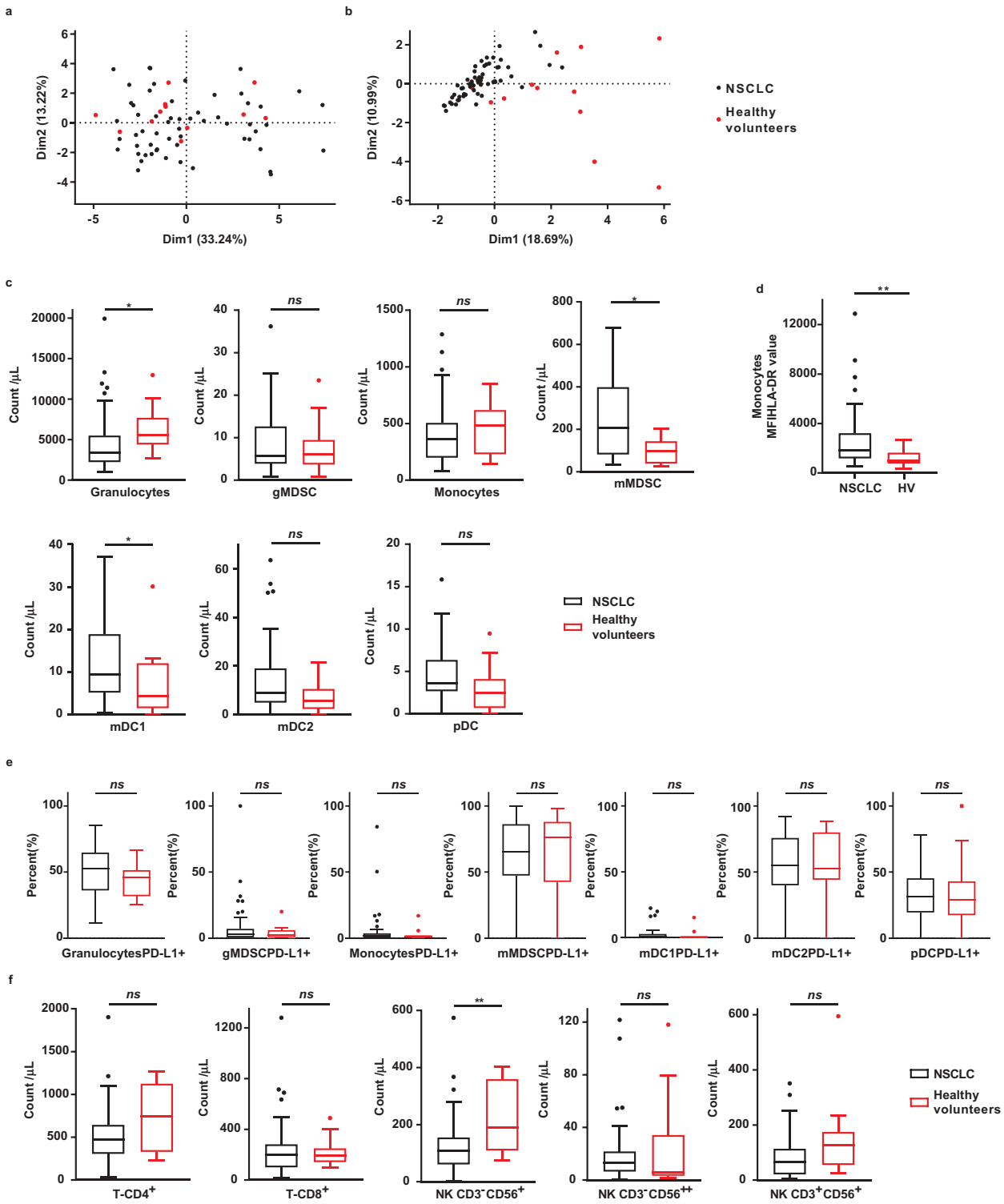


Figure 1. (a-b). Individual factor maps of two principal components analyses including all myeloid parameters (a) and all lymphoid parameters (b). Each individual is represented by a dot; red dots represent healthy volunteers and black dots represent non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Percentages given in brackets correspond to the percent of variance of initial data retained by the axis. (c). Boxplots showing the distribution of the number of cells for different myeloid subpopulations for healthy volunteers (in red) and NSCLC patients (in black). (d). Boxplot showing the distribution of the MFI HLA-DR values for different myeloid cell subpopulations for non-small cell lung cancer patients (NSCLC; in black) and healthy volunteers (HV; in red). (e). Boxplots showing the percent of PD-L1 expressing cells for different myeloid subpopulations for healthy volunteers (in red) and NSCLC patients (in black). (f). Boxplots showing the distribution of the number of cells for different lymphoid subpopulations for healthy volunteers (in red) and NSCLC patients (in black).
 *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns: not significant.

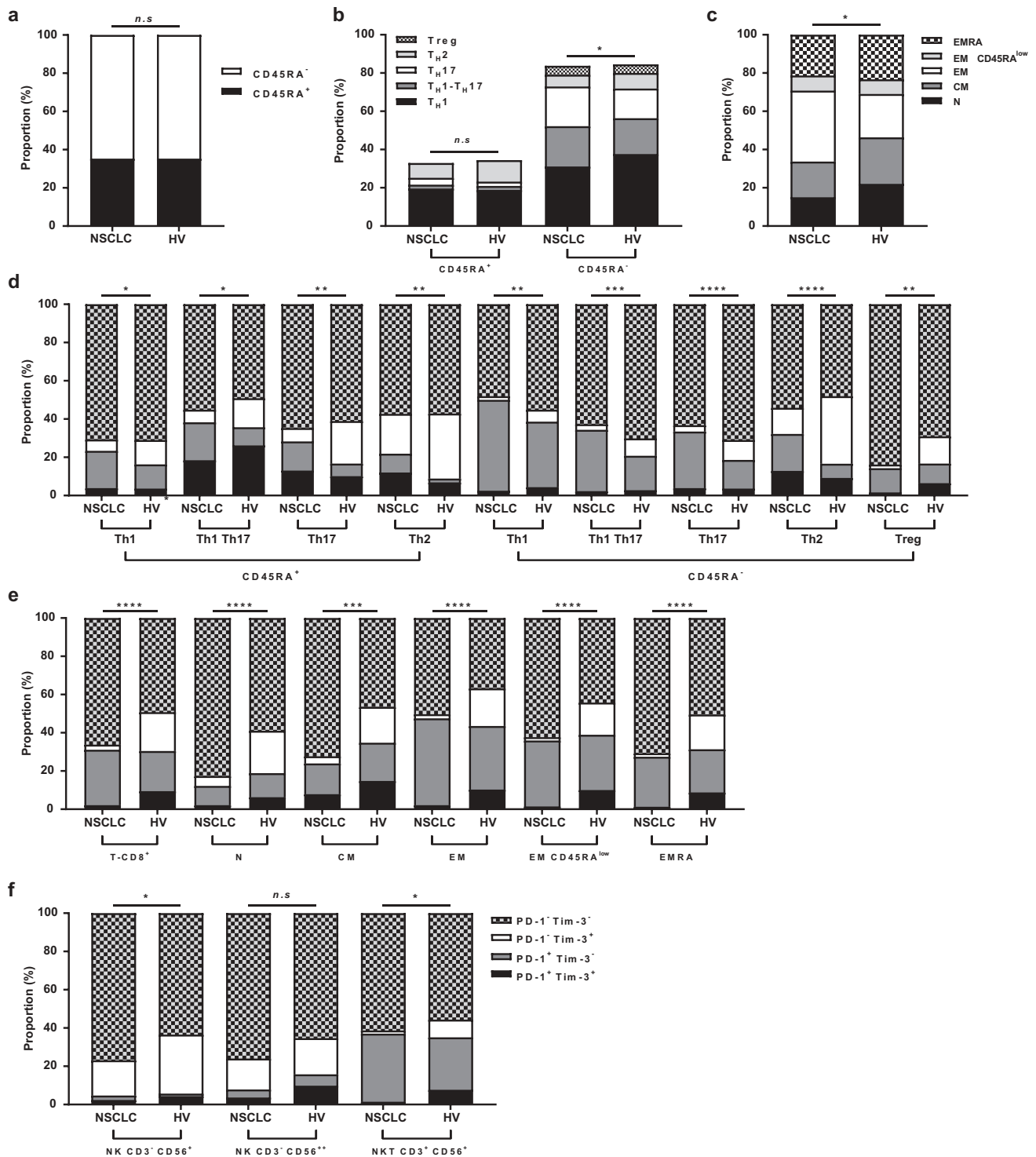


Figure 2. (a). Cumulative bar plots showing the mean proportion of CD45RA⁻ (in white) and CD45RA⁺ (in black) in CD4⁺ T cells for NSCLC patients and HV. (b-c). Cumulative bar plots showing the proportion of different CD4⁺ T subpopulations (Th1, Th2, Th17, Th1-Th17, Treg) in CD45RA⁻ and CD45RA⁺ cells (c) and CD8⁺ T cell subpopulations (Naive, Central Memory, Effector Memory, Effector Memory CD45RA^{low}, Effector Memory RA) for NSCLC patients and HV (d). (d-f). Cumulative bar plots showing the mean proportions of cells expressing both, one or none of the PD-1 and Tim-3 immune checkpoints in CD4⁺ T cells (Th1, Th2, Th17, Th1-Th17, Treg) (e), CD8⁺ T cells (Naive, Central Memory, Effector Memory, Effector Memory CD45RA^{low}, Effector Memory RA) (f) and NK cells (NK CD3⁻ CD56⁺, NK CD3⁻ CD56⁺⁺, NK CD3⁺ CD56⁺) (g) for NSCLC patients and HV.

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns: not significant.

estimated by the model. A Receiver Operating characteristic (ROC) curve was plotted with the corresponding estimated linear predictor, and the threshold corresponding to the point nearest the upper left corner (best compromise between

sensitivity and specificity) was chosen. The same model was applied to data at D15 without re-estimating the coefficients, and the same threshold was also applied to the resulting linear predictor.

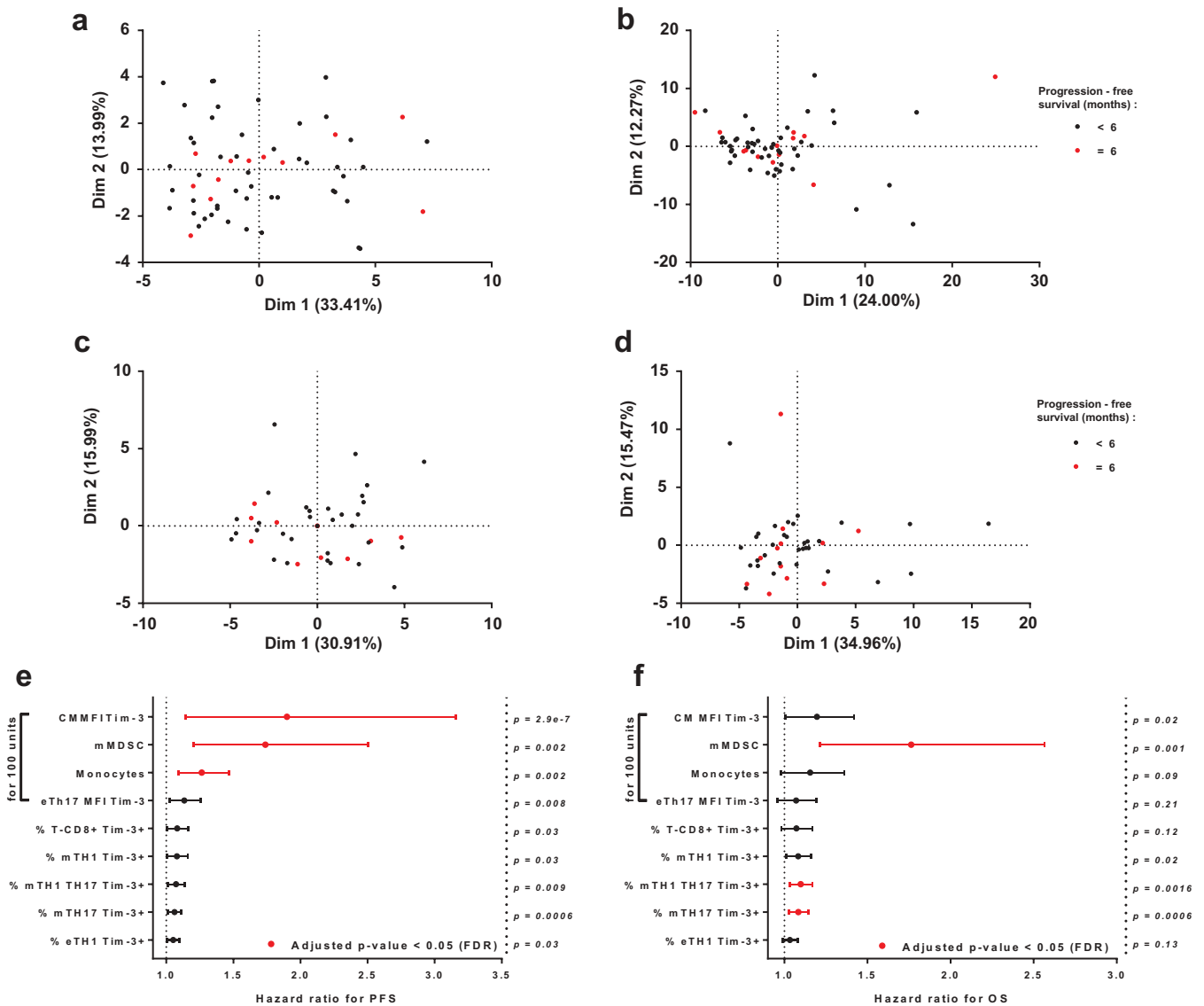


Figure 3. (a-b-c-d). Individual factor maps of four principal component analyses including: all myeloid parameters at day 0 (a); all lymphoid parameters at day 0 (b); all myeloid parameters at day 15 (c) and all lymphoid parameters at day 15 (d). Each individual is represented by a dot; red dots represent patients with progression-free survival greater than 6 months, and black dots represent patients with progression-free survival less than 6 months. Percentages given in brackets correspond to the percent of variance of initial data retained by the axis. (e-f). Forest plots of the hazard ratios and corresponding 95% confidence intervals estimated for variables significantly associated with progression-free survival (PFS) at day 15 from univariate Cox models (e). Forest plots for the same variables based on overall survival (OS) outcome (f). Significant variables after false-discovery rate (FDR) correction are displayed in red.

Results

T cell number and activation markers discriminate lung cancer patients from healthy volunteers

We first determined whether blood immune parameters could discriminate metastatic NSCLC from healthy volunteers. To do this we analyze 61 consecutive metastatic NSCLC patients before the introduction of nivolumab, as well as 12 sex- and age-matched healthy controls. We characterized the absolute number, frequency and mean fluorescence intensity (MFI) of various blood lymphoid and myeloid cells (Supplementary Figures 1–4 for gating strategy and Supplementary Table 1 for the list of immune subpopulations and markers). We analyzed 25 myeloid and 151 lymphoid variables, focusing on activation and differentiation markers.

The demographic and histopathologic characteristics of this cohort are described in Table 1. The median age was 66 years. The population was predominantly male (14 women (23%) and 47 men (77%)). Thirty-six patients (59%) had adenocarcinoma and 24 patients (39%) had squamous cell carcinoma. One patient (2%) had an undifferentiated carcinoma. Only six patients (10%) had never smoked. A total of 8 patients (13%) had locally advanced NSCLC and 53 (87%) had metastatic disease. Twelve patients presented partial response, 15 stable diseases and 34 progressive diseases at the CT-scan performed 2 months after initiation of therapy. Median progression-free survival (PFS) for all patients was 2.3 months (95% CI [1.8;3.9]). At the time of analysis, 13 patients (21%) had more than 6 months PFS. Median overall survival (OS) for all patients was 13.9 months (95% CI [11.9;22.9]).

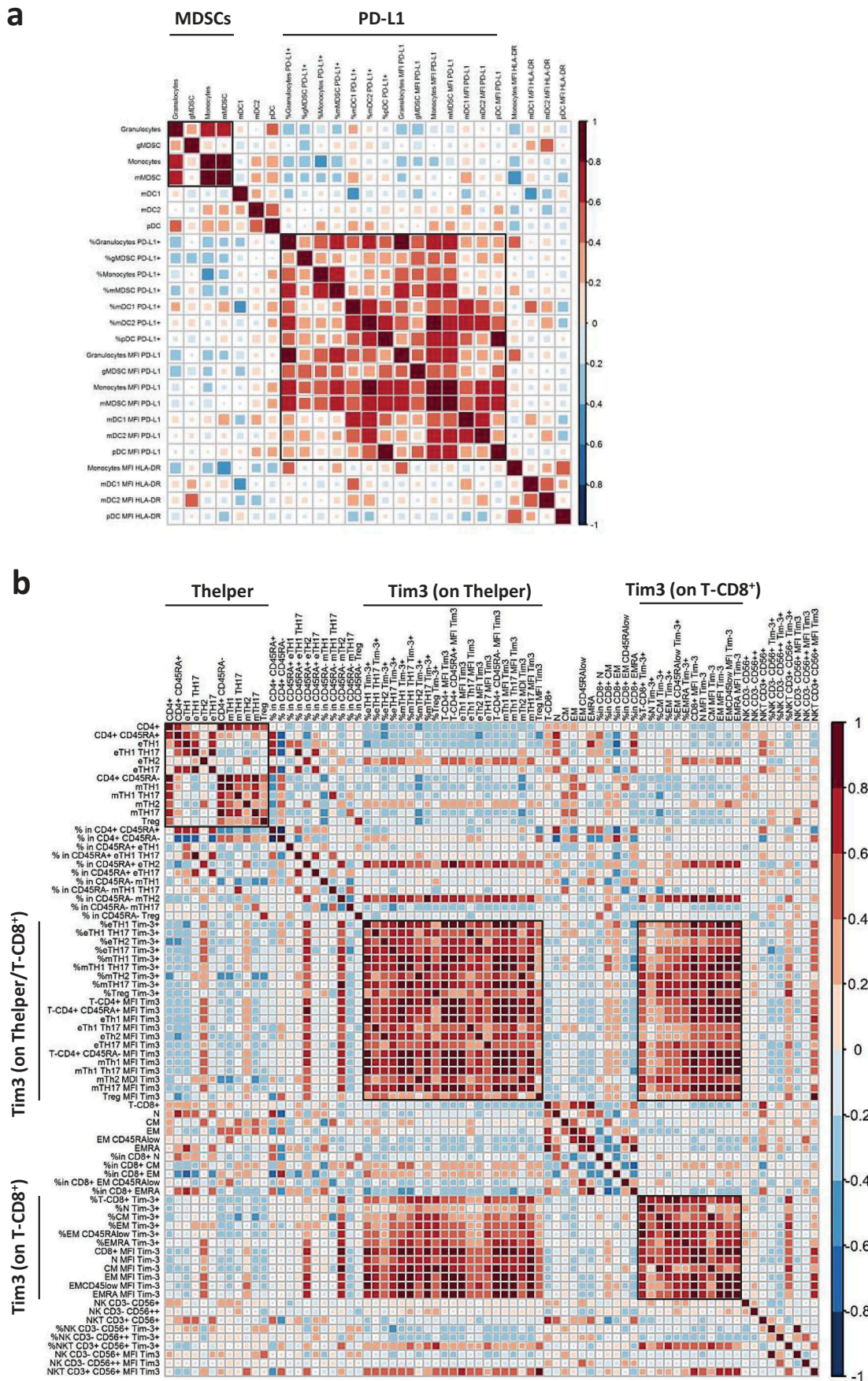


Figure 4. (a-b). Correlation matrices of myeloid parameters (a) and lymphoid parameters (b). Clusters of interest are displayed with black squares. Correlations were evaluated with Spearman's rank correlation coefficient.

We first performed a descriptive analysis of baseline immune parameters using two principal component analyses (PCA): one including all myeloid variables (Figure 1(a)) and the other including all lymphoid variables (Figure 1(b)). We observed that only lymphoid variables seem to have some variability that could separate cancer-bearing patients from healthy volunteers. Focusing on individual parameters for myeloid cells, we observed a significantly lower number of granulocytes (Wilcoxon rank-sum test $p = 0.01$) and a higher number of mMDSC (Wilcoxon rank-sum test $p = 0.01$) and mDC1 (Wilcoxon rank-sum test $p = 0.03$) in cancer patients compared to healthy volunteers (Figure 1(c)). A higher MFI value of HLA-DR activation markers on monocytes was observed in the cancer patient group (Wilcoxon rank-sum test $p = 0.005$) (Figure 1(d)) while proportions of myeloid cells expressing PD-L1⁺ did not differ between patients and healthy volunteers (Figure 1(e)).

Concerning lymphoid cells, we observed no significant changes in the number of major T cell subtypes (total CD4⁺ and CD8⁺ T cells), but a strong and significant decrease in NK cell numbers in cancer patients was observed (Wilcoxon rank-sum test $p = 0.004$) (Figure 1(f)). When we focused on the different subsets of CD4⁺ T cells, we did not observe a significant change in the proportions of total CD45RA⁺ or CD45RA⁻ cells (Figure 2(a)). While there was no variation in the proportions of the different CD45RA⁺ subpopulations, we observed a significant change of CD45RA⁻ subpopulation proportions due to a higher proportion of Th1 and a lower proportion of Th17 in the healthy volunteer group (permutation test $p = 0.048$) (Figure 2(b)). For CD8⁺ T cells, there was a decrease in central memory and naive CD8⁺ T cells in cancer patients (permutation test $p = 0.02$) (Figure 2(c)). Surprisingly, we observed significant changes for almost all lymphoid subpopulations in the proportions of Tim-3 and PD-1 expression. For each lymphoid population, we observed a decrease in the fraction of PD-1⁻ Tim-3⁺ for all subtypes in cancer patients and a decrease of double positive PD-1⁺ Tim-3⁺ for CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and NK cells (Figure 2(d-f)).

Taken together, these data underline that lymphoid markers discriminate NSCLC patients from healthy volunteers, and suggest that cancer affects peripheral T cell response with an accumulation of Th17 and a decrease in antitumoral NK cells, Th1 cells and exhausted CD8⁺ T cells.

Association between baseline and early blood lymphoid and myeloid parameters, and outcome

To address the prognostic role of each biological baseline parameter, we first performed a descriptive analysis using two PCA: one including all myeloid variables (Figure 3(a)) and the other including all lymphoid variables (Figure 3(b)). We could not separate patients with clinical benefit from those without clinical benefit. To explore further, we performed univariate Cox analysis for each immunological variable, using variables as continuous data. For myeloid cells, only a high MFI PD-L1 on granulocytic MDSC value was significantly associated with poor PFS (log-rank test $p = 0.04$), and a high MFI PD-L1 on monocyte value was also associated with poor PFS but was borderline significant

(log-rank test $p = 0.053$). For lymphoid cells, only a high MFI PD-1 on effector memory CD8 was significantly associated with poor PFS (log-rank test $p = 0.04$). However, no variable remained significant after false discovery rate (FDR) correction (Supplementary Tables 2–3).

A similar analysis was also performed on variables tested 15 days after initiation of nivolumab treatment. Likewise, two PCA were performed: one including all myeloid variables (Figure 3(c)) and the other including all lymphoid variables (Figure 3(d)), which could not separate patients with clinical benefit from patients without clinical benefit. By univariate Cox analysis, only two myeloid markers and eight lymphoid markers were significantly associated with PFS. After FDR correction, only high monocyte and monocytic MDSC numbers, and high Tim-3 MFI expression in memory CD8⁺ T cells were significantly associated with poor prognosis (Figure 3(e)) (Supplementary Tables 4–5). Only mMDSC keep being significant after FDR correction on OS outcome (Figure 3(f)).

Correlations between variables taken at day 15 were tested. For the myeloid variables, we observed correlations between all PD-L1⁺ variables. mMDSC and monocyte were also correlated. For lymphoid markers, all variables associated with Tim-3 expression in lymphoid cells were correlated, apart from Tim-3 expression in NK cells (Figure 4(a and b)).

Together, these data underline that the baseline blood immune cell parameters considered here are unable to predict the outcome, but Tim-3 expression on lymphoid cells, number monocytes, and mMDSC after one injection of nivolumab are associated with outcome.

Day 15 immune variables reveal the importance of Tim-3 and mMDSC in primary and secondary resistance

To further explore the association between immune variables and survival, we fitted a predictive model of PFS using a boosting algorithm for the Cox model, on all variables tested at day 15, because these variables seemed more informative than day 0 variables when analyzed independently. This model was used to select variables, which are related to the outcome. The variables retained were: the number of effector Th1, Tim-3 MFI in effector Th1, Th17 and CM CD8⁺ T cells, the proportion of NK CD3⁻ CD56^{high}, the proportion of Tim-3⁺ effector Th1 and Th17 and CM CD8⁺ T cells, the number of monocytes and mMDSC. The algorithm generated a new composite biological variable which is a linear regression based on selected variables. Receiver Operating characteristic (ROC) curve was generated to determine the discriminative potential of the new variable to predict the outcome. We observe an AUC of 0.80 (specificity of 83% and sensitivity of 74%) which underline a good discriminative property (Figure 5(a)). This new variable was strongly associated with PFS and could discriminate patients with good and poor PFS (median PFS: Not reached (NR) *versus* 1.9 months; log-rank test $p < 0.0001$) (Figure 5(b)). Similar results were not obtained for OS (Figure 5(c)). The same model was also strongly predictive of PFS but not for OS when biological variables were analyzed at day 30, thus demonstrating the stability of the model at a different timepoint (median PFS of 1.8 months *versus* NR; log-rank test $p = 0.02$) (Figure 5(d-e)). Together, these data

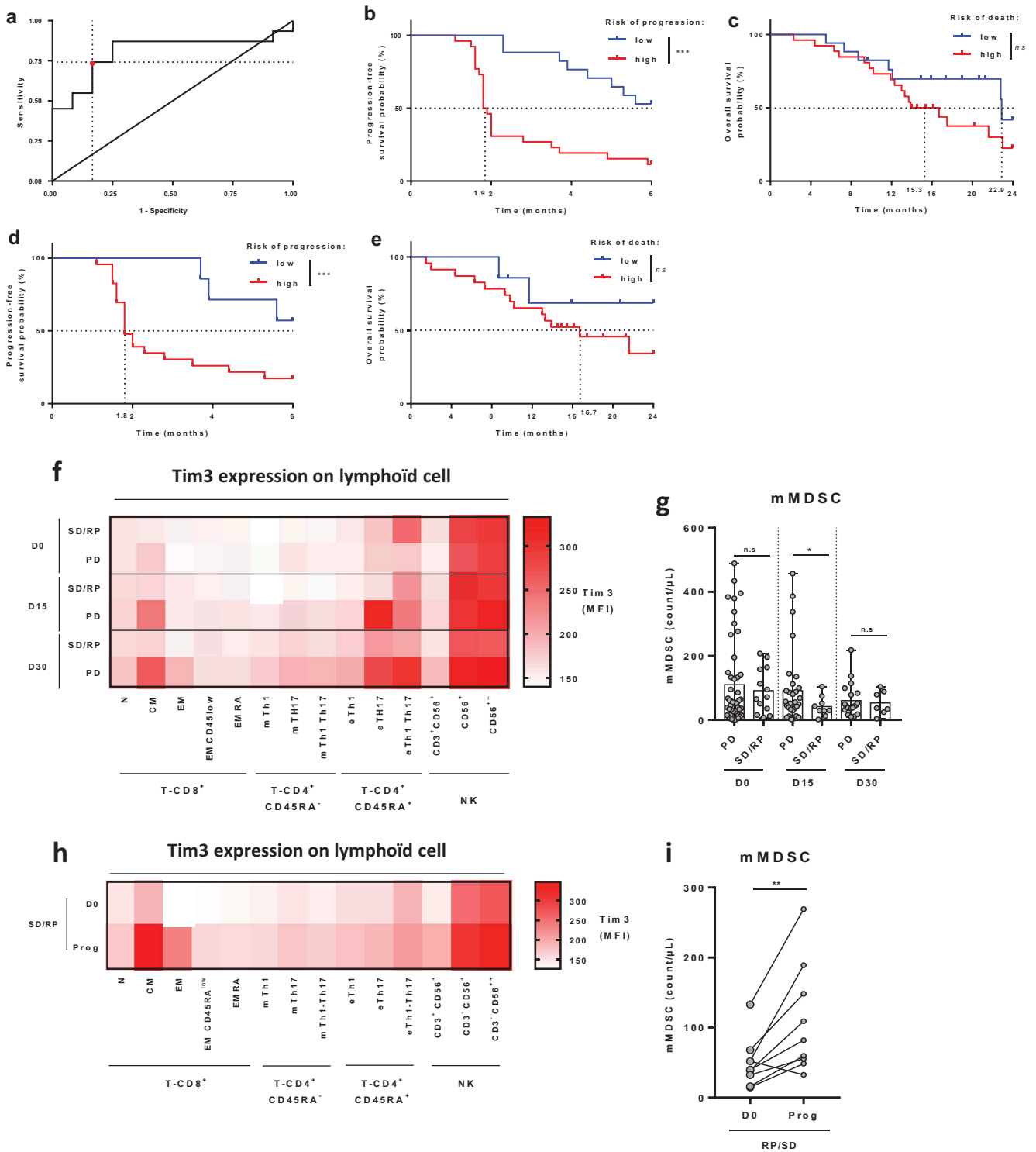


Figure 5. (a). ROC curve estimated using the linear predictor estimated from the Coxboost model adjusting for data at day 15. The chosen cutoff is represented by a red dot. (b-c). Kaplan-Meier estimates for progression-free survival (b) and overall survival (c); patients were stratified according to the value of the linear predictor estimated from the Coxboost model adjusted for data at day 15 on progression-free survival outcome: high risk (in red) or low risk (in blue). (d-e). Kaplan-Meier estimates for progression-free survival (d) and overall survival (e); patients were stratified according to the value of the linear predictor estimated from the Coxboost model for data at day 30 on progression-free survival outcome: high risk (in red) or low risk (in blue). (f). Representative heat map of Tim-3 median fluorescence intensity (MFI) on lymphoid cell subsets (CD8⁺ T, CD4⁺ T and NK subpopulations) at D0, D15 and D30 after anti-PD-1 introduction in responder/stable (PR/SD) versus progressive (PD) patients. (g). Scatter dot plot of mMDSC blood levels at D0, D15, and D30 after anti-PD-1 introduction in responder/stable (PR/SD) versus progressive (PD) patients. (h). Representative heat map of Tim-3 median fluorescence intensity (MFI) on lymphoid cell subsets (CD8⁺ T, CD4⁺ T, and NK subpopulations) at D0 and at the time of progression in initially responder/stable patients. (i). Scatter dot plot of mMDSC blood levels at D0 and at the time of progression in initially responder (RP)/stable (SD) patients.

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; n.s: not significant.

underline that early blood immune parameters detected after one injection of nivolumab are associated with outcome.

Univariate models and the CoxBoost model suggest that a high level of Tim-3 expression in peripheral lymphoid cells and an accumulation of mMDSC shortly after initiation of therapy are important factors that negatively affect the response to anti-PD-1 therapy. Indeed, during follow-up, we observed greater Tim-3 expression in progressive patients than in stable and responder patients in most of the lymphoid cell subsets after 1 or 2 injections of nivolumab (Figure 5(f)). When focusing on blood mMDSC numbers, we observed a rapid decrease in responders, while the number remained stable in non-responders (Figure 5(g)). We also obtained blood at progression for a small subset of patients (n = 8). As previously described, an increase in Tim-3 expression at progression in most lymphoid cell subpopulations (Figure 5(h)) and an increase in mMDSC blood levels (Figure 5(i)) was observed. These data suggest that high lymphoid Tim-3 expression and an accumulation of mMDSC are determinant factors in both primary and secondary resistance to nivolumab.

Galectin-9 expressing blood mMDSC impede Tim-3⁺ lymphoid cell functions and blunt efficacy of PD-1 blockade

To address the functional relevance of these observations, we collected blood from 10 metastatic NSCLC untreated with nivolumab. PBMC were isolated and restimulated with TCR triggering in the presence or not of nivolumab (Figure 6(a)). Interestingly, mMDSC expressed both PD-L1 and galectin-9, the respective ligands of PD-1 and Tim-3 (Figure 6(b)). In a context of PD-1 blockade, the capacity of PBMC to produce IFN γ was inversely correlated with the presence of mMDSC (Figure 6(c) left panel). When we focused our analysis on mMDSC phenotype, galectin-9, but not PD-L1, was negatively correlated with IFN γ secretion (Figure 6(c) center and right panel). In the absence of nivolumab, IFN γ -producing CD8⁺ T cells were inversely correlated with the presence of both PD-L1 and galectin-9 expressing MDSC (Figure 6(d)). Production of IFN γ by PBMC after nivolumab, *ex vivo* treatment was inversely correlated with the presence of Tim-3, but not PD-1 expressing CD8⁺ T cells (Figure 6(e-f)). In contrast, in the absence of nivolumab, the production of IFN γ by PBMC was inversely correlated with the presence of CD8⁺ T cells expressing both Tim-3 and PD-1 (Figure 6(g-h)). Otherwise, while nivolumab and anti-Tim-3 alone have only a modest and non-significant ability to restore IFN γ and TNF α secretion by PBMC of patients with NSCLC, the combination of the two antibodies strongly restores cytokine production (Figure 6(i)). Taken together, these findings underline that Tim-3 expression on CD8⁺ T cells and galectin-9 expression on monocytic MDSC blunt the secreting ability of CD8, and are involved in the mechanisms of resistance to nivolumab.

Discussion

Testing of peripheral blood markers is a non-invasive source of potential biomarkers in patients receiving immune-

checkpoint therapies. In this report, we propose that Tim-3 expression on blood circulating T cells, and accumulation of monocytic MDSC could be a surrogate early marker, for patients treated for NSCLC by nivolumab in second or further line therapy. In addition, these markers may also be used to detect secondary escape.

Few data exist addressing the prognostic role of blood immune cells in the setting of checkpoint inhibitor therapy. In the case of melanoma and ipilimumab studies, improved overall and progression-free survival were associated with baseline values, including low absolute neutrophil count, low neutrophil to lymphocyte ratio, low absolute monocyte count, low frequency of MDSC, high frequency of Treg, high frequency of lymphocytes and high eosinophil count,^{20,21} although such data are not currently validated in prospective studies. Dynamic changes during ipilimumab therapy in patients with melanoma including decreasing concentrations of Foxp3⁺ regulatory T cells, increasing absolute lymphocyte counts, and increasing eosinophil counts have also been associated with clinical benefit.²²⁻²⁴ Classical blood parameters could be associated with response to anti-PD-1. In a retrospective study including 607 patients with melanoma treated with pembrolizumab, elevated baseline eosinophil count and elevated lymphocyte count were both associated with improved overall survival¹¹. The role of immune parameters on avelumab (an anti-PD-L1 mAb) was recently addressed. In a phase I trial including 28 patients, 123 immune parameters were analyzed by flow cytometry prior to and following one, three, and nine cycles of avelumab. No statistically significant changes in any of the 123 immune cell subsets analyzed were observed at any dose level, or the number of doses of avelumab.²⁵ In a phase 1/2 study of nivolumab plus multi-peptide vaccine in patients with melanoma, an increased Treg frequency at week 12 was associated with progression and at baseline, antigen-specific CD8⁺ T cells were significantly lower in responders and stable patients compared with non-responders.²⁶ In a similar study testing the association of nivolumab with vaccine in melanoma, higher baseline Treg and MDSC populations were associated with poor response to therapy.²⁷ Recently, another study tested the role of blood parameters in 29 patients treated with pembrolizumab for melanoma. No parameter in baseline analysis was associated with response to therapy. In contrast, after the introduction of therapy, the authors observed a rapid activation of exhausted T cells. No blood parameter alone is a surrogate biomarker of response, but when combined with the assessment of tumor burden, a composite biomarker could predict patient survival under therapy.¹³

In our series, we addressed similar questions in the setting of NSCLC under nivolumab therapy. Like previous studies, no variable was significantly associated with PFS under anti-PD-1 at baseline. However, we highlighted an increase of mMDSC in patients at baseline like demonstrated by Yamauchi et al. in localized NSCLC with the same mMDSC gating strategy.²⁸ We observed that early accumulation of Tim-3 expressing lymphoid cells, and mMDSC were associated with resistance to nivolumab. Interestingly, in patients with initial response to nivolumab, we also observed accumulation of Tim-3

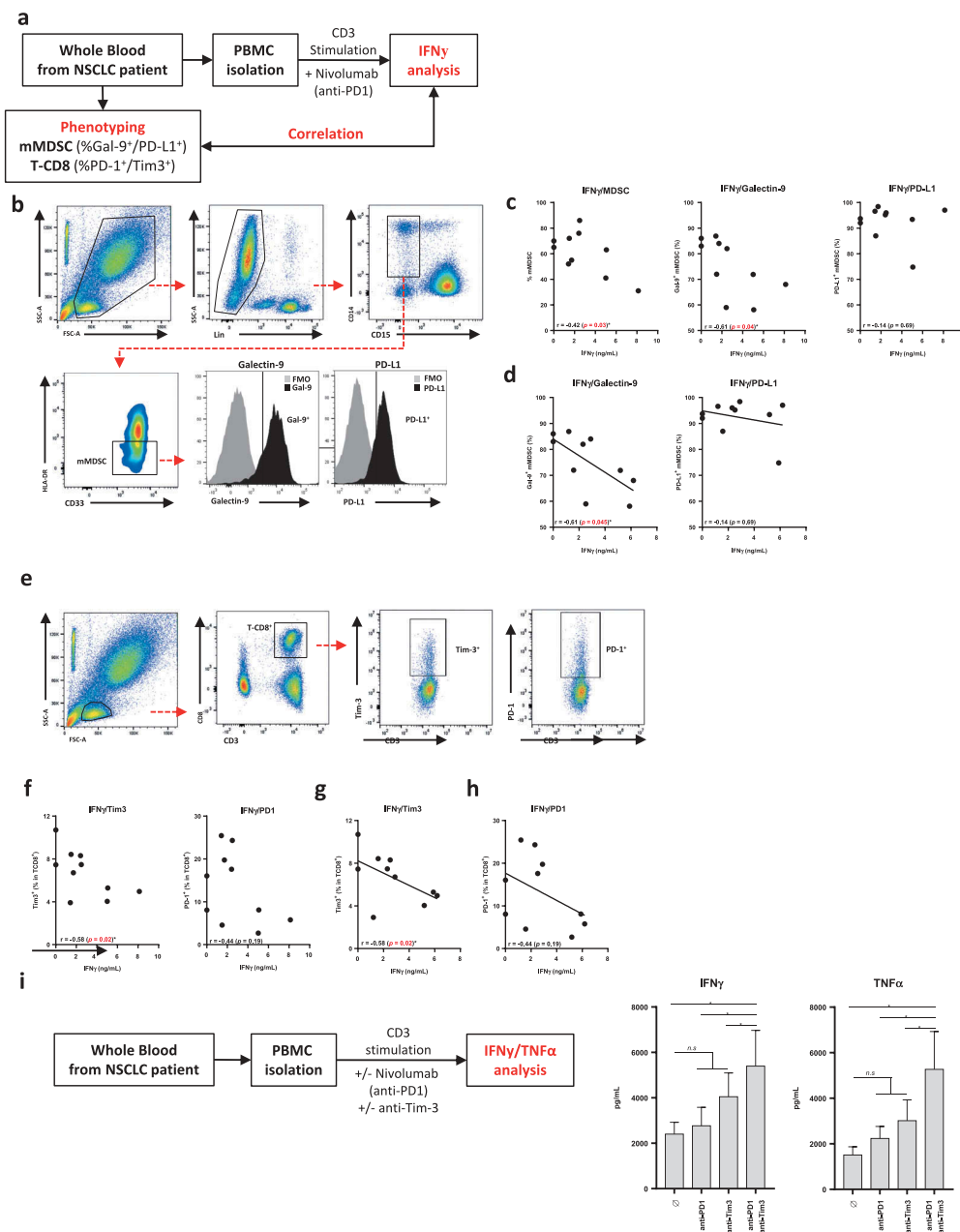


Figure 6. (a). Graphical representation of the strategy used to correlate PBMC immune profile (mMDSC and T-CD8⁺ phenotype) with response to CD3 stimulation and PD-1 blockade *in vitro* (during 3 days). (b). Representative gating strategy used to analyze PD-L1 and galectin-9 expression on peripheral blood mMDSC in NSCLC patients (n = 10). FMO controls were used to identify PD-L1 and galectin-9 positivity. (c). Correlation curves of mMDSC level in PBMC (at day 0) (on the left), of the percentage of galectin-9⁺ mMDSC (in the middle) and PD-L1⁺ mMDSC (on the right) with IFN γ secretion level (after 3 days of CD3 stimulation and PD-1 blockade). Correlations were evaluated with Spearman's rank correlation coefficient. (d). Correlation curves of the percentage of galectin-9⁺ mMDSC (in the left) and PD-L1⁺ mMDSC (on the right) with IFN γ secretion level (after 3 days of CD3 stimulation but without PD-1 blockade). Correlations were evaluated with Spearman's rank correlation coefficient. (e). Representative gating strategy used to analyze PD-1 and Tim-3 expression on peripheral blood CD8⁺ T cells in NSCLC patients (n = 10). FMO controls were used to identify PD-1 and Tim-3 positivity (presented in SD2). (f). Correlation curves of the percentage of Tim-3⁺ T-CD8⁺ (on the left) and PD-1⁺ T-CD8⁺ (on the right) with IFN γ secretion level (after 3 days of CD3 stimulation and PD-1 blockade). Correlations were evaluated with Spearman's rank correlation coefficient. (g-h). Correlation curves of the percentage of Tim-3⁺ T-CD8⁺ (G) and PD-1⁺ T-CD8⁺ (H) with IFN γ secretion level (after 3 days of CD3 stimulation but without PD-1 blockade). Correlations were evaluated with Spearman's rank correlation coefficient. (i). Graphical representation of the strategy used to study anti-PD-1 and anti-Tim-3 blockade additive effects *in vitro* on NSCLC PBMC after CD3 stimulation (3 days) (on the left). IFN γ and TNF α secretions were analyzed by ELISA (on the right).

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns: not significant.

expressing lymphoid cells and mMDSC at secondary progression. Taken together, these data suggest that Tim-3 expression and monocytic MDSC accumulation are mechanisms involved in both primary and secondary resistance to anti-

PD-1 therapy. Previous reports suggest that secondary resistance to checkpoint inhibitors is associated with genetic mutation linked to the pressure of selection. Some reports suggest that neoantigen loss could occur through the elimination of

tumor subclones which are eliminated by activated T cells by anti-PD-1.²⁹ Some other reports describe mechanisms that involve loss-of-function mutations or LOH in genes including *HLA* genes, β 2-microglobulin, *PTEN*, *JAK1*, and *JAK2*, or the transporter for antigen presentation (*TAP1*) genes.³⁰ However, no report previously suggested Tim-3 or mMDSC as mechanisms of secondary resistance.

From a biological point of view, mMDSC expressed galectin-9, the ligand of Tim-3. Presence of Tim-3⁺ exhausted T cells and galectin-9 expressing mMDSC was associated with decreased CD8 secreting capacity. From a therapeutic point of view, we observed that anti-Tim-3 could restore *in vitro* the CD8 secreting property when combined with anti-PD-1, thus suggesting that Tim-3 expression is not only a biomarker of resistance but may also have a mechanistic role in this resistance. Previous reports in mice also suggest that depletion of MDSC using different strategies, enhance the efficacy of anti-PD-1 or anti-CTLA4 therapy.^{31–33} Together our data and previous mice experiments provide a strong rationale to combine mMDSC depletion and Tim-3 blockade in addition to anti-PD-1 therapy to fight against primary and secondary resistance.

In conclusion, our data propose that early induction of Tim-3 expression on lymphoid cells and mMDSC could be used to predict patient response to anti-PD-1 therapy in lung cancer. Moreover, Tim-3 blockade and mMDSC are involved in primary and secondary resistance to anti-PD-1 therapy. mMDSC and Tim-3 expression are associated with the reduced capacity of CD8⁺ T cells to produce IFN γ under anti-PD-1 therapy. These data strongly support the rationale for testing combination therapy of anti-PD-1 and anti-Tim-3 and/or MDSC depletion in these patients to improve the response rate to anti-PD-1/PDL1 therapy in lung cancer.

Abbreviations

| | |
|-----------|---|
| anti PD-1 | (Program death 1) |
| MDSC | myeloid derived suppressor cells |
| Tim3 | T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 |

Authors' Contributions

Conception and design: E. Limagne, F. Ghiringhelli

Development of methodology: E. Limagne, C. Richard, M. Thibaudin, C. Truntzer

Acquisition of data (acquired and managed patients, provided facilities, etc.): E. Limagne, M. Thibaudin

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): C. Richard, C. Truntzer

Writing, review, and/or revision of the manuscript: E. Limagne, C. Richard, M. Thibaudin, C. Truntzer, F. Ghiringhelli

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases and patients' recruitment): J.D. Fumet, A. Lagrange, L. Favier, B. Coudert

Study supervision: E. Limagne, F. Ghiringhelli

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Competing financial interests

F. Ghiringhelli received honoraria for oral communication from Lilly, Sanofi, and Amgen and is an advisory board member for Merck Serano, Amgen, Sanofi. No other author has any potential conflict of interest to disclose.

References

- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015 Mar;65(2):87–108. doi:10.3322/caac.21294.
- Giroux Leprieur E, Dumenil C, Julie C, Giraud V, Dumoulin J, Labrune S, Chinet T. Immunotherapy revolutionises non-small-cell lung cancer therapy: results, perspectives and new challenges. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2017;78:16–23.
- Califano R, Kerr K, Morgan RD, Lo Russo G, Garassino M, Morgillo F, Rossi A. Immune checkpoint blockade: a new era for non-small cell lung cancer. *Curr Oncol Rep*. 2016;18(9):59. doi:10.1007/s11912-016-0544-7.
- Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015 Oct 22;373(17):1627–1639. doi:10.1056/NEJMoa1507643.
- Herbst RS, Baas P, Kim D-W, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han J-Y, Molina J, Kim JH, Arvis CD, Ahn MJ. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2016 Apr 9;387(10027):1540–1550. doi:10.1016/S0140-6736(15)01281-7.
- Diggs LP, Hsueh EC. Utility of PD-L1 immunohistochemistry assays for predicting PD-1/PD-L1 inhibitor response. *Biomark Res*. 2017;5:12. doi:10.1186/s40364-017-0093-8.
- Grigg C, Rizvi NA. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction? *J Immunother Cancer*. 2016;4:48. doi:10.1186/s40425-016-0153-x.
- Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csösz T, Fülöp A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2016 10;375(19):1823–1833. doi:10.1056/NEJMoa1606774.
- Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, Chen L, Pardoll DM, Topalian SL, Anders RA. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Oct 1;20(19):5064–5074. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3271.
- Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, Patnaik A, Aggarwal C, Gubens M, Horn L, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015 May 21;372(21):2018–2028. doi:10.1056/NEJMoa1501824.
- Weber R, Fleming V, Hu X, Nagibin V, Groth C, Altevogt P, Utikal J, Umansky V. Myeloid-derived suppressor cells hinder the anti-cancer activity of immune checkpoint inhibitors. *Front Immunol*. 2018;9:1310. doi:10.3389/fimmu.2018.01310.
- Weide B, Martens A, Hassel JC, Berking C, Postow MA, Bisschop K, Simeone E, Mangana J, Schilling B, Di Giacomo AM, et al. Baseline biomarkers for outcome of melanoma patients treated with pembrolizumab. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 Nov 15;22(22):5487–5496. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0127.
- Huang AC, Postow MA, Orlowski RJ, Mick R, Bengsch B, Manne S, Xu W, Harmon S, Giles JR, Wenz B, et al. T-cell invigoration to

- tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2017 04;545(7652):60–65. doi:10.1038/nature22079.
14. Rovati B, Mariucci S, Manzoni M, Bencardino K, Danova M. Flow cytometric detection of circulating dendritic cells in healthy subjects. *Eur J Histochem EJH*. 2008 Mar;52(1):45–52. doi:10.4081/1185.
 15. Legat A, Speiser DE, Pircher H, Zehn D, Fuentes Marraco SA. Inhibitory receptor expression depends more dominantly on differentiation and activation than “Exhaustion” of human CD8 T cells. *Front Immunol*. 2013;4:455. doi:10.3389/fimmu.2013.00455.
 16. Mahnke YD, Beddall MH, Roederer M. OMIP-017: human CD4 (+) helper T-cell subsets including follicular helper cells. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2013 May;83(5):439–440. doi:10.1002/cyto.a.22269.
 17. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001 Nov;22(11):633–640. doi:10.1016/S1471-4906(01)02060-9.
 18. Roederer M, Nozzi JL, Nason MC. SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2011 Feb;79(2):167–174. doi:10.1002/cyto.a.21015.
 19. Binder H CoxBoost: cox models by likelihood based boosting for a single survival endpoint or competing risks [Internet]; 2013 [accessed 2018 Sep 21]. <https://CRAN.R-project.org/package=CoxBoost>.
 20. Ferrucci PF, Ascierto PA, Pigozzo J, Del Vecchio M, Maio M, Antonini Cappellini GC, Guidoboni M, Queirolo P, Savoia P, Mandalà M, et al. Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016 Apr;27(4):732–738. doi:10.1093/annonc/mdw016.
 21. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Geukes Foppen M, Yuan J, Postow MA, Wong P, Romano E, Khammari A, Dreno B, Capone M, et al. Baseline peripheral blood biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 15;22(12):2908–2918. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2412.
 22. Delyon J, Mateus C, Lefeuvre D, Lanoy E, Zitvogel L, Chaput N, Roy S, Eggermont AMM, Routier E, Robert C. Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013 Jun;24(6):1697–1703. doi:10.1093/annonc/mdt027.
 23. Ku GY, Yuan J, Page DB, Schroeder SEA, Panageas KS, Carvajal RD, Chapman PB, Schwartz GK, Allison JP, Wolchok JD. Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting: lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer*. 2010 Apr 1;116(7):1767–1775. doi:10.1002/cncr.v116:7.
 24. Simeone E, Gentilcore G, Giannarelli D, Grimaldi AM, Caracò C, Curvietto M, Esposito A, Paone M, Palla M, Cavalcanti E, et al. Immunological and biological changes during ipilimumab treatment and their potential correlation with clinical response and survival in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol Immunother CII*. 2014 Jul;63(7):675–683. doi:10.1007/s00262-014-1545-8.
 25. Donahue RN, Lepone LM, Grenga I, Jochems C, Fantini M, Madan RA, Heery CR, Gulley JL, Schlom J. Analyses of the peripheral immunome following multiple administrations of avelumab, a human IgG1 anti-PD-L1 monoclonal antibody. *J Immunother Cancer*. 2017;5:20. doi:10.1186/s40425-017-0220-y.
 26. Weber JS, Kudchadkar RR, Yu B, Gallenstein D, Horak CE, Inzunza HD, Zhao X, Martinez AJ, Wang W, Gibney G, et al. Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naive melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Dec 1;31(34):4311–4318. doi:10.1200/JCO.2013.51.4802.
 27. Gibney GT, Kudchadkar RR, DeConti RC, Thebeau MS, Czupryn MP, Tetteh L, Eysmans C, Richards A, Schell MJ, Fisher KJ, et al. Safety, correlative markers, and clinical results of adjuvant nivolumab in combination with vaccine in resected high-risk metastatic melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015 Feb 15;21(4):712–720. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2468.
 28. Yamauchi Y, Safi S, Blattner C, Rathinasamy A, Umansky L, Juenger S, Warth A, Eichhorn M, Muley T, Herth FJF, et al. Circulating and tumor myeloid-derived suppressor cells in resectable non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018 Sep 15;198(6):777–787. doi:10.1164/rccm.201708-1707OC.
 29. Anagnostou V, Smith KN, Forde PM, Niknafs N, Bhattacharya R, White J, Zhang T, Adleff V, Phallen J, Wali N, et al. Evolution of neoantigen landscape during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*. 2017;7(3):264–276. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0828.
 30. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer*. 2018 Jan;118(1):9–16. doi:10.1038/bjc.2017.434.
 31. Orillion A, Hashimoto A, Damayanti N, Shen L, Adelaiye-Ogala R, Arisa S, Chintala S, Ordentlich P, Kao C, Elzey B, et al. Entinostat neutralizes myeloid-derived suppressor cells and enhances the antitumor effect of PD-1 inhibition in murine models of lung and renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 01;23(17):5187–5201. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0741.
 32. Kim SH, Li M, Trousil S, Zhang Y, Pasca Di Magliano M, Swanson KD, Zheng B. Phenformin inhibits myeloid-derived suppressor cells and enhances the anti-tumor activity of PD-1 blockade in melanoma. *J Invest Dermatol*. 2017 Aug;137(8):1740–1748. doi:10.1016/j.jid.2017.03.033.
 33. Holmgaard RB, Brachfeld A, Gasmi B, Jones DR, Mattar M, Doman T, Murphy M, Schaer D, Wolchok JD, Merghoub T. Timing of CSF-1/CSF-1R signaling blockade is critical to improving responses to CTLA-4 based immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2016 Jul;5(7):e1151595. doi:10.1080/2162402X.2016.1151595.

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure 1:

Flow cytometry gating strategy to identify human myeloid cell subpopulations

Supplementary Figure 2:

Flow cytometry gating strategy to identify human CD8 T cell subpopulations

Supplementary Figure 3:

Flow cytometry gating strategy to identify human Treg and Thelper subpopulations

Supplementary Figure 4:

Flow cytometry gating strategy to identify human NK cell subpopulations

Supplementary Table 1:

Different marker combinations to identify each myeloid or lymphoid (T CD4⁺, T CD8⁺ and NK) cell subsets (on the left). Summary of variable exported for immune profile analyses for myeloid and lymphoid cell subsets (on the right).

Supplementary Table 2:

Summary of univariate analyses of myeloid parameters at day 0

Supplementary Table 3:

Summary of univariate analyses of lymphoid parameters at day 0

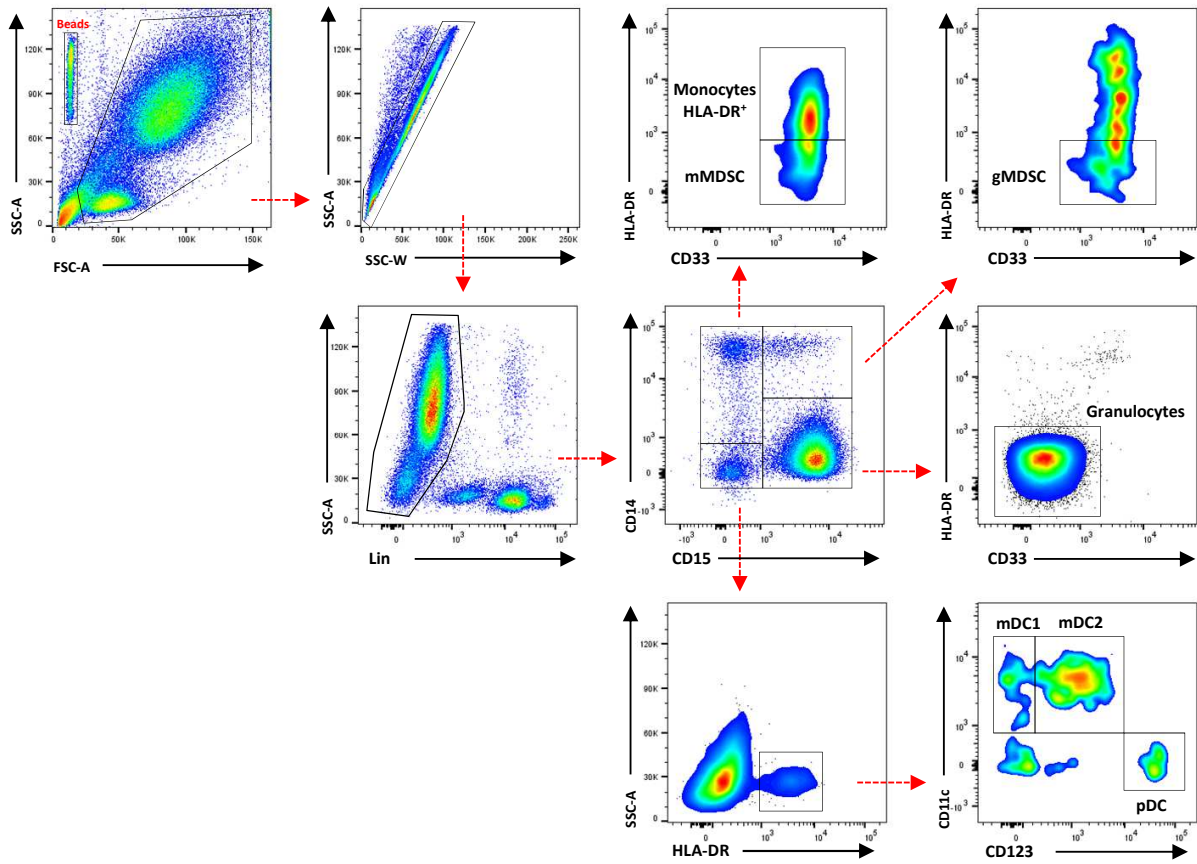
Supplementary Table 4:

Summary of univariate analyses of myeloid parameters at day 15

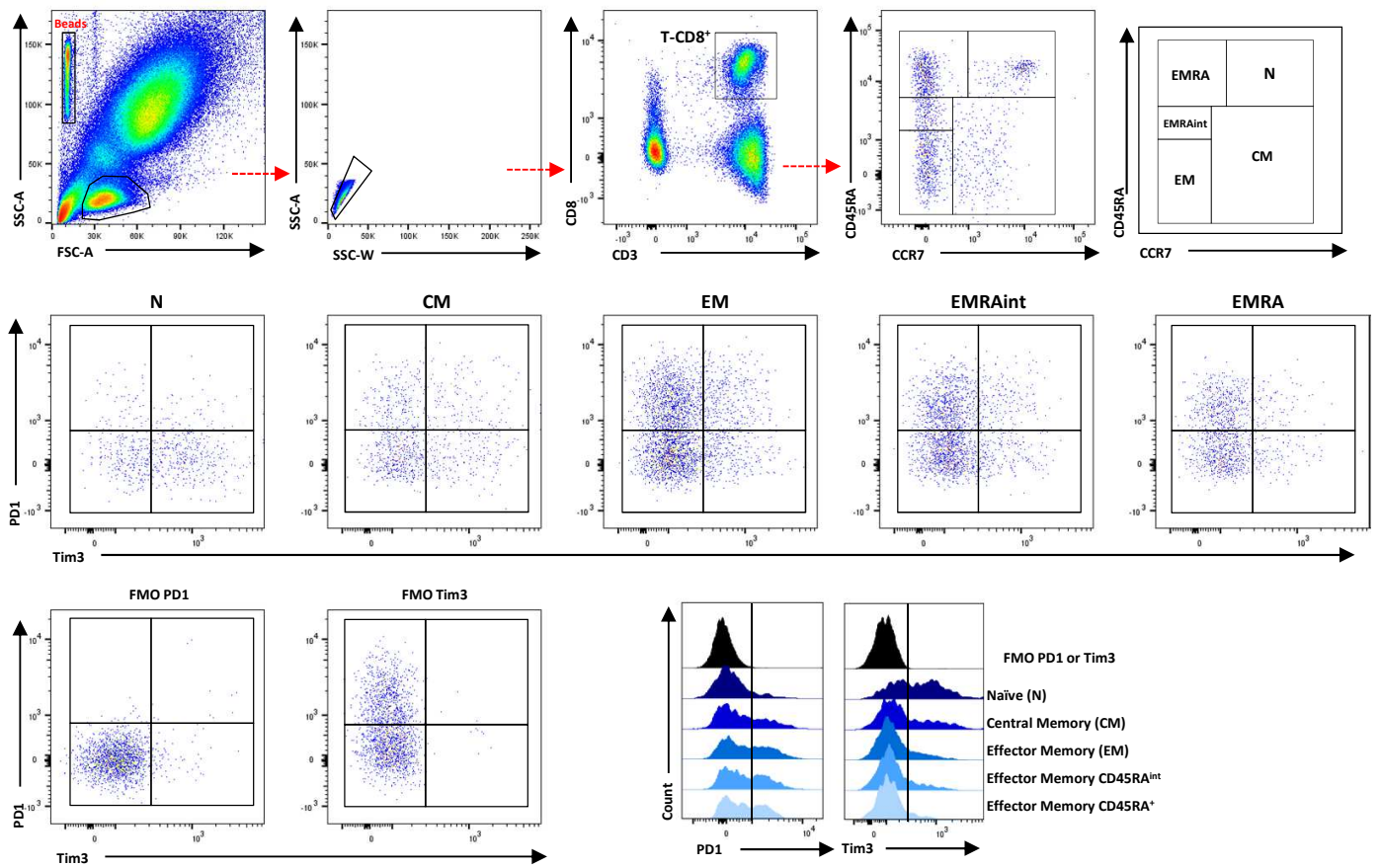
Supplementary Table 5:

Summary of univariate analyses of lymphoid parameters at day 15

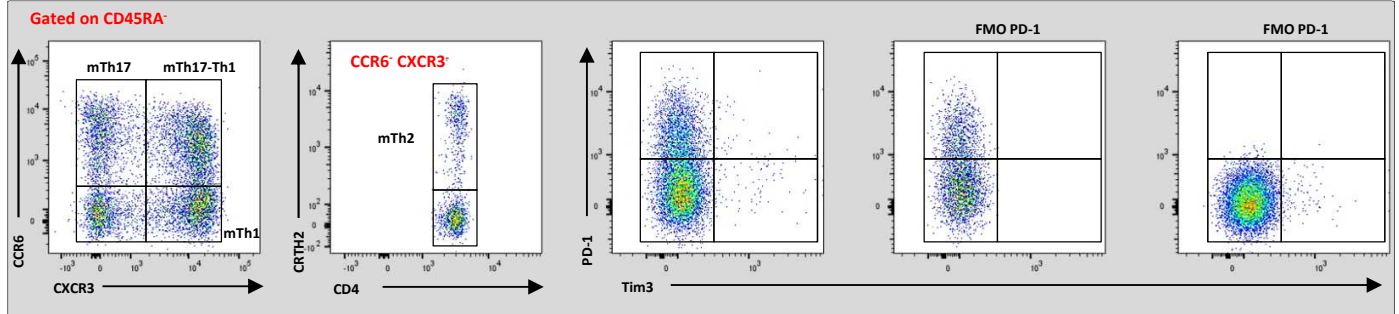
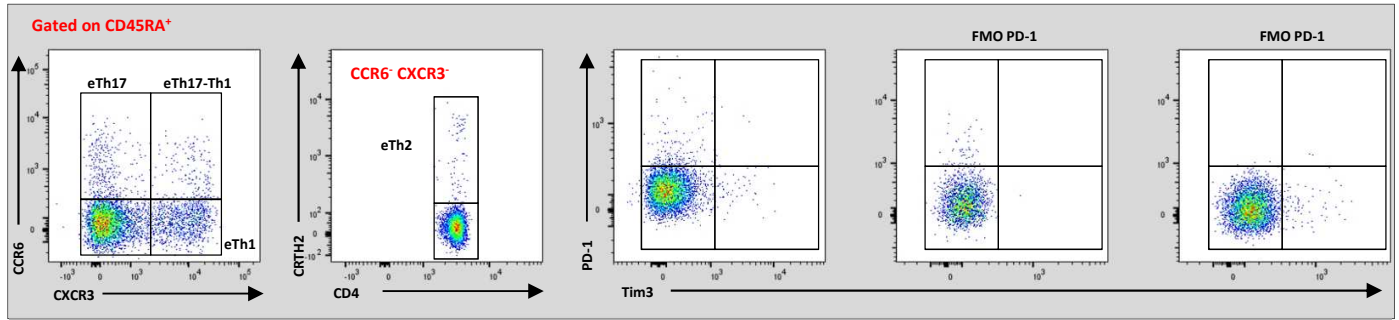
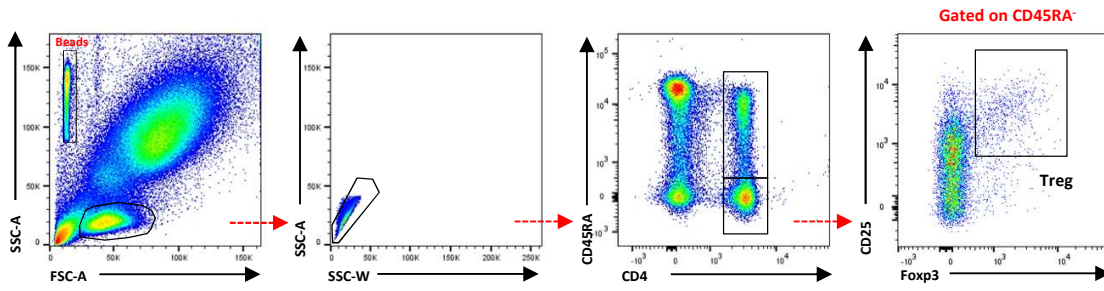
Supplementary Figure 1: Myeloid cell phenotyping



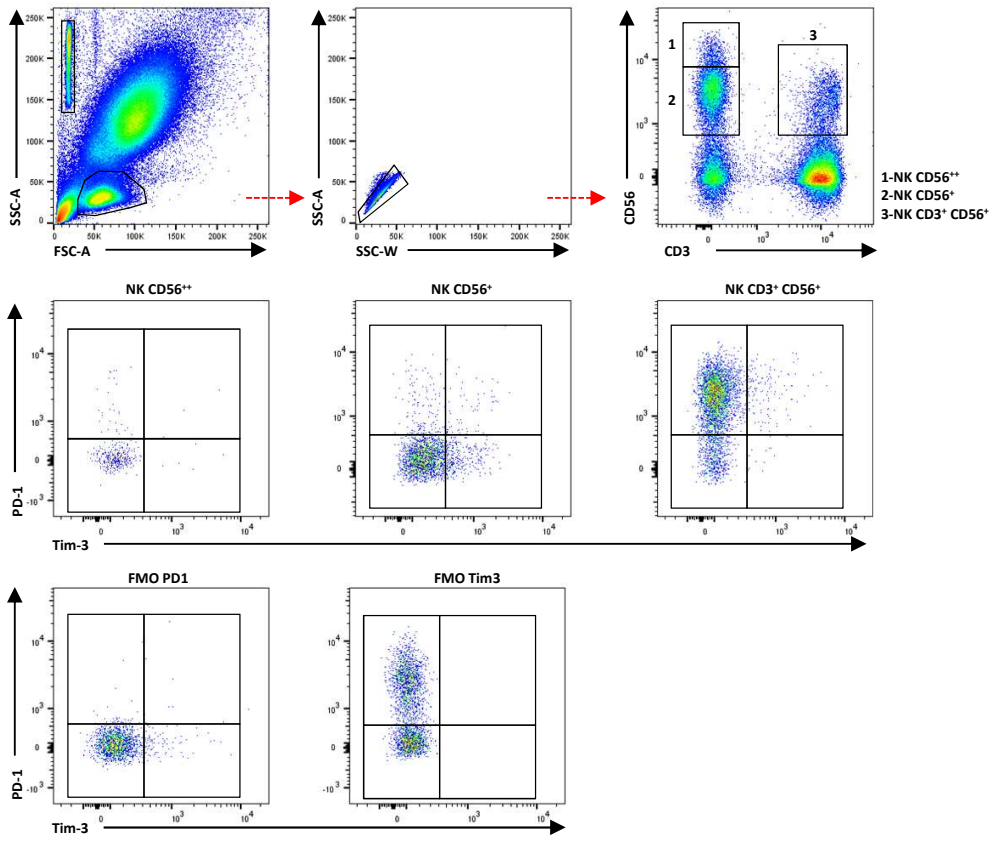
Supplementary Figure 2: CD8⁺ T cell phenotyping



Supplementary Figure 3: Thelper and Treg phenotyping



Supplementary Figure 4: NK cell phenotyping



Supplementary Table 1

Marker combination to identify myeloid cell subsets

| | Lin | CD33 | CD14 | CD15 | HLA-DR | CD11c | CD123 |
|--------------|-----|------|------|------|--------|-------|-------|
| Monocytes | - | + | + | - | + | + | low/- |
| mMDSC | - | + | + | - | low/- | + | low/- |
| Granulocytes | - | - | - | + | - | - | - |
| gMDSC | - | + | + | + | - | - | - |
| pDC | - | - | - | - | + | - | + |
| mDC1 | - | - | - | - | + | + | - |
| mDC2 | - | - | - | - | + | + | low |

Lin = CD3, CD20, CD19, CD56

Marker combination to identify lymphoid cell subsets

| | CD4 | CD45RA | CCR6 | CXCR3 | CRTH2 | | |
|-----------|-----|--------|------|-------|-------|--------------------------|-----------------------|
| mTh1 | + | - | - | + | - | % in CD45RA ⁺ | % in CD4 ⁺ |
| mTh17 | + | - | + | - | - | | |
| mTh1/Th17 | + | - | + | + | - | | |
| mTh2 | + | - | - | - | + | | |
| eTh1 | + | + | - | + | - | % in CD45RA ⁺ | % in CD4 ⁺ |
| eTh17 | + | + | + | - | - | | |
| eTh1/Th17 | + | + | + | + | - | | |
| eTh2 | + | + | - | - | + | | |

| | CD4 | CD45RA | CD25 | Foxp3 |
|------|-----|--------|------|-------|
| Treg | + | - | high | + |

| | CD3 | CD8 | CD45RA | CCR7 | PD1 | Tim3 | |
|---------------------------------------|-----|-----|--------|------|-----|------|-----------------------|
| Naïve | + | + | + | + | +/- | +/- | % in CD8 ⁺ |
| Central Memory | + | + | - | + | +/- | +/- | |
| Effector Memory | + | + | + | - | +/- | +/- | |
| Effector Memory CD45RA ^{low} | + | + | - | - | +/- | +/- | |
| EMRA | + | + | + | - | +/- | +/- | |

| | CD3 | CD56 |
|---------------------------------------|-----|------|
| NK CD56 ⁺ | - | + |
| NK CD56 ^{hi} | - | high |
| NK CD3 ⁺ CD56 ⁺ | + | + |

Summary of variable exported for immune profile analysis

| Absolute Count | PD-L1 | | HLA-DR |
|----------------|----------------------------|-----|--------|
| | % positive cells in subset | MFI | MFI |
| x | +/- | x | x |
| x | +/- | x | x |
| x | +/- | x | x |
| x | +/- | x | x |
| x | +/- | x | x |
| x | +/- | x | x |
| x | +/- | x | x |

Summary of variable exported for immune profile analysis

| PD1* | | Tim3 | |
|-------------|-----|-------------|-----|
| % in subset | MFI | % in subset | MFI |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |

| | | | |
|-----|---|-----|---|
| +/- | x | +/- | x |
|-----|---|-----|---|

* just for Day 0 (PD-1 staining is lost after Nivolumab treatment)

| PD1* | | Tim3 | |
|-------------|-----|-------------|-----|
| % in subset | MFI | % in subset | MFI |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |

* just for Day 0 (PD-1 staining is lost after Nivolumab treatment)

| PD1* | | Tim3 | |
|-------------|-----|-------------|-----|
| % in subset | MFI | % in subset | MFI |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |
| +/- | x | +/- | x |

* just for Day 0 (PD-1 staining is lost after Nivolumab treatment)

Supplementary Table 2: Summary of univariate analyses of myeloid parameters at day 0

| Parameters | Hratio | 95% CI low | 95% CI high | log-rank p-value | Adjusted p-value (FDR) |
|------------------------|---------|------------|-------------|------------------|------------------------|
| gMDSC MFI PD-L1 | 1,00001 | 1,00000 | 1,00002 | 0,039 | 0,66 |
| Monocytes MFI PD-L1 | 1,00001 | 1,00000 | 1,00002 | 0,053 | 0,66 |
| Monocytes | 1,00083 | 0,99966 | 1,00200 | 0,16 | 0,85 |
| mDC2 MFI PD-L1 | 1,00055 | 0,99971 | 1,00139 | 0,20 | 0,85 |
| mDC2 | 0,98599 | 0,96321 | 1,00932 | 0,23 | 0,85 |
| mMDSC | 1,00136 | 0,99906 | 1,00365 | 0,24 | 0,85 |
| gMDSC | 1,01902 | 0,97808 | 1,06168 | 0,37 | 0,85 |
| mDC2 MFI HLA-DR | 1,00003 | 0,99996 | 1,00009 | 0,45 | 0,85 |
| mDC1 MFI PD-L1 | 0,99989 | 0,99961 | 1,00017 | 0,45 | 0,85 |
| %mMDSC PD-L1+ | 0,97923 | 0,92313 | 1,03874 | 0,48 | 0,85 |
| pDC MFI HLA-DR | 0,99997 | 0,99990 | 1,00005 | 0,49 | 0,85 |
| %mDC2 PD-L1+ | 1,00442 | 0,98994 | 1,01911 | 0,55 | 0,85 |
| %Granulocytes PD-L1+ | 0,99561 | 0,98076 | 1,01069 | 0,57 | 0,85 |
| %mDC1 PD-L1+ | 0,99640 | 0,98344 | 1,00953 | 0,59 | 0,85 |
| mDC1 | 0,99230 | 0,96288 | 1,02262 | 0,61 | 0,85 |
| %gMDSC PD-L1+ | 0,99282 | 0,96532 | 1,02109 | 0,62 | 0,85 |
| mMDSC MFI PD-L1 | 0,99996 | 0,99977 | 1,00015 | 0,66 | 0,85 |
| mDC1 MFI HLA-DR | 0,99999 | 0,99995 | 1,00003 | 0,67 | 0,85 |
| pDC MFI PD-L1 | 1,00029 | 0,99869 | 1,00189 | 0,72 | 0,85 |
| Granulocytes MFI PD-L1 | 0,99983 | 0,99887 | 1,00079 | 0,72 | 0,85 |
| pDC | 0,98341 | 0,89499 | 1,08056 | 0,73 | 0,85 |
| %pDC PD-L1+ | 1,00280 | 0,98614 | 1,01974 | 0,74 | 0,85 |
| Monocytes MFI HLA-DR | 1,00001 | 0,99987 | 1,00016 | 0,86 | 0,94 |
| %Monocytes PD-L1+ | 0,99899 | 0,97097 | 1,02781 | 0,94 | 0,98 |
| Granulocytes | 1,00000 | 0,99992 | 1,00008 | 0,98 | 0,98 |

Supplementary Table 3: Summary of univariate analyses of lymphoid parameters at day 0

| Parameters | Hratio | 95% CI low | 95% CI high | log-rank p-value | Adjusted p-value (FDR) | Parameters | Hratio | 95% CI low | 95% CI high | log-rank p-value | Adjusted p-value (FDR) |
|-------------------------|---------|------------|-------------|------------------|------------------------|-------------------------|---------|------------|-------------|------------------|------------------------|
| EM MFI PD1 | 1,00061 | 1,00002 | 1,00002 | 0,04 | 0,99 | %EM CD45RAlow Tim-3+ | 0,99442 | 0,96796 | 0,96796 | 0,57 | 0,99 |
| %EM PD-1+ | 1,01198 | 0,99818 | 0,99818 | 0,09 | 0,99 | CD4+ CD45RA- | 1,00936 | 0,99806 | 0,99806 | 0,59 | 0,99 |
| % in CD45RA- mTH2 | 0,98318 | 0,99051 | 0,99051 | 0,11 | 0,99 | % in CD45RA- Treg | 0,99958 | 0,87728 | 0,87728 | 0,61 | 0,99 |
| EM CD45RAlow | 1,04408 | 0,97755 | 0,97755 | 0,11 | 0,99 | %in CD8+ CM | 0,98497 | 0,98145 | 0,98145 | 0,61 | 0,99 |
| eTH17 MFI PD1 | 0,98992 | 0,99784 | 0,99784 | 0,15 | 0,99 | %EMRA Tim-3+ | 0,99322 | 0,96986 | 0,96986 | 0,61 | 0,99 |
| %Treg PD-1+ | 0,99909 | 0,99247 | 0,99247 | 0,17 | 0,99 | %eTH1 PD-1+ | 0,99969 | 0,97546 | 0,97546 | 0,62 | 0,99 |
| Treg MFI PD1 | 1,00105 | 0,99951 | 0,99951 | 0,18 | 0,99 | %mTH1 TH17 Tim-3+ | 1,00349 | 0,96667 | 0,96667 | 0,63 | 0,99 |
| % in CD45RA+ eTH2 | 0,98532 | 0,98675 | 0,98675 | 0,21 | 0,99 | NK CD3- CD56+ MFI PD1 | 0,98890 | 0,99632 | 0,99632 | 0,65 | 0,99 |
| %in CD8+ N | 1,00909 | 0,99222 | 0,99222 | 0,21 | 0,99 | %in CD8+ EM CD45RAlow | 0,95881 | 0,91029 | 0,91029 | 0,66 | 0,99 |
| %eTH17 PD-1+ | 1,02320 | 0,97454 | 0,97454 | 0,22 | 0,99 | EM MFI Tim-3 | 0,98530 | 0,99777 | 0,99777 | 0,68 | 0,99 |
| %NK CD3- CD56+ Tim-3+ | 1,01350 | 0,99148 | 0,99148 | 0,22 | 0,99 | NKT CD3+ CD56+ MFI Tim3 | 0,99697 | 0,99419 | 0,99419 | 0,68 | 0,99 |
| NKT CD3+ CD56+ | 1,04428 | 0,99372 | 0,99372 | 0,23 | 0,99 | Treg MFI Tim3 | 1,00649 | 0,99719 | 0,99719 | 0,68 | 0,99 |
| %NKT CD3+ CD56+ PD-1+ | 0,99760 | 0,99466 | 0,99466 | 0,23 | 0,99 | mTH17 MFI PD1 | 0,99959 | 0,99747 | 0,99747 | 0,70 | 0,99 |
| EM | 0,99828 | 0,99542 | 0,99542 | 0,23 | 0,99 | mTH1 TH17 | 0,97315 | 0,99312 | 0,99312 | 0,71 | 0,99 |
| Treg | 0,99235 | 0,95334 | 0,95334 | 0,26 | 0,99 | eTH17 | 1,00664 | 0,97183 | 0,97183 | 0,72 | 0,99 |
| eTh2 MDI PD1 | 1,02495 | 0,99573 | 0,99573 | 0,26 | 0,99 | mTh1 MFI Tim3 | 0,99219 | 0,99174 | 0,99174 | 0,72 | 0,99 |
| T-CD8+ | 0,99201 | 0,99776 | 0,99776 | 0,27 | 0,99 | %NKT CD3+ CD56+ Tim-3+ | 0,99087 | 0,94807 | 0,94807 | 0,72 | 0,99 |
| %eTH17 Tim-3+ | 0,98274 | 0,97997 | 0,97997 | 0,27 | 0,99 | EMCD45low MFI Tim-3 | 0,98270 | 0,99797 | 0,99797 | 0,73 | 0,99 |
| % in CD45RA+ eTH1 TH17 | 0,99845 | 0,83416 | 0,83416 | 0,28 | 0,99 | CD8+ MFI PD1 | 0,99526 | 0,99933 | 0,99933 | 0,74 | 0,99 |
| % in CD45RA+ eTH17 | 1,01112 | 0,89484 | 0,89484 | 0,29 | 0,99 | mTh2 MDI PD1 | 1,00570 | 0,99747 | 0,99747 | 0,75 | 0,99 |
| EMRA | 0,99919 | 0,99305 | 0,99305 | 0,30 | 0,99 | eTH1 | 1,01695 | 0,99442 | 0,99442 | 0,76 | 0,99 |
| %CM PD-1+ | 0,93778 | 0,99363 | 0,99363 | 0,31 | 0,99 | NK CD3- CD56++ | 0,98366 | 0,99044 | 0,99044 | 0,77 | 0,99 |
| mTh1 MFI PD1 | 0,96209 | 0,99912 | 0,99912 | 0,31 | 0,99 | %T-CD8+ Tim-3+ | 1,00432 | 0,97504 | 0,97504 | 0,77 | 0,99 |
| %in CD8+ EMRA | 0,99758 | 0,96982 | 0,96982 | 0,34 | 0,99 | CD8+ MFI Tim-3 | 1,00324 | 0,99837 | 0,99837 | 0,78 | 0,99 |
| N | 1,01607 | 0,99538 | 0,99538 | 0,34 | 0,99 | %mTH17 PD-1+ | 0,99931 | 0,97605 | 0,97605 | 0,78 | 0,99 |
| eTh1 Th17 MFI Tim3 | 0,99970 | 0,99824 | 0,99824 | 0,35 | 0,99 | EMCD45low MFI PD1 | 0,99266 | 0,99950 | 0,99950 | 0,78 | 0,99 |
| %NK CD3- CD56+ PD-1+ | 1,01224 | 0,97953 | 0,97953 | 0,35 | 0,99 | %mTH17 Tim-3+ | 0,98289 | 0,97186 | 0,97186 | 0,78 | 0,99 |
| NK CD3- CD56+ | 0,98997 | 0,99510 | 0,99510 | 0,36 | 0,99 | %mTH1 TH17 PD-1+ | 0,98861 | 0,97643 | 0,97643 | 0,79 | 0,99 |
| %N PD-1+ | 1,00436 | 0,97235 | 0,97235 | 0,39 | 0,99 | %in CD8+ EM | 0,99961 | 0,98120 | 0,98120 | 0,80 | 0,99 |
| T-CD4+ MFI PD1 | 0,99943 | 0,99662 | 0,99662 | 0,41 | 0,99 | eTh1 MFI PD1 | 0,99899 | 0,99753 | 0,99753 | 0,80 | 0,99 |
| %EM CD45RAlow PD-1+ | 1,00556 | 0,99325 | 0,99325 | 0,42 | 0,99 | EMRA MFI Tim-3 | 0,99951 | 0,99802 | 0,99802 | 0,80 | 0,99 |
| %eTH2 PD-1+ | 0,99845 | 0,96844 | 0,96844 | 0,42 | 0,99 | CM MFI Tim-3 | 0,99727 | 0,99939 | 0,99939 | 0,83 | 0,99 |
| NK CD3- CD56+ MFI Tim3 | 0,98078 | 0,99784 | 0,99784 | 0,43 | 0,99 | %mTH2 PD-1+ | 0,99959 | 0,97750 | 0,97750 | 0,83 | 0,99 |
| mTH1 | 1,00578 | 0,99445 | 0,99445 | 0,43 | 0,99 | mTh1 Th17 MFI Tim3 | 0,99891 | 0,99436 | 0,99436 | 0,84 | 0,99 |
| % in CD4+ CD45RA+ | 0,99366 | 0,99134 | 0,99134 | 0,43 | 0,99 | %EMRA PD-1+ | 0,99556 | 0,98793 | 0,98793 | 0,85 | 0,99 |
| % in CD4+ CD45RA- | 0,97190 | 0,97997 | 0,97997 | 0,43 | 0,99 | %mTH2 Tim-3+ | 0,99871 | 0,98371 | 0,98371 | 0,85 | 0,99 |
| NK CD3- CD56++ MFI Tim3 | 0,99900 | 0,99754 | 0,99754 | 0,43 | 0,99 | mTH17 | 0,99465 | 0,99221 | 0,99221 | 0,86 | 0,99 |
| CD4+ CD45RA+ | 0,97432 | 0,99903 | 0,99903 | 0,44 | 0,99 | mTH17 MFI Tim3 | 0,99969 | 0,99454 | 0,99454 | 0,86 | 0,99 |
| %NK CD3- CD56++ Tim-3+ | 0,99517 | 0,98326 | 0,98326 | 0,45 | 0,99 | eTh1 MFI Tim3 | 1,00322 | 0,99611 | 0,99611 | 0,87 | 0,99 |
| NKT CD3+ CD56+ MFI PD1 | 1,00148 | 0,99974 | 0,99974 | 0,46 | 0,99 | EMRA MFI PD1 | 1,00014 | 0,99914 | 0,99914 | 0,90 | 0,99 |
| T-CD4+ CD45RA+ MFI PD1 | 0,99841 | 0,99659 | 0,99659 | 0,46 | 0,99 | T-CD4+ CD45RA+ MFI Tim3 | 1,00255 | 0,99743 | 0,99743 | 0,90 | 0,99 |
| %eTH1 TH17 Tim-3+ | 1,00578 | 0,98418 | 0,98418 | 0,47 | 0,99 | mTH2 | 0,99964 | 0,98318 | 0,98318 | 0,90 | 0,99 |
| % in CD45RA- mTH1 TH17 | 0,99425 | 0,95540 | 0,95540 | 0,47 | 0,99 | T-CD4+ MFI Tim3 | 1,00218 | 0,99644 | 0,99644 | 0,90 | 0,99 |
| eTH1 TH17 | 1,00163 | 0,94920 | 0,94920 | 0,47 | 0,99 | % in CD45RA- mTH17 | 1,00103 | 0,95334 | 0,95334 | 0,90 | 0,99 |
| %T-CD8+ PD-1+ | 1,00064 | 0,99092 | 0,99092 | 0,47 | 0,99 | N MFI Tim-3 | 1,00172 | 0,99920 | 0,99920 | 0,90 | 0,99 |
| % in CD45RA- mTH1 | 1,00016 | 0,95800 | 0,95800 | 0,48 | 0,99 | %mTH1 PD-1+ | 0,99676 | 0,98594 | 0,98594 | 0,92 | 0,99 |
| eTH2 | 0,99907 | 0,98643 | 0,98643 | 0,49 | 0,99 | %eTH1 Tim-3+ | 1,00272 | 0,97679 | 0,97679 | 0,92 | 0,99 |
| CM | 0,98777 | 0,99480 | 0,99480 | 0,49 | 0,99 | %Treg Tim-3+ | 1,00235 | 0,97920 | 0,97920 | 0,93 | 0,99 |
| T-CD4+ CD45RA- MFI PD1 | 0,98622 | 0,99771 | 0,99771 | 0,50 | 0,99 | mTh2 MDI Tim3 | 0,99980 | 0,99734 | 0,99734 | 0,93 | 0,99 |
| %eTH1 TH17 PD-1+ | 0,98861 | 0,98314 | 0,98314 | 0,50 | 0,99 | %N Tim-3+ | 1,00008 | 0,98384 | 0,98384 | 0,94 | 0,99 |
| %EM Tim-3+ | 1,00525 | 0,96778 | 0,96778 | 0,51 | 0,99 | %NK CD3- CD56++ PD-1+ | 1,00842 | 0,97887 | 0,97887 | 0,95 | 0,99 |
| CM MFI PD1 | 0,99208 | 0,99954 | 0,99954 | 0,51 | 0,99 | eTh2 MFI Tim3 | 1,00199 | 0,99827 | 0,99827 | 0,95 | 0,99 |
| %CM Tim-3+ | 1,00748 | 0,99105 | 0,99105 | 0,51 | 0,99 | CD4+ | 1,00256 | 0,99901 | 0,99901 | 0,95 | 0,99 |
| eTH17 MFI Tim3 | 1,00281 | 0,99831 | 0,99831 | 0,52 | 0,99 | T-CD4+ CD45RA- MFI Tim3 | 0,99681 | 0,99450 | 0,99450 | 0,97 | 0,99 |
| %mTH1 Tim-3+ | 0,99941 | 0,95159 | 0,95159 | 0,54 | 0,99 | eTh1 Th17 MFI PD1 | 1,00399 | 0,99787 | 0,99787 | 0,97 | 0,99 |
| % in CD45RA+ eTH1 | 0,98710 | 0,97161 | 0,97161 | 0,54 | 0,99 | mTh1 Th17 MFI PD1 | 0,99971 | 0,99787 | 0,99787 | 0,97 | 0,99 |
| N MFI PD1 | 1,00024 | 0,99867 | 0,99867 | 0,55 | 0,99 | NK CD3- CD56++ MFI PD1 | 0,99779 | 0,99850 | 0,99850 | 0,99 | 0,99 |
| | | | | | | %eTH2 Tim-3+ | 0,99977 | 0,98614 | 0,98614 | 0,99 | 0,99 |

Supplementary Table 4: Summary of univariate analyses of myeloid parameters at day 15

| Parameters | Hratio | 95% CI low | 95% CI high | log-rank p-value | Adjusted p-value (FDR) |
|------------------------|---------|------------|-------------|------------------|------------------------|
| Monocytes | 1,00235 | 1,00086 | 1,00384 | 0,0015 | 0,02 |
| mMDSC | 1,00554 | 1,00187 | 1,00923 | 0,0017 | 0,02 |
| mDC1 MFI PD-L1 | 1,00029 | 0,99993 | 1,00066 | 0,11 | 0,51 |
| pDC MFI PD-L1 | 1,00139 | 0,99968 | 1,00309 | 0,11 | 0,51 |
| gMDSC | 1,01219 | 0,99684 | 1,02777 | 0,11 | 0,51 |
| %mDC2 PD-L1+ | 1,01313 | 0,99586 | 1,03069 | 0,13 | 0,51 |
| mDC2 MFI PD-L1 | 1,00035 | 0,99988 | 1,00082 | 0,14 | 0,51 |
| pDC | 1,07620 | 0,94458 | 1,22617 | 0,27 | 0,73 |
| %pDC PD-L1+ | 1,01208 | 0,98998 | 1,03467 | 0,29 | 0,73 |
| mDC2 MFI HLA-DR | 1,00004 | 0,99997 | 1,00011 | 0,29 | 0,73 |
| Granulocytes | 1,00006 | 0,99993 | 1,00019 | 0,39 | 0,89 |
| gMDSC MFI PD-L1 | 0,99991 | 0,99968 | 1,00015 | 0,48 | 0,89 |
| %mDC1 PD-L1+ | 1,00749 | 0,98629 | 1,02914 | 0,49 | 0,89 |
| %mMDSC PD-L1+ | 0,95997 | 0,85244 | 1,08106 | 0,50 | 0,89 |
| pDC MFI HLA-DR | 1,00003 | 0,99994 | 1,00011 | 0,54 | 0,90 |
| %Monocytes PD-L1+ | 0,98392 | 0,91640 | 1,05642 | 0,65 | 0,96 |
| mMDSC MFI PD-L1 | 1,00006 | 0,99979 | 1,00034 | 0,66 | 0,96 |
| mDC2 | 0,99705 | 0,97830 | 1,01615 | 0,76 | 0,96 |
| Monocytes MFI PD-L1 | 1,00004 | 0,99977 | 1,00031 | 0,77 | 0,96 |
| %Granulocytes PD-L1+ | 0,99691 | 0,97679 | 1,01745 | 0,77 | 0,96 |
| Granulocytes MFI PD-L1 | 0,99986 | 0,99871 | 1,00101 | 0,81 | 0,96 |
| Monocytes MFI HLA-DR | 0,99998 | 0,99973 | 1,00022 | 0,85 | 0,97 |
| mDC1 MFI HLA-DR | 1,00000 | 0,99995 | 1,00006 | 0,91 | 0,99 |
| %gMDSC PD-L1+ | 0,99962 | 0,95215 | 1,04947 | 0,99 | 1,00 |
| mDC1 | 1,00005 | 0,97236 | 1,02852 | 1,00 | 1,00 |

Supplementary Table 5: Summary of univariate analyses of lymphoid parameters at day 15

| Parameters | Hratio | 95% CI low | 95% CI high | log-rank p-value | Adjusted p-value (FDR) | Parameters | Hratio | 95% CI low | 95% CI high | log-rank p-value | Adjusted p-value (FDR) |
|------------------------------|---------|------------|-------------|------------------|------------------------|-----------------------------|---------|------------|-------------|------------------|------------------------|
| CM MFI Tim-3 | 1,00643 | 1,00133 | 1,01156 | 2,9E-07 | 2,2E-05 | % in CD45RA- mTH17 | 0,97549 | 0,92232 | 1,03174 | 0,3853 | 0,76 |
| eTH17 MFI Tim3 | 1,00126 | 1,00025 | 1,00226 | 0,0083 | 0,23 | %EM PD-1+ Tim-3+ | 1,03514 | 0,95625 | 1,12054 | 0,3917 | 0,76 |
| %mTH17 PD-1+ Tim-3+ | 1,06085 | 1,01324 | 1,11069 | 0,0090 | 0,23 | EM MFI Tim-3 | 1,00443 | 0,99404 | 1,01493 | 0,4042 | 0,76 |
| %mTH1 TH17 PD-1+ Tim-3+ | 1,07197 | 1,00913 | 1,13872 | 0,0195 | 0,31 | CD4+ CD45RA+ | 1,00116 | 0,99824 | 1,00408 | 0,4362 | 0,76 |
| %mTH1 PD-1+ Tim-3+ | 1,07942 | 1,00636 | 1,15778 | 0,0278 | 0,31 | eTH1 | 1,00566 | 0,99128 | 1,02024 | 0,4416 | 0,76 |
| %eTH1 PD-1+ Tim-3+ | 1,05106 | 1,00432 | 1,09997 | 0,0282 | 0,31 | % in CD4+ CD45RA- | 1,00720 | 0,97465 | 1,01138 | 0,4464 | 0,76 |
| %T-CD8+ PD-1+ Tim-3+ | 1,08139 | 1,00602 | 1,16241 | 0,0330 | 0,31 | % in CD4+ CD45RA+ | 0,99285 | 0,98874 | 1,02600 | 0,4464 | 0,76 |
| %NK CD3- CD56++ PD-1+ Tim-3+ | 1,02518 | 0,99879 | 1,05226 | 0,0591 | 0,44 | eTH1 TH17 | 0,98228 | 0,93623 | 1,03059 | 0,4499 | 0,76 |
| %Treg PD-1+ Tim-3+ | 1,06983 | 0,99311 | 1,15248 | 0,0706 | 0,44 | %in CD8+ EM CD45RAlow | 0,97417 | 0,90049 | 1,05387 | 0,5133 | 0,84 |
| %eTH17 PD-1+ Tim-3+ | 1,01501 | 0,99806 | 1,03224 | 0,0787 | 0,44 | % in CD45RA- mTH1 | 1,01473 | 0,96639 | 1,06550 | 0,5568 | 0,84 |
| N MFI Tim-3 | 1,00887 | 0,99886 | 1,01898 | 0,0810 | 0,44 | NK CD3- CD56++ | 1,00540 | 0,98718 | 1,02395 | 0,5632 | 0,84 |
| mTh1 Th17 MFI Tim3 | 1,00873 | 0,99881 | 1,01875 | 0,0822 | 0,44 | mTh2 MDI Tim3 | 1,00107 | 0,99732 | 1,00483 | 0,5747 | 0,84 |
| N | 1,01243 | 0,99817 | 1,02689 | 0,0838 | 0,44 | %mTH2 PD-1+ Tim-3+ | 1,00560 | 0,98597 | 1,02563 | 0,5780 | 0,84 |
| mTH17 MFI Tim3 | 1,00788 | 0,99877 | 1,01707 | 0,0891 | 0,44 | EM CD45RAlow | 0,99581 | 0,98103 | 1,01081 | 0,5806 | 0,84 |
| T-CD4+ CD45RA+ MFI Tim3 | 1,00581 | 0,99893 | 1,01274 | 0,0932 | 0,44 | %N PD-1+ Tim-3+ | 1,01777 | 0,95543 | 1,08417 | 0,5840 | 0,84 |
| eTh1 MFI Tim3 | 1,00713 | 0,99858 | 1,01574 | 0,0995 | 0,44 | mTH1 | 0,99794 | 0,99053 | 1,00541 | 0,5884 | 0,84 |
| T-CD4+ CD45RA- MFI Tim3 | 1,00729 | 0,99801 | 1,01667 | 0,1206 | 0,50 | eTH17 | 0,98826 | 0,94546 | 1,03300 | 0,5986 | 0,84 |
| CD8+ MFI Tim-3 | 1,00783 | 0,99780 | 1,01795 | 0,1259 | 0,50 | %in CD8+ EMRA | 0,99328 | 0,96709 | 1,02018 | 0,6210 | 0,85 |
| T-CD4+ MFI Tim3 | 1,00642 | 0,99787 | 1,01505 | 0,1377 | 0,50 | EMRA | 1,00082 | 0,99727 | 1,00439 | 0,6503 | 0,85 |
| mTh1 MFI Tim3 | 1,00817 | 0,99729 | 1,01918 | 0,1387 | 0,50 | CD4+ CD45RA- | 0,99953 | 0,99746 | 1,00159 | 0,6532 | 0,85 |
| %eTH1 TH17 PD-1+ Tim-3+ | 1,01137 | 0,99461 | 1,02842 | 0,1817 | 0,60 | T-CD8+ | 1,00045 | 0,99841 | 1,00251 | 0,6640 | 0,85 |
| %EMRA PD-1+ Tim-3+ | 1,06114 | 0,97180 | 1,15870 | 0,1819 | 0,60 | NKT CD3+ CD56+ MFI Tim3 | 1,00205 | 0,99250 | 1,01170 | 0,6749 | 0,85 |
| %NKT CD3+ CD56+ PD-1+ Tim-3+ | 1,07625 | 0,95969 | 1,20696 | 0,2059 | 0,60 | %NK CD3- CD56+ PD-1+ Tim-3+ | 1,00608 | 0,97703 | 1,03600 | 0,6852 | 0,85 |
| % in CD45RA+ eTH17 | 0,88889 | 0,73770 | 1,07107 | 0,2076 | 0,60 | % in CD45RA+ eTH1 | 0,99187 | 0,95229 | 1,03310 | 0,6942 | 0,85 |
| %CM PD-1+ Tim-3+ | 1,01935 | 0,98883 | 1,05081 | 0,2131 | 0,60 | eTH2 | 1,00776 | 0,96937 | 1,04766 | 0,6964 | 0,85 |
| eTh2 MFI Tim3 | 1,00318 | 0,99809 | 1,00829 | 0,2185 | 0,60 | %in CD8+ EM | 0,99538 | 0,97197 | 1,01935 | 0,7028 | 0,85 |
| %in CD8+ N | 1,01731 | 0,98907 | 1,04636 | 0,2291 | 0,60 | % in CD45RA- Treg | 0,98056 | 0,87462 | 1,09933 | 0,7363 | 0,87 |
| EMRA MFI Tim-3 | 1,00549 | 0,99651 | 1,01456 | 0,2306 | 0,60 | Treg | 0,99523 | 0,96619 | 1,02515 | 0,7517 | 0,87 |
| NK CD3- CD56++ MFI Tim3 | 1,00278 | 0,99804 | 1,00753 | 0,2500 | 0,64 | EM | 0,99906 | 0,99319 | 1,00496 | 0,7531 | 0,87 |
| %eTH2 PD-1+ Tim-3+ | 1,01416 | 0,98957 | 1,03936 | 0,2597 | 0,64 | mTH17 | 0,99864 | 0,98960 | 1,00775 | 0,7683 | 0,87 |
| %EM CD45RAlow PD-1+ Tim-3+ | 1,06262 | 0,95596 | 1,18118 | 0,2630 | 0,64 | NK CD3- CD56+ | 1,00034 | 0,99716 | 1,00354 | 0,8324 | 0,90 |
| % in CD45RA+ eTH1 TH17 | 0,89350 | 0,72525 | 1,10078 | 0,2792 | 0,66 | mTH2 | 0,99690 | 0,96840 | 1,02624 | 0,8338 | 0,90 |
| % in CD45RA- mTH2 | 1,05984 | 0,95121 | 1,18088 | 0,2903 | 0,66 | %in CD8+ CM | 1,00279 | 0,97573 | 1,03060 | 0,8419 | 0,90 |
| EMCD45low MFI Tim-3 | 1,00552 | 0,99518 | 1,01597 | 0,2958 | 0,66 | mTH1 TH17 | 1,00068 | 0,99398 | 1,00742 | 0,8425 | 0,90 |
| % in CD45RA+ eTH2 | 1,02067 | 0,98113 | 1,06180 | 0,3068 | 0,67 | Treg MFI Tim3 | 0,99942 | 0,99027 | 1,00865 | 0,9016 | 0,95 |
| CM | 1,00460 | 0,99470 | 1,01461 | 0,3611 | 0,76 | NK CD3- CD56+ MFI Tim3 | 0,99973 | 0,99459 | 1,00489 | 0,9170 | 0,95 |
| eTh1 Th17 MFI Tim3 | 1,00141 | 0,99829 | 1,00454 | 0,3738 | 0,76 | NKT CD3+ CD56+ | 0,99971 | 0,99198 | 1,00751 | 0,9424 | 0,96 |
| | | | | | | % in CD45RA- mTH1 TH17 | 0,99883 | 0,95770 | 1,04173 | 0,9565 | 0,96 |
| | | | | | | CD4+ | 1,00004 | 0,99845 | 1,00163 | 0,9619 | 0,96 |

Article 3 : « Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy. »

L'expression de la protéine PD-1 par les cellules tumorales mesurée par IHC est le seul marqueur prédictif disponible de la réponse aux immunothérapies anti-PD-1 dans le traitement des CBNPC avancés. Cependant, il n'existe que très peu de données sur son caractère pronostique et sa capacité prédictive de réponse aux anti-PD-1 reste très discutée. Il est en effet peu probable qu'un blocage de la voie PD-1/PD-L1 induise une réponse des lymphocytes T cytotoxiques dans le cas d'une tumeur présentant une faible infiltration en populations lymphocytaires (Q. WANG *et al.* 2017). À contrario, il a été montré dans le mélanome qu'une infiltration de la tumeur en cellules T cytotoxiques était de bon pronostic sous traitement anti-PD-1 (TUMEH *et al.* 2014). Plus récemment, des signatures d'expressions géniques associées aux voies de l'interféron γ et à l'activation des cellules T ont été développées pour prédire la réponse au pembrolizumab dans le traitement de plusieurs types de tumeurs (AYERS *et al.* 2017; WALLDEN *et al.* 2016).

Le travail suivant a eu deux objectifs : **1-** évaluer les caractères **pronostique** et **prédictif** d'efficacité du nivolumab de la co-expression de CD8 et PD-L1 chez des CBNPC de stade avancé et **2-** comparer une signature transcriptomique combinant CD8 et PD-L1 à deux autres signatures combinant respectivement 6 et 18 gènes. Ces signatures ont été développées pour la prédiction de la réponse au pembrolizumab dans le traitement du mélanome, des cancers ORL et des cancers gastriques. Pour répondre à ces objectifs, plusieurs types de données ont été générées ou récoltées. Ainsi, des marquages IHC des CD8 infiltrant la tumeur (C8/144B clone, Dako) et de PD-L1 (Sp142 clones, Ventana) ont été réalisés sur une cohorte de 34 CBNPC traités par chimiothérapie standard pour évaluer le caractère **pronostique** des expressions IHC de ces protéines. Quant au rôle **pronostique** de leur expression transcriptomique, celui-ci a été analysé à l'aide des RNA-seq des échantillons tumoraux des projets LUAD (adénocarcinomes bronchique) et LUSC (carcinomes épidermoïdes bronchiques) de l'Atlas du Génome du Cancer (TCGA, The Cancer Genome Atlas). Les patients de ces deux projets n'ont pas été traités par immunothérapie. Pour l'étude de l'aspect **prédictif**, ces marquages IHC et RNA-seq ont pu être réalisés respectivement sur 78 et 43 patients de notre cohorte en raison des limitations de disponibilité du matériel.

L'analyse des cohortes **pronostiques** met en évidence qu'une forte expression de CD8 déterminée par IHC ou par séquençage d'ARN est associée à un bon pronostic. Quant au rôle de PD-L1, celui-ci est moins évident. En effet, lorsque son expression est mesurée par IHC, celle-ci n'est pas associée à la survie alors que lorsqu'elle est mesurée par RNA-seq, une faible expression est associée à une meilleure survie. L'association d'une expression de PD-L1 élevée et d'une expression de CD8 faible permet de définir un groupe de très mauvais répondeurs, quelle que soit la technique utilisée. Concernant l'aspect **prédictif** de réponse aux anti-PD-1, une forte expression de CD8 est toujours associée à une meilleure survie, que ce soit par marquage IHC ou par RNA-seq. Une forte expression de la protéine PD-L1 mesurée par RNA-seq a cette fois-ci une influence bénéfique sur la survie. La combinaison des expressions de ces deux gènes estimées par séquençage d'ARN permet de discriminer plus significativement encore des groupes de bons et de mauvais répondeurs : une co-expression forte de CD8 et de PD-L1 est de bon pronostic chez

les CBNPC traités par immunothérapie. Appliquée à une cohorte de validation externe, cette signature bi-génique montre une capacité prédictive de la survie sous anti-PD-1 aussi bonne que les deux signatures plus complexes proposées précédemment.

Ainsi, la co-expression de CD8 et de PD-L1 surpasse les expressions individuelles de ces deux gènes dans la prédiction de la survie sous anti-PD-1 dans les CBNPC. Elle présente aussi une capacité prédictive équivalente à d'autres signatures transcriptomiques précédemment établies malgré un nombre moins important de gènes.

Ce travail a fait l'objet d'un poster présenté au meeting annuel de l'ASCO 2018 à Chicago ainsi que d'une publication dans la revue *British Journal of Cancer* :

Fumet, J. D., **Richard, C.**, Ledys, F., Klopfenstein, Q., Joubert, P., Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy. *Br. J. Cancer* **119**, 950–960 (2018).


Fumet, J. D., **Richard, C.**, Ledys, F., Klopfenstein, Q., Truntzer, C., CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue as prognostic biomarker and a predictive marker of anti-PD-1 efficacy. *Abstract #3021*, Présenté au congrès annuel de l'ASCO, Chicago, IL. USA (2018).



ARTICLE

Molecular Diagnostics

Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy

Jean-David Fumet^{1,2,3,4}, Corentin Richard^{2,3,4}, Fanny Ledys^{2,3,4}, Quentin Klopfenstein^{2,3}, Philippe Joubert⁵, Bertrand Routy^{6,7}, Caroline Truntzer^{2,3}, Andréanne Gagné⁵, Marc-André Hamel⁵, Camila Figueiredo Guimaraes⁵, Bruno Coudert¹, Laurent Arnould⁸, Laure Favier¹, Aurélie Lagrange¹, Sylvain Ladoire^{1,4}, Pierre Saintigny⁹, Sandra Ortiz-Cuaran⁹, Maurice Perol⁹, Pascal Foucher¹⁰, Paul Hofman^{11,12}, Marius Ilie ^{11,12}, Sandy Chevrier^{2,3}, Romain Boidot^{2,3}, Valentin Derangere^{2,3} and François Ghiringhelli^{1,2,3,4,13}

BACKGROUND: No study has evaluated the predictive and prognostic role of CD8 and PD-L1 coexpression in non-small-cell lung cancer (NSCLC).

METHODS: We analyzed RNA sequencing and/or immunohistochemistry staining in NSCLC patients from The Cancer Genome Atlas ($n = 1016$), and 34 metastatic NSCLC samples not treated by immunotherapy as prognostic cohorts. As predictive aspect of CD8 and PD-L1, we used 85 NSCLC patients treated with anti-PD-1. Two validation cohorts were used including 44 NSCLC patients treated with anti-PD-1 and an external cohort with different tumor types.

RESULTS: In prognostic cohorts, high *CD8A* expression was associated with longer OS ($p = 0.02$), while high *CD274* mRNA was associated with poor prognosis ($p = 0.05$). In predictive cohort, high CD8 expression and *CD8A* mRNA were associated with longer progression-free survival (PFS) ($p = 0.0002$). There was no significant association between PD-L1 expression and PFS while high *CD274* mRNA was associated with longer PFS ($p = 0.009$). A combination of *CD8A* and *CD274* was highly predictive of outcome. These results were confirmed in the validation cohorts. This two-genes signature demonstrated similar results compared to gold standard signatures.

CONCLUSION: CD8 represents both a prognostic and predictive factor of outcomes, while PD-L1 share different prognostic and predictive roles.

British Journal of Cancer (2018) 119:950–960; <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0220-9>

BACKGROUND

Lung cancer is currently the most common type of cancer, and it accounts for the highest number of cancer deaths worldwide. Approximately, 80 % of newly diagnosed cases of non-small-cell lung cancer (NSCLC) are inoperable with locally advanced or metastatic disease.¹ The immune system controls NSCLC progression, and CD8⁺ infiltrates are associated with better outcome.² Programmed cell death-ligand-1 (PD-L1), the ligand of PD-1, is expressed in many cancer tissues, including NSCLC.^{3,4} The identification of PD-L1 as a distal immune modulator of adaptive CD8⁺ T-cell anticancer response was at the origin of the development of monoclonal antibodies targeting PD-1 (nivolumab and pembrolizumab) or PD-L1 (atezolizumab and durvalumab). These immune checkpoint PD-1/PD-L1 blocking agents showed remarkable clinical efficacy with long lasting clinical

response in typically immunogenic tumors such as melanoma, renal cell carcinoma, bladder cancer, and both squamous cell carcinoma and nonsquamous NSCLC.^{5–13}

Therefore, PD-1/PD-L1 pathway targeted immunotherapy has become a standard option for the management of locally advanced and metastatic lung cancer.^{5,6,8,9} In clinical trials, anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies produced a durable response in approximately 20% of unselected patients with advanced NSCLC in the second or third lines of treatment.^{8,9} There is no optimal predictive biomarker to select patients that would likely respond to anti-PD-1/PD-L1 therapies. Developing validated biomarkers remains a major challenge.

While genomic marker like tumor mutation burden becomes promising (Cancer Cell. 2018 May 14;33(5):843–852), PD-L1-expression represents the only clinically available and approved

¹Department of Medical Oncology, Center GF Leclerc, Dijon, France; ²Research Platform in Biological Oncology, Dijon, France; ³GIMI Genetic and Immunology Medical Institute, Dijon, France; ⁴University of Burgundy-Franche Comté, Dijon, France; ⁵Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Laval University, Quebec City, QC, Canada; ⁶Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC, Canada; ⁷Hematology–Oncology Division, Department of Medicine, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, QC, Canada; ⁸Department of Pathology, Center GF Leclerc, Dijon, France; ⁹Department of Medical Oncology, Center Leon Berard, Lyon, France; ¹⁰Department of Thoracic Oncology, Dijon University Hospital, Dijon, France; ¹¹Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, FHU OncoAge, Nice University Hospital, Université Côte d'Azur, Nice, France; ¹²Hospital-Integrated Biobank (BB-0033-00025), FHU OncoAge, Nice University Hospital, Université Côte d'Azur, Nice, France and ¹³INSERM UMR1231, Dijon, France
Correspondence: François. Ghiringhelli (fghiringhelli@cgfl.fr)

Received: 28 February 2018 Revised: 13 July 2018 Accepted: 16 July 2018
Published online: 15 October 2018

marker to predict response to PD1/PD-L1 axis inhibitors.^{5-7,14} In first line therapy of advanced NSCLC, pembrolizumab, demonstrated its superiority in comparison to chemotherapy in patients with high PD-L1 expression (>50%).⁵ Surprisingly, the similar test could not predict response to nivolumab, in a similar setting.¹⁴ Indeed, although the expression of PD-L1 may potentially serve as a predictive biomarker to identify patients that respond to treatment, it remains an imperfect biomarker. Subsequent work has shown that patients with PD-L1-negative tumors showed an aggregate 15% response rate (RR) across many types of cancer.¹⁵ PD-L1 expression used as a predictive marker has a poor negative predictive value, therefore selection of patients using only PD-L1 may exclude potentially responding patients. In contrast to the large amount of data on the predictive role of PD-L1 expression, its prognostic role remains unclear.

Additional strategies are being developed to predict clinical response to PD-1 checkpoint blockade. Transcriptomic signatures related to interferon (IFN)- γ signaling and activated T-cells are currently validated across tumors in patients treated with pembrolizumab.^{16,17} In addition, in the case of insufficient tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in a tumor, it is unlikely that PD-1/PD-L1 blockade would lead to a specific T-cell response¹⁸ despite PD-L1 expression. CD8⁺ T cells, which are the principal cytotoxic cells, are pivotal for cell-mediated antitumor immune responses. A study by Tumeh et al.¹⁹ found that preexisting CD8⁺ T cells are essential for tumor regression following therapeutic PD-1/PD-L1 blockade in metastatic melanoma, indicating that CD8⁺ TILs play a key role in anti-PD-1 therapy response. Recently, Teng et al.²⁰ proposed to classify tumors into four groups based on PD-L1 and CD8 expression. They defined four categories: type I adaptive immune resistance (PD-L1 positive and high TILs), type II immune ignorance (PD-L1 negative and low TILs), type III intrinsic induction (PD-L1 positive and low TILs), and type IV immune tolerance (PD-L1 negative and high TILs) pathways. However, there is no description of the predictive and prognostic roles of CD8 and PD-L1 coexpression in NSCLC patients receiving immune checkpoint inhibitors. The first aim of this study was to evaluate the prognostic role of PD-L1 and CD8 mRNA and protein expression in patients with NSCLC. The second aim was to evaluate the predictive role of PD-L1 and CD8 mRNA and protein expression in patients with NSCLC treated with nivolumab after failure of platinum-based chemotherapy.

MATERIALS AND METHODS

Patient characteristics

Prognosis immunohistochemistry cohort. We, retrospectively, reviewed 34 patients with stage IIIB-IV NSCLC who received at least one line of platinum-based therapy, but no immunotherapy. The median age of patients at the first-line therapy was 65 years. Two-thirds of patients had nonsquamous cell cancer. All clinical characteristics are shown in Supplementary Table 1.

Prognosis mRNA cohort. For The Cancer Genome Atlas (TCGA) RNA-seq prognostic cohort (Supplementary Table 2), raw data from 1016 samples was downloaded using the TCGA2STAT software package for statistical analysis in R,²¹ which includes the lung adenocarcinoma cohort and the lung squamous cell carcinoma cohorts.

Predictive nivolumab cohort. We, retrospectively, reviewed 85 patients from three French university hospitals with stage IIIB or IV NSCLC who had previously received one or two lines of chemotherapy. All patients were treated with first-line platinum-based chemotherapy. None of the patients had epidermal growth factor receptor, anaplastic lymphoma kinase, B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase, or ROS1 oncogenic driven tumors. Upon progression, they received 3 mg/kg nivolumab administered

intravenously as a single agent every two weeks. Tumor response was evaluated by computed tomography (CT) scan every four cycles. Response evaluation criteria in solid tumors (RECIST) 1.1 was used to define objective clinical response. The median age of patients at the introduction of nivolumab was 63 years. The most predominant histological type was adenocarcinoma (53%), followed by squamous cell carcinoma (44%). Clinical characteristics are shown in Supplementary Table 3. Tumors were collected, stored, and used with informed, written consent from the patients. The study was performed in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki.

We successfully performed CD8 and PD-L1 assessments using immunohistochemistry (IHC) for 78 patients, and RNA sequencing for 43 patients. Other patients were not analyzed because of lack of sufficient biological material or low quality RNA.

Validation predictive cohort. We, retrospectively, reviewed 44 patients from Institut Universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, with stage IIIB or IV NSCLC. All patients were treated in first line by pembrolizumab or further lines by nivolumab. Clinical characteristics are shown in Supplementary Table 4.

IHC procedures

Thin tissue sections measuring 4 μ m were cut from formalin fixed paraffin embedded specimen. All IHC procedures were performed using Benchmark apparatus (Ventana) and diaminobenzidine (DAB) as chromogenic revelator. All antibodies and secondary reagents used are reported in Supplementary Table 4. Once stained and permanently mounted, slides were digitalized with Nanozoomer HT2.0 (Hamamatsu) at 20 \times magnification and two pathologists independently analyzed numerized files. Scores were compared and when discrepancies occurred a third pathologist reviewed the slides and solved the results.

PD-L1 expression was evaluated with Sp142 clone (SpringBio, Ventana) based on scores determined by Poplar study.¹¹ Briefly, scores were achieved as a percentage of tumor cells expressing PD-L1: TC3 > 50%, TC2 > 5% and <50%, TC1 > 1% and <5%, TC0 < 1%; tumor infiltrating immune cells were also scored as a percentage of tumor area: IC3 > 10%, IC2 > 5% and <10%, IC1 > 1% and <5%, IC0 < 1%. So, an IC and/or TC score of two or more was considered as a high expression.

22C3 clone (Dako) was also used to evaluate PD-L1 expression. Results obtained with this clone confirmed our previous evaluations achieved with Sp142 clone. For this antibody, stain was restrained to tumor cells and scores were evaluated as a percentage of tumor cells expressing PD-L1 as Scheel et al.²² with a three-bins method: TC < 1%, TC > 1% and <50%, TC > 50% (Figure S1A).

Cytotoxic T cells infiltrates were evaluated using CD8 labeling with C8/144B clone (Dako). Number of positive cells per area (μ m²) was obtained using the recently released QuPath free software designed by Peter Bankhead.²³ Briefly, two pathologists manually selected a CD8⁺ hot spots area of approximately 1 mm² on digitalized slides in a blind fashion. Then, within this area, nuclei were detected and CD8⁺ cells were determined with a DAB threshold using automated Qupath algorithms (Figure S1B). The mean of the two values was used. In case of more than 5% of discordance, the two pathologists performed a second lecture jointly. The same algorithms (nuclei and DAB detections) were used for every slide to have homogenized results.

RNA sequencing analysis

Total RNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor slices (5 \times 5 μ m) using the Maxwell 16 LEV RNA FFPE Purification kit (Promega) following manufacturer instructions. Libraries were prepared from 12 μ l of total RNA with the TruSeq Stranded Total RNA using Ribo-Zero (Illumina) following

manufacturer instructions. Once qualified, paired-end libraries were sequenced using 2 × 75 bp output on a NextSeq 500 device (Illumina).

The abundance of transcripts from RNA-seq data was quantified through the Kallisto program.²⁴ This program is based on pseudo alignment for rapidly determining the compatibility of reads with targets, without the need for alignment. The Kallisto transcript index used as reference was built from merged human cDNA and ncDNA files from GRCh37 assembly ENSEMBL. Gene-level count matrices were then created with the DESeq2 library. Low-count genes were pre-filtered by removing genes with too few reads.²⁵ Enrichr software was used to analyze Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways.^{26,27}

Statistical methods

Data analysis was performed using R statistical software (<http://www.R-project.org/>) and presented with Prism 7 (GraphPad, San Diego, CA, USA). All patients from the prognostic cohorts were followed up until death or the end of data recording (November 1, 2017).

For the prognostic IHC cohort, composed with stage IIIB-IV patients, overall survival (OS) was calculated from the day the metastatic cancer was diagnosed to the date of death (all causes). Survivors were censored after 12 months. For the TCGA prognostic mRNA cohort, composed with patients from all stages (I-IV), OS was used for the survival analysis. Survivors were censored after 120 months. RNAseq gene expressions were based on RSEM raw counts normalized using variance stabilizing transformation in DESeq2 R package.²⁵ For the predictive cohort, treatment RR was determined from CT scan analysis according to RECIST 1.1 (progression disease (PD); stable disease); partial response (PR).²⁸ after 2–3 months of therapy. Progression-free survival (PFS) was defined as the time from the first day of treatment to the first recorded evidence of disease progression according to RECIST, clinical evaluation or death. For PFS, survivors were censored after 6 months.

Associations between disease characteristics and RR (PR + SD versus PD) were tested using χ^2 or Fisher's exact tests for qualitative variables and the Mann-Whitney test for continuous

variables, as appropriate. All boxplots were drawn with a median, quartiles and Tukey's whiskers.

Univariate Cox proportional-hazards models of all clinical and biological baseline variables were built to estimate hazard ratios (HRs) with a 95% CI. The best cutoff points for continuous variables were chosen using Cutoff Finder.²⁹ Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method and compared using log-rank tests. Median follow-up was calculated using the reverse Kaplan-Meier method or recorded as not reached (NR) as appropriate. Multivariate models for PFS were created including sex, age (continuous), World Health Organisation (WHO) performance status and histology if available, and biological parameters (CD8, PD-L1). The predictive power of these models was compared using Harrell's C index and the goodness of fit was estimated using Akaike Information Criterion (AIC). The two final multivariate models combining expression of CD8 and PD-L1 measured by mRNA or IHC were internally validated using bootstrapping (200 replications).

Differential gene expression analyses were performed using the DESeq2 R package.²⁵ A gene was considered as differentially expressed if the false discovery rate-adjusted *p* value of the corresponding test was less than 0.05.

RESULTS

Prognostic role of CD8 and PD-L1 expression in the IHC prognosis cohort

In 34 cases of metastatic NSCLC treated without immunotherapy, we tested the prognostic role of CD8⁺ TILs and PD-L1 IHC expression. We observed a high concordance between 22C3 and Sp142 labeling (Fisher's Exact test *p* = 0.0001) (Supplementary figures 2A, B). Sp142 mAb was then used for PD-L1 assessment. CD8⁺ TILs and PD-L1 IHC expression were not associated (Wilcoxon signed-rank test sum *p* = 0.46) (Fig. 1a). We observed that high CD8⁺ TILs IHC expression was associated with better OS (9.4 months versus 5.6 months; log-rank test *p* = 0.05) (Fig. 1b). OS did not differ between patients with high PD-L1 IHC expression and those with low PD-L1 IHC expression values (5.4 months versus 7.5 months; log-rank test *p* = 0.79) (Fig. 1c). Furthermore, according to Teng's classification high PD-L1/low

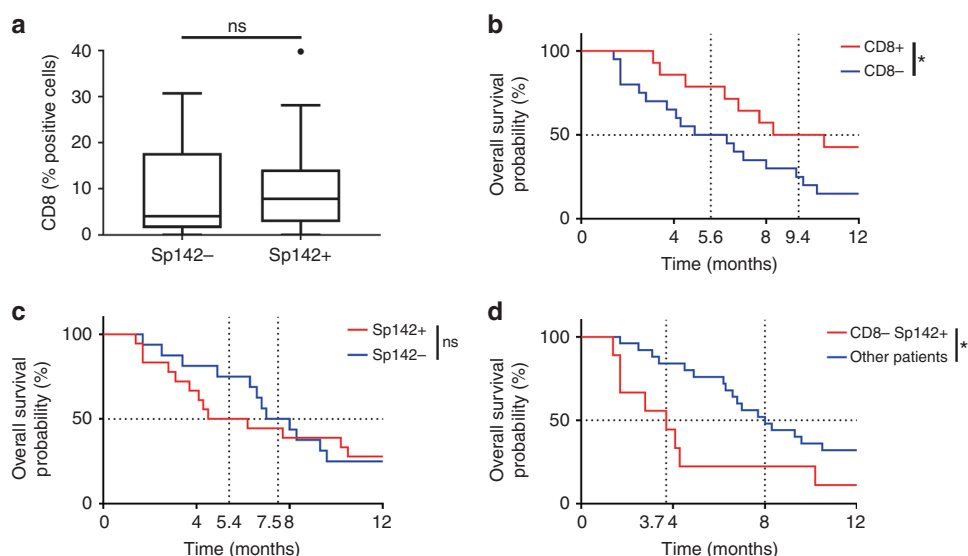


Fig. 1 Prognostic role of CD8 and PD-L1 expressions in a control cohort of metastatic NSCLC using IHC. **a** Box plots showing the CD8 IHC expression respectively for patients with high (Sp142+) or low (Sp142-) expression of Sp142 labeling. **b, c** Kaplan-Meier estimates for overall survival; patients were stratified according to the CD8 (**b**), and Sp142 (**c**) labeling expressions: high expression (CD8+/Sp142+; in red) and low expression (CD8-/Sp142-; in blue). **d** Kaplan-Meier estimates for overall survival; patients were stratified in two groups: a group with low expression of CD8 labeling (CD8-) and high expression of Sp142 labeling (Sp142+) and a group with the other patients. Cutoffs for low and high expressions were defined with the Cutoff Finder method. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001; ns not significant

CD8⁺ TILs tumors are suspected to have most deleterious immune microenvironment and potentially the worst prognosis. Indeed, we observed that patients with low CD8 expression and high PD-L1 expression had very poor outcomes, with a median OS of 3.7 months, while the median for all other patients was 8 months (log-rank test $p = 0.02$) (Fig. 1d). In a multivariate Cox proportional model including age, sex, performance status, and histology, we observed a trend for poor outcomes in patients with low CD8⁺ TILs and high PD-L1 IHC expression (Supplementary Table 5).

Together these data underline that among patients with metastatic NSCLC not treated with immune checkpoint inhibitors, those with high PD-L1 and low CD8 TILs IHC have a poorer prognosis.

Prognostic role of CD8 and PD-L1 expressions in the mRNA prognosis cohort

We used RNA sequencing data from 501 squamous-cell lung cancer samples and 515 adenocarcinoma NSCLC samples in TCGA. We analyzed *CD8A* (for CD8 expression) and *CD274* (for PD-L1 expression). *CD8A* and *CD274* expression were poorly correlated (Pearson's $r = 0.42$, $p < 0.0001$) (Fig. 2a), and we observed that *CD8A* and *CD274* expression did not differ according to histological type (squamous-cell versus nonsquamous cell), tumor stage, age, or sex (Supplementary Figures 3A–D). Moreover, late stage tumors and advanced age were associated with poor outcomes. We evaluated the prognostic role of *CD8A* and *CD274* expression on OS. We observed that high *CD8A* expression was associated with better OS (56.56 months versus 39.02 months; log-rank test $p = 0.02$) (Fig. 2b), while high *CD274* was significantly associated with poor OS (45.21 months versus 54.30 months; log-rank test $p = 0.05$) (Fig. 2c).

We observed that patients with low-*CD8A* expression and high expression of *CD274* had very poor prognostic outcomes with a median OS time of 31.9 versus 54.20 months for other patients (log-rank test $p = 0.009$) (Fig. 2d). Differential gene expression analysis was performed to select genes highly or poorly expressed in this category of patients (low *CD8A*/high *CD274*). We observed that 6091 genes were downregulated in the group of patients classified as low *CD8A* and high *CD274* compared to the whole group. A pathway analysis using KEGG showed enrichment in activated immune response, suggesting that this type of tumor is characterized by poor immune activation. In the same group of patients, we observed 2999 highly expressed genes. The analysis also showed enrichment of stemness pathways, suggesting aggressiveness and epithelial–mesenchymal differentiation of the tumor contingent (Fig. 2e–g).

The multivariate analysis showed that patients with stage II (HR = 1.53), stage III (HR = 2.11) and IV (HR = 3.09), advanced age (HR = 1.015), and high *CD274* expression had a poorer prognosis, whereas high *CD8A* expression was associated with a better prognosis (Supplementary Table 6). The Harrell's C statistics of this model (0.622) indicates a strong potential to discriminate patients with poor and good OS. When bootstrapping was performed to check the validity of the multivariate Cox model, *CD8A* and *CD274* expression remained significant (*CD8A* $p = 0.003$ and *CD274* $p = 0.02$).

In the subgroup analysis of stage III–IV patients, high *CD8A* expression remained associated with better outcomes while *CD274* was not associated with prognosis (Supplementary Figures 3E, F). Similar to the whole population with all stages of cancer, patients with low-*CD8A* expression and high-*CD274* expression had a poorer prognosis (Supplementary Figure 3G).

Predictive role of CD8 TILs and PD-L1 expression in a cohort of patients treated with nivolumab

We then addressed the role of CD8⁺ TILs and PD-L1 expression to predict response to nivolumab in a cohort of 85 patients treated with nivolumab in second line or beyond. We observed that a high

expression of CD8⁺ TILs measured with IHC and mRNA was significantly associated with RR and PFS (IHC: 4.3 versus 1.7 months; log-rank test $p = 0.0002$; mRNA: NR versus 2.8 months; log-rank test $p = 0.002$; Fig. 3a, b and S4A, B). For PD-L1, neither PD-L1 IHC nor mRNA expression were associated with RR (Supplementary Figures 4C, D). There was no significant association between PD-L1 expression measured by IHC on PFS (3.4 versus 2.4 months; log-rank test $p = 0.31$) (Fig. 3c). In contrast, high *CD274* expression was associated with better PFS (NR versus 2.8 months, log-rank test $p = 0.009$) (Fig. 3d). When combining these dichotomous markers, we observed that patients with high CD8⁺ TILs and PD-L1 by IHC or high *CD8A* and *CD274* coexpression had longer PFS (IHC: 4 versus 1.9 months, log-rank test p value = 0.04; mRNA: NR versus 2.8 months log-rank test $p = 0.001$) (Fig. 3e, f).

Using multivariate Cox proportional hazards models including age, sex, WHO performance status, and histology, we showed that CD8⁺ TILs expression measured through IHC or mRNA and PD-L1 in mRNA (but not PD-L1 determined upon IHC) remained independent predictive factors of PFS (Table 1). Harrell's C-statistics indicated better discrimination for each multivariate model that included PD-L1 or CD8⁺ TILs variables for predicting PFS than a simple clinical model including sex, age, WHO performance status, and histology. Moreover, multivariate models including both CD8 and PD-L1 expression (for IHC or mRNA) were more discriminant, with an increase in Harrell's C-statistic and a decrease in AIC. We noticed that for IHC variables, PD-L1 expression did not really improve the ability of CD8⁺ TILs expression to discriminate good and poor responders patients (Harrell's C-statistic = 0.76 for the model with clinical variables plus CD8 IHC variable versus Harrell's C-statistic = 0.78 for the model with clinical variables plus CD8 and PD-L1 IHC variables). More importantly, the mRNA model outclassed the IHC model (Harrell's C-statistic: 0.78 versus 0.90) although there were fewer patients. When bootstrapping was performed to check the stability of the multivariate Cox model, the association of *CD8A* and *CD274* expression values remained significantly related to PFS (*CD8A* $p = 0.048$ and *CD274* $p = 0.07$).

Differential gene expression analysis was performed to characterize highly expressed and poorly expressed genes in the category of patients with high *CD8A* and *CD274* expression. Only 26 highly expressed genes were retained. Pathway analysis using Enrichr and the 2016 KEGG database showed enrichment in activated immune response (Fig. 3g, h).

Then, a validation of these mRNA's results was performed from a second independent cohort of 44 patients (validation predictive cohort from Québec city, Canada). We observed that high *CD8A* expression was associated with a longer PFS, with a trend toward significance (median PFS 2.1 months versus 4.4 months; log-rank $p = 0.07$) (Fig. 4a). High-*CD274* expression was significantly associated with a longer PFS (median PFS 2.2 versus 6 months; log-rank $p = 0.03$) (Fig. 4b). When using a combination of these dichotomous markers, we observed that patients with high *CD8A* and *CD274* expression had higher PFS (median PFS 2.2 months versus NR; log-rank $p = 0.02$) (Fig. 4c).

Our data thus underline that the coexpression CD8 and PD-L1 mRNA outperformed PD-L1 or CD8 mRNA when analyzed separately, as well as IHC variables.

Benchmarking of CD8/PD-L1 mRNA variables in comparison with other immune signatures

Using the linear predictor of the *CD8A-CD274* mRNA multivariate model as a new composite variable, the corresponding model discriminates between patients with good and poor PFS (median NR versus 2 log-rank test $p < 0.0001$) (Fig. 5a). Previous reports have established that common sets of IFN- γ - and T cell-associated inflammatory genes could predict responsiveness to PD-1 blockade across different tumor types.¹⁶ These signatures, made

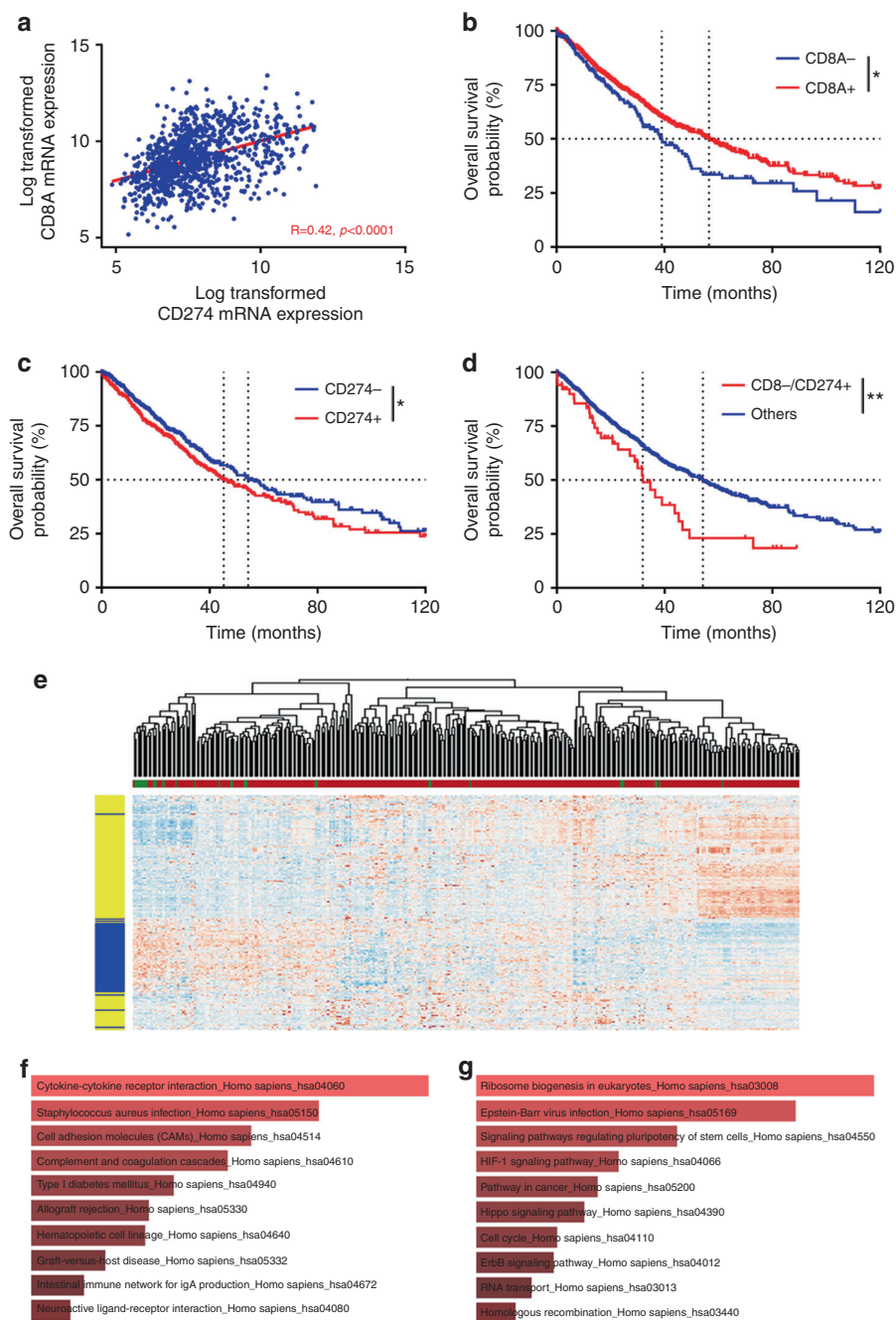


Fig. 2 Prognostic role of CD8 and PD-L1 expressions in TCGA cohort. **a** Scatter plot showing the correlation between CD8 mRNA expression and CD274 mRNA expression. **b** Kaplan Meier estimates for overall survival; patients were stratified according to CD8 (**b**) and CD274 (**c**) mRNA expression: high expression (CD8+/CD274+; in red) and low expression (CD8-/CD274-; in blue). **d** Kaplan-Meier estimates for overall survival; patients were stratified in two groups: a group with low expression of CD8A and high expression of CD274 mRNA (CD8A-/CD274+) and a group with the other patients. **e** Heat map of genes significantly differentially expressed between patients with low-mRNA CD8 and high-PD-L1 expression, and the other patients. The row side bar represents genes upregulated in the group of interest in blue and genes downregulated in yellow. **f** Pathway selected through an enrichment analysis performed on the downregulated genes using Enrichr with the KEGG 2016 database. **g** Pathway classification of the upregulated genes using Enrichr with the KEGG 2016 database. Cutoffs for low and high expressions were defined with the Cutoff Finder method. $p < 0.05$; $^{**} p < 0.01$; $^{***} p < 0.001$; $^{****} p < 0.0001$; ns not significant

up of 6 and 18 genes, respectively, were further called IFN signature and expanded immune gene (EIG) signature. To benchmark our model, including clinical variables and CD8A-CD274 signature, we adjusted multivariate Cox proportional hazard models including clinical variables with either IFN signature or EIG signature (Supplementary Table 7). IFN and EIG

signatures did not remain significant but close to (both $p = 0.08$). Using the linear predictor of the IFN and EIG signature multivariate model as a new composite variable, these models discriminate between patients with good and poor PFS, but with less significance than CD8A-CD274 signature (CD8A/CD274: NR versus 2.0; log-rank test $p < 0.0001$; IFN: NR versus 2.2 months, log-rank

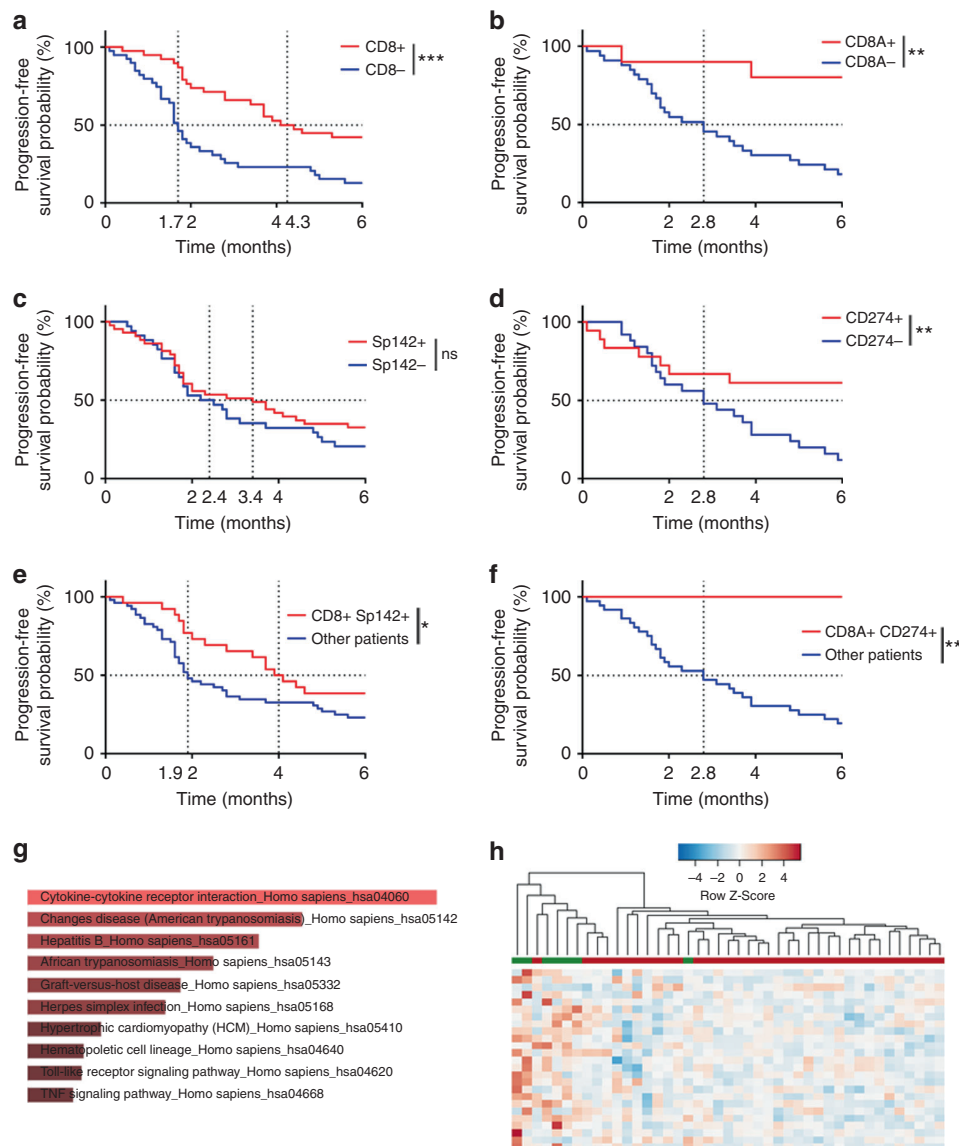


Fig. 3 Predictive role of CD8 and PD-L1 expression in a cohort of patients treated with nivolumab. **a, b** Kaplan–Meier estimates for progression-free survival; patients were stratified according to CD8 IHC (**a**) and mRNA (**b**) expression: high expression (CD8+/CD8A+; in red) and low expression (CD8-/CD8A-; in blue). **c, d** Kaplan–Meier estimates for progression-free survival; patients were stratified according to PD-L1 IHC (**c**) and mRNA (**d**) expression: high expression (Sp142+/CD274+; in red) and low expression (Sp142-/CD274-; in blue). **e, f** Kaplan–Meier estimates for progression-free survival; patients were stratified in two groups: a group with high CD8 and PD-L1 IHC (**e**) and mRNA (**f**) expression (IHC: CD8+ Sp142+; mRNA: CD8A+ CD274+), and a group with the other patients. **g** Pathway selected through an enrichment analysis performed on the upregulated genes using Enrichr with the KEGG 2016 database. Heat map of genes significantly differentially expressed between patients with high mRNA CD8 and PD-L1 expressions and the other patients. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns not significant

test $p = 0.03$; EIG: 1.7 versus 4.8 months, log-rank test $p = 0.001$) (Fig. 5a–c). Moreover, both IFN and EIG signature models were outperformed by CD8A/CD274 mRNA model in term of prediction (Harrell’s C -statistics: IFN = 0.77 versus EIG = 0.75 versus CD8A/CD274 mRNA = 0.90) (Fig. 5d).

Finally, we used a previously described cohort of 65 patients with melanoma, lung cancer, head cancer, or neck cancer, and treated with anti-PD1 therapy (nivolumab and pembrolizumab), to perform external validation of our RNA signature in different types of cancer. The samples were analyzed on the nCounter system using the PanCancer 730-Immune Panel.³⁰ In this cohort, IFN, EIG, and CD8/CD274 mRNA signatures were used to predict PFS (Supplementary Table 8) (Fig. 5e–g). We also confirmed that the

CD8A/CD274 signature had similar predictive properties than IFN or EIG signatures (Harrell’s C -statistics: IFN = 0.79 versus EIG = 0.79 versus CD8/PD-L1 mRNA = 0.81) (Fig. 5h). Similar results were observed in the validation predictive cohort from Quebec city (Supplementary Figure S5). Altogether, the findings demonstrate the validity of the CD8A/CD274 signature to predict PFS in another external cohort of patients treated with anti-PD-1 antibodies, thus generalizing our observation.

DISCUSSION

Immune checkpoint inhibition has changed anticancer strategy in solid tumors. Efforts are currently being made worldwide to get a

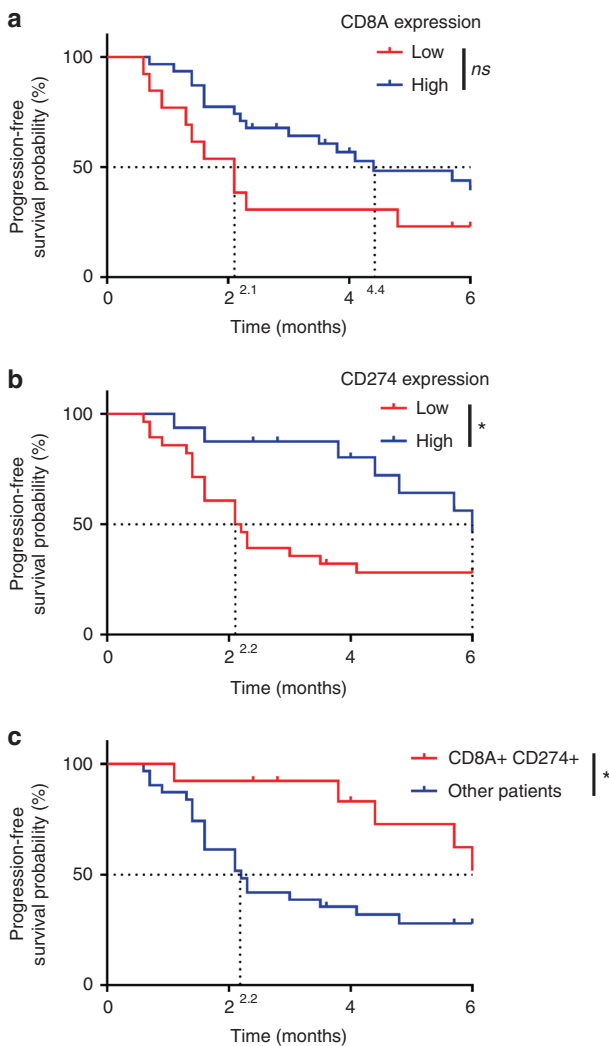


Fig. 4 Validation of predictive role of CD8 and PD-L1 expression in a cohort of patients treated with nivolumab or pembrolizumab. **a, b** Kaplan–Meier estimates for progression-free survival; patients were stratified according to CD8A (**a**) and CD274 (**b**) mRNA expression: low expression (in red) and high expression (in blue). **c** Kaplan–Meier estimates for progression-free survival; patients were stratified in two groups: a group with high CD8A and CD274 mRNA expression (CD8A+ CD274+) and a group with the other patients. Cutoffs for low and high expressions were defined with the Cutoff Finder method. *p* < 0.05; **** *p* < 0.01; ***** *p* < 0.001; ****** *p* < 0.0001; *ns* not significant

better understanding of this immune axis and its crosstalk with the tumor microenvironment, notably with TILs. Despite an increasing number of published articles in this field, there is no clear consensus for two essential concerns. The first major concern is the effect of PD-L1 expression on NSCLC survival. The second and perhaps most important concern is to identify the biomarkers that could efficiently select patients who would benefit the most from immune intervention targeting the PD-L1/PD-1 axis.

This study underlines the predictive and prognostic role of CD8⁺ TILs and PD-L1 expression in lung cancer. The prognostic value of PD-L1 expression in solid tumors is still unclear, and past studies have yielded controversial results. In NSCLC, a high level of PD-L1 expression has been associated with poor clinical outcomes,^{31–34} although these findings remain controversial.^{35,36} A recent meta-analysis suggested that PD-L1 expression was

associated with a poor prognosis in Asian population.³⁷ On the contrary, it is well documented that CD8⁺ TILs are positively correlated with a better prognosis in patients suffering from NSCLC.^{2,31,38} No study analyzed both CD8⁺ TILs and PD-L1 as prognostic factor.

The first part of our study was dedicated to the evaluation of PD-L1 and CD8⁺ T cells as prognostic markers in NSCLC. With two cohorts and two different methods (i.e., RNA sequencing and IHC procedures), we confirmed that CD8 expression was associated with a good prognosis, whereas PD-L1 did not prove to be a valuable prognostic biomarker even if a trend was observed. Subsequently, we tested the prognostic role of the four Teng’s immunological groups and observed that intrinsic induction group (PD-L1^{high}/CD8⁺ TILs^{low} group) determined upon IHC and mRNA is associated with a poorer prognosis than the three other groups. This is observed in both early and late stage NSCLC. In a molecular point of view this intrinsic induction group was characterized by a loss of immune genes and an increase in stemness and genes that increase tumor aggressiveness. Our results clearly underscored the advantage of combining these two variables to classify patients according to their prognosis.

Even though immune checkpoint inhibitors (ICI) play a major role in the management of NSCLC, the absence of biomarkers remains a major issue, and only 20–30% of patients treated with ICI achieved clinical benefit. We focused on this aspect in the second part of our study.

At present, the evaluation of PD-L1 expression upon IHC in NSCLC is the only available biomarker in clinics, but there are several limitations. It is now well accepted that PD-L1 expression is heterogeneous in the tumors of most types of cancer. A recent study showed a discordance in PD-L1 assessment between biopsy and surgically resected specimens.^{39,40} In NSCLC, the analysis is generally performed on a biopsy, which does not reflect the expression of PD-L1 in the whole tumor. Furthermore, PD-L1 assessment with IHC procedures is done using different anti-PD-L1 antibodies and cut-off criteria. In different published studies, the mAbs targeting PD-L1, the methods of analysis and the threshold for PD-L1 positive expression with IHC procedures were different. In an effort to harmonize PD-L1 IHC assessment, a blueprint project assessed interobserver concordance⁴¹ and demonstrated that the result of PD-L1-stained tumor cells was comparable using 22C3, 28-8, and SP263 clones, whereas the SP142 assay exhibited fewer stained tumor cells. However, in the context of NSCLC 22C3 and SP142 share similar power to predict response to checkpoint inhibitors.⁴² However, PD-L1 positivity alone cannot be considered as an optimal factor for predicting response to PD-1/PD-L1 blockade.

Some studies have reported an association between PD-L1 expression and CD8⁺ TILs density in lung cancer.^{34,43} Few studies have examined CD8 expression as a predictive biomarker.⁴⁴ A recent study published in Nature described CD8 profiling in the peripheral blood of patients with melanoma treated with ICI. The findings demonstrated an association between CD8 activation and ICI response.⁴⁵ Tumeh et al.¹⁹ and Le et al.⁴⁶ demonstrated an association between CD8 expression in tumors upon IHC and response to ICI in melanoma and colorectal cancer, respectively. Based on these results, our intention was to evaluate CD8 expression as a predictive biomarker of response to nivolumab in NSCLC.

Firstly, using the same methodology as our prognostic cohorts, we demonstrated that IHC evaluation of CD8⁺ TILs alone was a powerful biomarker that discriminated patients receiving immune checkpoint inhibitors for PFS. The study of PD-L1 expression with IHC procedures did not yield additional information. Even if CD8⁺ TILs evaluation with IHC procedures is typically more robust than PD-L1 evaluation, we chose to use a semiautomated method to accurately count CD8⁺ T cells. The automatization of this type of quantitative analysis using open-source software is less time

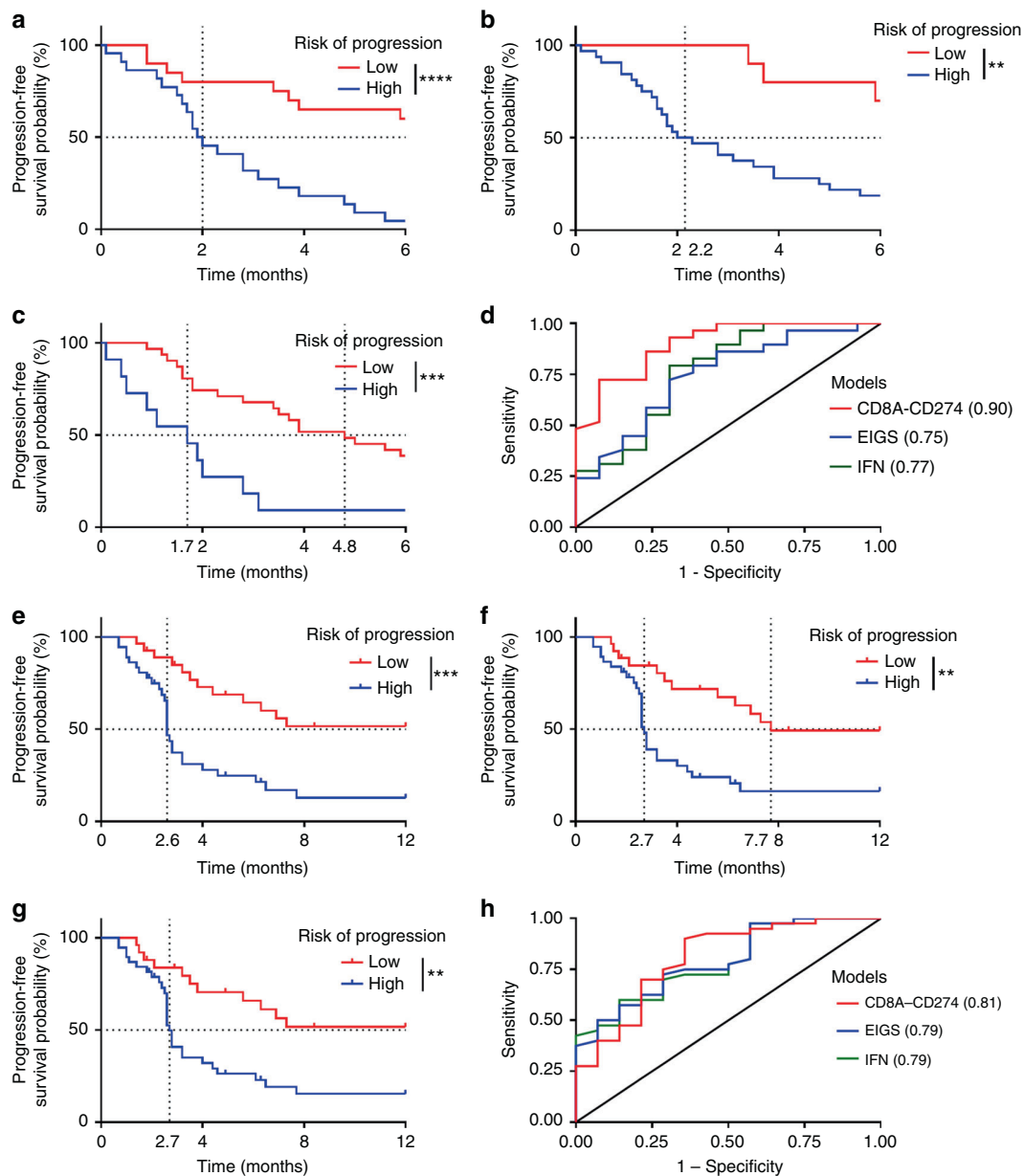


Fig. 5 Benchmarking of CD8/PD-L1 mRNA variables in comparison with other immune signatures. **a–c** Kaplan–Meier estimates for progression-free survival; patients were stratified according to the value of the linear predictor estimated from the clinical Cox model plus CD8/PD-L1 mRNA (**a**), IFN signature (**b**), or EIG signature (**c**) for predictive cohort: high (blue) or low (red) risk. **d** ROC curves estimated using the linear predictor of the clinical Cox model plus CD8/PD-L1 mRNA (red), IFN signature (green), or EIG signature (blue) for predictive cohort. For each model, the area under the curve is given in brackets. **e–g** Kaplan–Meier estimates for progression-free survival; patients were stratified according to the value of the linear predictor estimated from the clinical Cox model plus CD8/PD-L1 mRNA (**e**), IFN signature (**f**), or EIG signature (**g**) for the external validation cohort: high (blue) or low (red) risk. **h** ROC curves estimated using the linear predictor of the clinical Cox model plus CD8/PD-L1 mRNA (red), IFN signature (green) or EIG signature (blue) for the external validation cohort. For each model, the area under the curve is given in brackets. Cutoffs for low and high expressions were defined with the Cutoff Finder method. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns not significant

consuming and more informative than standard evaluation by a pathologist. Automated analysis should be more widely used to homogenize published results.

Secondly, CD8A and CD274 mRNA quantification using RNAseq was predictive to ICI response. Interestingly, the combination of the two factors outperformed the discriminatory properties of CD8A or CD274 variables alone, as well as CD8⁺ TILs and PD-L1 IHC variables. Moreover, we observed that the CD8A/CD274 two-genes signature was superior to two previously published gold-

standard signatures.¹⁶ The CD8A/CD274 signature was also validated in a public data set which involves NSCLC, head and neck, melanoma treated with anti PD1 or PD-L1 mAb. In addition, we also validated this biomarker in an additional cohort of metastatic lung cancer patients from Quebec City treated with pembrolizumab in first line or nivolumab in further line. We believe that our data support the rationale that CD8⁺ TILs infiltration and expression of PD-L1 are both required for the efficacy of checkpoint inhibitors targeting PD-1 or PD-L1 in lung

cancer treated with immunotherapy in first or further line. This intuitive result corroborates the proposal of tumor classification according to CD8⁺ TILs and PD-L1 level by Teng's.²⁰ Furthermore, our signature outperformed other previous signatures in an external cohort with various tumor types. These data underline the stability of the model, making our observations relevant for other tumor types, other anti-PD-1 antibodies and other technologies.

In conclusion, our retrospective study showed for the first time that combining CD8⁺ TILs and PD-L1 assessment seems to outperform CD8⁺ TILs or PD-L1 alone as a prognostic marker in NSCLC and as predictive signature of ICI response. Transcriptomic data enabled us to pull out a CD8A/CD274 two-genes signature that identified good responders. In exploratory analysis, this signature outperformed recently published extended immune and interferon signatures and yields better results than IHC data. Limitations of our study include the retrospective design of the study and the low number of patients, so our findings need to be validated by prospective studies and clinical trials. If the CD8A/CD274 signature is validated by further study, this novel biomarker might be adapted to routine analysis and could be used by clinicians to address prognostic of patients and select patients eligible for ICI administration.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. Rankin Suzanne for English corrections. No applicable funding.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.D.F., C.R., V.D., R.B., and F.G. designed the study. B.C., L.F., A.L., A.G., M.A.H., B.R., P.S., M.P., P.F., and P.H. included and followed patients. J.D.F. provided clinical data. L.A., V.D., J.D.F., and F.L. performed the IHC analyses. S.C. performed sequencing experiments. C.R., Q.K., and C.T. performed the bioinformatics analyses. C.R. and Q.K. performed statistical analyses. C.R., Q.K., V.D., and F.L. performed figures. F.G. supervised the study. J.D.F., C.R., Q.K., V.D., R.B., and F.G. wrote the manuscript. All coauthors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This study was supported by INCA (Institut National du Cancer), Ligue Nationale contre le Cancer, and l'Institut du Cancer de Montreal.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0220-9>.

Consent for publication: All subjects gave written consent for publication.

Ethics approval and consent to participate: All subjects gave written consent. The study protocol was approved by the hospital's ethics committee. The study was performed according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. Competing interests: F.G. received honoraria for oral communication from Lilly, Sanofi, Amgen, and is an advisory board of Merck Serono, Amgen, and Sanofi. The remaining authors declare no competing interests.

Note: This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 4.0 Unported License.

REFERENCES

- Didkowska, J., Wojciechowska U., Mańczuk M., Łobaszewski J. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. *Ann Transl Med* [Internet]. avr 2016 [cité 26 juin 2017];4(8). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4860480/>
- Donnem, T. et al. Stromal CD8⁺ T-cell density—a promising supplement to TNM staging in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 2635–2643 (2015).

- Gatalica, Z. et al. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* **23**, 2965–2970 (2014).
- Azoury, S. C., Straughan D. M., and Shukla V. Immune checkpoint inhibitors for cancer therapy: clinical efficacy and safety. *Curr Cancer Drug Targets.* **15**, 452–62 (2015).
- Reck, M. et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1823–1833 (2016).
- Herbst, R. S. et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* **387**, 1540–1550 (2016).
- Garon, E. B. et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2018–2028 (2015).
- Borghaei, H. et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1627–1639 (2015).
- Brahmer, J. et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 123–135 (2015).
- Hellmann et al. Genomic Features of Response to Combination Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell.* **33**, 843–852. e4. (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.018>.
- Fehrenbacher, L. et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* **387**, 1837–1846 (2016).
- Motzer, R. J. et al. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1803–1813 (2015).
- Hodi, F. S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, 711–723 (2010).
- Carbone, D. P. et al. First-Line nivolumab in stage IV or recurrent non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **376**, 2415–2426 (2017).
- Sunshine, J. & Taube, J. M. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* **23**, 32–38 (2015).
- Ayers, M. et al. IFN-γ-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J. Clin. Invest.* **127**, 2930–2940 (2017).
- Wallden, B. et al. Development and analytical performance of a molecular diagnostic for anti-PD1 response on the nCounter Dx analysis system. *J. Clin. Oncol.* **34**(15_suppl), 3034–3034 (2016).
- Wang, Q. & Wu, X. Primary and acquired resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment. *Int Immunopharmacol.* **46**, 210–219 (2017).
- Tumeh, P. C. et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).
- Teng, M. W. L., Ngoiw, S. F., Ribas, A. & Smyth, M. J. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* **75**, 2139–2145 (2015).
- Wan, Y.-W., Allen, G. I. & Liu, Z. TCGA2STAT: simple TCGA data access for integrated statistical analysis in R. *Bioinformatics* **32**, 952–954 (2016).
- Scheel, A. H. et al. Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. *Mod. Pathol.* **29**, 1165–1172 (2016).
- Bankhead, P., et al. QuPath: open source software for digital pathology image analysis. *bioRxiv*. 6 mars 2017;099796.
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P. & Pachter, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* **34**, 525 (2016).
- Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
- Chen, E. Y. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinform.* **14**, 128 (2013).
- Kuleshov, M. V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**(Web Server issue), W90–W97 (2016).
- Eisenhauer, E. A. et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer* **45**, 228–247 (2009).
- Budczies, J. et al. Cutoff finder: a comprehensive and straightforward web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLOS ONE* **7**, e51862 (2012).
- Prat, A. et al. Immune-related gene expression profiling after pd-1 blockade in non-small cell lung carcinoma, head and neck squamous cell carcinoma, and melanoma. *Cancer Res.* **77**, 3540–3550 (2017).
- Tokito, T. et al. Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8⁺ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy. *Eur. J. Cancer* **55**, 7–14 (2016).
- Zhang, Y., et al. Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma. *OncoTargets Ther.* **12**, 567–73.
- Chen, Y., Mu, C.-Y. & Huang, J.-A. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori* **98**, 751–755 (2012).

34. Mu, C.-Y., Huang, J.-A., Chen, Y., Chen, C. & Zhang, X.-G. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol.* **28**, 682–688 (2011).
35. Schmidt, L. H. et al. PD-1 and PD-L1 expression in NSCLC indicate a favorable prognosis in defined subgroups. *PLOS ONE* **10**, e0136023 (2015).
36. Boland, J. M. et al. Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung. *Clin. Lung Cancer* **14**, 157–163 (2013).
37. Zhang, M. et al. PD-L1 expression in lung cancer and its correlation with driver mutations: a meta-analysis. *Sci. Rep.* **7**, 10255 (2017).
38. Al-Shibli, K. I. et al. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 5220–5227 (2008).
39. Ilie, M. 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.* **27**, 147–153 (2016).
40. Gagné, A. et al. Comprehensive assessment of PD-L1 staining heterogeneity in pulmonary adenocarcinomas using tissue microarrays: impact of the architecture pattern and the number of cores. *Am. J. Surg. Pathol.* **42**, 687 (2018).
41. Hirsch, F. R. et al. PD-L1 immunohistochemistry assays for lung cancer: results from phase 1 of the blueprint PD-L1 IHC assay comparison project. *J. Thorac. Oncol.* **12**, 208–222 (2017).
42. Gadgeel, S., et al. 1296O Clinical efficacy of atezolizumab (Atezo) in PD-L1 subgroups defined by SP142 and 22C3 IHC assays in 2L + NSCLC: results from the randomized OAK study. *Ann Oncol* [Internet]. [cité 25 mai 2018];28(suppl_5). Disponible sur: https://academic.oup.com/annonc/article/28/suppl_5/mdx380.001/4109356 (2017).
43. Konishi, J. et al. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin. Cancer Res.* **10**, 5094–5100 (2004).
44. Mazzaschi, G. et al. Low PD-1 expression in cytotoxic CD8+ tumor infiltrating lymphocytes confers an immune privileged tissue microenvironment in NSCLC with a prognostic and predictive value. *Clin. Cancer Res.* **2156**, 2017 (2017).
45. Huang, A. C. et al. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature* **545**, 60–65 (2017).
46. Le, D. T. et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509–2520 (2015).



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Figure S1:

(A) (Upper panel) PD-L1 staining in percentage of positive tumor cells (TC) where 0 is lower than 1%, 1 is between 1% and 5%, 2 between 5% and 50% and 3 is higher than 50%. (Lower panel) PD-L1 staining in percentage of positive immune cells (IC) where 0 is lower than 1%, 1 is between 1% and 5%, 2 is between 5% and 10% and 3 is higher than 10% (lower panel). Yellow bar scale at the bottom indicates 50 μ m. (B) Semi-automated evaluation of CD8⁺ cells using QuPath software. Cells were counted in areas within red boundaries. CD8⁺ positive cells are displayed with red contours while negative cells are displayed with blue contours. (Upper panel) Representative snapshots of CD8⁺ low patient. (Lower panel) Representative snapshots of CD8⁺ high patient. Yellow scale bar is 500 μ m for low magnification and 100 μ m for high magnification.

Figure S2:

(A) Representative snapshots of typical low (upper panel) and high CD8 staining (lower panel) at low and high magnification. Scale bar is respectively 500 μ m and 100 μ m. (B) Representative snapshots of the same sample stained with Sp142 and 22C3 anti-PD-L1 clones. Scale bar is 250 μ m. (C) Cumulative bar plots representing the proportion of patients with high Sp142 labeling expression (Sp142+; light grey) or low Sp142 labeling expression (Sp142-; black), respectively for patients with a 22C3 labeling expression < 1%, between 1 and 49% and \geq 50%.

Figure S3:

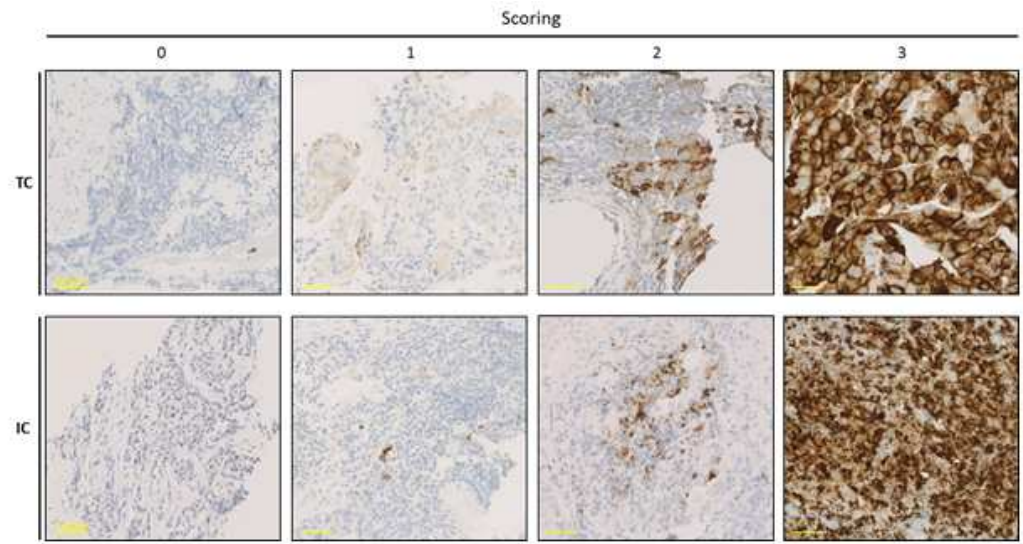
(A-D) Box plots showing the mRNA expression of CD8A and CD274 genes comparing distribution between histological classifications (A), tumor stage (B), age (C) and sex (D). (E-F) Kaplan-Meier estimates for overall survival; patients with stage III or IV were stratified according to CD8 (E) and CD274 (F) mRNA expression: high expression (CD8+/CD274+; in red) and low expression (CD8-/CD274-; in blue). (G) Kaplan-Meier estimates for overall survival; patients with stage III or IV were stratified in two groups: a group with low CD8 and high CD274 mRNA expression (CD8-/CD274+) and a group with the other patients. Cutoffs for low and high expressions were defined with the Cutoff Finder method. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns: not significant.

Figure S4:

(A-B) Cumulative bar plots showing the proportion of patients with high CD8 expression (CD8+/CD8A+; light grey) or low CD8 expression (CD8-/CD8A-; black) for IHC (A) and mRNA (B) analyses, respectively for patients with progression-disease RECIST response (PD) and pooled stable-disease and partial response (SD + PR). (C-D) Cumulative bar plots showing the proportion of patients with high PD-L1 expression (Sp142+/CD274+; light grey) or low PD-L1 expression (Sp142-/CD274-; black) for IHC (A) and mRNA (B) analyses, respectively for patients with progression-disease RECIST response (PD) and pooled stable-disease and partial response (SD + PR). Cutoffs for low and high expressions were defined with the Cutoff Finder method. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns: not significant.

Figure S1

A



B

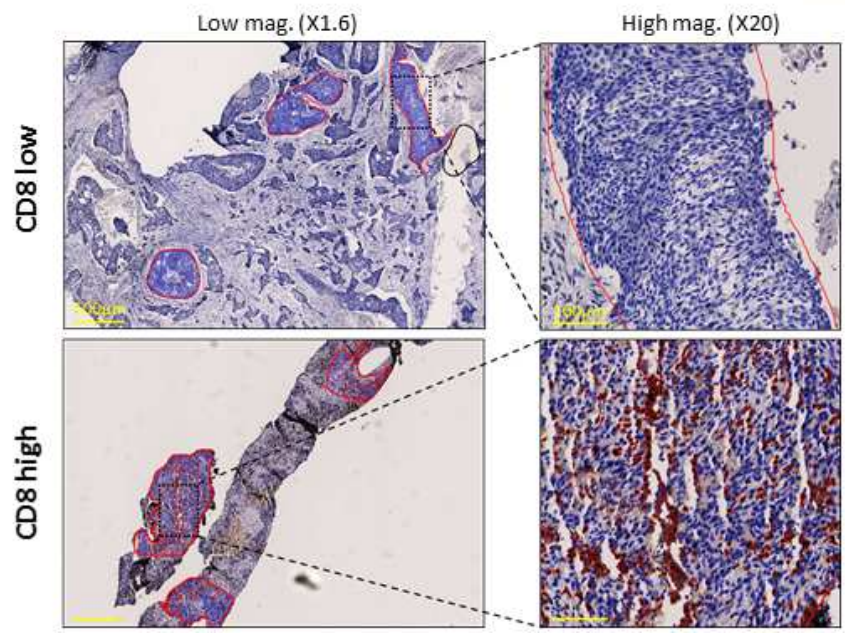


Figure S2

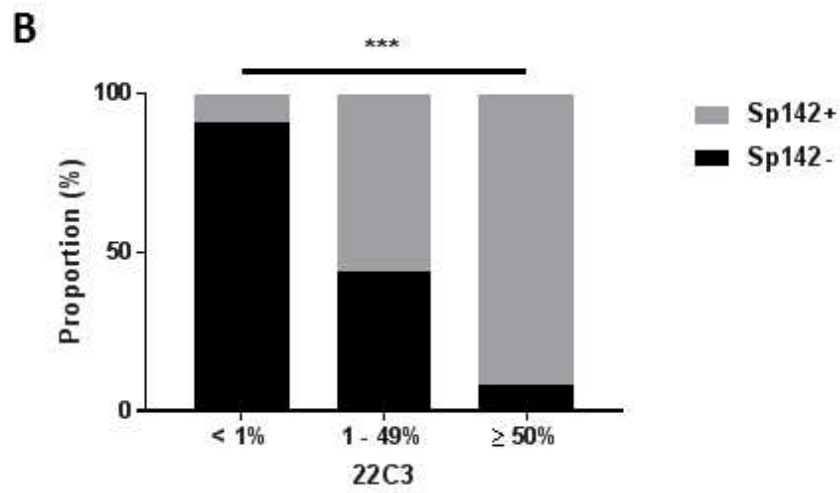
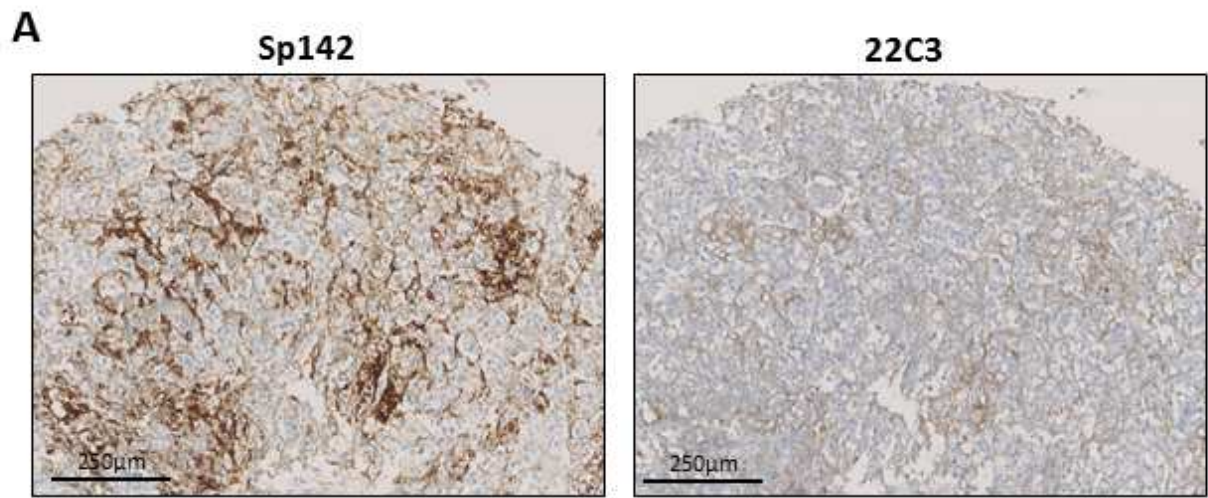


Figure S3

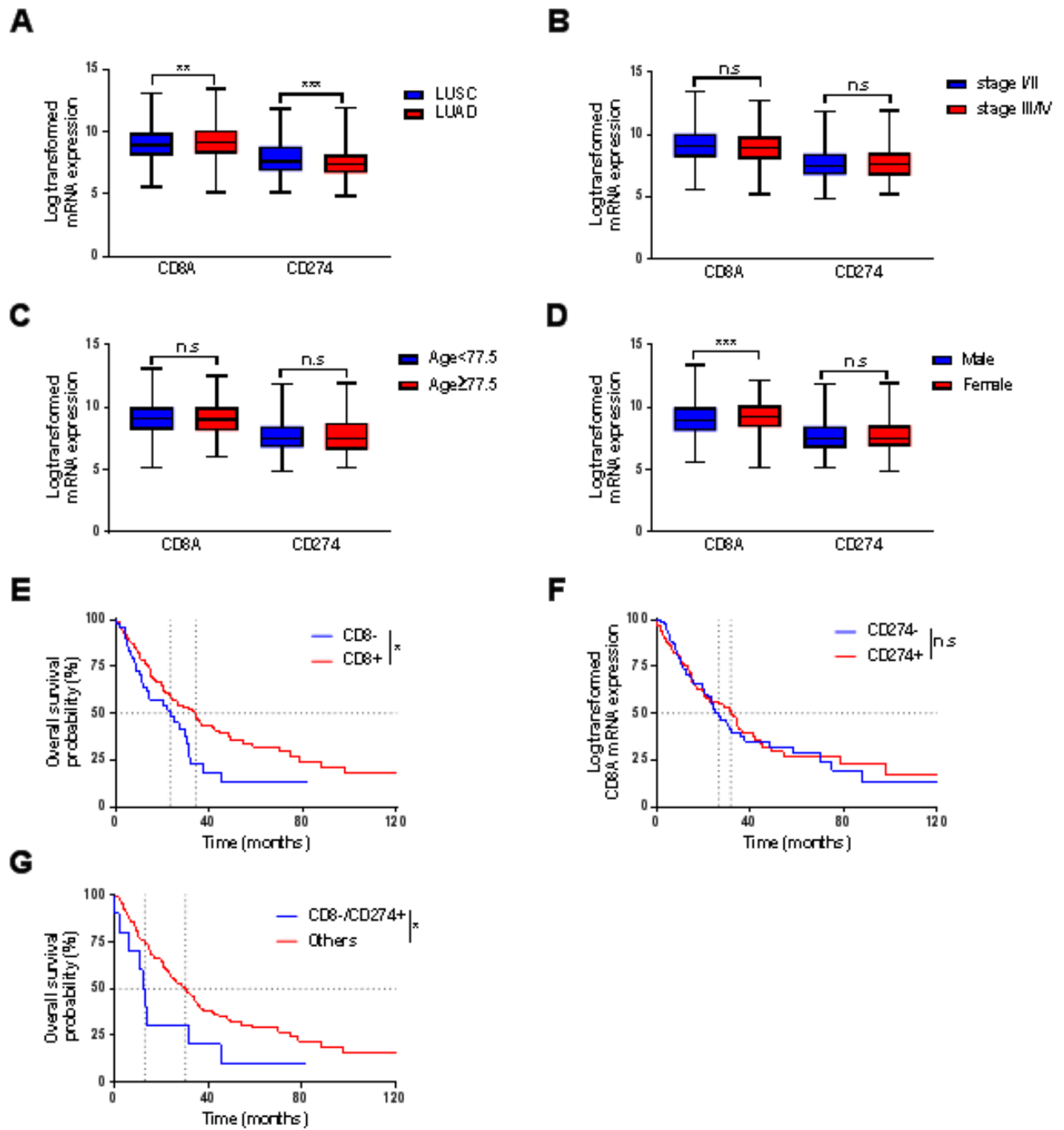


Figure S4

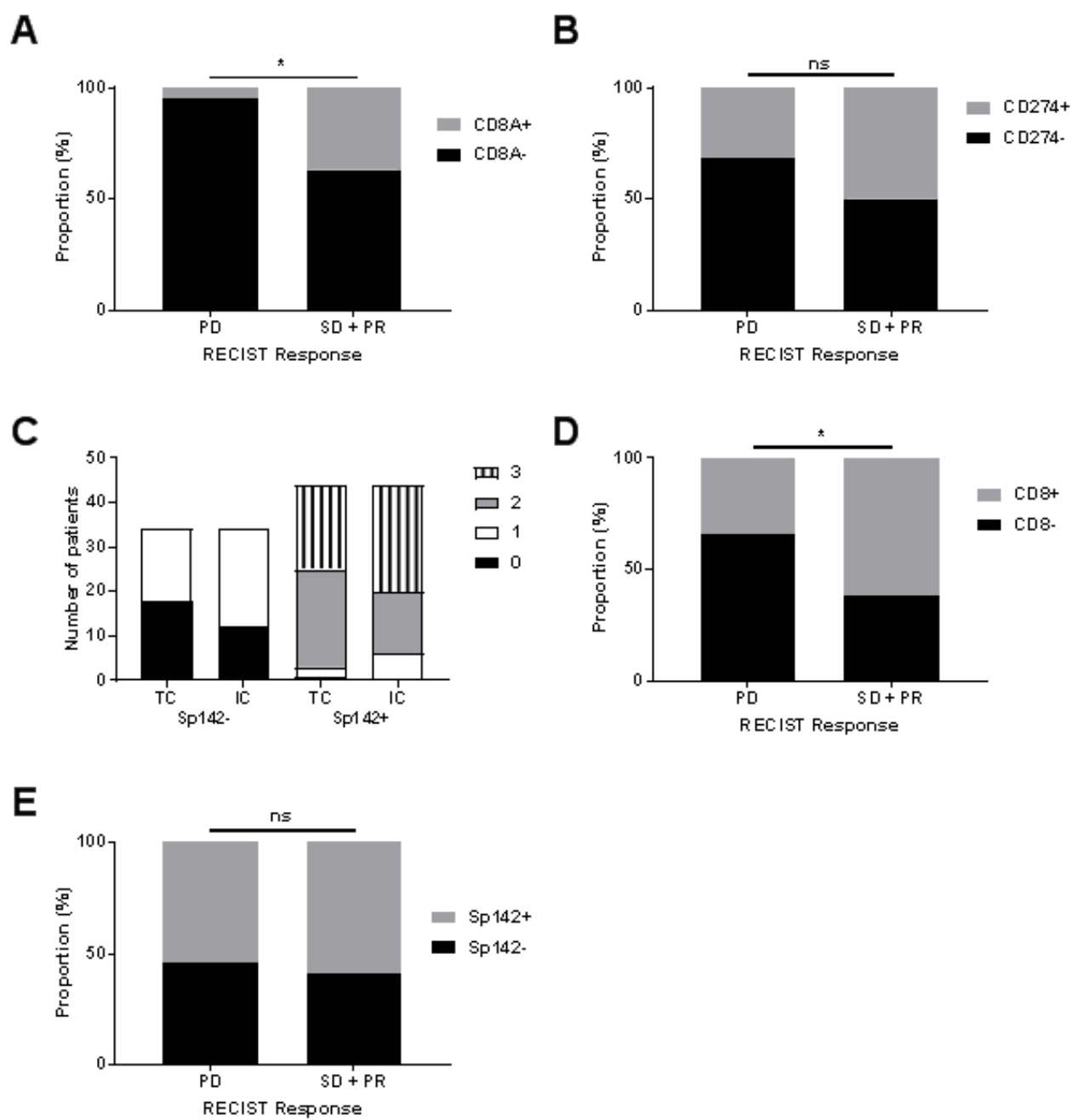
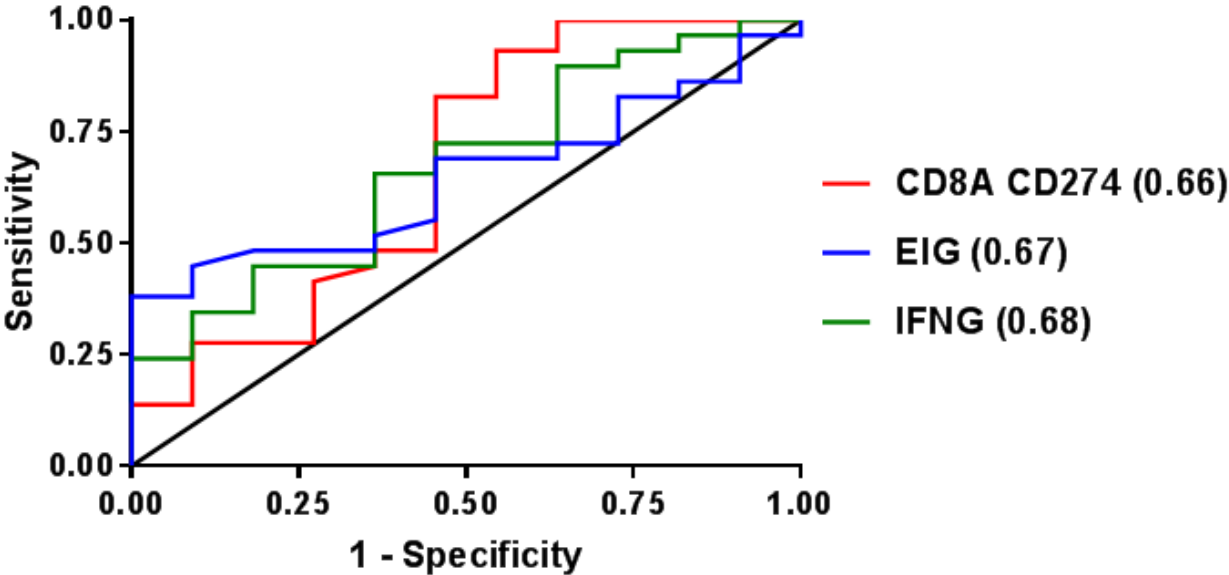


Figure S5



| Variable | | Total (N=34) |
|-------------------------------|------------------|--------------|
| Sex-no.(%) | Female | 10 (29) |
| | Male | 24 (71) |
| Age-yr | median (range) | 65 (38-81) |
| | mean (sd) | 65 (9.3) |
| WHO performance status-no.(%) | 0 | 9 (27) |
| | 1 | 15 (44) |
| | 2 | 10 (29) |
| Histology-no.(%) | Nonsquamous-cell | 22 (65) |
| | Squamous-cell | 12 (35) |
| Stage-no.(%) | IIIB | 4 (12) |
| | IV | 30 (88) |
| Smoker-no.(%) | No | 2 (6) |
| | Yes | 33 (94) |

Table S1. Summary of clinical characteristics of the prognostic IHC cohort.

| Variable | | Total (N=1016) | Hratio | OS 95% CI | P-value |
|-----------------|----------------|----------------|--------|---------------|-----------------|
| Stade(%) | Stage I | 519 (51.1) | 1 | | |
| | Stage II | 284 (28.0) | 1.627 | [1.280;2.068] | 7.06e-05 |
| | Stage III | 168 (16.5) | 2.222 | [1.712;2.883] | 1.91e-09 |
| | Stage IV | 33 (3.2) | 3.105 | [1.965;4.908] | 1.22e-06 |
| | Missing | 12 (1.2) | | | |
| Age(%) | median (range) | 67 (38-90) | | | |
| | mean (sd) | 66.2 (9.3) | 1.011 | [1;1.023] | 0.05 |
| Sexe(%) | Female | 407 (40.1) | 1 | | |
| | Male | 609 (59.9) | 1.144 | [0.931;1.406] | 0.20 |
| Histo(%) | Adenocarcinoma | 515 (50.7) | 1 | | |
| | Epidermoid | 501 (49.3) | 1.091 | [0.893;1.333] | 0.40 |
| CD274 | low | 545 (53.6) | 1 | | |
| | high | 471 (46.4) | 1.214 | [1;1.481] | 0.05 |
| CD8A | low | 205 (20.2) | 1 | | |
| | high | 811 (79.8) | 0.757 | [0.598;0.959] | 0.02 |

Table S2. Summary of clinical characteristics of the pronostic mRNA cohort

| Variable | | RECIST response | | | p |
|-------------------------------|------------------|-----------------|----------------|--------------|------|
| | | PD (N=45) | SD + PR (N=40) | Total (N=85) | |
| Sexe-no.(%) | Female | 12 (27) | 6 (15) | 18 (21) | 0.29 |
| | Male | 33 (73) | 34 (85) | 67 (79) | |
| Age-yr | median (range) | 63 (45-80) | 67 (49-85) | 66 (45-85) | 0.02 |
| | mean (sd) | 63 (8.9) | 68 (9.9) | 65 (9.7) | |
| WHO performance status-no.(%) | 0 | 11 (25) | 17 (43) | 28 (33) | 0.02 |
| | 1 | 28 (62) | 23 (57) | 51 (60) | |
| | 2 | 6 (13) | 0 (0) | 6 (7) | |
| Histology-no.(%) | Nonsquamous-cell | 28 (62) | 17 (43) | 45 (53) | 0.14 |
| | Squamous-cell | 16 (36) | 21 (52) | 37 (44) | |
| | Other | 1 (2) | 2 (5) | 3(3) | |
| Stage-no.(%) | IIIB | 3 (7) | 8 (20) | 11 (13) | 0.13 |
| | IV | 42 (93) | 32 (80) | 74 (87) | |
| Smoker-no.(%) | No | 4 (9) | 5 (13) | 9 (11) | 0.73 |
| | Yes | 41 (91) | 35 (87) | 76 (89) | |

Table S3. Summary of clinical characteristics of the predictive cohort.

| Variable | | Total (N=44) |
|-------------------------------|------------------|---------------|
| Sex-no.(%) | Female | 24 (55) |
| | Male | 20 (45) |
| Age-yr | median (range) | 65 (45-81) |
| | mean (sd) | 65 (7.2) |
| WHO performance status-no.(%) | 0 | 4 (9) |
| | 1 | 31 (72) |
| | 2 | 8 (19) |
| Histology-no.(%) | Nonsquamous-cell | 32 (73) |
| | Squamous-cell | 8 (18) |
| | Other | 4 (9) |
| Stage-no.(%) | III | 18 (41) |
| | IV | 26 (59) |
| Smoker-no.(%) | No | 3 (7) |
| | Yes | 41 (93) |

Table S4. Summary of clinical characteristics of the validation predictive cohort.

| Variable | Univariate Cox models | | | | Multivariate Cox models | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|----------------|--------------|------------------|-------------------------|---------------|-------------|--------|---------------|------|--------------------|---------------|-------------|--------|---------------|------|
| | Hratio | 95% IC | p | Adjusted p (FDR) | Clinical | | CD8 | | Sp142 | | Combined CD8/Sp142 | | | | | |
| | | | | | Hratio | 95% IC | p | Hratio | 95% IC | p | Hratio | 95% IC | p | Hratio | 95% IC | p |
| Sex | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Female | 1 | | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | |
| Male | 0.642 | [0.274;1.505] | 0.30 | 0.40 | 0.413 | [0.153;1.112] | 0.08 | 0.557 | [0.162;1.919] | 0.35 | 0.410 | [0.151;1.114] | 0.08 | 0.551 | [0.159;1.912] | 0.35 |
| Age-yr | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Continuous | 1.048 | [0.995;1.104] | 0.08 | 0.13 | 1.046 | [0.983;1.113] | 0.16 | 1.046 | [0.984;1.111] | 0.15 | 1.046 | [0.983;1.114] | 0.16 | 1.048 | [0.985;1.115] | 0.14 |
| WHO performance status | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 1 | | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | |
| 1 | 1.555 | [0.531;4.557] | 0.42 | 0.48 | 1.300 | [0.383;4.416] | 0.67 | 1.002 | [0.194;5.173] | 1.00 | 1.308 | [0.384;4.450] | 0.67 | 1.008 | [0.197;5.148] | 0.99 |
| 2 | 6.551 | [2.040;21.03] | 0.002 | 0.02 | 5.136 | [1.370;19.26] | 0.02 | 3.394 | [0.539;21.37] | 0.19 | 5.178 | [1.369;19.59] | 0.02 | 3.420 | [0.541;21.61] | 0.19 |
| Histology | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nonsquamous-cell | 1 | | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | |
| Squamous-cell | 2.176 | [0.951;4.979] | 0.06 | 0.12 | 1.285 | [0.469;3.520] | 0.63 | 1.875 | [0.541;6.506] | 0.32 | 1.242 | [0.378;4.082] | 0.72 | 1.691 | [0.415;6.891] | 0.46 |
| CD8 expression | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Low | 1 | | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | |
| High | 0.452 | [0.204;0.9998] | 0.05 | 0.12 | 0.488 | [0.124;1.921] | 0.31 | 0.488 | [0.124;1.921] | 0.31 | 1 | | | 0.481 | [0.122;1.907] | 0.30 |
| PD-L1 expression (Sp142) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Low | 1 | | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | |
| High | 1.115 | [0.506;2.455] | 0.79 | 0.79 | 1.055 | [0.397;2.799] | 0.92 | 1.179 | [0.416;3.341] | 0.76 | 1.055 | [0.397;2.799] | 0.92 | 1.179 | [0.416;3.341] | 0.76 |
| CD8 and PD-L1 expressions | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CD8- PD-L1 + | 1 | | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | |
| Others patients | 0.384 | [0.164;0.903] | 0.02 | 0.08 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.446 | [0.142;1.402] | 0.17 |

Table S5. Summary of univariate and multivariate Cox models with IHC expressions and clinical characteristics of the pronostic IHC cohort.

| Variable | Univariate Cox models | | | | Multivariate Cox models | | | | Bootstrapping | | | |
|--------------------------|-----------------------|---------------|-----------------|------------------|-------------------------|---------------|-----------------|----------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
| | Hratio | 95% IC | p | Adjusted p (FDR) | Hratio | 95% IC | P-value | Hratio | 95% IC | P-value | 95% CI | P-value |
| Sex | | | | | | | | | | | | |
| Female | 1.144 | [0.931;1.406] | 0.20 | 0.23 | 1 | [0.867;1.346] | 0.49 | 1 | [0.876;1.358] | 0.44 | [0.875;1.349] | 0.4 |
| Male | 1.011 | [1;1.023] | 0.05 | 0.07 | 1.089 | [1.003;1.027] | 1.00E-02 | 1.015 | [1.003;1.026] | 1.00E-02 | [1.004;1.026] | 7.00E-03 |
| Age-yr | | | | | | | | | | | | |
| Continuous | 1.011 | [1;1.023] | 0.05 | 0.07 | 1.015 | [1.003;1.027] | 1.00E-02 | 1.015 | [1.003;1.026] | 1.00E-02 | [1.004;1.026] | 7.00E-03 |
| Stage | | | | | | | | | | | | |
| I | 1.627 | [1.280;2.068] | 7.06E-05 | 0.0002 | 1.554 | [1.214;1.990] | 5.00E-04 | 1 | [1.209;1.982] | 5.30E-04 | [1.194;1.959] | 7.70E-04 |
| II | 2.222 | [1.712;2.883] | 1.91E-09 | 1.5E-08 | 2.141 | [1.646;2.784] | 1.35E-08 | 2.119 | [1.628;2.756] | 2.26E-08 | [1.621;2.745] | 2.74E-08 |
| III | 3.105 | [1.965;4.908] | 1.22E-06 | 4.8E-06 | 3.098 | [1.941;4.945] | 2.14E-06 | 3.107 | [1.946;4.962] | 2.06E-06 | [1.931;4.932] | 2.44E-06 |
| IV | | | | | | | | | | | | |
| Histology | | | | | | | | | | | | |
| Non-squamous cell | 1.091 | [0.893;1.333] | 0.40 | 0.4 | 1 | [0.801;1.240] | 0.97 | 1 | [0.800;1.241] | 0.97 | [0.786;1.218] | 0.51 |
| Squamous cell | 0.757 | [0.598;0.959] | 0.02 | 0.04 | 1.007 | [0.810;1.252] | 0.95 | 0.997 | [0.801;1.240] | 0.97 | [0.785;1.220] | 0.84 |
| CD8 expression (CD8A) | | | | | | | | | | | | |
| Low | 1.214 | [1;1.481] | 0.05 | 0.07 | 1 | - | - | 1 | - | - | [0.589;0.963] | 0.02 |
| High | | | | | | | | | | | | |
| PD-L1 expression (CD274) | | | | | | | | | | | | |
| Low | 1.214 | [1;1.481] | 0.05 | 0.07 | 1 | - | - | 1 | - | - | [0.961;1.465] | 0.11 |
| High | | | | | | | | | | | | |
| Statistics | | | | | | | | | | | | |
| AIC | | | | | 4486.503 | | | 4485.588 | | | 4485 | |
| Harrell's C | | | | | 0.62 | | | 0.62 | | | 0.622 | |

Table S6. Summary of univariate and multivariate Cox models with mRNA expressions and clinical characteristics of the pronostic mRNA cohort.

| Variable | mRNA multivariate Cox models | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|------------------------------|----------------|-------------|---------------|----------------|-------------|---------------------|----------------|-------------|--------|----------------|-------------|
| | IFN signature | | | EIG signature | | | Combined CD8A/CD274 | | | | | |
| | Hratio | 95% IC | p | Hratio | 95% IC | p | Hratio | 95% IC | p | Hratio | 95% IC | p |
| Sexe | | | | | | | | | | | | |
| Female | 1 | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | |
| Male | 0.528 | [0.198;1.408] | 0.20 | 0.505 | [0.188;1.358] | 0.18 | 0.302 | [0.105;0.868] | 0.03 | 0.302 | [0.105;0.868] | 0.03 |
| Age | | | | | | | | | | | | |
| Continuous | 0.974 | [0.938;1.011] | 0.17 | 0.977 | [0.940;1.015] | 0.24 | 0.951 | [0.910;0.994] | 0.02 | 0.951 | [0.910;0.994] | 0.02 |
| WHO performance status | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 1 | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | |
| 1 | 0.786 | [0.333;1.855] | 0.58 | 0.778 | [0.330;1.834] | 0.57 | 0.665 | [0.291;1.524] | 0.34 | 0.665 | [0.291;1.524] | 0.34 |
| 2 | 5.260 | [1.296;21.356] | 0.02 | 4.884 | [1.160;20.569] | 0.03 | 3.985 | [0.993;15.988] | 0.051 | 3.985 | [0.993;15.988] | 0.051 |
| Histology | | | | | | | | | | | | |
| Nonsquamous-cell | 1 | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | |
| Squamous-cell | 0.833 | [0.350;1.982] | 0.68 | 0.843 | [0.356;1.996] | 0.70 | 1.301 | [0.536;3.156] | 0.56 | 1.301 | [0.536;3.156] | 0.56 |
| CD8 expression (CD8A) | | | | | | | | | | | | |
| Low | | - | | | - | | | - | | | - | |
| High | | | | | | | 0.163 | [0.033;0.798] | 0.03 | 0.163 | [0.033;0.798] | 0.03 |
| PD-L1 expression (CD274) | | | | | | | | | | | | |
| Low | | - | | | - | | | - | | | - | |
| High | | | | | | | 1 | | | 1 | | |
| IFN signature expression | | | | | | | | | | | | |
| Low | 1 | | | | | | | | | | | |
| High | 0.455 | [0.188;1.100] | 0.08 | | | | 0.366 | [0.127;1.051] | 0.06 | | | |
| EIG signature expression | | | | | | | | | | | | |
| Low | | - | | | - | | | - | | | - | |
| High | | | | 1 | | | 0.458 | [0.189;1.108] | 0.08 | | | |
| Statistics | | | | | | | | | | | | |
| AIC | | 185 | | | 185 | | | 173 | | | 173 | |
| Harrell's C-statistic | | 0.77 | | | 0.75 | | | 0.90 | | | 0.90 | |

Table S7. Summary of mRNA multivariate Cox models built on the predictive cohort data.

| Variable | Clinical model | | | NanoString multivariate Cox models | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|----------------|-------------|------------------------------------|-------------------------|--------------|--------|-------------------------|--------------|--------|----------------|-------------|
| | Hratio | 95% IC | p | Hratio | IFN signature 95% IC | p | Hratio | EIG signature 95% IC | p | Hratio | 95% IC | p |
| Sexe | Female | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | |
| | Male | [0.230;0.899] | 0.02 | 0.454 | [0.200;0.799] | 0.01 | 0.390 | [0.193;0.784] | 0.008 | 0.426 | [0.206;0.881] | 0.02 |
| Age-yr | Continuous | [0.988;1.040] | 0.30 | 1.013 | [0.983;1.033] | 0.53 | 1.010 | [0.985;1.035] | 0.46 | 1.008 | [0.985;1.031] | 0.51 |
| WHO performance status | 0 | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | |
| | 1 | [0.818;3.489] | 0.16 | 1.690 | [0.946;4.022] | 0.07 | 1.810 | [0.884;3.703] | 0.10 | 2.161 | [1.043;4.478] | 0.04 |
| | 2 | [0.173;10.639] | 0.77 | 1.358 | [0.235;15.179] | 0.55 | 1.843 | [0.229;14.814] | 0.57 | 4.594 | [0.481;43.902] | 0.19 |
| IFN signature expression | Low | | | 1 | | | 1 | | | | | |
| | High | - | | 0.382 | [0.190;0.769] | 0.007 | | - | | | - | |
| EIG signature expression | Low | | | 1 | | | 1 | | | | | |
| | High | - | | 0.427 | [0.217;0.838] | 0.01 | | - | | | - | |
| CD8 expression (CD8A) | Low | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | |
| | High | - | | | - | | 0.376 | [0.186;0.759] | 0.006 | | | |
| PD-L1 expression (CD274) | Low | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | |
| | High | - | | | - | | 0.326 | [0.102;1.038] | | | | 0.06 |
| Statistics | AIC | 287 | | | 283 | | | 284 | | | 279 | |
| | Harrell's C-statistic | 0.71 | | | 0.79 | | | 0.79 | | | 0.81 | |

Table S8. Summary of multivariate Cox models built on the externe validation cohort data.

ARTICLE 4 : « Exome analysis reveals genomic markers associated with better efficacy of nivolumab in lung cancer patients. »

Le caractère imparfait de l'estimation par IHC de l'expression de la protéine PD-1 à la surface des cellules tumorales comme biomarqueur prédictif de réponse aux anti-PD-1 a incité les chercheurs à se tourner vers d'autres pistes. Récemment, la charge mutationnelle tumorale (TMB) définie le plus souvent comme le nombre de mutations somatiques codantes non silencieuses portées par la tumeur, est apparue comme un potentiel marqueur de réponse (FEHRENBACHER *et al.* 2016; H. RIZVI *et al.* 2018). Dans l'étude Checkmate 026 portant sur l'utilisation du nivolumab en première ligne de traitement, l'efficacité de l'immunothérapie surpasse celle de la chimiothérapie standard seulement chez les patients présentant un TMB élevé (CARBONE *et al.* 2017). Ceci peut s'expliquer biologiquement par le fait que les tumeurs présentant un fort taux de mutations sont celles qui ont la probabilité la plus élevée de contracter un grand nombre de TAA immunogènes. Ainsi, l'activité antitumorale des lymphocytes T rétablie par l'introduction d'un traitement anti-PD-1 serait facilitée par cette potentielle profusion d'antigènes du non-soi. Une estimation du TMB par séquençage d'exome d'un échantillon tumoral et d'un échantillon sain du patient pour obtenir les mutations somatiques semble alors prometteur. D'autres caractéristiques tumorales mesurables par un séquençage de l'exome semblent d'intérêt pour estimer le bénéfice à la prise d'anti-PD-1 telles les altérations des voies biologiques de réparation de l'ADN (LE *et al.* 2015; LE *et al.* 2017) ou bien la diversité en clonotypes du TCR infiltrant la tumeur (RIAZ *et al.* 2017).

Le travail suivant a eu pour objectif d'analyser un grand nombre de paramètres génétiques déterminés à partir de l'analyse des exomes tumoraux et normaux de 77 patients de notre cohorte afin de **1-** déterminer des facteurs prédictifs de survie et **2-** construire un modèle multi-paramétrique afin de prédire au mieux le bénéfice de la prise du traitement. Ce modèle est comparé à un modèle clinique classique comprenant une estimation IHC de PD-1 sur l'échantillon tumoral et un second modèle incluant en plus une estimation du TMB.

Dans cette cohorte, un fort TMB et un nombre élevé de TAA, des mutations dans les voies de la réparation à l'ADN et un faible nombre de clonotypes du TCR infiltrant la tumeur sont associés à une meilleure survie sans progression (SSP). L'ajustement d'un modèle de survie avec sélection de variables par méthode LASSO (*Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*) intègre 9 paramètres dont les altérations de voies biologiques de réparations de l'ADN, le nombre de TAA, ou bien encore le nombre de clones TCR infiltrant la tumeur. Ce modèle permet une discrimination significative des patients selon leur SSP et leur SG. Il montre aussi une meilleure capacité de discrimination que le modèle clinique classique ou le modèle incluant une estimation du TMB. Ces résultats ont été confirmés sur trois cohortes externes : la première incluant 34 patients atteints de CBNPC traités en première ligne par pembrolizumab, la seconde composée de 75 CBNPC traités par nivolumab et ipilimumab en première ligne de traitement et enfin la dernière constituée de 25 patients atteints de cancer de la vessie traités par atezolizumab (N. A. RIZVI *et al.* 2015a; HELLMANN *et al.* 2018b; SNYDER *et al.* 2017).

Cette analyse étendue de l'exome avant initiation du nivolumab a permis de mettre en évidence des caractéristiques tumorales et immunes majeures pour la prédiction du bénéfice de la prise de nivolumab. Un modèle de survie incluant ces paramètres permet une meilleure prédic-

tion de la survie que des modèles cliniques classiques incluant l'expression de PD-L1 ou la charge tumorale seulement.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue *Clinical Cancer Research* ainsi que d'un poster présenté au meeting annuel de l'ASCO 2018 à Chicago, au congrès WIN 2018 Symposium à Paris et au Forum des Jeunes Chercheurs à Besançon :

Richard, C., Fumet, J. D., Chevrier, S., Derangere, V., Ledys, F., Exome Analysis Reveals Genomic Markers Associated with Better Efficacy of Nivolumab in Lung Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* **25**, 957–966 (2019).

Richard, C., Fumet, J. D., Chevrier, S., Derangere, V., Ledys, F., Exome Analysis to Reveal Genomic Markers Associated with Better Efficacy of Nivolumab in Lung Cancer Patients. *Abstract #9044*, Présenté au congrès annuel de l'ASCO, Chicago, IL. USA (2018).

Richard, C., Fumet, J. D., Chevrier, S., Derangere, V., Ledys, F., Exome Analysis to Reveal Genomic Markers Associated with Better Efficacy of Nivolumab in Lung Cancer Patients. *Abstract P2.22*, Présenté au congrès WIN Symposium, Paris, France (2018).

Richard, C., Fumet, J. D., Chevrier, S., Derangere, V., Ledys, F., Exome Analysis to Reveal Genomic Markers Associated with Better Efficacy of Nivolumab in Lung Cancer Patients. *Abstract P54*, Présenté au Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, France (2018).

Exome Analysis Reveals Genomic Markers Associated with Better Efficacy of Nivolumab in Lung Cancer Patients

Corentin Richard^{1,2,3}, Jean-David Fumet^{1,2,3,4}, Sandy Chevrier^{1,3}, Valentin Derangère^{1,3}, Fanny Ledys^{1,2,3}, Aurélie Lagrange⁴, Laure Favier⁴, Bruno Coudert⁴, Laurent Arnould^{1,3,5}, Caroline Truntzer^{1,3}, Romain Boidot^{1,2,3,5,6}, and François Ghiringhelli^{1,2,3,4,5,6}



Abstract

Purpose: Immune checkpoint inhibitors revolutionized the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). However, only one-quarter of patients benefit from these new therapies. PD-L1 assessment and tumor mutational burden (TMB) are available tools to optimize use of checkpoint inhibitors but novel tools are needed. Exome sequencing could generate many variables but their role in identifying predictors of response is unknown.

Experimental Design: We performed somatic and constitutional exome analyses for 77 patients with NSCLC treated with nivolumab. We studied: one-tumor-related characteristics: aneuploidy, CNA clonality, mutational signatures, TMB, mutations in WNT, AKT, MAPK, and DNA repair pathways, and two-immunologic characteristics: number of intratumoral TCR clones, HLA types, and number of neoantigens; and six clinical parameters.

Results: A high TMB per Mb, a high number of neoantigens, mutational signatures 1A and 1B, mutations in DNA repair pathways, and a low number of TCR clones are associated with greater PFS. Using a LASSO method, we established an exome-based model with nine exome parameters that could discriminate patients with good or poor PFS ($P < 0.0001$) and overall survival ($P = 0.002$). This model shows better ability to predict outcomes compared with a PD-L1 clinical model with or without TMB. It was externally validated on two cohorts of patients with NSCLC treated with pembrolizumab or with nivolumab and ipilimumab as well as in urothelial tumors treated with atezolizumab.

Conclusions: Altogether, these data provide a validated biomarker that predicts the efficacy of nivolumab or pembrolizumab in patients with NSCLC. Our biomarker seems to be superior to PD-L1 labeling and TMB models.

Introduction

Despite recent advances in the molecular classification of non-small cell lung cancer (NSCLC), the prognosis for advanced patients remains poor (1). Currently patients are treated in first-line with platinum-based chemotherapy or target therapies in case of presence of activating driver mutations. This first-line therapy field is moving rapidly, and for some patients "baseline therapy" will likely be platinum-based chemotherapy combined with immunotherapy in the near future. Despite the effectiveness of these therapies, the prognosis remains poor due to the ineluc-

table escape of the disease. mAbs targeting "immune" checkpoint inhibitors of the immune response revolutionized the treatment of lung cancer (2, 3). The CheckMate 057 study (4) was the first study demonstrating that an anti-PD-1 antibody (nivolumab) provided a better survival advantage than chemotherapy in lung adenocarcinomas that have progressed after first-line therapy. These data were further confirmed in squamous and nonsquamous cell lung carcinoma treatment using another anti-PD-1 mAb pembrolizumab (5) or the anti-PD-L1 mAb atezolizumab (6). Nivolumab, pembrolizumab, and atezolizumab are currently approved for the second- or third-line treatment of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. Despite the undeniable efficacy of these therapies, only one-quarter of patients with NSCLC benefits from these new therapies (4, 7). Consequently, predictive biomarkers are needed to correctly identify responding patients. The assessment of PD-L1 tumor expression by IHC is used to select responder patients; however, this marker is suboptimal (8, 9) and does not predict the absence of anti-PD-1 efficacy. Despite this shortcoming, PD-L1 remains the gold standard biomarker in many studies (5, 10–12). In addition to histologic markers, transcriptomic and exome analyses have revealed potential biomarkers needing further confirmation (13, 14). Recently, tumor mutational burden (TMB) has emerged as a good surrogate marker of outcome (13, 15). In the Checkmate 026 study of nivolumab use as first-line lung cancer treatment, exploratory analysis also suggests that high TMB is associated with better efficacy of nivolumab compared with chemotherapy (16).

¹Platform of Transfer in Cancer Biology, France. ²University of Burgundy Franche-Comté, France. ³Genetic and Immunology Medical Institute, Dijon, France. ⁴Department of Medical Oncology, Georges-François LECLERC Cancer Center - UNICANCER, Dijon, France. ⁵Department of Tumor Biology and Pathology, Georges François Leclerc Cancer Center - UNICANCER, Dijon, France. ⁶INSERM U1231, Dijon, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

C. Truntzer, R. Boidot, and F. Ghiringhelli share co-authorship.

Corresponding Author: François Ghiringhelli, Centre Georges François Leclerc, 1 rue du professeur marion, Dijon 21000, France. Phone: 33380393353; Fax: 33380393434; E-mail: fghiringhelli@cgfl.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1940

©2018 American Association for Cancer Research.

Richard et al.

Translational Relevance

Immunotherapy is a major advance in the treatment of non-small cell lung cancer. However, not all patients benefit from such therapy, so predictive biomarkers are required to improve patients selection. This study demonstrated that exome analysis before initiation of nivolumab therapy can be highly predictive of PFS and OS when analyzed in multiple dimensions. Such analysis is more informative than current biomarkers like PD-L1 or mutation tumor burden. These findings have far-reaching implications for an efficient immunotherapy and should unravel the interest of complex analysis of exome for precision medicine in immuno-oncology.

In this study, we retrospectively performed an analysis of a large set of somatic and constitutional exome parameters in a cohort of patients isolated from the Exoma clinical trial and treated with nivolumab as second- or third-line therapy. The objective was to select biomarkers that better predict nivolumab efficacy compared with previous models.

Materials and Methods

Patients

This prospective monocentric cohort of patients included 77 patients with locally advanced unresectable or metastatic NSCLC treated with nivolumab in monotherapy at the recommended dose (3 mg/kg q2 weeks) in second- or third-line. The patients were treated at Georges-Francois LECLERC Cancer Center. All patients were treated in first-line with platinum-based chemotherapy. They were all prospectively included in the Exoma trial. The clinical data collection and the exome sequencing were performed prospectively according to the trial. The dedicated analysis of this population of patients with NSCLC treated with immunotherapy was performed retrospectively as it was not the aim of the Exoma trial. The database was registered and declared to the National French Commission on Informatics and Liberty (CNIL). The study was conducted in accordance with standard procedures in France and from the Declaration of Helsinki ethical guidelines, with approval from the relevant institutional review boards.

Accordingly, all patients signed a written informed consent before inclusion and benefited from a consultation with a geneticist before constitutional exome analysis. Upon protocol, patients and tumors' characteristics were collected and concerned: age, sex, WHO Performance Status (PS), smoking history, histologic type, tumor stage, EGFR, and Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene (KRAS) mutation status, anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangement status, and best RECIST response to nivolumab. All of the CT-scans have been reviewed by two physicians to validate response to nivolumab, and evaluation was based on RECIST 1.1 (17). All progressions were confirmed by a second CT-scan performed 6 weeks after the initial one. The database was closed on August 10, 2017.

Statistical analysis

All patients were followed up until death or the end of data recording (August 10, 2017). Response rate to treatment was assessed by physicians on CT scans using RECIST version 1.1

(17), following 2 months of therapy and patients have been classified in three categories: progression-disease (PD), stable-disease (SD), and partial response (PR). Patients who died early were considered as PD. Progression-free survival (PFS) for nivolumab treatment was calculated as the time from the date of the treatment start to the first recorded evidence of disease progression by the RECIST criteria, clinical evaluation or death, and was censored after 6 months. Overall survival (OS) was calculated as the time from the date of the nivolumab treatment start to the date of death and censored after 24 months. Patients and disease characteristics were examined using the χ^2 test or Fisher exact test for qualitative variables and the Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test for continuous variables, as appropriate. All boxplots were drawn with median, quartiles and Tukey's whiskers. Correlations were estimated with the Spearman's rank correlation coefficient and associated *P*-values were estimated with the `cor.test()` function from the R package *stats*. Survival probabilities were estimated using the Kaplan-Meier method, best cutoffs for continuous variables were chosen using Cutoff Finder (18) and survival curves were evaluated using the log-rank test. Three multivariate survival models were compared: one model with only clinical variables [gender, age (continuous), WHO performance status, histology and tumor stage] as well as PD-L1 IHC expression called "clinical model"; a second adding TMB per Mb to the first model, called "TMB model"; and a last model, called "exome-derived model", with all exome derived variables selected thanks to a LASSO method using the function `cv.glmnet` from the R package *glmnet* (19). ROC curves were constructed with the linear predictor estimated from each of the previous multivariate models and compared with the function `compareC` from the R package *compare* (20). Statistical analyses were performed using the R software version 3.3.2 and graphs were drawn using GraphPad Prism version 7.03. All tests were two-sided, and *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

Data availability

The data sets generated and/or analyzed during this study, as well as the computer code used to perform statistical analysis, are available from the corresponding authors on reasonable request.

Supplementary information about IHC procedures, exome sequencing, and generation of exome-derived variables are available in supplementary methods.

Results

Patient characteristics

Seventy-seven patients with metastatic NSCLC, all of whom were from a single institution (Georges-Francois LECLERC Cancer Center), were included in this analysis. The median follow-up was 11 months. The patients displayed characteristics typical of the metastatic lung cancer population. There were 59 (77%) men and 18 (23%) women. The median age at first nivolumab usage was 66 years old (range, 45–85 years). The most common histologic type was adenocarcinoma ($n = 44$; 57%), which was followed by squamous cell carcinoma ($n = 30$; 39%), and the remaining 4% include two insufficiently differentiated tumors and one neuroendocrine tumor. The population was mostly composed of current or former smokers (70; 91%; Table 1). Median PFS with nivolumab was 2.3 months, and median OS was 13.9 months from metastatic diagnosis. We observed 15 (20%) patients with PR, 18 (23%) patients with SD, and 44 (58%) patients with PD as the best response in accordance with RECIST 1.1 criteria. RECIST

Table 1. Summary of clinical characteristics of the cohort

| Variable | | RECIST response | | | P |
|-----------------------------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|------|
| | | PD (N = 44) | SD + PR (N = 33) | Total (N = 77) | |
| Gender, no. (%) | Female | 12 (27) | 6 (18) | 18 (23) | 0.51 |
| | Male | 32 (73) | 27 (82) | 59 (77) | |
| Age, years | Median (range) | 64 (45-85) | 68 (51-85) | 66 (45-85) | 0.01 |
| | Mean (SD) | 64.2 (8.4) | 69.4 (9.0) | 66.4 (9.0) | |
| Smoker, no. (%) | No | 4 (9) | 3 (9) | 7 (9) | 1.00 |
| | Yes | 40 (91) | 30 (91) | 70 (91) | |
| WHO performance status, no. (%) | 0 | 15 (34) | 17 (52) | 32 (42) | 0.19 |
| | 1-2 | 29 (66) | 16 (48) | 45 (58) | |
| Histology, no. (%) | Nonsquamous cell | 25 (57) | 19 (58) | 44 (57) | 0.97 |
| | Squamous cell | 18 (41) | 12 (36) | 30 (39) | |
| | Other | 1 (2) | 2 (6) | 3 (4) | |
| Stage, no. (%) | IIIb | 4 (9) | 6 (18) | 10 (13) | 0.31 |
| | IV | 40 (91) | 27 (82) | 67 (87) | |
| EGFR, no. (%) | Not mutated | 40 (91) | 31 (94) | 71 (92) | 0.70 |
| | Mutated | 4 (9) | 2 (6) | 6 (8) | |
| KRAS, no. (%) | Not mutated | 25 (76) | 18 (78) | 43 (77) | 1.00 |
| | Mutated | 8 (24) | 5 (22) | 13 (23) | |
| ALK, no. (%) | Not mutated | 31 (100) | 19 (95) | 50 (98) | - |
| | Mutated | 0 (0) | 1 (5) | 1 (2) | |
| | Not evaluated | 13 | 13 | 26 | |
| PD-L1 expression (Sp142), no. (%) | Low | 27 (64) | 16 (48) | 43 (57) | 0.26 |
| | High | 15 (36) | 17 (52) | 32 (43) | |
| | Not evaluated | 2 | 0 | 2 | |

response is strongly associated with PFS [median for PD = 1.7; SD = 4.8; PR = not reached (NR); log-rank test $P < 0.0001$; $n = 77$] and OS (median PD = 9.8; SD = 22.9; PR = NR; log-rank test $P = 0.0008$; $n = 77$; Supplementary Fig. S1A and S1B). PD-L1 staining using Sp142 mAb was observed in 55 patients; a high level of PD-L1 was not significantly associated with better PFS but was associated with a better OS (median OS: 12.1 months vs. 22.8 months; log-rank test $P = 0.03$; $n = 55$; Supplementary Fig. S1C and S1D).

In this group, 65 patients had sufficient blood and tumor tissue to process all somatic and constitutional exome analyses, and for 12 patients, only an estimation of their TCR clonality could be performed because of an absence of constitutional sample (Supplementary Fig. S2).

Association between TMB, mutational signatures, and outcome

We identified a median TMB of 4.1 mutations per Mb (range, 0.6-43.7; Fig. 1A). Using a cutoff of 5.73 mutations per Mb, a higher TMB per Mb was significantly associated with a better PFS (median 4.6 months vs. 2 months, log-rank test $P = 0.03$; $n = 65$; Fig. 1B) but was not associated with OS (median 17.5 months vs. 16.7 months, log-rank test $P = 0.62$; $n = 65$; Supplementary Fig. S3A).

We observed a strong heterogeneity of mutational signatures across patients (Fig. 1C). The most frequently expressed signatures were signature 1A (87%, 54/62) and signature 4 (60%, 37/62). Among the 27 tested signatures, we chose to keep only the most common signatures across patients (frequency > 25%), which are signatures 1A, 1B, 3, 4, 6, 16, and 21. Only signature 4 was significantly correlated with TMB per Mb (Spearman $\rho = 0.50$; $P < 0.0001$; $n = 62$; Fig. 1D), confirming that smoking induces several mutations. When focusing on the prognostic utility of the different signatures, we observed that only signatures 1A and 1B had an influence on PFS (Fig. 1E). A high fraction of signature 1A is associated with a better PFS (median 4.3 months vs. 2 months; log-rank test $P = 0.02$; $n = 62$; Fig. 1F) and with a better OS

(median 22.9 vs. 10.3; log-rank test $P = 0.04$; $n = 62$; Supplementary Fig. S3B). A high fraction of signature 1B is associated with a poor PFS (median 1.8 vs. 3.3; log-rank test $P = 0.03$; $n = 62$; Fig. 1G) but not with OS (median 13.3 vs. 17.3; log-rank test $P = 0.93$; $n = 62$; Supplementary Fig. S3C). The other signatures such as signatures related to homologous recombination deficiency or mismatch repair (signatures 3 and 6) or smoking (signature 4) were not significantly associated with any outcome (Supplementary Fig. S3D-S3H).

These data indicate that not only the TMB but also the specific profile of mutations is associated with nivolumab efficacy.

Association between chromosomal instability, tumor clonality, and outcome

Chromosomal instability was previously reported to impact immune response in breast cancer or colorectal cancer (21, 22). The median number of large deletions was 7 (range, 0-19), and the median for large LOH was 17 (range, 1-28). Twenty-six patients were estimated to be aneuploid (41%, 26/63), and one-quarter of patients presented only one major CNA clone (27%, 17/63; Fig. 2A).

Aneuploidy, LOH, CNA clones, and large deletions were all pairwise correlated; only the number of large deletions and the number of CNA clones were not pairwise correlated (Supplementary Fig. S4). However, none of these variables were correlated with TMB, thus suggesting that these variables can provide additional information to TMB.

We observed that high numbers of large LOH and deletions were associated with a poor PFS prognosis (LOH: median 1.7 months vs. 2.6 months; log-rank test $P = 0.02$; deletions: median 1.8 months vs. 3.1 months; log-rank test $P = 0.03$; $n = 63$; Fig. 2B and C), whereas tumor CNA polyclonality and aneuploidy were not associated with PFS (Supplementary Fig. S5A and S5B). Both the high number of large deletions and aneuploidy were significantly associated with reduced OS (deletions: median 9.3 months vs. 22.8 months; log-rank test $P = 0.004$; ploidy: median

Richard et al.

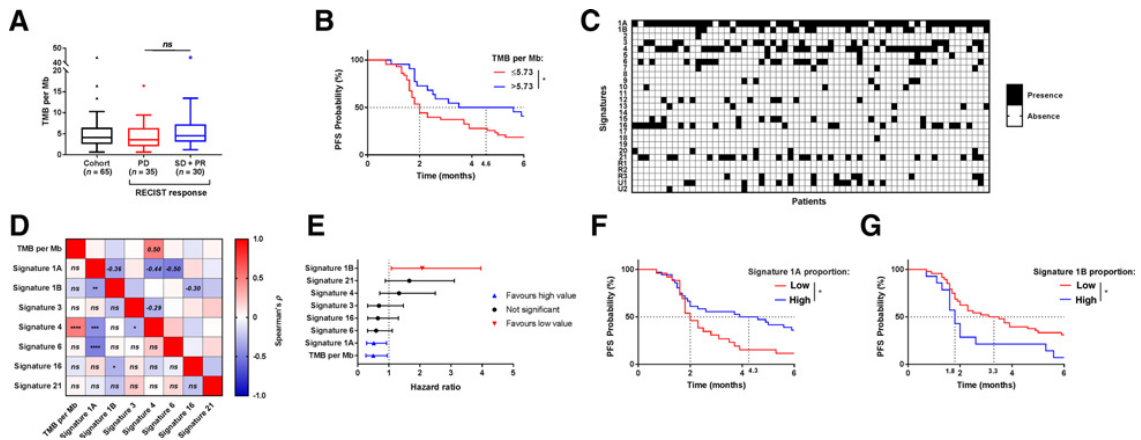


Figure 1.

Prognostic role of tumor burden and mutational signatures. **A**, Boxplots showing the distribution of the TMB per Mb for all patients (in black), patients with progression-disease RECIST response (PD; in red), and pooled patients with stable-disease and partial response (SD + PR; in blue). **B**, Kaplan-Meier estimates of PFS; patients were stratified according to their TMB per Mb: high rate (>5.73; in blue) or low rate (≤5.7; in red). **C**, Heatmap showing the presence/absence of mutational signatures (Alexandrov and colleagues 2013) for each patient. Presence of a mutational signature is represented with a black square, and a white square represents absence of the signature. **D**, Spearman's rank correlation matrix between TMB per Mb and mutational signature proportions. Lower triangular matrix: *P*-values of corresponding correlation test. Upper triangular matrix: Spearman's rank correlation coefficients for significant tests. **E**, Forest plot of the hazard ratios and corresponding 95% confidence intervals estimated from corresponding univariate Cox models: variables significantly associated with a good PFS are displayed in blue, poor PFS variables are in red, and nonsignificant variables are in black. **F–G**, Kaplan-Meier estimates for PFS; patients were stratified according to their proportions of signatures 1A (**F**) and 1B (**G**): low proportion (in red) and high proportion (in blue). All cutoffs were defined with the Cutoff Finder method. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001; ****, *P* < 0.0001; ns, not significant.

11.9 months vs. 22.9 months; log-rank test *P* = 0.01; *n* = 63). A high number of large LOH and CNA polyclonality approached significance (LOH: median 10.2 months vs. 21.6 months; log-rank test *P* = 0.053; CNA clonality: median 13.7 months vs. 23 months; log-rank test *P* = 0.051; *n* = 63; Supplementary Fig. S5C–S5F).

Together, these data support the hypothesis that a high level of chromosomal instability is associated with poor outcome with nivolumab treatment.

Alterations of genetic pathways and outcome

We studied the prognostic role of the top mutated genes in this cohort. We selected 320 genes that were mutated in more than 10% of the cohort. Cox univariate models indicated that 13 mutated genes were associated with better PFS, whereas eight mutated genes were associated with reduced PFS (data not shown). However, after FDR correction for multtesting, no mutated genes were significantly associated with PFS (data not shown).

To investigate further, we studied the implications of mutations linked to genetic pathways classically activated in lung cancer or previously involved in immunosubversion or resistance to checkpoints in other diseases (23, 24). We focused on the MAPK, PI3K/AKT, and WNT pathways. The genes involved in these pathways are listed in Table S1. For the MAPK and PI3K/AKT pathways, only somatic mutations were studied. For the WNT pathway, we looked at both somatic and constitutional mutations because these germline alterations have been shown to impact tumor development. Twenty-six percent, 9% and 11% of patients had at least one deleterious mutation involved in the MAPK, PI3K/AKT, and WNT pathways, respectively (Supplementary Fig. S6A). Acti-

vating mutations in the MAPK and PI3K/AKT pathways were not associated with PFS (Supplementary Fig. S6B) or with OS (Supplementary Fig. S6C). Mutations in the WNT pathway were only associated with a poor OS (median 21.6 months vs. 6.8 months; log-rank test *P* = 0.045; *n* = 65; Fig. 2D and S6D).

We then addressed the presence of mutations in the DNA repair machinery. We looked at the frequency of mutations in homologous recombination (HR), mismatch repair (MMR), base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), and nonhomologous end joining (NHEJ) pathways at both the somatic and constitutional levels. We observed that germline mutations were more frequent than somatic mutations, and most mutations were in the HR pathway (Supplementary Fig. S6E). We observed a significant association between TMB per Mb and mutations in DNA repair machinery (for any DNA repair pathway; Wilcoxon rank-sum test *P* = 0.03; *n* = 65; Supplementary Fig. S6F). When looking at the association with prognosis, we first observed that somatic DNA repair machinery mutations were associated with a better PFS with Nivolumab therapy (median PFS: 5 months vs. 2 months; log-rank test *P* = 0.01; *n* = 65; Fig. 2E) but were not associated with OS (median OS: 16.7 months vs. 22.8 months; log-rank test *P* = 0.52; *n* = 65; Supplementary Fig. S6G). Because germline mutations in DNA repair pathways could impact tumor behaviour, we considered the presence of somatic and/or germline mutations in DNA repair pathways. Importantly, presence of at least one somatic or one constitutive mutation improved the ability of this variable to predict PFS (median PFS: 3.9 versus 1.9 months; log-rank test *P* = 0.004; *n* = 65) (Fig. 2F) but not to predict OS (median OS: 16.7 versus 22.8 months; log-rank test *P* = 0.23; *n* = 65) (Supplementary Fig. S6H). DNA repair genes are considered tumor suppressors, and it is presumed that a double

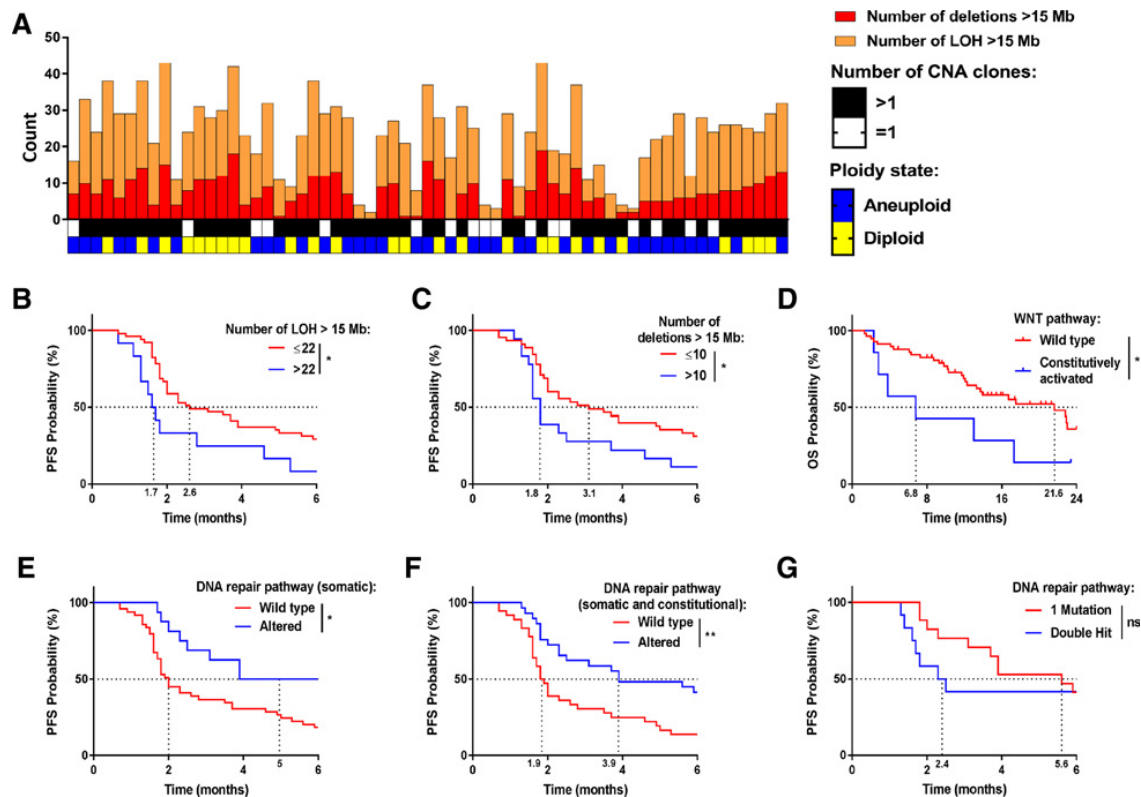


Figure 2.

Prognostic role of tumor chromosomal instability and mutations in oncogenic pathways. **A**, Top: Bar plot showing the number of large (>15 Mb) deletions (in red) and losses of heterozygosity (LOH; in orange) for each patient. Bottom: heat-map showing the number of CNA clones (one clone in white, more than one clone in black) and the tumor ploidy state (diploid in yellow and aneuploid in blue). **B** and **C**, Kaplan-Meier estimates of PFS; patients were stratified according to the number of large LOH (**B**) and the number of large deletions (**C**): high number (in blue) or low number (in red). **D**, Kaplan-Meier estimates for overall survival; patients were stratified according to the presence of mutations in the WNT pathway: wild-type (in red) and presence of activated mutations (in blue). **E** and **F**, Kaplan-Meier estimates for PFS; patients were stratified according to the presence of somatic mutations (**E**) and pooled somatic and constitutional mutations (**F**) in genes involved in the DNA repair pathway: wild-type (in red) and altered (in blue). **G**, Kaplan-Meier estimates for PFS; patients were stratified according to their DNA repair pathway state: single hit (only one mutation; in red) or double hit (in blue), which is at least two mutations or one mutation and one loss of heterozygosity. Only patients with at least one mutation in the DNA repair pathway were retained for this analysis. All cutoffs were defined with the Cutoff Finder method. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; ns, not significant.

hit (germline and somatic alterations or 2 somatic alterations, such as point mutation and loss of heterozygosity) is required for complete pathway inactivation. We observed no significant difference for PFS (Fig. 2G) or OS (Supplementary Fig. S6I) between the 17 patients with a single hit and the 12 patients with a double hit.

Altogether, our data indicate that mutation in WNT oncogenic pathway is associated with poor outcomes, while mutations in DNA repair machinery positively impact nivolumab efficacy.

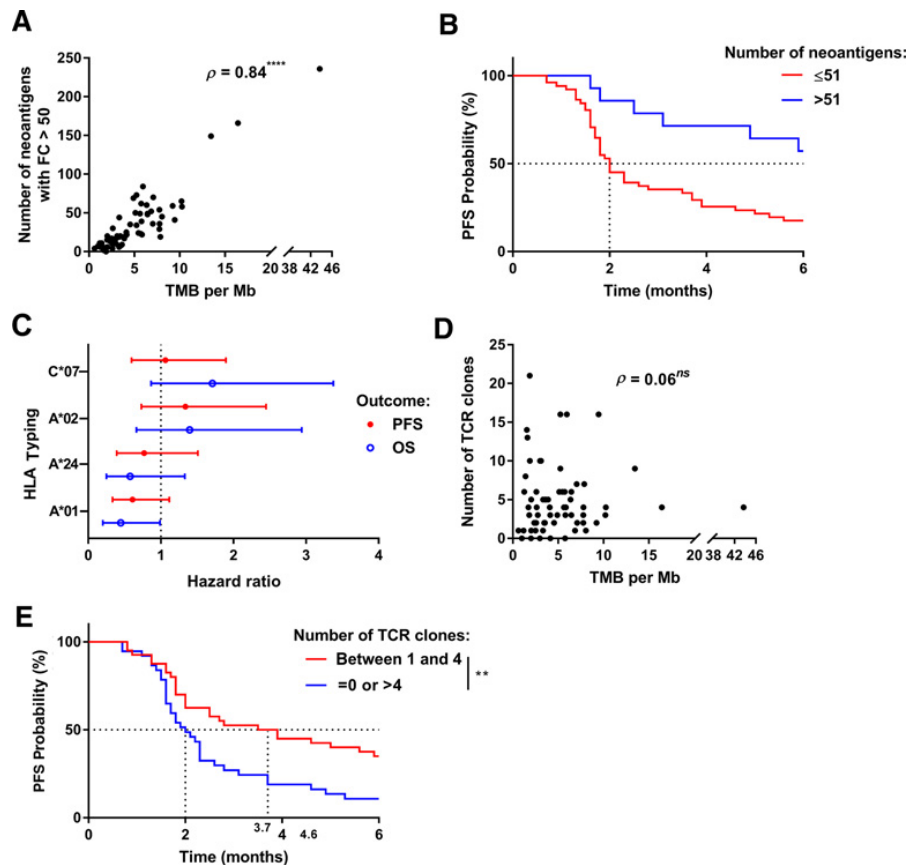
Association of exome immune parameters with outcome

Because the TMB per Mb is linked to PFS, we decided to examine the landscape of neoantigens using pVACseq software. We identified a median of 22 candidate neoepitopes per tumor (range, 0–236) and observed that the number of neoantigens per tumor was correlated with the tumor mutation burden per Mb (Spearman $\rho = 0.84$; $P < 0.0001$; $n = 65$; Fig. 3A). The absolute burden of candidate neoantigens was strongly associated with a

better PFS (median PFS: NR months vs. 2 months, log-rank test $P = 0.004$; $n = 65$; Fig. 3B) but was not associated with OS (median OS: 17.5 months vs. 17.3 months, log-rank test $P = 0.76$; $n = 65$; Supplementary Fig. S7A). Type I HLA phenotype was heterogeneous and sparse (Supplementary Fig. S7B) across patients. Only specific HLA alleles present in at least 25% of patients were further considered, namely, HLA-A*01, HLA-A*02, HLA-A*24, and HLA-C*07. Specific HLA alleles did not correlate with nivolumab efficacy, except HLA-A*01, which was associated with a better OS (Fig. 3C).

In our cohort, TCR clonality was studied using the MixCR software on somatic exome data. The median number of TCR clones detected was 4 (range 0–21). TCR clonality was not associated with TMB per Mb or the number of neoepitopes (Fig. 3D; Supplementary Fig. S7C). A restriction in the number of TCR clones was associated with a good PFS (median PFS: 2.8 vs. 2.1; log-rank test $P = 0.03$; $n = 77$). Using the biological rationale

Richard et al.

**Figure 3.**

Prognostic role of immune-related variables. **A**, Scatterplot showing the number of bioinformatically detected neopeptides for a given TMB per Mb. The ρ value represents Spearman's rank correlation. **B**, Kaplan–Meier estimates for PFS; patients were stratified according to their number of neopeptides: low rate (≤ 51 ; in red) or high rate (> 51 ; in blue). **C**, Forest plot of the hazard ratios and corresponding 95% confidence intervals estimated for HLA typing from univariate Cox models: considering PFS as outcome in red or OS in blue. **D**, Scatterplots showing the number of bioinformatically detected T-cell receptor (TCR) clones for a given TMB per Mb. The ρ value represents Spearman's rank correlation. **E**, Kaplan–Meier estimates for PFS; patients were stratified according to the number of TCR clones: between 1 and 4 clones (in red), or less than 1 or more than 4 (in blue). All cutoffs were defined with the Cutoff Finder method. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; ns, not significant.

that tumors with poor immunologic responses include tumors with no T-cell infiltration and tumors with polyclonal nonspecific T-cell infiltration, we decided to improve the biological classification by including patients having no TCR clone in the tumor with patients with a high number of TCR clones. We observed that clonal restriction in tumors was associated with a better PFS (median PFS: 2.0 vs. 3.7; log-rank test $P = 0.005$; $n = 77$; Fig. 3E) but not with OS (median OS: 13.3 vs. 21.6; log-rank test $P = 0.11$; $n = 77$; Supplementary Fig. S7D).

Together, these data indicate that a high number of neopeptides and a restricted number of TCR clones are associated with better outcome.

An exome composite variable is an efficient predictor of a good outcome.

Three multivariate Cox models—clinical, TMB, and exome-derived models—were adjusted with PFS as outcome by survival

analyses. One model included all clinical variables (sex, age, WHO performance status, histology, the tumor stage, and smoker state) and PD-L1 IHC expression (Sp142 antibody), one included all previous variables and the TMB per Mb as described in Rizvi and colleagues (14) and the last model included a selection of relevant variables among the 21 exome-derived variables. By using the LASSO algorithm, we selected the following nine variables: the DNA repair pathway status (altered vs. wild-type), the WNT pathway status (altered vs. wild-type), the number of TCR clones, the number of neoantigens, the HLA**A**1, and HLA**A**24 statuses, and the fractions of signatures 1A, 1B, and 6. ROC curves based on the linear predictors for each of the three models estimated on 44 patients for whom all exome-derived and clinical variables were available showed that the exome-derived model was more predictive than the others (clinical vs. exome-derived models AUC: 80.3 vs. 92.3; Z-test $P = 0.003$; TMB vs. exome-derived model AUC: 80.5 vs. 92.3; Z-test $P = 0.01$; $n = 60$; Fig. 4A).

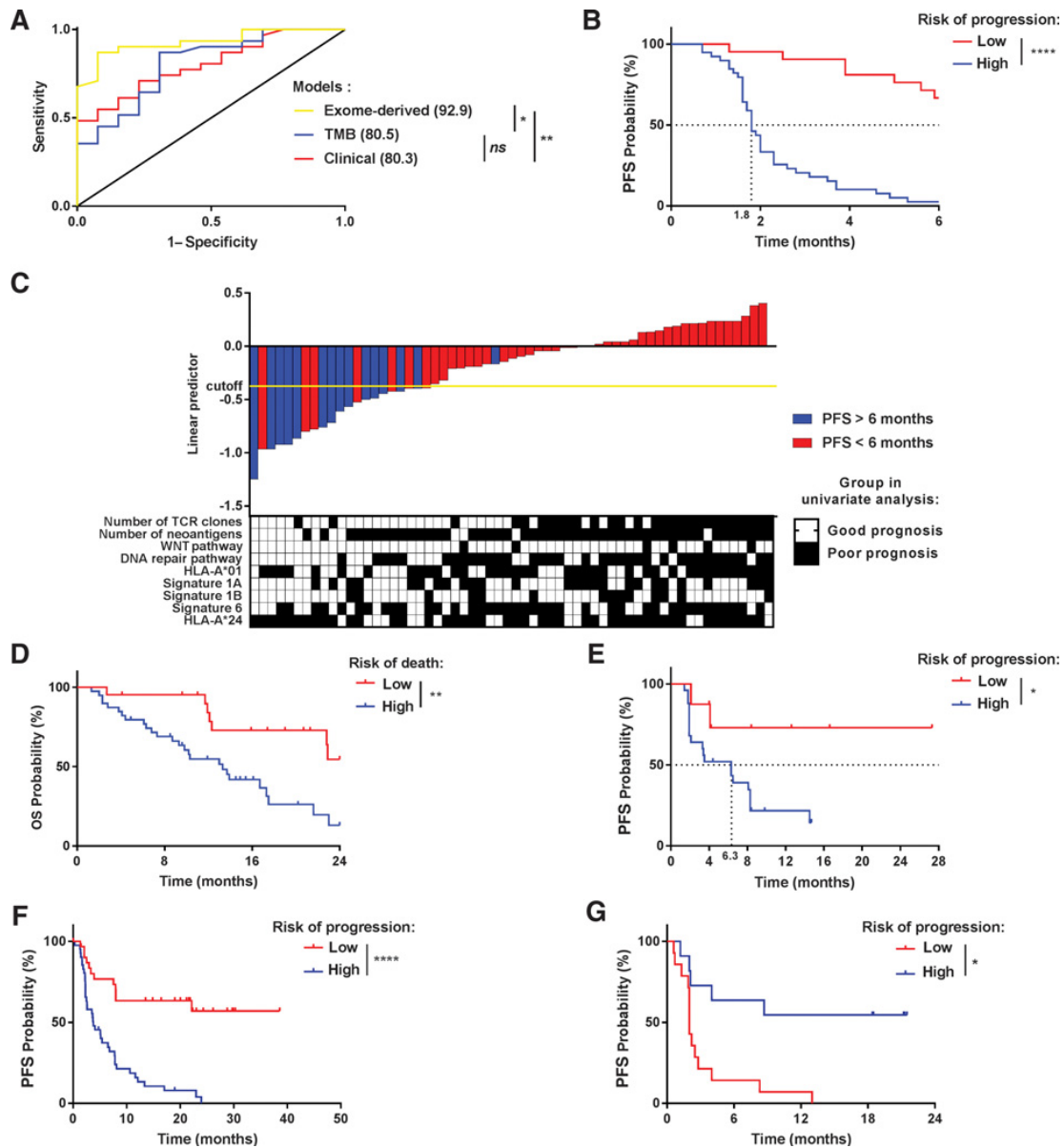


Figure 4.

Prognostic role of the composite exome biomarker. **A**, ROC curves estimated using the linear predictor of the clinical and PD-L1 Cox model (clinical; in red), the clinical and TMB model (in blue), and the exome-derived model (in yellow). For each model, the area under the curve is given in brackets. **B**, Kaplan-Meier estimates for PFS; patients were stratified according to the value of the linear predictor estimated from the exome-derived Cox model: high risk (in blue) or low risk (in red). **C**, Top: Barplot showing the values of the linear predictor estimated from the exome-derived model for each patient: patients with PFS greater than 6 months in blue and lower than 6 months in red. Bottom: Heatmap showing how patients are stratified given the threshold defined in the univariate analysis of each variable selected in the exome-derived model: good prognosis (white) and poor prognosis (black). **D**, Kaplan-Meier estimates for overall survival; patients were stratified according to the value of the linear predictor estimated from the exome-derived Cox model: high risk (in blue) or low risk (in red). **E**, Kaplan-Meier estimates for PFS; patients from the Rizvi and colleagues (2015) cohort were stratified according to the value of the linear predictor estimated from the exome-derived Cox model: high risk (in blue) or low risk (in red). **F** and **G**, Kaplan-Meier estimates for PFS; patients from **(F)** the Hellmann and colleagues (2018) cohort and **(G)** Snyder and colleagues (2017) cohort were stratified according to the value of the linear predictor estimated from the exome-derived Cox model: high risk (in blue) or low risk (in red). All cutoffs were defined with the Cutoff Finder method. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; ns, not significant.

Richard et al.

Using Cutoff Finder, a cutoff was chosen on the linear predictor built on all patients with the exome-derived model. This cutoff enables the discrimination of patients with high risk of progression from those with low risk of progression under nivolumab (median PFS: 1.8 vs. NR; log-rank test $P < 0.0001$; $n = 60$; Fig. 4B). Using 6-month PFS as a clinical relevant point, our biomarker classifies 14 of the 15 patients with PFS of more than 6 months as good responders, and only 7 of the 45 patients with PFS less than 6 months are misclassified (leading to a sensitivity of 97% and a positive predictive value of 84%). In the group designated as poor prognosis, we selected one patient with a PFS of more than 6 months and 38 patients with a PFS of less than 6 months (leading to a negative predictive value of 93% and a specificity of 66%; Fig. 4C). By applying the model adjusted on PFS without re-estimation of the coefficients and keeping the same cutoff, we successfully discriminated patients with good and poor OS (median OS: 13.3 vs. NR; log-rank test $P = 0.002$; $n = 60$; Fig. 4D).

Finally, we decided to validate our exome-based model on an external cohort. We used the dataset studied by Rizvi and colleagues (14), which contains 34 patients with lung cancer treated by pembrolizumab. From the 34 patients, 33 were used because the number of neoantigens could not be estimated using pVAC-Seq for one patient. Similarly to the previous cohort, alteration of DNA repair and WNT pathways, the number of infiltrated TCR clones, the number of neoantigens, HLA types, and mutational signatures were determined. On this external cohort treated with another anti-PD-1/PD-L1 interaction inhibitor, we used our nine-variables predictor signature as described above using the same parameters and threshold as for our training cohort. This signature was strongly associated with PFS and could discriminate patients with good and poor PFS (median PFS of 6.3 months vs. NR; log-rank test $P = 0.03$; $n = 33$; Fig. 4E).

To generalize our findings, we finally tested our model on two additional cohorts. We used previously published Hellmann's dataset (25) consisting in 75 patients with NSCLC treated in first-line by nivolumab plus ipilimumab, and the also previously published Snyder's dataset (26), which includes 25 urothelial cancer patients treated with atezolizumab. In both cohorts, a model was adjusted on PFS with the same variables as above. Only the number of TCR clusters was discarded because these data were not available in these cohorts. We showed that our signature model including the same variables had good performances to predict outcome (Supplementary Fig. S4F and S4G), thus generalizing our observations in urothelial cancer and in patients with NSCLC treated in first-line with anti-PD1 plus anti-CTLA4.

Discussion

Immune checkpoint blockade therapies such as anti-PD-1 and anti-PD-L1 mAb have revolutionized the treatment of lung cancer and other cancer types. However, only a fraction of patients benefit from these treatments as monotherapy, and robust predictors of response and understanding of the mechanisms of therapeutic resistance are currently lacking. In this study, we showed that in NSCLCs treated with nivolumab, exome analysis could be used to predict PFS. The information provided by exome analysis allowed a better prediction than clinical data, PD-L1 status, or TMB per Mb information. In addition to an elevated nonsynonymous TMB per Mb and neoantigen rates, which are usually associated with clinical efficacy, some other parameters were studied to better define prognosis. In particular, mutations in

DNA repair genetic pathways, TCR clonal restriction, HLA-A*01, the small number of large LOH and deletions, and mutational signatures 1A and 1B were significantly associated with clinical efficacy using univariate Cox models. Using adapted statistical models, we were able to generate a predictive biomarker that includes nine exome-derived variables. Interestingly, when we applied the same pipeline of analysis on another set of patients treated with pembrolizumab and sequenced on another platform using a different technology, we were able to externally validate our biomarker.

Previous studies in this field have analyzed the prognostic role of the most mutated genes to predict response to checkpoint inhibitors (15, 27). Using a similar strategy, we were unable to find any valid predictive biomarkers. Most likely, many mutations in different genes in the same pathway could share similar biological properties; because of the small number of patients in these genetic studies, candidate biomarkers may be selected only by chance. Analyzing mutations at the pathway level may be more relevant and may limit the problem of statistical multitesting.

Rizvi and colleagues also reported that a high fraction of copy number-altered genome is associated with a poor outcome (15). By the same analysis in our series, we also observed that genetic instability and polyclonality were associated with a poor prognosis, but these variables were not selected in the composite variable. Swanton's group reported in patients with lung cancer not treated with immunotherapy that genetic instability and polyclonality are associated with poor prognosis (28), thus suggesting that these genetic variations are more prognostic than they are predictive.

The association of a high nonsynonymous mutation burden per Mb and a high number of neoantigens with prognosis is not surprising and was previously reported by Rizvi and colleagues (14) and Carbone and colleagues (16) in the CheckMate 026 study. The high number of mutations is correlated with the presence of a high number of neoantigens that could be recognized by CD8 T cells and that favor antitumoral immunity. More interestingly, we observed that neoantigens had greater ability to predict PFS than TMB per Mb. Only the number of neoantigens was selected in the composite predictive biomarker; TMB was omitted. In addition, the clinical efficacy of nivolumab correlates with an accumulation of molecular signature 1A and a low accumulation of signature 1B. Both 1A and 1B signatures are characterized by the prominence of C>T substitutions at NpCpG trinucleotides. Because these two signatures are modestly and negatively correlated, it is not surprising that they have opposite clinical outcomes. Signature 4 is frequently observed in lung adenocarcinomas, squamous cell carcinomas, small cell carcinomas, head and neck squamous cell carcinomas, and liver cancers and is considered the smoking signature. Signature 4 is an imprint of the bulky DNA adducts generated by polycyclic hydrocarbons found in tobacco smoke and their removal by transcription-coupled NER (13). This signature 4 is modestly correlated with TMB. However, it is not associated with prognosis in our dataset. In contrast, we observed strong association between signature 4 and PFS in the data of Rizvi and colleagues (not shown). In our data set, 91% of patients were smokers, and thus the smoking signature is overrepresented, which limits the discrimination capacity of this signature.

Interestingly, using the MixCR software we could demonstrate the feasibility of detecting TCR clones in the tumor sample using

exome analysis with a coverage depth of 80× to 100×. Tumeah and colleagues (29) similarly reported in melanoma patients that clonal restriction tested using a dedicated assay (TCR immunoseq) was associated with a better outcome. These data suggest that a preexisting expansion of restricted TCR clones may characterize tumors with antigens recognized by T cells, whereas the presence of multiple clones may characterize tumors with an accumulation of nonspecific T cells with no antitumoral function. We decided to improve the biological classification by including patients with no TCR clones in the tumor with the patients with a high level number of TCR clones using the biological rationale that tumors with poor immunologic responses include tumors with no T-cell infiltration and tumors with polyclonal nonspecific T-cell infiltration. However, this hypothesis is not biologically addressed in the literature at present. The next step will be the characterization, in a tumor sample, of the types of peptides recognized by these clones. This approach could further confirm that these TCR clones recognize shared tumor antigens or neoantigens and confirm the association between TCR clonal restriction and their capacity for tumor antigen detection.

In a more clinically relevant manner, our study is the first to provide a multidimensional prospective analysis of somatic and constitutional exomes of patient treated with anti-PD1 antibody. Our study could generate a composite predictive biomarker of efficacy. This marker could help to identify patients who will have more than 6 month PFS with good sensitivity and specificity. It seemed to be more powerful for detecting patients who will not respond to immunotherapy than TMB or PD-L1 markers that are classically used. This predictive biomarker was also validated in an external cohort previously published by Rizvi and colleagues (14), for patients with lung cancer treated with pembrolizumab. We could also validate our findings in a cohort of NSCLC treated with nivolumab and ipilimumab (25) as well as some urothelial tumors treated with atezolizumab (26). These results suggest that our signature could be generalized to different types of immu-

notherapy targeting checkpoints, and suggest that it could be tested in other tumor types like urothelial cancer.

However, due to the retrospective design and the low number of patients, this biomarker needs to be validated in further data sets and prospective trials.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: C. Truntzer, R. Boidot, F. Ghiringhelli

Development of methodology: C. Richard, C. Truntzer, R. Boidot, F. Ghiringhelli

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): S. Chevrier, A. Lagrange, L. Favier, B. Coudert, L. Arnould, R. Boidot

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): C. Richard, V. Derangère, F. Ledys, C. Truntzer, R. Boidot, F. Ghiringhelli

Writing, review, and/or revision of the manuscript: C. Richard, J.-D. Fumet, L. Arnould, C. Truntzer, R. Boidot, F. Ghiringhelli

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): C. Richard, J.-D. Fumet, S. Chevrier, R. Boidot

Study supervision: F. Ghiringhelli, C. Truntzer

Acknowledgments

This work was funded by Georges François Leclerc Cancer Center, INCA (Institut National du Cancer) and Ligue nationale contre le cancer which finance C.R.'s thesis.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received June 18, 2018; revised July 31, 2018; accepted August 22, 2018; published first August 28, 2018.

References

- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87-108.
- Giroux Leprieur E, Dumenil C, Julie C, Giraud V, Dumoulin J, Labrune S, et al. Immunotherapy revolutionises non-small-cell lung cancer therapy: results, perspectives and new challenges. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2017;78:16-23.
- Califano R, Kerr K, Morgan RD, Lo Russo G, Garassino M, Morgillo F, et al. Immune checkpoint blockade: a new era for non-small cell lung cancer. *Curr Oncol Rep* 2016;18:59-63.
- Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015;373:1627-39.
- Herbst RS, Baas P, Kim D-W, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han J-Y, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2016;387:1540-50.
- Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2017;389:255-65.
- Lim SH, Sun J-M, Lee S-H, Ahn JS, Park K, Ahn M-J. Pembrolizumab for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2016; 16:397-406.
- Diggs LP, Hsueh EC. Utility of PD-L1 immunohistochemistry assays for predicting PD-1/PD-L1 inhibitor response. *Biomark Res* 2017;5:12-20.
- Grigg C, Rizvi NA. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction? *J Immunother Cancer* 2016;4:48-54.
- Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 2014; 20:5064-74.
- Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015;372:2018-28.
- Rizvi NA, Mazières J, Planchard D, Stinchcombe TE, Dy GK, Antonia SJ, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* 2015;16:257-65.
- Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanzet M, Vansteenkiste J, Mazieres J, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2016;387:1837-46.
- Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015;348:124-8.
- Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K, Chatila W, Jonsson P, Halpenny D, et al. Molecular determinants of response to anti-programmed cell death (PD)-1 and anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) blockade in patients with non-small-cell lung cancer profiled with targeted next-generation sequencing. *J Clin Oncol* 2018;36:633-41.

Richard et al.

16. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, Creelan B, Horn L, Steins M, et al. First-line nivolumab in stage IV or recurrent non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2017;376:2415–26.
17. Schwartz LH, Litière S, de Vries E, Ford R, Gwyther S, Mandrekar S, et al. RECIST 1.1-Update and clarification: from the RECIST committee. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2016;62:132–7.
18. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Györfy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, et al. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* 2012;7:e51862.
19. Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization paths for generalized linear models via coordinate descent. *J Stat Softw* 2010;33:1–22.
20. Kang L, Chen W, Petrick NA, Gallas BD. Comparing two correlated C indices with right-censored survival outcome: a one-shot nonparametric approach. *Stat Med* 2015;34:685–703.
21. Györfy B, Bottai G, Nagy A, Pusztai L, Santarpia L. Immune gene signatures in triple-negative breast cancers characterized by varying levels of chromosomal instability. *J Clin Oncol* 2017;35:1096–1096.
22. Angelova M, Charoentong P, Hackl H, Fischer ML, Snajder R, Krogsdam AM, et al. Characterization of the immunophenotypes and antigenomes of colorectal cancers reveals distinct tumor escape mechanisms and novel targets for immunotherapy. *Genome Biol* 2015;16:64–70.
23. Liu C, Peng W, Xu C, Lou Y, Zhang M, Wargo JA, et al. BRAF inhibition increases tumor infiltration by T cells and enhances the antitumor activity of adoptive immunotherapy in mice. *Clin Cancer Res* 2013;19:393–403.
24. Peng W, Chen JQ, Liu C, Malu S, Creasy C, Tetzlaff MT, et al. Loss of PTEN promotes resistance to T cell-mediated immunotherapy. *Cancer Discov* 2016;6:202–16.
25. Hellmann MD, Nathanson T, Rizvi H, Creelan BC, Sanchez-Vega F, Ahuja A, et al. Genomic features of response to combination immunotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Cell* 2018;33:843–852.e4.
26. Snyder A, Nathanson T, Funt SA, Ahuja A, Buros Novik J, Hellmann MD, et al. Contribution of systemic and somatic factors to clinical response and resistance to PD-L1 blockade in urothelial cancer: an exploratory multi-omic analysis. *PLoS Med* 2017;14:e1002309.
27. Miao D, Margolis CA, Gao W, Voss MH, Li W, Martini DJ, et al. Genomic correlates of response to immune checkpoint therapies in clear cell renal cell carcinoma. *Science* 2018;359:801–6.
28. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, Birkbak NJ, Watkins TBK, Veeriah S, et al. Tracking the evolution of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2017;376:2109–21.
29. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014;515:568–71.

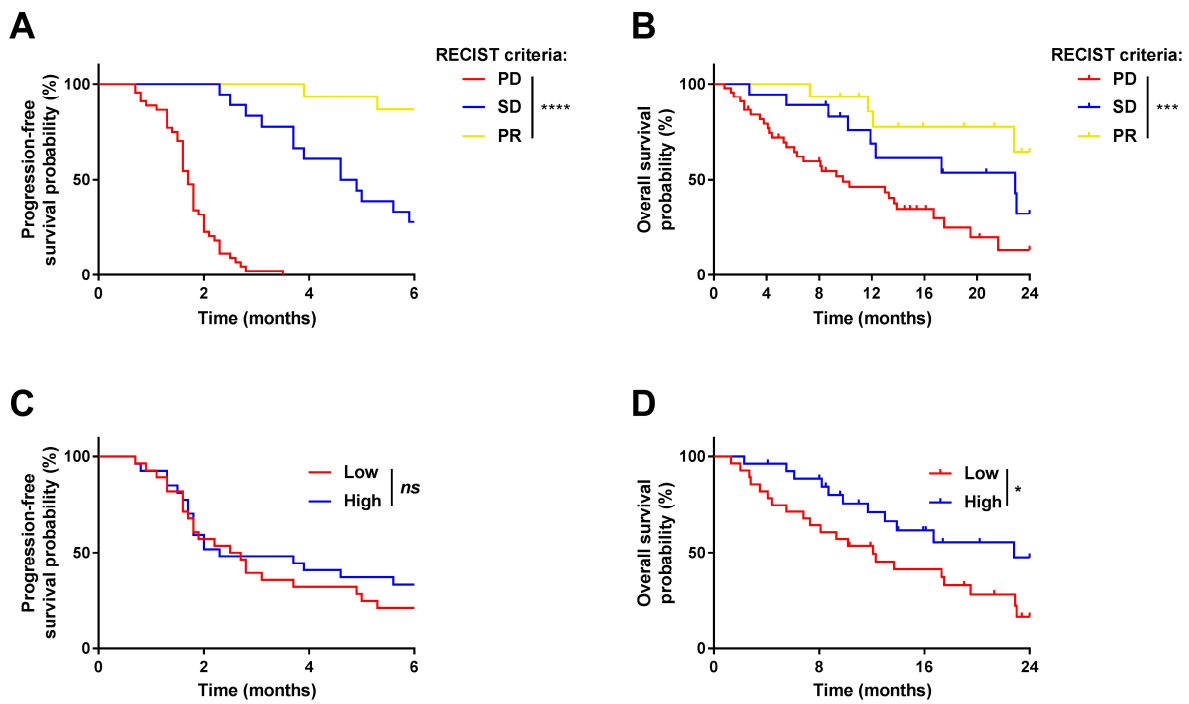


Figure S1: (A-B) Kaplan-Meier estimates for progression-free survival (A) and overall survival (B); patients were stratified according to their RECIST response: progression-disease (PD, in red), stable-disease (SD, in blue), and partial-response (PR, in yellow). **(C-D)** Kaplan-Meier estimates for progression-free survival (C) and overall survival (D); patients were stratified according to their PD-L1 expression: low expression (in red) or high expression (in blue). High and low expressions were determined according to POPLAR study. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns: not significant.

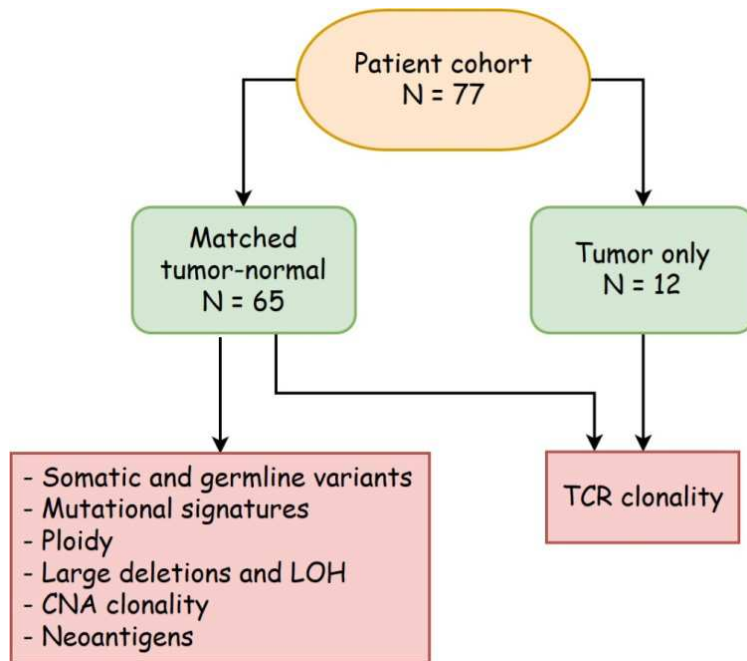


Figure S2. Flowchart of the exome analysis. The cohort is composed of 77 patients; 65 have matched tumour and normal exomes, and 12 have only a tumour exome. When matched exomes are available, single-nucleotide variants, polymorphisms, mutational signatures, ploidy, large loss of heterozygosity (LOH) and deletions, copy number alteration (CNA) clonality, neoantigens, and T-cell receptor (TCR) clonality were analysed. TRC clonality could also be estimated for patients with a tumour exome only.

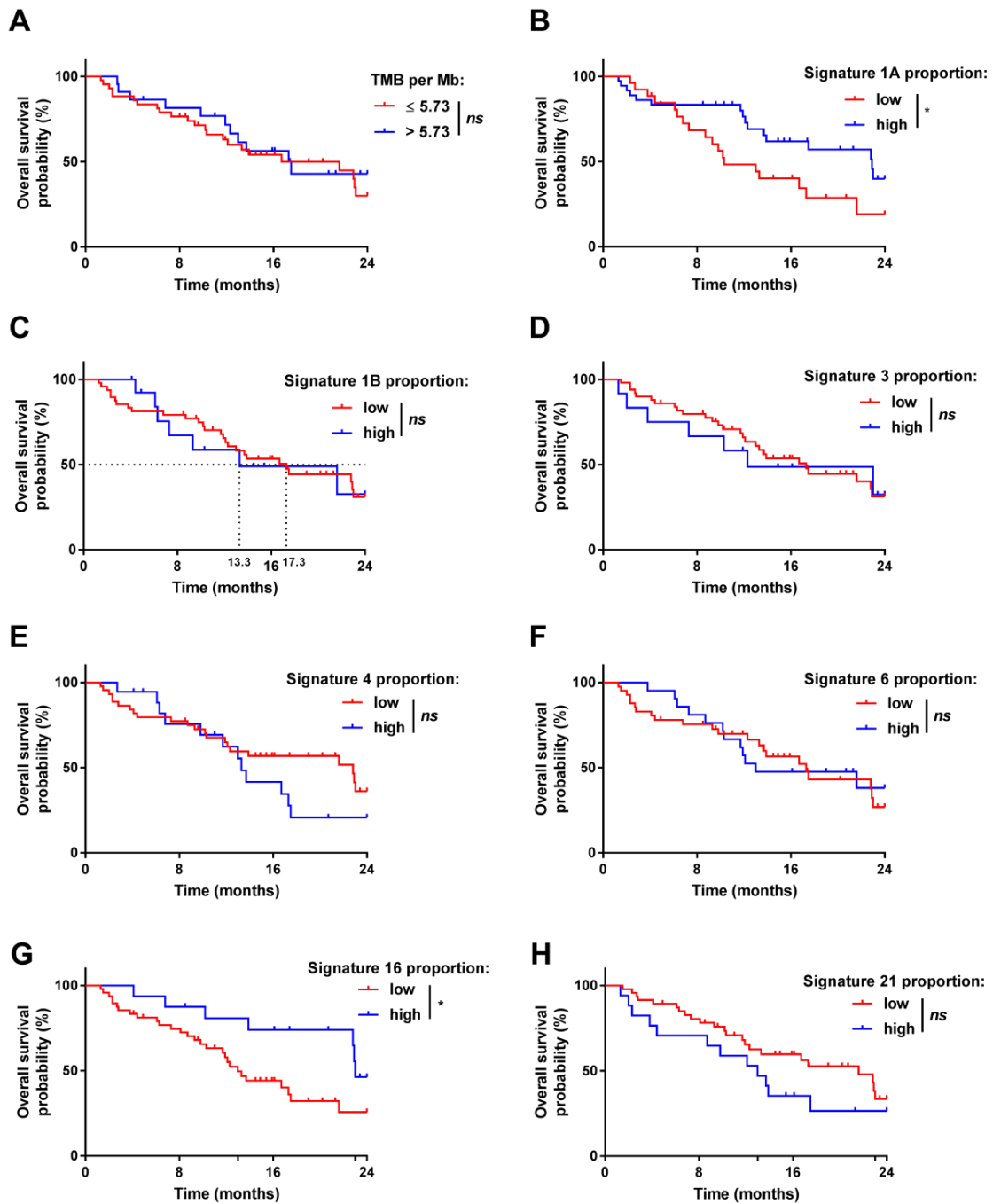


Figure S3. (A) Kaplan-Meier estimates for overall survival (OS); patients were stratified according to their tumor mutational burden (TMB) per Mb: low rate (in red) or high rate (in blue). (B-H) Kaplan-Meier estimates for OS; patients were stratified according to their proportion of signatures 1A (B), 1B (C), 3 (D), 4 (E), 6 (F), 16 (G), and 21 (H): low proportion (in red) or high proportion (in blue). The cutoffs were those defined for progression-free survival with the Cutoff Finder method. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns: not significant.

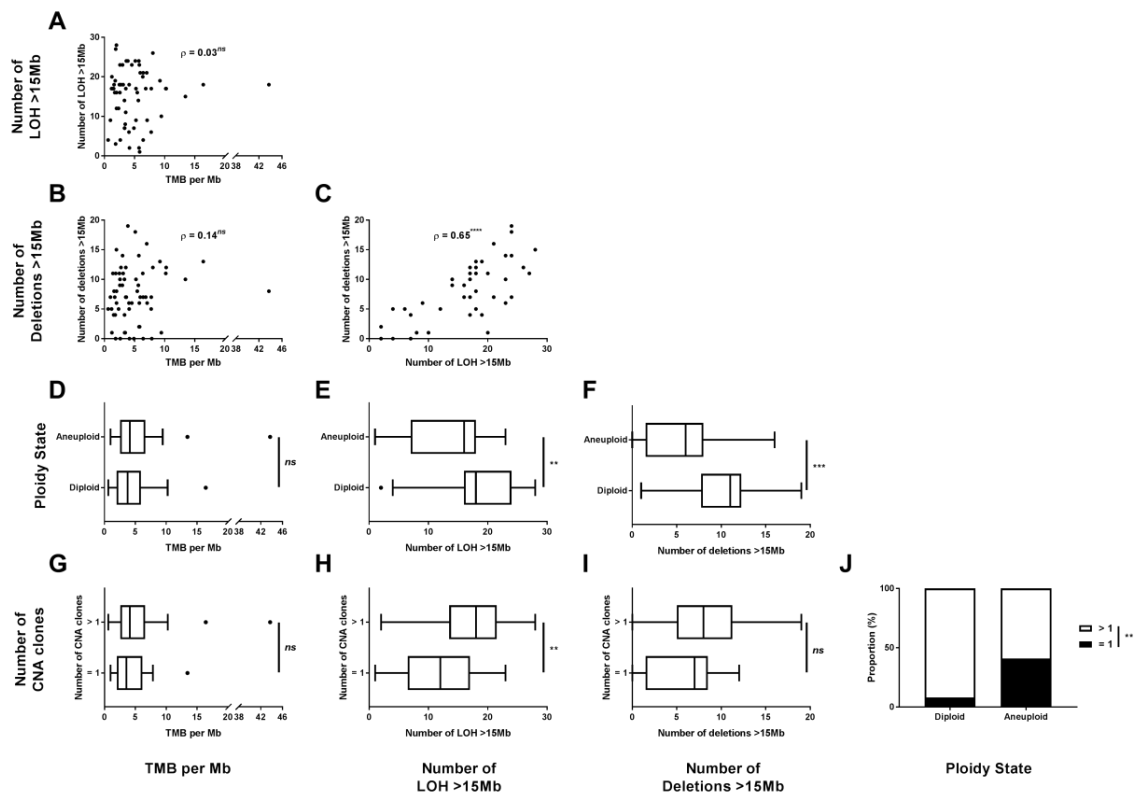


Figure S4. Association between variables reflecting chromosomal instability variables and tumor mutational burden (TMB) per Mb. (A-C) Scatterplots are displayed to represent the association between two quantitative variables (TMB per Mb and number of large deletions and losses of heterozygosity (LOH)). (D-I) Association between one quantitative variable and one qualitative variable (ploidy state and categorized copy number alteration (CNA) clones) are shown through boxplots, and (J) cumulative barplots are used to represent association between the two qualitative variables. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns : not significant.

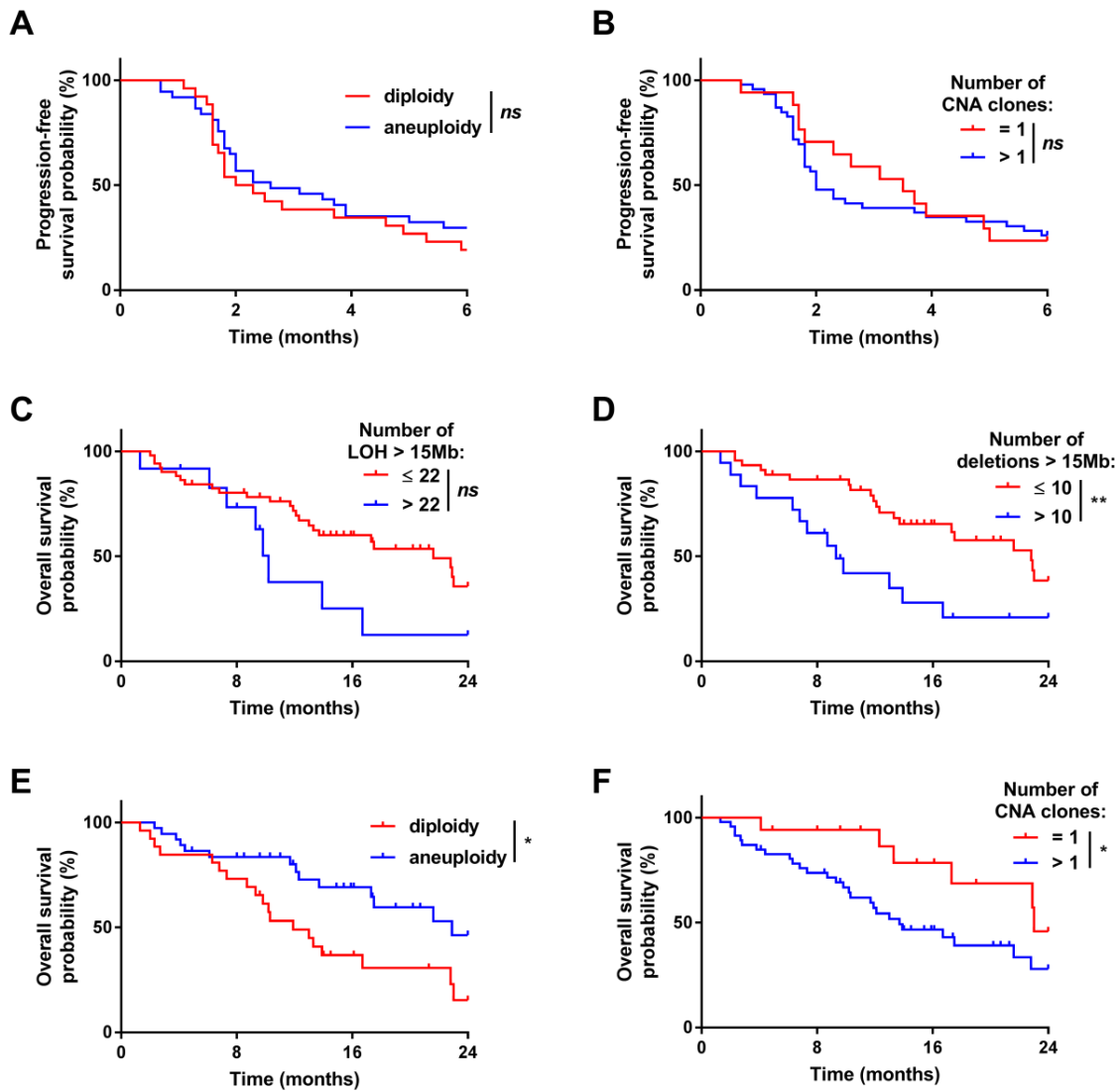


Figure S5. (A) Kaplan-Meier estimates for progression-free survival (PFS); patients were stratified according to the diploid (in red) or aneuploid (in blue) nature of their tumour. (B) Kaplan-Meier estimates for PFS according to the number of copy number alteration (CNA) clones: 1 clone (in red) or more than 1 (in blue). (C-D) Kaplan-Meier estimates for overall survival (OS); patients were stratified according to the number of large LOH (C) and the number of large deletions (D): high number (in blue) or low number (in red). (E) Kaplan-Meier estimates for OS; patients were stratified according to the diploid (in red) or aneuploid (in blue) nature of their tumour. (F) Kaplan-Meier estimates for OS according to the number of copy number alteration (CNA) clones: 1 clone (in red) or more than 1 (in blue). The cutoffs were those defined for PFS with the Cutoff Finder method. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns: not significant.

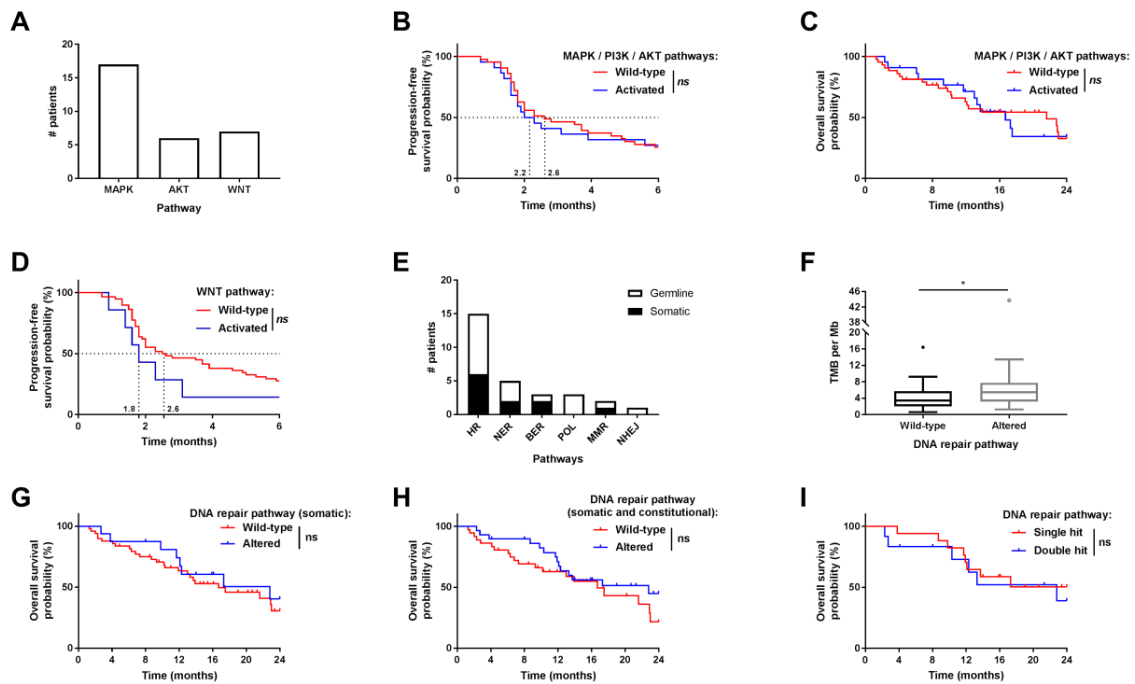


Figure S6. (A) Barplot showing the number of patients with at least one mutation in the MAPK, PI3K/AKT, or WNT pathways. (B-C) Kaplan-Meier estimates for progression-free survival (PFS) (B) and overall survival (OS) (C); patients were stratified according to the presence (activated; in blue) or absence (wild-type; in red) of somatic mutations in genes involved in the MAPK/PI3K/AKT pathways. (D) Kaplan-Meier estimates for PFS; patients were stratified according to the presence (activated; in blue) or absence (wild-type; in red) of mutations in genes involved in the WNT pathway. (E) Cumulative barplot showing the number of patients with mutations in the HR, NER, BER, POL, MMR, and NHEJ pathways: somatic mutations are in black, germline mutations are in white. (F) Boxplots representing the tumour mutational burden (TMB) per Mb for patients with altered genes involved in DNA repair pathways (altered; grey) or without altered genes in DNA repair pathways (wild-type; black), respectively. (G-H) Kaplan-Meier estimates for OS; patients were stratified according to the presence of somatic mutations (G) and pooled somatic and constitutional mutations (H) in genes involved in DNA repair pathways: wild-type (in red) and altered (in blue). (I) Kaplan-Meier estimates for OS; patients were stratified according to the DNA repair pathway state: single hit (only one mutation; in red) or double hit (in blue), which is at least two mutations or one mutation and one loss of heterozygosity. Only patients with at least one mutation in the DNA repair pathway were retained in this analysis. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns: not significant.

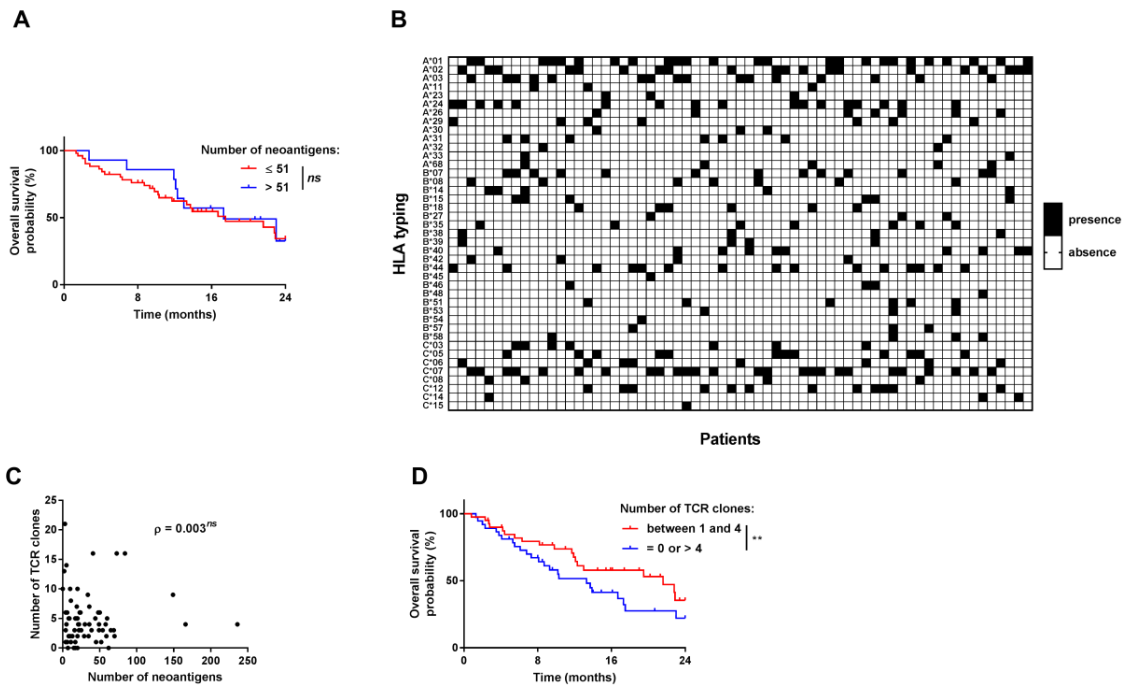


Figure S7. (A) Kaplan-Meier estimates for overall survival (OS); patients were stratified according to the number of neoantigens: low rate (≤ 51 ; in blue) or high rate (> 51 ; in red). **(B)** Heat-map showing for each patient the presence/absence of each of the type I HLA phenotypes. Presence of a type I HLA phenotype is represented with a black square, and a white square represents the absence of this phenotype. **(C)** Scatterplots showing the number of bioinformatically detected T-cell receptor (TCR) clones for a given number of neoantigens. The rho value represents Spearman's rank correlation. **(D)** Kaplan-Meier estimates for OS; patients were stratified according to the number of TCR clones: between 1 and 4 clones (in red) or less than 1 or more than

Supplementary methods

Immunohistochemical procedures

4 μ m thin tissue sections were obtained from formalin fixed paraffin embedded specimen. All IHC procedures were performed using Benchmark apparatus (Ventana) and diaminobenzidine (DAB) as chromogenic revelator. Once stained and permanently mounted, slides were scanned with Nanozoomer HT2.0 (Hamamatsu) at x20 magnification; two MD analyzed the corresponding scanned files in an independent manner. Scores were compared and when discrepancies occurred a third pathologist reviewed the slides and solved the results.

PD-L1 expression was evaluated with Sp142 clone (SpringBio, Ventana) based on scores determined by Poplar study. Briefly, scores were achieved as a percentage of tumor cells (TC) expressing PD-L1: TC3>50%, TC2 >5% and <50%, TC1>1% and <5%, TC0<1%; tumor infiltrating immune cells (IC) were also scored as a percentage of tumor area: IC3>10%, IC2>5% and <10%, IC1>1% and <5%, IC0<1%.

DNA isolation

DNA was isolated from archival tumor tissue using the Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA). DNA from whole blood (germline DNA) was isolated using the Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega) following the manufacturer's instructions. Quantity of extracted genomic DNA was assessed by a fluorimetric method with the Qubit device.

Whole exome capture and sequencing

Two hundred ng of genomic DNA were used for library preparation using the Agilent SureSelectXT reagent kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The totality of enriched library was used in the hybridization and captured with the SureSelect All Exon v5 (Agilent Technologies) baits. Following hybridization, the captured libraries were purified according to the manufacturer's recommendations and amplified by polymerase chain reaction (12 cycles). Normalized libraries were pooled and DNA was sequenced on an Illumina NextSeq500 device using 2 x 150-bp paired-end

reads and multiplexed. Tumor and germline DNA sequencing generated mean target coverages of 78X and 90X respectively, and a mean of more than 90% of the target sequence was covered with a read depth of at least 10X for somatic DNA.

Exome analysis pipeline

Raw DNA sequencing data were aligned to the hg19 genome build using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA) version 0.7.15. Duplicates were marked with Picard version 2.5.0. Base quality scores recalibration and variant calling were performed using GATK tools version 3.6.

For SNV (Single Nucleotide Variation), annotation was performed using the VariantStudio (V3) Illumina software. Filters of candidate variants included: coverage depth of 10X or greater and a variant nucleotide allelic fraction in tumor DNA greater than 5%.

Determination of tumor mutational burden per Mb

Whole exome sequencing data were used to generate tumor mutation burden per Mb for each patient. Tumor mutational burden (TMB) per Mb corresponds to the total number of missense and indel somatic-specific mutations divided by the number of megabases of the target sequences of the SureSelect All Exon v5 baits (≈ 50.6 Mb). Tumor mutations were identified from paired exomes by subtracting SNV observed in germline exome from SNV observed in the corresponding somatic exome. Then, SNV contributing to the tumor burden computation were filtered out according to the consequence of the mutation given by the VariantStudio Software: intron, non-coding exon, non-coding transcript and synonymous variant mutations were excluded.

HLA typing

HLA typing was performed using the HLAMiner software. HLAMiner allows the prediction of HLA class I and II alleles starting from the germline exome of each patient. This software is available at

<http://www.bcgsc.ca/platform/bioinfo/software/hlaminer>. Only HLA class I alleles were used for further analysis.

Tumor neoepitope determination

To identify tumor-specific mutant peptides, pVAC-Seq version 4.0.3 (personalized Variant Antigens by Cancer Sequencing) was used. This computational workflow compares and differentiates the epitopes found in normal cells against the neoepitopes specifically present in tumor cells to predict neoantigens.

pVAC-Seq is based on HLA typing obtained by HLAMiner (see above) and an annotated list of somatic variants for each patient; it is available at <https://github.com/griffithlab/pVAC-Seq>. To filter neoantigen candidates, only 8 and 9-mer peptides which bound to HLA class I with a best predicted binding score 50 times higher in normal than in tumor samples were kept for further analysis.

Determination of tumor ploidy, copy number alteration, clonality, large deletions and loss of heterogeneity

TITAN a python / R pipeline version 5.3, was used to infer the number of copy number alterations (CNA) subclones, the number of large deletions, as well as loss of heterogeneity (LOH) > 15Mb from whole-exome sequencing data. It was also used to estimate tumor ploidy. It is available at available at https://github.com/MO-BCCRC/titan_workflow.

Analysis of somatic mutational signatures

Analysis of mutational signatures was based on the 27 consensus mutational signatures identified in Alexandrov *et al.* across 30 cancer types. All these signatures are described in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). To identify mutational signatures in each tumor sample, we used the deconstructSigs, R library from Bioconductor. The objective is to determine how much of

each signature is present in a given sample so that the sum of the weighted combination of signatures most closely reconstructs the mutational profile. For each patient, signatures with a weight less than 0.06 were discarded.

Analysis of mutations in MAPK, AKT, WNT and DNA repair pathways

To analyze mutations in their pathway context, we first determined a list of genes involved in MAPK, AKT, WNT and DNA repair pathways using KEGG. Then, for MAPK and PI3K/AKT we only focused on somatic mutations because we hypothesized that only tumoral variation could influence the efficacy of the therapy (Table S1).

For DNA repair and WNT pathways, we analyzed somatic and constitutional mutations. In both cases, each mutation was manually reviewed by a molecular biologist and the mutation was retained only if described as pathogenic or likely pathogenic using ClinVar, ExPASy and dbSNP databases. If unknown, a mutation was retained if predicted deleterious using both Sift and Polyphen tools.

When a somatic or constitutional deleterious mutation in DNA repair genes was detected, LOH status was determined using TITAN to determine if there was a single or double hit inactivation.

Analysis of T-cell receptor clonality

Presence and quantitation of T-cell receptor (TCR) clones in exome data were determined using the MixCR software, available at <http://mixcr.milaboratory.com/>. Starting from somatic DNA sequencing data, MixCR aligns sequencing reads to reference V, D, J and C genes of T-cell receptors and assembles identical and homologous reads into clonotypes to provide TCR profiling. In the present analysis, clonotypes were assembled based on CDR3 sequence only.

DISCUSSION

Les immunothérapies α PD-1 ont montré une efficacité remarquable dans le traitement des CBNPC. Pourtant, seule une minorité de patients tire bénéfice de ces nouveaux traitements. L'estimation de l'expression tumorale de la protéine PD-L1 par marquage immunohistochimique a été le premier marqueur de réponse investigué et est actuellement le seul disponible pour sélectionner les patients à traiter. Ce marqueur est cependant sous optimal. En effet, il ne permet pas de prédire l'absence d'efficacité des traitements. Par conséquent, son utilisation comme biomarqueur de prédiction d'efficacité exclut certains patients qui pourraient tirer bénéfice de ce type de traitement. C'est pourquoi l'identification de nouveaux biomarqueurs de réponse ou de résistance reste à ce jour un enjeu majeur.

De récentes publications font état d'une induction de mort cellulaire immunogène dans le cas de traitement par thérapie cytotoxique (ZHONG *et al.* 2016; LUO *et al.* 2016; GARG *et al.* 2016). Ce processus promeut une phagocytose par les cellules de l'immunité innée, une présentation antigénique optimale et un recrutement de lymphocytes T cytotoxiques, favorisant une réponse immune antitumorale. Il a été montré que l'utilisation de cyclophosphamide et d'oxaliplatine de manière concomitante dans le traitement des CBNPC pouvait induire cette dynamique (PFIRSCHKE *et al.* 2016). Dans notre cohorte, les patients ont été traités par un doublet cytotoxique en première ou seconde ligne de traitement composé d'un sels de platine, cisplatine ou carboplatine, et d'une chimiothérapie, gemcitabine, pemetrexed ou taxane. Ces deux sels de platine ne sont pas considérés comme favorisant une mort cellulaire immunogène et il n'existe pas de données concernant leur utilisation en doublet cytotoxique (MARTINS *et al.* 2011; HATO *et al.* 2014). Concernant les chimiothérapies, il a été montré que la gemcitabine pouvait éliminer les cellules immunosuppressives MDSC et, de fait, pouvait contribuer à une bonne réponse à l'immunothérapie (VINCENT *et al.* 2010; BRUCHARD *et al.* 2013; AGLIETTA *et al.* 2014). Cependant, aucune donnée similaire n'existe pour les chimiothérapies pemetrexed et taxane.

Les résultats de notre analyse des traitements de première ligne de 115 CBNPC mettent en évidence qu'une bonne réponse clinique au doublet cytotoxique est associée à une meilleure efficacité du nivolumab en ligne ultérieure. En effet, les patients ayant vu une stabilisation ou une régression de la maladie sont 60% à avoir répondu au nivolumab, contre seulement 2 patients (8%) ayant rencontré une progression en première ligne de chimiothérapie. Cette constatation interroge sur la pertinence clinique de l'utilisation de traitements α PD-1 pour des patients n'ayant pas tiré bénéfice de la prise de chimiothérapie de première ligne. Cette corrélation entre la réponse au traitement de première intention et la réponse à l'immunothérapie de deuxième ligne n'avait jusqu'alors jamais été mise en évidence. Toutefois, celle-ci est similaire à la corrélation entre les réponses aux chimiothérapies cytotoxiques classiques de première et seconde intention (DI MAIO *et al.* 2010). Il est alors important de considérer que cette réponse à la chimiothérapie de première intention peut être un facteur pronostique de réponse au traitement ultérieur quel qu'en soit le type. Les types de sels de platine et de chimiothérapie associés, quant à eux, ne semblent pas influencer cette réponse. L'utilisation de la gemcitabine ne montre pas d'association statistiquement significative avec la survie ou la réponse clinique dans notre cohorte, contrairement aux résultats de précédentes études (VINCENT *et al.* 2010; BRUCHARD *et al.* 2013; AGLIETTA *et al.* 2014). Bien que non significative, la gemcitabine montre une tendance à être la chimiothérapie donnant le meilleur pronostic.

Une limitation notable à cette analyse concerne la ligne métastatique à laquelle les patients ont reçu le nivolumab. Notre cohorte est constituée de deux groupes de patients : les uns ayant reçu du nivolumab en deuxième ligne tandis que les autres l'ont reçu en troisième ligne. Certains patients ont donc pu recevoir deux chimiothérapies avant prise de nivolumab et seule la dernière a été prise en compte dans cette analyse, ce qui peut potentiellement avoir biaisé nos résultats. Cependant, nous avons pu observer qu'il n'y a pas de différence significative de survie ou de réponse clinique entre ces groupes de patients.

L'analyse des cellules immunitaires circulantes est une technique non-invasive pour le patient. Elle peut fournir une grande quantité d'informations permettant de connaître le profil immunologique d'un patient et de suivre son évolution. Peu de données existent sur le rôle pronostique de ces cellules immunitaires circulantes dans le cadre du traitement des CBNPC par immunothérapie. Dans le traitement du mélanome par α CTLA-4, un faible nombre de cellules immunosuppressives et un fort taux de cellules T régulatrices et cytotoxiques mesurés avant traitement ont été reliés à une bonne survie globale et sans progression (FERRUCCI *et al.* 2018; MARTENS *et al.* 2016). Des changements dans la répartition de ces différentes populations ont aussi pu être reliés au pronostic. Ainsi, une diminution du nombre de cellules T régulatrices et une augmentation du nombre de cellules T cytotoxiques sont associées à une bonne survie. Toujours pour le mélanome, une étude plus récente montre l'intérêt d'un immunophénotypage pour la détection de marqueurs de réponse au pembrolizumab (WEIDE *et al.* 2016). Il a donc semblé d'intérêt d'explorer l'impact du profil immunitaire des patients avant et au cours de la prise de nivolumab dans notre cohorte de CBNPC.

L'analyse des marqueurs sanguins circulants mesurés avant traitement souligne qu'aucun ne permet de prédire la survie ou la réponse aux α PD-1. La comparaison des profils immunitaires des patients et des volontaires sains met en évidence un taux plus important de cellules MDSC monocytaires (mMDSC) chez les CBNPC. Bien que le nombre de volontaires sains de notre étude soit faible, ces résultats concordent avec ceux de précédentes études (YAMAUCHI *et al.* 2018; HUANG *et al.* 2013; FENG *et al.* 2012). Ce taux important de cellules immunosuppressives pourrait témoigner de l'environnement immunosuppressif instauré par la tumeur.

Bien que l'étude du profil immunitaire avant prise de nivolumab ne permette pas de distinguer les répondeurs des non-répondeurs, son évolution au cours de la prise de traitement s'est révélée très informative. En effet, on observe une accumulation de cellules mMDSC et de cellules exprimant le point de contrôle inhibiteur TIM-3 chez des patients développant une résistance précoce au nivolumab. L'accumulation de mMDSC avait été décrite comme de mauvais pronostic dans le traitement des CBNPC par chimiothérapie (FENG *et al.* 2012) mais aucune donnée similaire n'existait dans le cadre d'un traitement par immunothérapie. Le rôle de l'accumulation de cellules exprimant TIM-3 n'avait pas non plus été décrit précédemment. L'augmentation du nombre de ces deux types de cellules peut aussi être observée au moment de la rechute de patients initialement répondeurs aux α PD-1. Ces résultats suggèrent que l'expression de TIM-3 par les lymphocytes T et le nombre de cellules mMDSC sont à la fois impliqués dans les mécanismes de résistances innée et acquise à l'immunothérapie. Il est important de souligner qu'aucune étude précédemment publiée n'avait évoqué le rôle de ces deux marqueurs dans la résistance acquise.

D'un point de vue biologique, ces résistances pourraient être expliquées par plusieurs mécanismes. D'une part, les cellules mMDSC participent à l'instauration d'un environnement immunosuppresseur aux abords de la tumeur. D'autre part, ces cellules expriment la protéine GAL-9, ligand récepteur de TIM-3. De fait, une augmentation conjointe de mMDSC et de cellules cytotoxiques exprimant TIM-3 peut diminuer drastiquement l'ampleur de la réponse antitumorale de ces dernières.

L'expérimentation *in vitro* a permis de montrer que l'introduction d'une thérapie α TIM-3 concomitante aux α PD-1 peut restaurer la capacité antitumorale des cellules T. Ces résultats suggèrent que l'expression de TIM-3 n'est pas seulement un marqueur de résistance mais qu'elle tient aussi un rôle mécanistique dans l'échappement de la maladie. De précédentes publications ont aussi démontré qu'une déplétion des mMDSC pouvait améliorer l'efficacité des α PD-1 dans plusieurs tumeurs chez la souris (ORILLION *et al.* 2017; S. H. KIM *et al.* 2017). Il semble alors d'intérêt d'expérimenter l'ajout d'un inhibiteur de TIM-3 et d'un traitement permettant la déplétion des mMDSC pour limiter les résistances innée et acquise chez les CBNPC sous α PD-1.

On peut souligner plusieurs limites à cette étude. La première concerne le *design* de l'analyse. Les échantillons sanguins ont été récoltés et analysés le jour de chaque prise de traitement afin de limiter l'impact du milieu et de la durée de conversation des cellules. Cependant, cette procédure a pu engendrer d'autres facteurs de confusion tels que des variations dans la calibration du cytomètre ou des changements dans la pré-analyse des données par les différents biologistes. La seconde limitation concerne la méthode employée pour le pré-traitement des données et le phénotypage des cellules. Ces deux étapes de l'analyse ont été réalisées manuellement par un biologiste et auraient pu être automatisées à l'aide d'algorithmes dédiés afin de limiter les biais d'analyse (HAHNE *et al.* 2009; FLETEZ-BRANT *et al.* 2016).

La première partie de l'étude des expressions tumorales des protéines CD8 et PD-L1 a été consacrée à l'évaluation de leur potentiel comme marqueurs pronostiques dans les CBNPC. Avec deux cohortes et deux techniques différentes (séquençage de l'ARN et marquage IHC), nous avons montré que l'expression tumorale de CD8 était associée à un bon pronostic. Ces résultats viennent confirmer de précédentes études (TOKITO *et al.* 2016; DEVAUX *et al.* 2019). *A contrario*, l'expression de PD-L1 ne s'est pas révélée être un biomarqueur de pronostic valable même si une tendance à être de mauvais pronostic a été observée en RNA-seq, à l'instar d'autres études (Y. B. CHEN *et al.* 2012; MU *et al.* 2011). Par la suite, nous avons testé la co-expression de ces deux gènes et mis en évidence le mauvais pronostic des patients dont la tumeur exprime faiblement CD8 et fortement PD-L1, et ce, quelle que soit la technique de mesure employée. Le rôle pronostique de cette classification des tumeurs bronchiques formulée par Teng *et al.* n'avait jamais été investigué auparavant (TENG *et al.* 2015). D'un point de vue moléculaire, ce groupe est caractérisé par une sous-expression de gènes impliqués dans les voies de la réponse immunitaire et par une sur-expression de gènes favorisant l'agressivité des cellules tumorales. Ces premiers résultats soulignent l'intérêt de combiner ces deux paramètres pour discriminer les patients selon leur pronostic.

Dans la deuxième partie de cette analyse, c'est cette fois-ci le rôle prédictif de réponse au nivolumab de ces gènes et de leur co-expression qui a été étudié. D'une part, nous avons démontré que l'évaluation par IHC de la protéine CD8 seule était un marqueur puissant pour discriminer

les patients selon leur SSP sous nivolumab. Ce résultat vient confirmer le rôle de l'expression de CD8 dans la réponse aux immunothérapies de type inhibiteur de point de contrôle constaté dans le mélanome et le cancer colorectal (TUMEH *et al.* 2014; LE *et al.* 2015). L'étude de l'expression du PD-L1 par technique IHC n'a pas fourni d'informations supplémentaires. Par ailleurs, des expressions élevées de CD8 et PD-L1 mesurées à l'aide d'un séquençage de l'ARN sont prédictifs de la réponse au nivolumab. Cependant, l'association de la survie avec PD-L1 est moins significative que celle avec CD8. Ceci suggère qu'une estimation de l'expression de CD8 serait plus informative pour prédire le pronostic d'un patient sous nivolumab qu'une estimation de l'expression de PD-L1 seule, et ce, quelle que soit la technique utilisée pour la mesurer. De plus, la combinaison de ces deux expressions permet de surpasser l'efficacité de ces deux marqueurs considérés individuellement, que ce soit en IHC ou en RNA-seq. Nous avons ainsi pu mettre en évidence le bon pronostic des patients sous nivolumab dont la tumeur exprime fortement CD8 et PD-L1, quelle que soit la technique employée.

Nous pouvons aussi observer que cette signature bi-génique permet une aussi bonne prédiction du pronostic sous nivolumab que certaines signatures géniques plus complexes publiées précédemment. Cette signature a été validée sur deux cohortes externes, l'une composées de patients atteints de CBNPC traités en première ligne par pembrolizumab, l'autre comprenant des patients atteints de CBNPC, de mélanomes ou de cancers ORL traités par α PD-1 ou α PD-L1.

Ces données suggèrent que les lymphocytes T-CD8⁺ infiltrant la tumeur et l'expression de PD-L1 sont deux marqueurs dont l'estimation conjointe pourrait permettre une bonne estimation de l'efficacité des α PD-1 et des α PD-L1 dans le traitement de première ou de deuxième ligne de CBNPC et d'autres types de tumeurs. Nous pouvons aussi souligner que dans la majorité des cas, l'expression de PD-L1 mesurée en RNA-seq constituait un meilleur marqueur pronostique et prédictif que lorsqu'elle est mesurée par PD-L1. On peut donc supposer que l'estimation effectuée par séquençage de l'ARN permet de s'affranchir des limitations dues aux marquages IHC (diversité des anticorps, seuils de positivité, etc.).

Enfin, l'étude des séquençages des échantillons tumoraux et sains a mis en évidence plusieurs marqueurs de réponse au nivolumab. Ainsi, un grand nombre d'altérations du génome en nombre de copies est associé à une mauvaise survie sans progression sous nivolumab, à l'instar de résultats précédemment publiés pour le pembrolizumab (H. RIZVI *et al.* 2018). Toutefois, ce type d'instabilité génétique a aussi été rapporté comme étant associé à un mauvais pronostic dans le cas de CBNPC non traités par immunothérapie. Ces résultats suggèrent que ces variations génétiques constituent en premier lieu un marqueur pronostic de survie (JAMAL-HANJANI *et al.* 2017).

L'association entre une forte charge mutationnelle tumorale et un nombre élevé d'antigènes associés à la tumeur avec la survie sans progression sous anti-PD-1 a déjà été rapportée dans plusieurs études (N. A. RIZVI *et al.* 2015a; CARBONE *et al.* 2017). Cependant, nous avons observé que les néoantigènes avaient une plus grande capacité à prédire la survie sous nivolumab que la charge tumorale. La signature 4 considérée comme la signature du tabagisme, est légèrement corrélée avec le TMB. Toutefois, celle-ci n'est pas associée au pronostic dans notre cohorte. En revanche, nous avons pu observer une forte association entre la signature 4 et la survie sans progression dans les données de Rizvi *et al.* (non présentées). Le fait que 91% des patients de notre cohorte soient fumeurs limite la capacité à détecter l'impact potentiel de cette signature.

Par ailleurs, nous avons pu démontrer qu'un nombre restreint de clones TCR dans l'échantillon tumoral était associé à un bon pronostic. Ce résultat avait déjà été rapporté chez des patients atteints de mélanome à l'aide d'un séquençage du TCR (TUMEH *et al.* 2014). Ces données suggèrent qu'un nombre restreint de clones TCR peut caractériser les tumeurs avec des antigènes reconnus par les cellules cytotoxiques, tandis qu'une grande diversité de clones peut caractériser les tumeurs très immunoévasives et présentant une accumulation de cellules T non spécifiques sans fonction antitumorale. Nous avons décidé d'améliorer cette classification en regroupant les tumeurs sans infiltration TCR et celles infiltrées par un nombre élevé de clones. Cette décision est motivée par la considération que des tumeurs ayant une faible réponse immunologique incluent des tumeurs sans infiltration des lymphocytes T et des tumeurs avec infiltration non spécifique polyclonale des cellules T. Cette hypothèse n'avait jamais été abordée auparavant.

Dans un objectif plus clinique, nous avons généré un biomarqueur prédictif qui comprend neuf variables dérivées de cette analyse d'exome à l'aide d'un algorithme de *boosting*. Ce marqueur permet une identification des patients ayant une survie sans progression de plus de 6 mois avec une bonne sensibilité et spécificité. Il est aussi plus puissant pour détecter les patients qui ne répondent pas au nivolumab que les marqueurs TMB ou PD-L1 utilisés de façon classique. Ce biomarqueur prédictif a également été validé dans une cohorte externe précédemment publiée chez des patients atteints de CBNPC traités par pembrolizumab (N. A. RIZVI *et al.* 2015a). Nous avons également pu valider nos résultats dans une cohorte de CBNPC traités par le nivolumab et l'ipilimumab ainsi que dans certaines tumeurs urothéliales traitées par l'atezolizumab (HELLMANN *et al.* 2018b; SNYDER *et al.* 2017). Ces résultats suggèrent que notre signature pourrait être généralisée à différents types d'immunothérapie ciblant les points de contrôle de l'immunité et pourrait s'appliquer à d'autres types de tumeurs.

Dans ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence le rôle de marqueurs divers de l'efficacité du nivolumab dans notre cohorte de CBNPC. La réponse au nivolumab apparaît alors comme multi-paramétrique, et l'analyse conjointe de ces différents marqueurs biologiques et de leur relation permettrait certainement d'affiner encore plus la prédiction de l'efficacité de cette thérapie.

Ces résultats sont à pondérer au vu de deux limitations majeures des analyses ici présentées. D'une part, la constitution de notre cohorte ainsi que la collection et l'analyse de certains échantillons ont été effectuées de manière rétrospective. Ainsi, certains échantillons ont pu provenir de différentes localisations (tumeurs primaires contre métastases), être conservés dans des milieux différents (paraffine contre congélation pour des tissus p. ex.) pendant des durées variables, et analysés lors d'expériences différentes. Ceci implique de potentiels biais techniques et biologiques difficiles à contrôler. Bien que ces facteurs de confusions aient pu impacter certains de nos résultats, ceux-ci ont toujours rencontré une cohérence biologique, une validation sur cohorte externe ou confirmation à travers d'autres publications, traitements ou types de tumeurs. Par ailleurs, le faible nombre de patients de notre cohorte et la disparité dans la disponibilité de chaque matériel ont limité nos analyses des liens existants entre les différents profils biologiques d'un même patient et leur implication sur le pronostic.

*CONCLUSION ET
PERSPECTIVES*

Dans ce travail, nous nous sommes attachés à la recherche de marqueurs cliniques, immunologiques, génétiques et transcriptomiques permettant de prédire l'efficacité du traitement anti-PD-1 nivolumab en deuxième ou troisième ligne de traitement de CBNPC avancé. L'analyse de l'impact des thérapies de première ligne, des cellules immunitaires circulantes, de la génomique des tumeurs et de leur transcriptome sur une cohorte de 115 patients CBNPC a permis de mettre en évidence le rôle de divers marqueurs dans la réponse au nivolumab :

- L'étude du type de doublet cytotoxique employé en première ligne montre que la réponse au nivolumab n'est ni influencée par le type de sels de platine ni par la chimiothérapie associée. Cependant, une bonne réponse à ce traitement favorise une efficacité optimale du nivolumab en ligne ultérieure quelle que soit l'association de thérapies utilisée.
- L'analyse de l'évolution du profil immunitaire d'un patient permet de détecter une résistance primaire ou secondaire au nivolumab. En particulier, les augmentations du nombre de cellules immunosuppressives mMDSC et de l'expression de TIM-3 par les cellules cytotoxiques au cours du traitement sont témoins d'une acquisition de résistance à l'anti-PD-1 et d'un échappement de la maladie. Par ailleurs, le nombre de mMDSC est plus élevé chez les patients que chez les volontaires sains, témoignant de l'environnement immunosuppresseur mis en place par la maladie.
- L'estimation conjointe des expressions des protéines PD-L1 et CD8 constitue un marqueur prédictif majeur de réponse aux anti-PD-1 qu'elle soit mesurée en IHC ou en RNA-seq. Cependant, la capacité prédictive de cette signature bi-génique est meilleure que lorsque celle-ci est effectuée par RNA-seq. Elle surpasse aussi celle de PD-L1 ou de CD8 seuls, ainsi que celle d'autres signatures transcriptomiques précédemment établies et composées d'un nombre plus important de gènes.
- L'étude des exomes des échantillons tumoraux et sains de patients souligne l'importance d'une analyse extensive de l'exome avant la prise de nivolumab. Une considération conjointe de plusieurs facteurs tels que la charge mutationnelle, la diversité de clones du TCR infiltrant la tumeur, les anomalies des voies de réparation de l'ADN ainsi que certaines signatures mutationnelles, permet une prédiction d'efficacité du traitement bien supérieure à l'utilisation seule de l'expression de PD-L1 ou de la charge tumorale.

L'ensemble de ces résultats souligne la diversité des facteurs de réponse au nivolumab dans le traitement des CBNPC et la nécessité de ne pas se limiter à l'utilisation d'un seul marqueur ou d'une seule technologie. Une connaissance de l'efficacité de la première ligne métastatique, une surveillance de l'évolution du profil immunologie, une estimation de l'expression tumorale des protéines CD8 et PD-L1 ainsi qu'une évaluation étendue du profil génétique de la tumeur fournissent ensemble une vision éclairée pour estimer le bénéfice à la prise de nivolumab en seconde intention pour un patient atteint de CBNPC.

Il reste cependant un effort important de validation de ces biomarqueurs à effectuer. D'une part, ces marqueurs devraient être validés dans des modèles précliniques *in vivo* et dans des cohortes prospectives. Par ailleurs, le nombre important de variables génomiques testées implique que la sélection et la validation de ces marqueurs devrait être effectuée sur des cohortes beaucoup plus grandes.

La poursuite des efforts de recherche de biomarqueurs devrait être axée sur des domaines moins investigués jusqu'alors. Ainsi, des analyses approfondies en épigénomique³¹, en protéomique, en métabolomique³² et en métagénomique du microbiote intestinal³³ pourraient contribuer à caractériser pleinement la relation entre l'immunité du patient, la biologie tumorale et le microbiome dans la réponse aux inhibiteurs de PCI. Les résultats des premières études dans chacun de ces domaines sont très encourageants et offrent de nouvelles perspectives de mécanismes à cibler conjointement avec l'immunothérapie (ROUTY *et al.* 2018; ASCIERTO *et al.* 2019; C. H. JOHNSON *et al.* 2016).

D'un point de vue technologique, l'arrivée sur le marché de séquenceurs dits de « 3ème génération » annonce une nouvelle révolution. Ces nouveaux séquenceurs sont capables de générer de très longs *reads* sans avoir besoin d'amplifier le signal par une étape de génération de *clusters*. Dans le cadre de la recherche de biomarqueurs, ils pourraient faciliter de nombreuses analyses telles que les mutations en phase ou les variations de structure (SUZUKI *et al.* 2017; SAKAMOTO *et al.* 2019). En revanche, ces technologies nécessitent encore du temps de développement, notamment pour faire diminuer le taux d'erreur de séquençage à un niveau convenable (TYLER *et al.* 2018).

Concernant le développement de l'immunothérapie en oncologie thoracique, les principaux efforts de recherche se tournent désormais vers les combinaisons de thérapies à base d'anti-PD-1 en première ligne traitement. L'objectif est de passer outre les résistances primaire et secondaire et de faire intervenir ces thérapies plus tôt dans le traitement de la maladie. Plusieurs études sont en cours ; certaines s'intéressent aux associations avec un autre inhibiteur de PCI tandis que d'autres étudient les associations avec une chimiothérapie. Pour ces premières, l'utilisation d'une combinaison de durvalumab et de tremelimumab (NCT02453282) montre des résultats décevants comparée à une chimiothérapie standard seule. Cependant, les études associant le nivolumab et l'ipilimumab (CheckMate 227) ou l'epacadostat avec un anti-PD-1 (ECHO-202, ECHO-204) montrent une bonne tolérance et des taux de réponse impressionnants. Concernant les combinaisons avec des chimiothérapies, les doublets de platine associés à du nivolumab (CheckMate 012) ou à du pembrolizumab (KEYNOTE 189) montrent aussi des résultats d'efficacité supérieurs à ceux de chacune de ces thérapies utilisées individuellement. Toutefois, on peut déplorer un risque accru de toxicité à l'utilisation de ces dernières combinaisons. Bien que la majorité de ces études soit encore en cours et qu'un important travail de validation de biomarqueurs d'efficacité reste à effectuer, ces nouveaux protocoles de traitement représentent actuellement l'une des perspectives les plus prometteuses dans la recherche en oncologie thoracique.

31. Étude des mécanismes moléculaires capables de réguler l'expression des gènes sans en modifier la séquence nucléotidique.

32. Étude de l'ensemble des métabolites (sucres, acides aminés, acides gras, etc.) présents dans une cellule.

33. Étude de l'ensemble des micro-organismes de l'écosystème intestinal.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**, 248–249 (2010).
- Adzhubei, I., Jordan, D. M., Sunyaev, S. R., Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet* **Chapter 7**, Unit7.20 (2013).
- Aglietta, M., Barone, C., Sawyer, M. B., Moore, M. J., Miller, W. H., A phase I dose escalation trial of tremelimumab (CP-675,206) in combination with gemcitabine in chemotherapy-naive patients with metastatic pancreatic cancer. *Ann. Oncol.* **25**, 1750–1755 (2014).
- Aguirre-Ghiso, J. A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 834–846 (2007).
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* **114**, 1537–1544 (2009).
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A., Behjati, S., Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–421 (2013).
- Anagnostou, V., Smith, K. N., Forde, P. M., Niknafs, N., Bhattacharya, R., Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov* **7**, 264–276 (2017).
- Ardizzoni, A., Boni, L., Tiseo, M., Fossella, F. V., Schiller, J. H., Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer : an individual patient data meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 847–857 (2007).
- Asadzadeh, Z., Mohammadi, H., Safarzadeh, E., Hemmatzadeh, M., Mahdian-Shakib, A., The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cell. Immunol.* **322**, 15–25 (2017).
- Ascierto, P. A., Capone, M., Grimaldi, A. M., Mallardo, D., Simeone, E., Proteomic test for anti-PD-1 checkpoint blockade treatment of metastatic melanoma with and without BRAF mutations. *J Immunother Cancer* **7**, 91 (2019).
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Gene ontology : tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* **25**, 25–29 (2000).
- Ayers, M., Lunceford, J., Nebozhyn, M., Murphy, E., Loboda, A., IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J. Clin. Invest.* **127**, 2930–2940 (2017).
- Barbee, M. S., Oggunniyi, A., Horvat, T. Z., Dang, T. O., Current status and future directions of the immune checkpoint inhibitors ipilimumab, pembrolizumab, and nivolumab in oncology. *Ann Pharmacother* **49**, 907–937 (2015).
- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
- Barlesi, F., Mazieres, J., Merlio, J. P., Debieuvre, D., Mosser, J., 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* **387**, 1415–1426 (2016).

- Bell, R. B., Feng, Z., Bifulco, C. B., Leidner, R., Weinberg, A., in *Oral, Head and Neck Oncology and Reconstructive Surgery* Exported from <https://app.dimensions.ai> on 2019/05/04, 314–340 (2018). doi :10.1016/b978-0-323-26568-3.00015-4. <https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1091552511>.
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* **456**, 53–59 (2008).
- Binder-Foucard, F., Belot, A., Delafosse, P., Remontet, L., Woronoff, A. S., Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeur solides. *Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire* **122 p** (2013).
- Bischof, O., Dejean, A., Pineau, P., [A review of cellular senescence : friend or foe of tumorigenesis?] *Med Sci (Paris)* **25**, 153–160 (2009).
- Boffetta, P., Autier, P., Boniol, M., Boyle, P., Hill, C., An estimate of cancers attributable to occupational exposures in France. *J. Occup. Environ. Med.* **52**, 399–406 (2010).
- Bolotin, D. A., Poslavsky, S., Mitrophanov, I., Shugay, M., Mamedov, I. Z., MiXCR : software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat. Methods* **12**, 380–381 (2015).
- Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D. R., Steins, M., Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1627–1639 (2015).
- Bosetti, C., Boffetta, P., La Vecchia, C., Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers : a quantitative review to 2005. *Ann. Oncol.* **18**, 431–446 (2007).
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2455–2465 (2012).
- Brahmer, J., Reckamp, K. L., Baas, P., Crino, L., Eberhardt, W. E., Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 123–135 (2015).
- Brahmer, J., Horn, L., Jackman, D., Spigel, D., Antonia, S., Abstract CT077 : Five-year follow-up from the CA209-003 study of nivolumab in previously treated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) : Clinical characteristics of long-term survivors. *Cancer Research* **77**, CT077–CT077 (2017).
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Global cancer statistics 2018 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394–424 (2018).
- Bruchard, M., Mignot, G., Derangere, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat. Med.* **19**, 57–64 (2013).
- Buque, A., Bloy, N., Aranda, F., Castoldi, F., Eggermont, A., Trial Watch : Immunomodulatory monoclonal antibodies for oncological indications. *Oncoimmunology* **4**, e1008814 (2015).
- Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* **27**, 111–122 (2007).
- Campisi, J., Fagagna, F., Cellular senescence : when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 729–740 (2007).
- Capriotti, E., Calabrese, R., Casadio, R., Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics* **22**, 2729–2734 (2006).

- Carbognin, L., Pilotto, S., Milella, M., Vaccaro, V., Brunelli, M., Differential Activity of Nivolumab, Pembrolizumab and MPDL3280A according to the Tumor Expression of Programmed Death-Ligand-1 (PD-L1) : Sensitivity Analysis of Trials in Melanoma, Lung and Genitourinary Cancers. *PLoS ONE* **10**, e0130142 (2015).
- Carbone, D. P., Reck, M., Paz-Ares, L., Creelan, B., Horn, L., First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **376**, 2415–2426 (2017).
- Chen, D. S., Mellman, I., Oncology meets immunology : the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
- Chen, Y. B., Mu, C. Y., Huang, J. A., Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer : a 5-year-follow-up study. *Tumori* **98**, 751–755 (2012).
- Colonna, M. Epidémiologie du cancer du poumon en France : incidence, mortalité et survie (tendance et situation actuelle). *Revue des Maladies Respiratoires Actualités* **8**, 308–318 (2016).
- Cowppli-Bony, A., Uhry, Z., Remontet, L., Guizard, A. V., Voirin, N., Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine, 1989-2013. Partie 1 – Tumeurs solides. *Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire* **274 p** (2016).
- Curiel, T. J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* **9**, 562–567 (2003).
- Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194–198 (2003).
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350–354 (2006).
- De Monte, L., Reni, M., Tassi, E., Clavenna, D., Papa, I., Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* **208**, 469–478 (2011).
- DeKosky, B. J., Ippolito, G. C., Deschner, R. P., Lavinder, J. J., Wine, Y., High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire. *Nat. Biotechnol.* **31**, 166–169 (2013).
- Delva, F., Andujar, P., Lacourt, A., Brochard, P., Pairon, J. C., [Occupational risk factors for lung cancer]. *Rev Mal Respir* **33**, 444–459 (2016).
- Delva, F., Margery, J., Laurent, F., Petitprez, K., Pairon, J. C., Medical follow-up of workers exposed to lung carcinogens : French evidence-based and pragmatic recommendations. *BMC Public Health* **17**, 191 (2017).
- Di Maio, M., Lama, N., Morabito, A., Smit, E. F., Georgoulas, V., Clinical assessment of patients with advanced non-small-cell lung cancer eligible for second-line chemotherapy : a prognostic score from individual data of nine randomised trials. *Eur. J. Cancer* **46**, 735–743 (2010).
- Doll, R., Hill, A. B., Lung cancer and other causes of death in relation to smoking ; a second report on the mortality of British doctors. *Br Med J* **2**, 1071–1081 (1956).
- Doll, R., Peto, R., Boreham, J., Sutherland, I., Mortality in relation to smoking : 50 years' observations on male British doctors. *BMJ* **328**, 1519 (2004).
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis : a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* **8**, 793–800 (2002).
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., Schreiber, R. D., Cancer immunoediting : from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991–998 (2002).

- Dunn, G. P., Old, L. J., Schreiber, R. D., The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 329–360 (2004).
- Fehrenbacher, L., Spira, A., Ballinger, M., Kowanzetz, M., Vansteenkiste, J., Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR) : a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* **387**, 1837–1846 (2016).
- Feng, P. H., Lee, K. Y., Chang, Y. L., Chan, Y. F., Kuo, L. W., CD14(+)S100A9(+) monocytic myeloid-derived suppressor cells and their clinical relevance in non-small cell lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 1025–1036 (2012).
- Ferrucci, P. F., Ascierto, P. A., Pigozzo, J., Del Vecchio, M., Maio, M., Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio : prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. *Ann. Oncol.* **29**, 524 (2018).
- Fletez-Brant, K., ?pidlen, J., Brinkman, R. R., Roederer, M., Chattopadhyay, P. K., flowClean : Automated identification and removal of fluorescence anomalies in flow cytometry data. *Cytometry A* **89**, 461–471 (2016).
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **192**, 1027–1034 (2000).
- Gagne, A., Enlow, W., Pigeon, M. A., Orain, M., Turcotte, S., Comprehensive Assessment of PD-L1 Staining Heterogeneity in Pulmonary Adenocarcinomas Using Tissue Microarrays : Impact of the Architecture Pattern and the Number of Cores. *Am. J. Surg. Pathol.* **42**, 687–694 (2018).
- Galluzzi, L., Buque, A., Kepp, O., Zitvogel, L., Kroemer, G., Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 97–111 (2017).
- Gandini, S., Botteri, E., Iodice, S., Boniol, M., Lowenfels, A. B., Tobacco smoking and cancer : a meta-analysis. *Int. J. Cancer* **122**, 155–164 (2008).
- Garg, A. D., Romano, E., Rufo, N., Agostinis, P., Immunogenic versus tolerogenic phagocytosis during anticancer therapy : mechanisms and clinical translation. *Cell Death Differ.* **23**, 938–951 (2016).
- Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2018–2028 (2015).
- Gaumont-Leclerc, M. F., Ferbeyre, G., [Cytokines prevent tumors via a cell senescence mechanism]. *Med Sci (Paris)* **25**, 138–140 (2009).
- Germano, G., Lamba, S., Rospo, G., Barault, L., Magri, A., Inactivation of DNA repair triggers neoantigen generation and impairs tumour growth. *Nature* **552**, 116–120 (2017).
- Gettinger, S. N., Horn, L., Gandhi, L., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2004–2012 (2015).
- Gettinger, S. N., Shepherd, F. A., Antonia, S. J., Brahmer, J. R., Chow, L. Q. M., First-line nivolumab (anti-PD-1 ; BMS-936558, ONO-4538) monotherapy in advanced NSCLC : Safety, efficacy, and correlation of outcomes with PD-L1 status. *Journal of Clinical Oncology* **32**, 8024–8024 (2014).
- Gilham, C., Rake, C., Burdett, G., Nicholson, A. G., Davison, L., Pleural mesothelioma and lung cancer risks in relation to occupational history and asbestos lung burden. *Occup Environ Med* **73**, 290–299 (2016).
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., Spies, T., Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**, 734–738 (2002).
- Hackshaw, A. K., Law, M. R., Wald, N. J., The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* **315**, 980–988 (1997).

Hagemann, I. S., Cottrell, C. E., Lockwood, C. M., Design of targeted, capture-based, next generation sequencing tests for precision cancer therapy. *Cancer Genet* **206**, 420–431 (2013).

Hahne, F., LeMeur, N., Brinkman, R. R., Ellis, B., Haaland, P., flowCore : a Bioconductor package for high throughput flow cytometry. *BMC Bioinformatics* **10**, 106. ISSN : 1471-2105 (2009).

Hato, S. V., Khong, A., Vries, I. J., Lesterhuis, W. J., Molecular pathways : the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics. *Clin. Cancer Res.* **20**, 2831–2837 (2014).

Hayes, R. B. The carcinogenicity of metals in humans. *Cancer Causes Control* **8**, 371–385 (1997).

Hellmann, M. D., Callahan, M. K., Awad, M. M., Calvo, E., Ascierto, P. A., Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination with Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* **33**, 853–861 (2018).

Hellmann, M. D., Nathanson, T., Rizvi, H., Creelan, B. C., Sanchez-Vega, F., Genomic Features of Response to Combination Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* **33**, 843–852 (2018).

Herbst, R. S., Baas, P., Kim, D. W., Felip, E., Perez-Gracia, J. L., Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010) : a randomised controlled trial. *Lancet* **387**, 1540–1550 (2016).

Hodi, F. S., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Rutkowski, P., Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067) : 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **19**, 1480–1492 (2018).

Howie, B., Sherwood, A. M., Berkebile, A. D., Berka, J., Emerson, R. O., High-throughput pairing of T cell receptor α and β sequences. *Sci Transl Med* **7**, 301ra131 (2015).

Huang, A., Zhang, B., Wang, B., Zhang, F., Fan, K. X., 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.* **62**, 1439–1451 (2013).

Hundal, J., Carreno, B. M., Petti, A. A., Linette, G. P., Griffith, O. L., pVAC-Seq : A genome-guided in silico approach to identifying tumor neoantigens. *Genome Med* **8**, 11 (2016).

IARC, Tobacco Smoke. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Tobacco smoke and involuntary smoking* **83**, 51–1187 (2004).

Ilie, M., Long-Mira, E., Bence, C., Butori, C., Lassalle, S., 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.* **27**, 147–153 (2016).

Jager, E., Ringhoffer, M., Arand, M., Karbach, J., Jager, D., Cytolytic T cell reactivity against melanoma-associated differentiation antigens in peripheral blood of melanoma patients and healthy individuals. *Melanoma Res.* **6**, 419–425 (1996).

Jamal-Hanjani, M., Wilson, G. A., McGranahan, N., Birkbak, N. J., Watkins, T. B. K., Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **376**, 2109–2121 (2017).

Jéhannin-Ligier, K., Dantony, E., Bossard, N., Molinié, F., Defosse, G., Erojection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2017. Rapport technique. *Saint-Maurice : Santé publique France* **122 p** (2017).

Johansson, M., Denardo, D. G., Coussens, L. M., Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol. Rev.* **222**, 145–154 (2008).

Johnson, B. E., Janne, P. A., Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **65**, 7525–7529 (2005).

- Johnson, C. H., Spilker, M. E., Goetz, L., Peterson, S. N., Siuzdak, G., Metabolite and Microbiome Interplay in Cancer Immunotherapy. *Cancer Res.* **76**, 6146–6152 (2016).
- Johnson, D. H., Fehrenbacher, L., Novotny, W. F., Herbst, R. S., Nemunaitis, J. J., Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **22**, 2184–2191 (2004).
- Kanehisa, M., Goto, S., KEGG : kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30 (2000).
- Kaufmann, S. H. Immunology's foundation : the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat. Immunol.* **9**, 705–712 (2008).
- Kim, E. S., Kim, J. E., Patel, M. A., Mangraviti, A., Ruzevick, J., Immune Checkpoint Modulators : An Emerging Antiglioma Armamentarium. *J Immunol Res* **2016**, 4683607 (2016).
- Kim, S. H., Li, M., Trousil, S., Zhang, Y., Pasca di Magliano, M., Phenformin Inhibits Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances the Anti-Tumor Activity of PD-1 Blockade in Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 1740–1748 (2017).
- Kim, S. T., Cristescu, R., Bass, A. J., Kim, K. M., Odegaard, J. I., Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nat. Med.* **24**, 1449–1458 (2018).
- Kircher, M., Witten, D. M., Jain, P., O’Roak, B. J., Cooper, G. M., A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat. Genet.* **46**, 310–315 (2014).
- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* **450**, 903–907 (2007).
- Kuang, D. M., Zhao, Q., Peng, C., Xu, J., Zhang, J. P., Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J. Exp. Med.* **206**, 1327–1337 (2009).
- Kuilman, T., Peeper, D. S., Senescence-messaging secretome : SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 81–94 (2009).
- Le, D. T., Durham, J. N., Smith, K. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* **357**, 409–413 (2017).
- Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509–2520 (2015).
- Leuraud, K., Schnelzer, M., Tomasek, L., Hunter, N., Timarche, M., Radon, smoking and lung cancer risk : results of a joint analysis of three European case-control studies among uranium miners. *Radiat. Res.* **176**, 375–387 (2011).
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Comparison of next-generation sequencing systems. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 251364 (2012).
- Loomis, D., Huang, W., Chen, G., The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution : focus on China. *Chin J Cancer* **33**, 189–196 (2014).
- Lopez-Chavez, A., Young, T., Fages, S., Leon, L., Schiller, J. H., Bevacizumab maintenance in patients with advanced non-small-cell lung cancer, clinical patterns, and outcomes in the Eastern Cooperative Oncology Group 4599 Study : results of an exploratory analysis. *J Thorac Oncol* **7**, 1707–1712 (2012).
- Lowe, S. W., Cepero, E., Evan, G., Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307–315 (2004).

- Lubin, J. H. Radon and lung cancer risk : a joint analysis of 11 underground miners studies. *Washington, National Institutes of Health* (1994).
- Lundegaard, C., Lamberth, K., Harndahl, M., Buus, S., Lund, O., NetMHC-3.0 : accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic Acids Res.* **36**, W509–512 (2008).
- Luo, M., Fu, L., The effect of chemotherapy on programmed cell death 1/programmed cell death 1 ligand axis : some chemotherapeutical drugs may finally work through immune response. *Oncotarget* **7**, 29794–29803 (2016).
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2129–2139 (2004).
- Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., Oizumi, S., Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N. Engl. J. Med.* **362**, 2380–2388 (2010).
- Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., Boffetta, P., Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur. Respir. J.* **48**, 889–902 (2016).
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F., Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–444 (2008).
- Manuel, M., Tredan, O., Bachelot, T., Clapisson, G., Courtier, A., Lymphopenia combined with low TCR diversity (divpenia) predicts poor overall survival in metastatic breast cancer patients. *Oncimmunology* **1**, 432–440 (2012).
- Marino, P., Touzani, R., Perrier, L., Rouleau, E., Kossi, D. S., Correction : Cost of cancer diagnosis using next-generation sequencing targeted gene panels in routine practice : a nationwide French study. *Eur. J. Hum. Genet.* **26**, 1396–1397 (2018).
- Martens, A., Wistuba-Hamprecht, K., Geukes Foppen, M., Yuan, J., Postow, M. A., Baseline Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Clin. Cancer Res.* **22**, 2908–2918 (2016).
- Martins, I., Kepp, O., Schlemmer, F., Adjemian, S., Tailler, M., Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* **30**, 1147–1158 (2011).
- Mastaglio, S., Wong, E., Perera, T., Ripley, J., Blombery, P., Natural killer receptor ligand expression on acute myeloid leukemia impacts survival and relapse after chemotherapy. *Blood Adv* **2**, 335–346 (2018).
- Matos, T. R., Rie, M. A., Teunissen, M. B. M., Research Techniques Made Simple : High-Throughput Sequencing of the T-Cell Receptor. *J. Invest. Dermatol.* **137**, e131–e138 (2017).
- Matsushita, H., Vesely, M. D., Koboldt, D. C., Rickert, C. G., Uppaluri, R., Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* **482**, 400–404 (2012).
- Meldrum, C., Doyle, M. A., Tothill, R. W., Next-generation sequencing for cancer diagnostics : a practical perspective. *Clin Biochem Rev* **32**, 177–195 (2011).
- Metzker, M. L. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res.* **15**, 1767–1776 (2005).
- Miao, D., Margolis, C. A., Vokes, N. I., Liu, D., Taylor-Weiner, A., Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade in microsatellite-stable solid tumors. *Nat. Genet.* **50**, 1271–1281 (2018).
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., Smyth, M. J., New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* **27**, 16–25 (2014).
- Mok, T. S., Wu, Y. L., Thongprasert, S., Yang, C. H., Chu, D. T., Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* **361**, 947–957 (2009).

Mouw, K. W., Goldberg, M. S., Konstantinopoulos, P. A., D'Andrea, A. D., DNA Damage and Repair Biomarkers of Immunotherapy Response. *Cancer Discov* **7**, 675–693 (2017).

Mu, C. Y., Huang, J. A., Chen, Y., Chen, C., Zhang, X. G., High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med. Oncol.* **28**, 682–688 (2011).

Ng, P. C., Henikoff, S., SIFT : Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3812–3814 (2003).

Nirschl, C. J., Drake, C. G., Molecular pathways : coexpression of immune checkpoint molecules : signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4917–4924 (2013).

Health, U. D., Services. H., The Health Consequences of Smoking : 50 Years of Progress. A Report of the Surgeon General. *Atlanta, U.S Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health* (2014).

Olsson, A. C., Gustavsson, P., Kromhout, H., Peters, S., Vermeulen, R., Exposure to diesel motor exhaust and lung cancer risk in a pooled analysis from case-control studies in Europe and Canada. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 941–948 (2011).

Orillion, A., Hashimoto, A., Damayanti, N., Shen, L., Adelaiye-Ogala, R., Entinostat Neutralizes Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances the Antitumor Effect of PD-1 Inhibition in Murine Models of Lung and Renal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 5187–5201 (2017).

Ou, S. H., Ahn, J. S., De Petris, L., Govindan, R., Yang, J. C., Alectinib in Crizotinib-Refractory ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer : A Phase II Global Study. *J. Clin. Oncol.* **34**, 661–668 (2016).

Paez, J. G., Janne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., EGFR mutations in lung cancer : correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **304**, 1497–1500 (2004).

Paolillo, C., Londin, E., Fortina, P., Next generation sequencing in cancer : opportunities and challenges for precision cancer medicine. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **245**, 84–91 (2016).

Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).

Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9543–9553 (2005).

Pfirschke, C., Engblom, C., Rickelt, S., Cortez-Retamozo, V., Garris, C., Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy. *Immunity* **44**, 343–354 (2016).

Postow, M. A., Manuel, M., Wong, P., Yuan, J., Dong, Z., Peripheral T cell receptor diversity is associated with clinical outcomes following ipilimumab treatment in metastatic melanoma. *J Immunother Cancer* **3**, 23 (2015).

Pujol, J. L., Barlesi, F., Daures, J. P., Should chemotherapy combinations for advanced non-small cell lung cancer be platinum-based? A meta-analysis of phase III randomized trials. *Lung Cancer* **51**, 335–345 (2006).

Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z. J., Beelen, R., Samoli, E., Stafoggia, M., Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts : prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* **14**, 813–822 (2013).

Radoja, S., Rao, T. D., Hillman, D., Frey, A. B., Mice bearing late-stage tumors have normal functional systemic T cell responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.* **164**, 2619–2628 (2000).

Rancoule, C., Vallard, A., Guy, J. B., Espenel, S., Sauvaigo, S., [Impairment of DNA damage response and cancer]. *Bull Cancer* **104**, 962–970 (2017).

Reck, M., Rodriguez-Abreu, D., Robinson, A. G., Hui, R., Cs ?sz, T., Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1823–1833 (2016).

Reck, M., Pawel, J., Zatloukal, P., Ramlau, R., Gorbounova, V., Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer : AVAIL. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1227–1234 (2009).

Riaz, N., Havel, J. J., Makarov, V., Desrichard, A., Urba, W. J., Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell* **171**, 934–949 (2017).

Ribas, A. Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2517–2519 (2012).

Rizvi, H., Sanchez-Vega, F., La, K., Chatila, W., Jonsson, P., Molecular Determinants of Response to Anti-Programmed Cell Death (PD)-1 and Anti-Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Profiled With Targeted Next-Generation Sequencing. *J. Clin. Oncol.* **36**, 633–641 (2018).

Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348**, 124–128 (2015).

Rizvi, N. A., Mazieres, J., Planchard, D., Stinchcombe, T. E., Dy, G. K., Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063) : a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol.* **16**, 257–265 (2015).

Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC) : a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **13**, 239–246 (2012).

Rosenthal, R., McGranahan, N., Herrero, J., Taylor, B. S., Swanton, C., DeconstructSigs : delineating mutational processes in single tumors distinguishes DNA repair deficiencies and patterns of carcinoma evolution. *Genome Biol.* **17**, 31 (2016).

Rota, M., Bosetti, C., Boccia, S., Boffetta, P., La Vecchia, C., Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons and respiratory and urinary tract cancers : an updated systematic review and a meta-analysis to 2014. *Arch. Toxicol.* **88**, 1479–1490 (2014).

Routy, B., Le Chatelier, E., Derosa, L., Duong, C. P. M., Alou, M. T., Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* **359**, 91–97 (2018).

Roychowdhury, S., Chinnaiyan, A. M., Translating genomics for precision cancer medicine. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **15**, 395–415 (2014).

Rudd, C. E., Taylor, A., Schneider, H., CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol. Rev.* **229**, 12–26 (2009).

Sakamoto, Y., Xu, L., Seki, M., Yokoyama, T. T., Kasahara, M., Long read sequencing reveals a novel class of structural aberrations in cancers : identification and characterization of cancerous local amplifications. *bioRxiv*. doi :10.1101/620047. eprint : <https://www.biorxiv.org/content/early/2019/04/29/620047.full.pdf>. <https://www.biorxiv.org/content/early/2019/04/29/620047> (2019).

Samstein, R. M., Lee, C. H., Shoushtari, A. N., Hellmann, M. D., Shen, R., Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat. Genet.* **51**, 202–206 (2019).

Schiller, J. H., Harrington, D., Belani, C. P., Langer, C., Sandler, A., Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **346**, 92–98 (2002).

Schreiber, R. D., Old, L. J., Smyth, M. J., Cancer immunoediting : integrating immunity’s roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).

Schumacher, T. N., Schreiber, R. D., Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348**, 69–74 (2015).

Schwartz, L. H., Litiere, S., Vries, E., Ford, R., Gwyther, S., RECIST 1.1-Update and clarification : From the RECIST committee. *Eur. J. Cancer* **62**, 132–137 (2016).

Seidler, A., Jahnichen, S., Hegewald, J., Fishta, A., Krug, O., Systematic review and quantification of respiratory cancer risk for occupational exposure to hexavalent chromium. *Int Arch Occup Environ Health* **86**, 943–955 (2013).

Sfanos, K. S., Bruno, T. C., Meeker, A. K., De Marzo, A. M., Isaacs, W. B., Human prostate-infiltrating CD8+ T lymphocytes are oligoclonal and PD-1+. *Prostate* **69**, 1694–1703 (2009).

Sharma, P., Allison, J. P., The future of immune checkpoint therapy. *Science* **348**, 56–61 (2015).

Shaw, A. T., Kim, D. W., Mehra, R., Tan, D. S., Felip, E., Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1189–1197 (2014).

Shaw, A. T., Kim, D. W., Nakagawa, K., Seto, T., Crino, L., Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **368**, 2385–2394 (2013).

Shaw, A. T., Yeap, B. Y., Solomon, B. J., Riely, G. J., Gainor, J., Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement : a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* **12**, 1004–1012 (2011).

Al-Shibli, K. I., Donnem, T., Al-Saad, S., Persson, M., Bremnes, R. M., Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 5220–5227 (2008).

Smart, A. C., Margolis, C. A., Pimentel, H., He, M. X., Miao, D., Intron retention is a source of neoepitopes in cancer. *Nat. Biotechnol.* **36**, 1056–1058 (2018).

Smyth, M. J., Dunn, G. P., Schreiber, R. D., Cancer immunosurveillance and immunoediting : the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* **90**, 1–50 (2006).

Snyder, A., Nathanson, T., Funt, S. A., Ahuja, A., Buros Novik, J., Contribution of systemic and somatic factors to clinical response and resistance to PD-L1 blockade in urothelial cancer : An exploratory multi-omic analysis. *PLoS Med.* **14**, e1002309 (2017).

Socinski, M. A., Jotte, R. M., Cappuzzo, F., Orlandi, F., Stroyakovskiy, D., Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **378**, 2288–2301 (2018).

Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **448**, 561–566 (2007).

Solomon, B. J., Mok, T., Kim, D. W., Wu, Y. L., Nakagawa, K., First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2167–2177 (2014).

Soria, J. C., Marabelle, A., Brahmer, J. R., Gettinger, S., Immune checkpoint modulation for non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 2256–2262 (2015).

Steinman, R. M. Decisions about dendritic cells : past, present, and future. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 1–22 (2012).

Sullivan, I., Planchard, D., ALK inhibitors in non-small cell lung cancer : the latest evidence and developments. *Ther Adv Med Oncol* **8**, 32–47 (2016).

Sun, C., Mezzadra, R., Schumacher, T. N., Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* **48**, 434–452 (2018).

Sunshine, J., Taube, J. M., PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* **23**, 32–38 (2015).

Suzuki, A., Suzuki, M., Mizushima-Sugano, J., Frith, M. C., Makalowski, W., Sequencing and phasing cancer mutations in lung cancers using a long-read portable sequencer. *DNA Res.* **24**, 585–596 (2017).

Sznol, M., Chen, L., Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1021–1034 (2013).

Tappeiner, E., Finotello, F., Charoentong, P., Mayer, C., Rieder, D., TIminer : NGS data mining pipeline for cancer immunology and immunotherapy. *Bioinformatics* **33**, 3140–3141 (2017).

Teng, M. W., Ngiow, S. F., Ribas, A., Smyth, M. J., Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* **75**, 2139–2145 (2015).

Teo, M. Y., Seier, K., Ostrovnaya, I., Regazzi, A. M., Kania, B. E., Alterations in DNA Damage Response and Repair Genes as Potential Marker of Clinical Benefit From PD-1/PD-L1 Blockade in Advanced Urothelial Cancers. *J. Clin. Oncol.* **36**, 1685–1694 (2018).

Tokito, T., Azuma, K., Kawahara, A., Ishii, H., Yamada, K., Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8+ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy. *Eur. J. Cancer* **55**, 7–14 (2016).

Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–2454 (2012).

Tredaniel, J., Boffetta, P., Saracci, R., Hirsch, A., Exposure to environmental tobacco smoke and risk of lung cancer : the epidemiological evidence. *Eur. Respir. J.* **7**, 1877–1888 (1994).

Tsoi, C. T., Tse, L. A., Professional drivers and lung cancer : a systematic review and meta-analysis. *Occup Environ Med* **69**, 831–836 (2012).

Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J., PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).

Turnbull, C. Introducing whole-genome sequencing into routine cancer care : the Genomics England 100 000 Genomes Project. *Ann. Oncol.* **29**, 784–787 (2018).

Tyler, A. D., Mataseje, L., Urfano, C. J., Schmidt, L., Antonation, K. S., Evaluation of Oxford Nanopore’s MinION Sequencing Device for Microbial Whole Genome Sequencing Applications. *Sci Rep* **8**, 10931 (2018).

Van der Auwera, G. A., Carneiro, M. O., Hartl, C., Poplin, R., Del Angel, G., From FastQ data to high confidence variant calls : the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics* **43**, 1–33 (2013).

Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* **70**, 3052–3061 (2010).

Wallden, B., Pekker, I., Popa, S., Dowidar, N., Sullivan, A., Development and analytical performance of a molecular diagnostic for anti-PD1 response on the nCounter Dx Analysis System. *Journal of Clinical Oncology* **34**, 3034–3034 (2016).

Wang, Q., Wu, X., Primary and acquired resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment. *Int. Immunopharmacol.* **46**, 210–219 (2017).

Wang, S., Jia, M., He, Z., Liu, X. S., APOBEC3B and APOBEC mutational signature as potential predictive markers for immunotherapy response in non-small cell lung cancer. *Oncogene* **37**, 3924–3936 (2018).

Weber, R., Fleming, V., Hu, X., Nagibin, V., Groth, C., Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol* **9**, 1310 (2018).

Weide, B., Martens, A., Hassel, J. C., Berking, C., Postow, M. A., Baseline Biomarkers for Outcome of Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab. *Clin. Cancer Res.* **22**, 5487–5496 (2016).

- Wraith, D., Mengersen, K., A Bayesian approach to assess interaction between known risk factors : the risk of lung cancer from exposure to asbestos and smoking. *Stat Methods Med Res* **17**, 171–189 (2008).
- Wu, Y. M., Cieřlik, M., Lonigro, R. J., Vats, P., Reimers, M. A., Inactivation of CDK12 Delineates a Distinct Immunogenic Class of Advanced Prostate Cancer. *Cell* **173**, 1770–1782 (2018).
- Yamauchi, Y., Safi, S., Blattner, C., Rathinasamy, A., Umansky, L., Circulating and Tumor Myeloid-derived Suppressor Cells in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **198**, 777–787 (2018).
- Yarchoan, M., Johnson, B. A., Lutz, E. R., Laheru, D. A., Jaffee, E. M., Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 209–222 (2017).
- Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., Karin, M., Autophagy, Inflammation, and Immunity : A Troika Governing Cancer and Its Treatment. *Cell* **166**, 288–298 (2016).
- Zitvogel, L., Tesniere, A., Kroemer, G., Cancer despite immunosurveillance : immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 715–727 (2006).
- Zou, W., Chen, L., Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 467–477 (2008).

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

Devaux, M., Gerard, L., **Richard, C.**, Bengrine-Lefevre, L., Vincent, J., Retrospective evaluation of FOLFIRI3 alone or in combination with bevacizumab or aflibercept in metastatic colorectal cancer. *World J Clin Oncol* **10**, 75–85 (2019).

Elkrief, A., El Raichani, L., **Richard, C.**, Messaoudene, M., Belkaid, W., Antibiotics are associated with decreased progression-free survival of advanced melanoma patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Oncoimmunology* **8**, e1568812 (2019).

Grapin, M., **Richard, C.**, Limagne, E., Boidot, R., Morgand, V., Optimized fractionated radiotherapy with anti-PD-L1 and anti-TIGIT : a promising new combination. *J Immunother Cancer* **7**, 160 (2019).

Limagne, E., **Richard, C.**, Thibaudin, M., Fumet, J. D., Truntzer, C., Tim-3/galectin-9 pathway and mMDSC control primary and secondary resistances to PD-1 blockade in lung cancer patients. *Oncoimmunology* **8**, e1564505 (2019).

Richard, C., Fumet, J. D., Chevrier, S., Derangere, V., Ledys, F., Exome Analysis Reveals Genomic Markers Associated with Better Efficacy of Nivolumab in Lung Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* **25**, 957–966 (2019).

Aarnink, A., **Richard, C.**, Truntzer, C., Vincent, J., Bengrine, L., Baseline splenic volume as a surrogate marker of FOLFIRINOX efficacy in advanced pancreatic carcinoma. *Oncotarget* **9**, 25617–25629 (2018).

Fumet, J. D., **Richard, C.**, Ledys, F., Klopfenstein, Q., Joubert, P., Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy. *Br. J. Cancer* **119**, 950–960 (2018).

Isambert, N., Hervieu, A., Rebe, C., Hennequin, A., Borg, C., Fluorouracil and bevacizumab plus anakinra for patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard therapies (IRAFU) : a single-arm phase 2 study. *Oncoimmunology* **7**, e1474319 (2018).

Richard, C., Niogret, J., Boidot, R., Ghiringhelli, F., EGFR amplification induces sensitivity to antiEGFR therapy in pancreatic acinar cell carcinoma. *World J Gastrointest Oncol* **10**, 103–107 (2018).

Humblin, E., Thibaudin, M., Chalmin, F., Derangere, V., Limagne, E., IRF8-dependent molecular complexes control the Th9 transcriptional program. *Nat Commun* **8**, 2085 (2017).

Kaderbhai, C. G., **Richard, C.**, Fumet, J. D., Aarnink, A., Ortiz-Cuaran, S., Response to first line chemotherapy regimen is associated with efficacy of nivolumab in non-small-cell lung cancer. *Oncoimmunology* **6**, e1339856 (2017).

Kaderbhai, C., **Richard, C.**, Fumet, J. D., Aarnink, A., Foucher, P., Antibiotic Use Does Not Appear to Influence Response to Nivolumab. *Anticancer Res.* **37**, 3195–3200 (2017).

Ghiringhelli, F., **Richard, C.**, Chevrier, S., Vegran, F., Boidot, R., Efficiency of olaparib in colorectal cancer patients with an alteration of the homologous repair protein. *World J. Gastroenterol.* **22**, 10680–10686 (2016).

Communications affichées

Grabin, M., Limagne, E., **Richard, C.**, Boidot, R., Thibaudin, M., Optimized fractionated radiotherapy with anti-PD-L1 and anti-TIGIT : a promising combination. *Abstract PV-0537*, Présenté au 38ème congrès annuel de l'ESTRO, Milan, Italy (2019).

Medjebar, S., **Richard, C.**, Fumet, J. D., Malo, J., Routy, B., Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Is Associated with Decreased Survival in NSCLC Patients Treated with PD-1 Checkpoint Blockers. *Abstract #2389*, Présenté au congrès annuel de l'ESMO, Barcelone, Espagne (2019).

Richard, C., Elkrief, A., Malo, J., Cvetkovic, L., Florescu, M., Body Mass Index and Age Do Not Influence Survival in Patients with Lung Cancers Treated with PD1/PDL1 Immune Checkpoint Inhibitors. *Abstract #2333*, Présenté au congrès annuel de l'ESMO, Barcelone, Espagne (2019).

Richard, C., Fumet, S., Derangere, V., Boidot, R., P. Truntzer, C., An Interactive Interface for Prediction of Anti-PD-1 Efficacy in Lung Cancer Patients. *Abstract #2460*, Présenté au congrès annuel de l'ESMO, Barcelone, Espagne (2019).

Fumet, J. D., **Richard, C.**, Ledys, F., Klopfenstein, Q., Truntzer, C., CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue as prognostic biomarker and a predictive marker of anti-PD-1 efficacy. *Abstract #3021*, Présenté au congrès annuel de l'ASCO, Chicago, IL. USA (2018).

Limagne, E., **Richard, C.**, Thibaudin, M., Fumet, J. D., Truntzer, C., La voie TIM-3/Galectine-9 et les MDSC monocytaires (mMDSC) sont impliquées dans la résistance au Nivolumab dans les cancers bronchiques de stade III/IV. *Abstract SP11-44*, Présenté au 22ème congrès annuel de l'AFC, Lyon, France (2018).

Richard, C., Fumet, J. D., Chevrier, S., Derangere, V., Ledys, F., Exome Analysis to Reveal Genomic Markers Associated with Better Efficacy of Nivolumab in Lung Cancer Patients. *Abstract #9044*, Présenté au congrès annuel de l'ASCO, Chicago, IL. USA (2018).

Richard, C., Fumet, J. D., Chevrier, S., Derangere, V., Ledys, F., Exome Analysis to Reveal Genomic Markers Associated with Better Efficacy of Nivolumab in Lung Cancer Patients. *Abstract P2.22*, Présenté au congrès WIN Symposium, Paris, France (2018).

Richard, C., Fumet, J. D., Chevrier, S., Derangere, V., Ledys, F., Exome Analysis to Reveal Genomic Markers Associated with Better Efficacy of Nivolumab in Lung Cancer Patients. *Abstract P54*, Présenté au Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, France (2018).

Kaderbhai, C. G., **Richard, C.**, Fumet, J. D., Aarnink, A., Ortiz-Cuaran, S., Response to first-line chemotherapy regimen to predict efficacy of nivolumab in lung cancer. *Abstract #3026*, Présenté au congrès annuel de l'ASCO, Chicago, IL. USA (2017).

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 04 octobre 2019

Par CORENTIN RICHARD

**IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS PRÉDICTIFS DE L'EFFICACITÉ DU
NIVOLUMAB DANS LE TRAITEMENT DE PATIENTS ATTEINTS DE CANCER
BRONCHIQUE NON À PETITES CELLULES DE STADE AVANCÉ**

L'arrivée récente de l'immunothérapie a bouleversé la prise en charge des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC). Le nivolumab, anticorps inhibiteur du point de contrôle immunitaire PD-1, a montré des résultats remarquables en deuxième ligne métastatique après échec des chimiothérapies standards de première intention. Cependant, seul un quart des patients tire un bénéfice durable de la prise de ce traitement. À ce jour, aucun biomarqueur prédictif de l'efficacité thérapeutique du nivolumab n'a pu être identifié de manière claire et consensuelle. La recherche de biomarqueurs prédictifs de bénéfice ou de résistance à ce traitement représente donc un enjeu majeur.

L'apparition du séquençage à haut débit au cours de la dernière décennie a eu un impact considérable sur la recherche clinique et fondamentale, permettant d'appréhender la génétique d'une tumeur dans son ensemble. Ces nouvelles techniques s'ajoutent à d'autres déjà éprouvées telles que l'immunophénotypage ou l'immunohistochimie à disposition des chercheurs pour une analyse extensive des caractéristiques de la tumeur et du patient.

L'objectif de ce travail a été d'identifier des marqueurs prédictifs d'efficacité du nivolumab dans le traitement des CBNPC avancés au moyen de ces différentes technologies. Pour cela, notre étude s'est alors intéressée à une cohorte multicentrique de 115 patients atteints de CBNPC et traités par nivolumab en deuxième ou troisième ligne métastatique après échec d'un doublet cytotoxique. Dans les limites de disponibilité et de qualité des échantillons, les profils génétique, transcriptomique et immunohistochimique de la tumeur ainsi que les profils clinique et immunologique des patients ont été analysés.

Nos résultats mettent en évidence des marqueurs prédictifs majeurs de réponse au nivolumab. Ainsi, une bonne réponse au doublet cytotoxique de première intention favorise une efficacité optimale du nivolumab en ligne ultérieure. Par ailleurs, un contrôle régulier de l'évolution des cellules myéloïdes immunosuppressives et des cellules cytotoxiques exprimant TIM-3 d'un patient permet de détecter une résistance primaire ou secondaire au traitement. D'autre part, l'estimation conjointe des expressions des protéines PD-L1 et CD8 par séquençage d'ARN constitue un marqueur prédictif majeur de réponse. Sa capacité prédictive surpasse celle de l'estimation de PD-L1 seule et celle d'autres signatures transcriptomiques précédemment établies et composées d'un nombre plus important de gènes. Enfin, l'étude des séquençages d'exome des tumeurs montre l'importance d'une analyse étendue de la génétique tumorale et la nécessité de ne pas se limiter à l'estimation de sa charge mutationnelle.

Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence des marqueurs prédictifs d'efficacité du nivolumab dans le traitement des CBNPC avancés. Nos résultats soulignent l'importance de l'utilisation de plusieurs technologies pour la caractérisation de la biologie tumorale et de l'immunité du patient dans une démarche de découverte de biomarqueurs et de construction de modèles prédictifs d'efficacité des immunothérapies.

Mots-clés : immunothérapie ; cancers bronchiques ; biomarqueurs ; séquençage nouvelle génération ; modèles prédictifs.