

Influence Du Cisplatine Sur L'Expression Du Check-Point Immunitaire PD-1/PD-L1 Dans Le Cancer Broncho-Pulmonaire Non A Petites Cellules

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale de cancérologie n° 582

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Unité de recherche : Inserm UMR-S 1124

Référent : Faculté de médecine du Kremlin-Bicêtre

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 12 Mai 2020, par

Ludovic FOURNEL

Composition du Jury

Pr Christos CHOUAID

PUPH, CHI de Créteil

Président

Pr Pierre MORDANT

PUPH, Hôpital Bichat

Rapporteur & Examineur

Pr Emmanuel DONNADIEU

DR2, Institut Cochin

Rapporteur & Examineur

Dr Ken OLAUSEN

MCU, Institut Gustave Roussy

Examineur

Université Paris Saclay

Dr Patricia Forgez

CRHC, INSERM

Directrice de thèse

Pr Marco ALIFANO

PUPH, Hôpital Cochin

Co-Directeur de thèse

Remerciements

A ma famille ici présente, ma mère Maryse, mon frère Jérôme et ma femme Marie qui m'ont toujours énormément soutenu, à différents égards, dans la réalisation de mes projets et pour cette thèse en particulier.

Une pensée spéciale pour mon père Hubert qui aurait certainement été heureux d'assister à la finalisation de ces années de doctorat.

Un grand merci à mes deux co-directeurs de thèse le Patricia Forgez et Marco Alifano envers qui je suis extrêmement reconnaissant de m'avoir guidé dans ce projet de recherche et d'avoir su stimuler mon esprit critique et scientifique depuis des années. Je les en remercie d'autant plus, qu'avec le temps j'ai compris à quel point l'encadrement requiert énergie et investissement moral. Merci Patricia pour avoir su combiner la rigueur d'une checheuse à une approche générale très pragmatique, ce qui est particulièrement appréciable pour nous, médecins. Merci Marco pour ton aide soutenue depuis l'Hôtel-Dieu et pour tes qualités scientifiques et chirurgicales qui ont toujours été exemplaires à mes yeux.

Je souhaitais également remercier mes rapporteurs Pierre Mordant et Emmanuel Donnadiu pour avoir accepté de relire, commenter et rapporter ce travail de thèse, ainsi que Ken Olausen et Christos Chouaid pour respectivement examiner et présider cette soutenance de thèse.

Mes sincères remerciements à toute l'équipe du laboratoire, Evelyne Segal, Evelyne Grassano, Jacqueline, Jin, Sylvie, Eliette, Zeyni, Eric, Michael, Nicolas sans qui les études murines de ce travail auraient été une autre paire de manche, et bien-sûr mon

acolyte Zherui qui depuis mon Master 2 m'a été d'une aide plus que précieuse pour le travail de laboratoire et qui par ailleurs est une remarquable personne.

Je remercie vivement les pathologistes Diane Damotte et Audrey Lupo pour leur aide sur l'analyse immunohistochimique et pour les débats enrichissants que nous avons pu avoir au sujet de ce travail.

Je voulais également remercier chaleureusement Filippo Lococo et l'équipe du CORE de Reggio Emilia ainsi que le laboratoire de recherche oncologique de l'université de Modène pour leur support sur certaines analyses issues d'expériences *in-vivo*.

Enfin je m'excuse d'avance pour les personnes qui ont collaboré à ce travail et que je n'ai pas personnellement citées.

Index

Remerciements.....	3
Liste des figures et tableaux.....	7
Glossaire.....	10
Chapitre 1. Le cancer broncho-pulmonaire.....	13
1.1. Epidémiologie du cancer broncho-pulmonaire.....	13
1.2. Les facteurs de risques de cancer pulmonaire.....	15
1.2.1. Le tabac.....	15
1.2.2. Exposition aux carcinogènes environnementaux	19
1.2.3. Exposition professionnelle aux carcinogènes.....	20
1.2.4. Maladies pulmonaires sous-jacentes.....	21
1.2.5. Susceptibilité individuelle.....	22
1.2.6. Rôle du métabolisme.....	23
1.3. Facteurs pronostiques du CBNPC.....	25
1.3.1 Le stade TNM.....	25
1.3.2. Le type histologique.....	28
1.4. Immunité anti-tumorale et immuno-édition.....	35
Chapitre 2. Le microenvironnement immunitaire.....	39
2.1. Principaux acteurs cellulaires de l'immunité anti-tumorale.....	40
2.1.1. La réponse immunitaire innée.....	40
2.1.2. La réponse immunitaire adaptative.....	43
2.2. Le point de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1.....	48
2.2.1. Régulation de PD-L1.....	49
2.2.2. Description et fonction.....	52
2.2.3. Rôle de PD-1/PD-L1 dans la régulation de la réponse immunitaire anti-tumorale.....	56
Chapitre 3. Cadres thérapeutiques du CBNPC.....	59
3.1. Traitement des stades précoces.....	60
3.2. Cas particulier des stades intermédiaires.....	61
3.3. Traitement des stades métastatiques et localement avancés non opérables.....	64
3.3.1. Les chimiothérapies conventionnelles et sels de platine.....	65
3.3.2. Les thérapies ciblées.....	73

3.3.3. Les immunothérapies et les inhibiteurs de check-points immunitaires.....	77
Chapitre 4. Thérapie innovante du CBNPC : Un anticorps dirigé contre les formes immatures de la neurotensine (NTS).....	82
4.1. La neurotensine (NTS).....	82
4.1.1. Biosynthèse et maturation.....	83
4.1.2. Sécrétion de NTS et taux plasmatique.....	84
4.2. Récepteurs de la NTS.....	85
4.2.1. NTSR1.....	85
4.2.2. Rôle de NTS/NTSR1 dans le cancer et le CBNPC.....	88
4.2.3. Expression de NTSR1 dans le cancer et le CBNPC.....	91
4.2.4. Influence du couple NTS/NTSR1 sur la réponse aux traitements	92
Chapitre 5. Rationnel et objectifs de la thèse.....	94
Chapitre 6. Résultats.....	99
6.1. Le cisplatine augmente l'expression de PD-L1 et optimise l'inhibition du point de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1 dans le CBNPC (Travail 1).....	99
6.1.1. Introduction.....	99
6.1.2 Patients et spécimens chirurgicaux.....	99
6.1.3. Résultats préliminaires.....	101
6.1.4. Résultats du travail 1.....	104
6.1.5. Discussion.....	126
6.1.6. Matériel et méthodes du travail 1.....	132
6.1.7 Annexe 1.....	141
6.2. Modulation de la plasticité et de l'hétérogénéité cellulaire et restauration de la sensibilité au cisplatine par un anticorps anti-neurotensine, dans le CBNPC (travail 2).....	151
6.2.1. Introduction.....	151
6.2.2. Principaux résultats.....	154
6.2.3 Matériel et méthodes du travail 2.....	161
6.2.4 Annexes du travail 2.....	165
Chapitre 7. Conclusions générales et perspectives.....	181
Chapitre 8. Chronologie de thèse/place du travail 2.....	184
Chapitre 9. Bibliographie.....	185

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Taux de mortalité lié au cancer pulmonaire en France

Figure 2 : Risque relatif de cancer broncho-pulmonaire en fonction de l'intoxication tabagique

Figure 3 : Carcinomes épidermoïdes

Figure 4 : Adénocarcinome micropapillaire

Figure 5 : Adénocarcinome lépidique

Figure 6 : Adénocarcinome acineux

Figure 7 : Tumeur carcinoïde

Figure 8 : Carcinome neuroendocrine à grandes cellules

Figure 9 : Carcinome non à petites cellules

Figure 10 : Différents acteurs du microenvironnement tumoral

Figure 11 : Interactions moléculaires induites par les signaux co-inhibiteurs ou co-stimulateurs

Figure 12 : Séquence de PD-L1 humain

Figure 13 : Mécanismes impliqués dans la signalisation IFN- γ et son récepteur

Figure 14 : Voies de signalisation régulant l'expression de PD-L1

Figure 15 : Structure tridimensionnelle du ligand PD-L1

Figure 16 : « Synapse immunologique » et signalisation induite par l'interaction PD-1/PD-L1

Figure 17 : Impact de la signalisation impliquant PD-1/(PD-L1/PD-L2) sur les cellules du microenvironnement immunitaire

Figure 18 : Structure chimique des principaux sels de platine

Figure 19 : Différents types de liaisons sels de platine-ADN

Figure 20: Schéma des différentes voies apoptotiques

Figure 21 : Mode d'action et effet du cisplatine

Figure 22 : Mécanisme d'action des anticorps anti-PD-1 ou anti-PD-L1

Figure 23 : Représentation schématique de la structure du précurseur NTS/NN et de ses produits de clivage

Figure 24 : Schéma de NTSR1 et NTSR2

Figure 25 : Voies de signalisations prolifératives induites par l'interaction NTS/NTSR1

Figure 26 : Signalisation pro-oncogénique induite par la stimulation chronique du NTSR1 par NTS ou un agoniste de la NTS

Figure 27 : Comparaison de l'expression de NTS /NTSR1 en IHC entre adénocarcinomes pulmonaires humains et parenchymes sains

Figure 28 : Comparaison des taux de survie de patients opérés pour un CBNPC en fonction de leur statut NTSR1

Figure 29 : Effets induits par le blocage de NTSR1 sur les mécanismes cellulaires d'influx et d'efflux des sels de platine ainsi que sur les dommages associés

Figure 30 : Taux de survie à 5 ans des cancers broncho-pulmonaires en fonction du stade

Figure 31 : Effets attendus du blocage de la signalisation pro-oncogénique NTS/NTSR1 par un anticorps anti-NTS

Figure 32 : Niveau d'ARNm PD-L1 en PCR après exposition de cellules SKOV3 au PBS (Ctrl) ou au carboplatine

Figure 33 : Niveau d'ARNm PD-L1 en PCR après exposition de cellules LNM-R au PBS (Ctrl) ou au cisplatine

Figure 34 : Comparaison individuelle de % de cellules tumorales marquées PD-L1 entre tumeur primitive pulmonaire et ganglions médiastinaux métastatiques

Figure 35 : Comparaison du % de cellules tumorales ganglionnaires médiastinales marquées PD-L1 avant et après chimiothérapie néo-adjuvante

Figure 36 : Marquage PD-L1 en IHC réalisé sur tissu tumoral pré- et post-chimiothérapie

Figure 37 : Comparaison du % de cellules tumorales marquées PD-L1 avant et après chimiothérapie néo-adjuvante

Figure 38 : Répartition catégorielle de Δ PD-L1 des cellules tumorales

Figure 39 : Score PD-L1 des cellules immunitaires du microenvironnement sur échantillons appariés

Figure 40 : Densité moyenne de lymphocytes CD8+ sur les échantillons tumoraux avant et après chimiothérapie

Figure 41 : Transcrit PD-L1 de cellules LLC1 en PCR classique

Figure 42 : Comparaison de l'expression protéique de PD-L1 en Western Blot avant et après injection de cisplatine aux souris portant une tumeur LLC1

Figure 43 : Comparaison de l'expression de l'ARNm PD-L1 avant et après injection de cisplatine à des souris portant une tumeur A549

Figure 44 : Niveau d'expression de l'ARNm PD-L1 par des cellules de LNM-R en fonction des concentrations de cisplatine

Figure 45 : Niveau d'expression de l'ARNm PD-L1 par des cellules A549 et LLC1 en fonction des concentrations de cisplatine

Figure 46 : Effet du cisplatine sur l'expression protéique PD-L1 de cellules LNM-R et A549

Figure 47 : Immuno-cytomarquage PD-L1 de cellules A549 traitées au cisplatine

Figure 48 : Expression protéique d'AKT et pAKT par traitement au cisplatine de cellules A549 et LNM-R

Figure 49 : Effet du blocage d'AKT sur l'expression de l'ARNm PD-L1 par des cellules LLC1 traitées au cisplatine

Figure 50 : Effet du blocage d'AKT sur l'expression de la protéine PD-L1 par des cellules LLC1 traitées au cisplatine

Figure 51 : Analyse comparative de la croissance de tumeurs LLC1 en fonction des groupes de traitement

Figure 52 : Analyse individuelle de la croissance tumorale au sein de chaque groupe de traitement

Figure 53 : Protocole 1 de prélèvements tumoraux

Figure 54 : Protocole 2 de prélèvements tumoraux

Figure 55 : Aspects morphologiques des sous clones issus de la lignée parentale LNM-35

Figure 56 : Evaluation de la corrélation entre exposition au cisplatine et expression de NTS. Impact du blocage NTS sur la CI50 du cisplatine

Figure 57 : Modèle de doubles tumeurs LNM-R et impact du blocage NTS sur la sensibilité au cisplatine

Figure 58 : Marquage γ H2AX après exposition au cisplatine seul ou combiné au blocage LF-NTS

Figure S1 : Courbes de croissance de tumeurs LNM-R selon la concentration et fréquence d'administration d'anti LF-NTS

Figure S2 : Analyse comparative de la croissance de tumeurs R-SI NTSR1 en fonction des groupes de traitement

Figure S3 : Résumé visuel du travail 1

Tableaux

Tableau 1 : Classification TNM des tumeurs broncho-pulmonaires 8^{ème} édition 2017

Tableau 2: Répartition des patients en fonction du statut PD-L1 et du site tumoral

Tableau 3 : caractéristiques cliniques des patients opérés après chimiothérapie néo-adjuvante

Tableau 4 : Association entre facteurs clinico-pathologiques et Δ PD-L1

Glossaire

ADN: acide désoxyribonucléique

ALK: anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase

ARNm: acide ribonucléique messenger

ATP: adénosine tri-phosphate

BAX: Bcl-2-associated X protein

BCL-2: B-cell lymphoma 2

BPCO: bronchopneumopathie chronique obstructive

BRAF: v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

CAR T-cells: lymphocytes T à récepteur antigénique chimérique

CBNPC: cancer bronchopulmonaire non à petites cellules

CDDP: cisplatine

CDm: cellules dendritiques matures

CK: caséine kinase

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CPA: cellule présentatrice d'antigène

CTLA4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CTR: copper transporter

DAG: diacylglycérol

DDR: DNA damage response

DMEM: Dulbecco's Modified Eagles Medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

EGF-R: epidermal growth-factor receptor

EML4: echinoderm microtubule-associated protein-like 4

ERCC1: excision repair cross-complementation group 1

FBS: serum de veau fétal

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GMPc: guanosine monophosphate cyclique

HER: human epidermal growth-factor receptor

HMG: protéines à boîtes du groupe à haute mobilité

HRP: horseradish peroxidase

ICI: inhibiteur de check-point immunitaire

Ig: immunoglobuline

IHC: immunohistochimie

IL: interleukine

INF: interferon

IRF-1: interferon regulatory factor 1

JAK: Janus kinase

JNK: c-Jun terminal kinase

K-RAS: V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LAG-3: lymphocyte activation gene 3

MAPK (ERK): mitogen-activated protein kinase

MMR: mismatch repair

MRP: multidrug resistance associated protein

MSH2: MutS homolog 2 mismatch repair protein

mTOR: cible mécanistique de la rapamycine

NAD: Nicotinamide adénine dinucléotide

NER: nucleotid excision repair

NK: natural killer

NTS: neurotensine

NTSR1: récepteur de haute affinité à la neurotensine de type 1

PARP: poly [ADPribose] polymérase

PD-1: programmed cell death protein-1

PD-L1: programmed death ligand-1

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PKC: protéine kinase C

PLC: phospholipase C

PR: réponse partielle à la chimiothérapie

PTEN: phosphatase and TENsin homolog

ROS: reactive oxygen species

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SD : maladie stable après chimiothérapie

SHP: Src homology 2 domain-containing phosphatase

SNC: système nerveux central

STAT: signal transducers and activators of transcription

TCR: récepteur des cellules T

TGF: transforming growth factor

Th1-2: lymphocyte T helper 1 ou 2

Ti-BALT: tumor-induced bronchus associated lymphoid tissue

TILs: lymphocytes infiltrant la tumeur

TIM-3: T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3

TKI: tyrosine kinase inhibiteur

TLR: toll-like receptor

TNF: tumor necrosis factor

Treg: lymphocyte T régulateur

TTF1: thyroid Transcription Factor -1

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

ZAP-70: zeta-chain-associated protein kinase 70

Chapitre 1. Le cancer broncho-pulmonaire

1.1. Epidémiologie du cancer broncho-pulmonaire

Le cancer du poumon reste, au niveau mondial, la première cause de décès lié au cancer, avec près de 20 % des décès par cancer (Barta, Powell, and Wisnivesky 2019). Il existe toutefois d'importantes disparités en termes d'incidence et de pronostic entre zones géographiques et sexe notamment à cause de différences socioculturelles, de niveau de développement, d'accès au tabac et d'autres facteurs aboutissant à une grande variété de consommation tabagique entre pays (Global Burden of Disease Cancer Collaboration et al. 2018). Si dans de nombreux pays industrialisés, les Etats-Unis en particulier ou le Royaume-Uni, l'incidence du cancer pulmonaire a diminué, elle continue au contraire d'augmenter dans les pays émergents ou en voie de développement, et reste stable dans certains pays de l'ouest de l'Europe occidentale notamment la France si l'on prend en compte les deux genres. Ces écarts épidémiologiques observés s'expliquent par le fait que l'incidence du cancer broncho-pulmonaire est étroitement liée aux différents pics de consommation tabagique (Van der Heyden et al. 2009). Dans une majorité de pays industrialisés occidentaux, le pic de consommation a débuté chez les hommes après la Seconde Guerre mondiale, pour entraîner un pic de survenue dans les années 80 avec toutefois un biais lié à des moyens de détection diagnostique moins performants que de nos jours. Chez les femmes des mêmes zones géographiques, les pics d'intoxication tabagique sont survenus ultérieurement et la pente de consommation est généralement restée croissante ou stable jusqu'à une date plus

récente, quand celle des hommes s'était inversée pour décroître. En Europe, l'incidence a donc globalement décliné chez l'homme depuis les années 90 et commence à se stabiliser chez la femme sauf dans un certain nombre d'anciens pays de l'Union soviétique ou d'autres comme la France (Lortet-Tieulent et al. 2015).

En France, le cancer broncho-pulmonaire présentait une incidence toujours élevée avec près de 50 000 nouveaux cas par an dont 32 300 chez l'homme en 2017, selon les chiffres de l'InVS ('Cancer Du Poumon/ Données Par Localisation/ Cancers/ Maladies Chroniques et Traumatismes/ Dossiers Thématiques/ Accueil' n.d.). Le taux d'incidence de 53 cas pour 100 000 habitants est en légère diminution depuis 2005 chez l'homme (-0,3 %/an) alors qu'il a fortement augmenté depuis les années 80 jusqu'en 2012 chez la femme (5,3 %/an).

Toujours en France, la mortalité associée à cette maladie était de 31 000 décès par an donnant un taux de survie nette standardisée de 16 % à 5 ans. De même que l'incidence, le taux de mortalité diminue chez l'homme alors qu'il a tendance à augmenter chez la femme avec une forte hausse sur la période récente de 2005 à 2012 (+4,6 % par an). Il existe en France des disparités régionales qui sont également liées à des facteurs démographiques, socioculturels de consommation tabagique, d'accès aux soins diagnostiques ou thérapeutiques. Par exemple, le taux régional de mortalité (sur la période 2005-2009) varie de 36 à 56,4 pour 100 000 hommes entre le Midi-Pyrénées et le Nord-Pas-de-Calais. Les taux restent beaucoup plus bas dans les départements d'outre-mer chez l'homme comme chez la femme (Figure 1). Il n'existe pas, pour le moment, de programme national de dépistage du cancer du poumon en France en dehors de nombreux protocoles de recherche clinique visant à sélectionner les populations cibles les plus adaptées

comme cela a pu être réalisé dans des essais randomisés internationaux (Horeweg et al. 2013; National Lung Screening Trial Research Team et al. 2013).

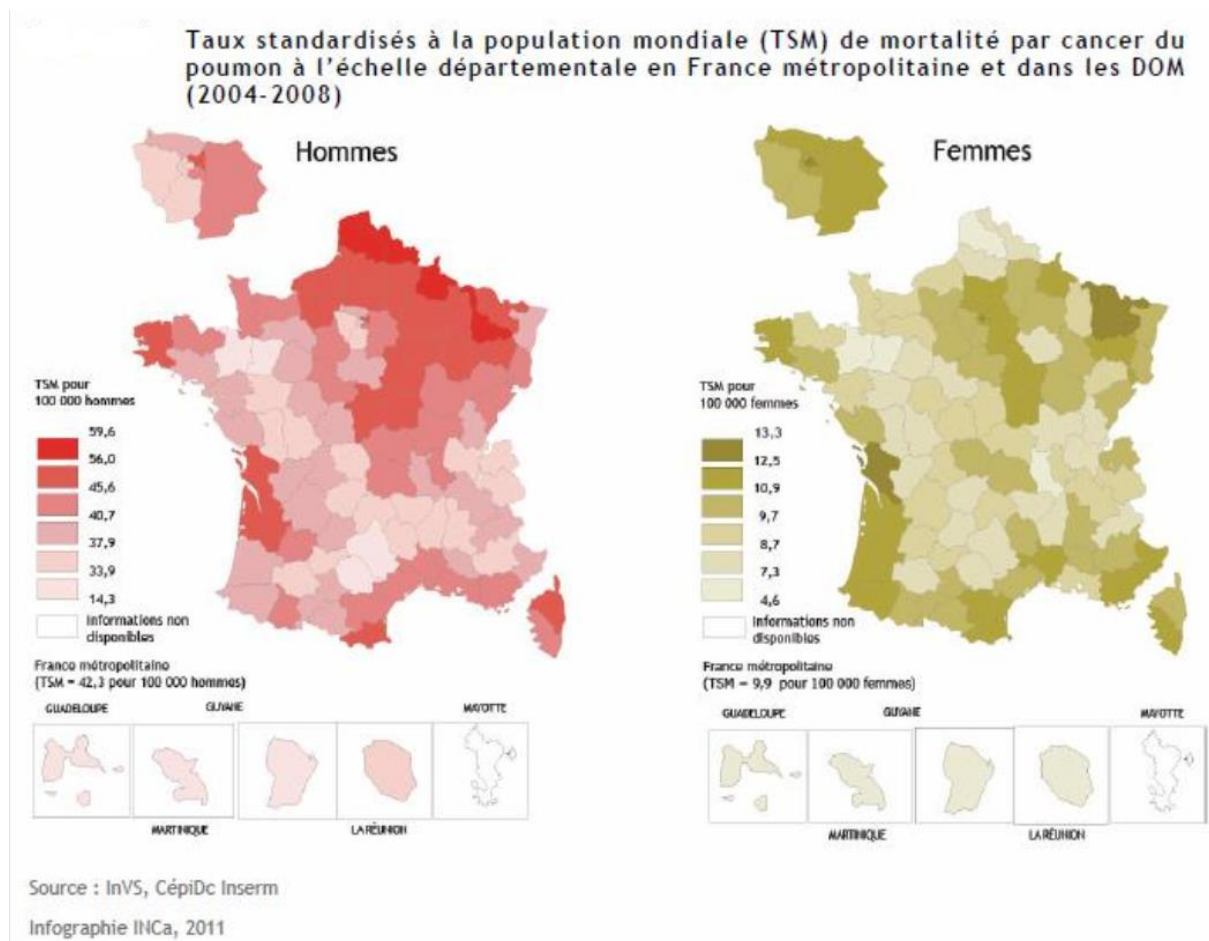


Figure 1 : Taux de mortalité lié au cancer pulmonaire en France ('Cancer Du Poumon / Données Par Localisation / Cancers / Maladies Chroniques et Traumatismes / Dossiers Thématiques / Accueil' n.d.)

1.2. Les facteurs de risques de cancer pulmonaire

1.2.1. Le tabac

Comme évoqué dans le paragraphe précédent, la fumée de cigarette est de loin la première cause de cancer du poumon, avec une imputabilité dans 9 cas sur 10. Le risque relatif de développer un cancer broncho-pulmonaire lorsqu'on a eu une

intoxication tabagique active est 20 fois supérieur à celui de patients «contrôle» non-fumeurs (Alberg et al. 2013). Une étude cas-témoins réalisés dans 6 pays européens montrait en l'occurrence que le risque relatif de cancer du poumon chez l'homme fumeur était de 23,9 par rapport aux non-fumeurs comme le montre le graphique suivant (Figure 2), illustrant le travail préalablement évoqué (Simonato et al. 2001).

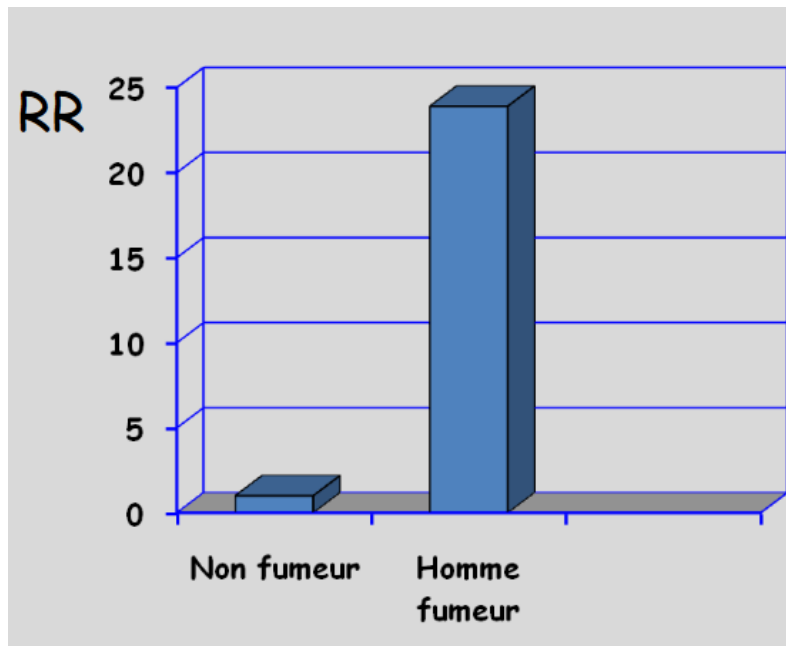


Figure 2 : Risque relatif de cancer broncho-pulmonaire en fonction de l'intoxication tabagique (Courtoisie du Pr J. Tredaniel)

Le paramètre quantitatif chiffrant l'intoxication tabagique en paquets-années découle du fait que le risque de cancer du poumon est positivement corrélé à la durée d'exposition et au nombre de cigarettes fumées chaque jour. Une méthode de quantification, proposée en 1978, montrait que l'impact de la durée est supérieur à celui de la quantité journalière d'intoxication tabagique (Doll and Peto 1978).

L'augmentation, lors des dernières décennies, de la consommation tabagique dans certaines populations, comme en Asie, ou chez les femmes de certains pays

européens, explique donc l'évolution parallèle de l'incidence du cancer du poumon dans ces populations (Parascandola and Xiao 2019).

Depuis la période suivant la Seconde Guerre mondiale, les produits entrant dans la composition des cigarettes ont significativement changé, avec notamment l'intensification de la vente de cigarettes trouées puis de cigarettes à filtre (Hoffmann and Hoffmann 1997). Bien que de premières études aient démontré un effet bénéfique de la consommation de cigarettes avec filtre, des essais ultérieurs ont infirmé ces résultats (Wynder and Mabuchi 1972). En effet, il a été plus récemment observé que l'usage du filtre et de caractéristiques des cigarettes avait pour effet de modifier la taille des particules inhalées, ce qui a eu pour conséquence de changer la typologie histologique et topographique des lésions tumorales associées (Thun et al. 1997; Everatt, Kuzmickienė, and Senulis 2011; Wynder and Muscat 1995).

Avec les changements liés aux filtres, il a été observé une réduction des taux de nicotine et de goudron. Le goudron résulte de la combustion du tabac qui se trouve bloqué sur le filtre de machines à fumer permettant l'analyse des particules retenues, à laquelle on soustrait la nicotine. Ces particules correspondent à un mélange complexe de molécules ayant en majorité des propriétés pro-oncogéniques. À part la nicotine qui n'est pas considérée comme un carcinogène, la fumée de cigarette contient plus de 55 particules potentiellement impliquées dans la survenue de cancer pulmonaire. On retrouve notamment le 4-méthylnitrosamine-1-3-pyridyl-1-butanone (NNK), certains aldéhydes, et les hydrocarbures polycycliques aromatiques dont l'activation peut aboutir à des modifications épigénétiques et à des lésions de l'ADN (Weng et al. 2018; Hussain et al. 2019). Malgré les évolutions technologiques des cigarettes, les changements dans la composition de la fumée inhalée, et la diminution des taux de goudron observés lors de la deuxième moitié du 20^{ème} siècle,

le risque de survenue d'un cancer broncho-pulmonaire chez l'individu fumeur ne s'est pas infléchi (Institute of Medicine (US) Committee to Assess the Science Base for Tobacco Harm Reduction 2001).

L'inhalation de fumée de pipes et de cigares est également responsable d'une augmentation du risque de cancer broncho-pulmonaire. Ce risque est toutefois inférieur à celui dû à la fumée de cigarette de par la quantité et la profondeur de fumée inhalée (McCormack et al. 2010 ; S. Benhamou, Benhamou, and Flamant 1986). L'impact de la consommation de cannabis sur la survenue de cancer du poumon, bien que rationnel, n'est pas encore totalement établi à cause du peu de robustesse des études réalisées, et de la présence de nombreux facteurs confondants, la cointoxication tabagique étant le premier d'entre eux (Jett et al. 2018 ; Gilhodes et al. 2015).

L'usage de la cigarette électronique ou "vaporette" est, lui, croissant dans la plupart des pays industrialisés, notamment chez les jeunes (Coleman et al. 2017; Singh et al. 2016). Sa consommation a été promue pour remplacer la cigarette traditionnelle en se basant sur le fait qu'elle permet de délivrer la substance stimulante nicotinique par la voie d'aérosols ce qui procure au fumeur un plaisir instantané. Toutefois, même si la e-cigarette a initialement été promue pour son caractère peu carcinogène, de plus en plus de réticence est observée par la communauté médicale et les pouvoirs publics du fait d'études *in vitro* et *in vivo* montrant des lésions de l'ADN et un impact pro-oncogénique de cancer pulmonaire et qui remettent en cause sa prétendue innocuité carcinologique (H.-W. Lee et al. 2018). De plus, la consommation de la cigarette électronique dans l'espace public entraîne une augmentation de l'inhalation passive des particules associées à sa fumée et dont l'innocuité n'est pas fermement démontrée (Laverty et al. 2017).

La question de l'impact de la cigarette électronique incite également à aborder le problème du tabagisme passif et de son imputabilité dans la survenue de cancer du poumon chez les non-fumeurs. Le rôle du tabagisme passif a commencé à être clairement identifié et attesté sur des populations de femmes mariées à des hommes fumeurs. Dans ces sous-groupes de femmes, le risque de cancer broncho-pulmonaire était accru par rapport aux cas contrôles (Trichopoulos et al. 1981). Un travail récent de l'International Lung Cancer Consortium évaluait les données poolées de 2500 cas de non-fumeurs et a mis en évidence une association significative entre tabagisme passif et cancer pulmonaire avec un risque relatif de 1,31 (IC95 % : 1,17–1,47) (C. H. Kim et al. 2014). Ces résultats viennent corroborer de précédentes analyses alertant sur les risques carcinologiques de l'inhalation passive de fumée de cigarette et suggérant l'intérêt de mesures préventives de santé publique (Office of the Surgeon General 2019).

1.2.2. Exposition aux carcinogènes environnementaux

Le volume d'air inhalé en 24 heures par un être humain est d'environ 15 000 litres. Il est donc logique que la contamination de l'air par des particules carcinogènes, même en faible quantité, puisse être inductrice de cancer broncho-pulmonaire, car il est en contact avec une grande partie de l'arbre respiratoire. Ce qui est appelé plus communément la pollution atmosphérique représente principalement la présence dans l'air d'hydrocarbures aromatiques polycycliques résultant de la combustion d'énergies fossiles. On qualifie de microparticules, les particules en suspension atmosphérique ayant un diamètre à 50 microns, certaines particules encore plus fines (nanoparticules) sont présentes dans l'air pollué et peuvent avoir des effets

intracellulaires directs voire entrainer des lésions de l'ADN (Oberdörster 2000). Une étude de 2002 a notamment montré que la concentration de particules fines dans l'atmosphère était corrélée positivement au risque de cancer broncho-pulmonaire avec une augmentation de 14 % du risque par tranche de 10 µg/m³ supplémentaire (Pope et al. 2002). En plus des particules fines, l'exposition au radon, initialement associée à une exposition occupationnelle, est de nos jours communément admise comme faisant partie des facteurs environnementaux.

1.2.3. Exposition professionnelle aux carcinogènes

De nombreuses études ont évalué l'impact des différents types d'expositions professionnelles sur la survenue du cancer broncho-pulmonaire. Malgré une méthodologie fiable, elles sont souvent d'interprétation difficile, car la part imputable à l'exposition aux polluants en milieu professionnel dans la survenue de cancer du poumon, par rapport à une éventuelle consommation tabagique concomitante, est difficile à évaluer (Alberg et al. 2013). Les résultats issus d'études de type cas-témoins ont mis en évidence que l'exposition professionnelle à des toxiques était responsable d'une proportion de cancers broncho-pulmonaires variant de 9 % à 15 % (Dave et al. 1988; Siemiatycki et al. 1994).

Typiquement, l'exposition aux cristaux de silice a longtemps été considérée comme un facteur de risque de développement de cancer broncho-pulmonaire mais l'impact de la consommation tabagique simultanée comme facteur confondant n'avait pas été suffisamment bien pris en compte pour pouvoir en tirer des conclusions fiables (McDonald et al. 2005; Smith, Lopipero, and Barroga 1995). De même, l'exposition au benzo-a-pyrène qui s'observe chez les patients exposés au goudron a été

associée à une élévation du risque de survenue de cancer pulmonaire, tout comme l'exposition à certains métaux comme, le chrome, l'arsenic ou le nickel (Lloyd 1971; Alberg et al. 2002).

Concernant l'exposition à l'amiante et à certains types de radiations ionisantes les preuves d'un impact significatif sur l'augmentation du risque de développement d'une néoplasie broncho-pulmonaire ou pleurale, sont plus formelles (Doll 1993). De plus, il a été montré que le risque de néoplasie broncho-pulmonaire augmentait de manière temps-dépendante avec l'exposition à l'amiante sous ses différentes formes (Newhouse and Berry 1979). L'amiante s'est révélé être facteur de risque de cancer pulmonaire indépendamment de l'intoxication tabagique, mais lorsque ces deux expositions sont simultanées elles agissent de manière synergique en augmentant très significativement le risque relatif (Hammond, Selikoff, and Seidman 1979).

1.2.4. Maladies pulmonaires sous-jacentes

Comme évoqué dans le chapitre précédent concernant les expositions professionnelles, une silicose ou une asbestose peuvent représenter un terrain favorable à la survenue d'un cancer pulmonaire (T. P. Ng 1994).

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie pulmonaire le plus souvent liée à une intoxication tabagique prolongée, et qui constituerait un facteur de risque de cancer broncho-pulmonaire mais dont la contribution relative dans le déterminisme de la néoplasie est difficile à établir comme pour les co-intoxications au tabac (Sekine et al. 2012).

Certaines études anciennes avaient montré, à contrario, une association inverse entre asthme et cancer du poumon (Gabriel, Dudley, and Alexander 1972; Alderson 1974), ce qui a plus tard était infirmé par différentes métaanalyses souvent rigoureusement contrôlées pour le tabagisme et qui ont retrouvé une association positive entre l'asthme et le risque de cancer pulmonaire, spécialement de type non-adénocarcinome (Eriksson et al. 1995; Rosenberger et al. 2012 ; Qu et al. 2017). La relation potentielle entre les maladies interstitielles pulmonaires et les cancers pulmonaires reste controversée, car ces maladies ont été alternativement considérées comme responsables de cancers pulmonaires ou provoquées par le cancer du poumon (Daniels and Jett 2005).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour tenter d'expliquer la relation entre pathologie pulmonaire sous-jacente et cancer broncho-pulmonaire, ceux-ci comprennent principalement la survenue de dommages génétiques dus à l'accumulation de radicaux libres ou d'agents toxiques ainsi qu'à une inflammation chronique aboutissant à une dégénérescence, une dérégulation des processus mitotiques, et une modification de l'équilibre immunitaire (Grudny et al. 2013; Sekine et al. 2014 ; Y. W. Kim et al. 2015 ; Biton et al. 2018).

1.2.5. Susceptibilité individuelle

L'exposition aux facteurs environnementaux ou professionnels concerne une proportion très importante de la population générale, mais seule une minorité de personnes développe une pathologie tumorale pulmonaire maligne. Sur la base de cette simple considération, la susceptibilité individuelle et génétique au cancer pulmonaire peut être évoquée.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré, notamment chez les populations de non-fumeurs, qu'une histoire familiale de cancer pulmonaire peut augmenter le risque de développer la maladie (Matakidou, Eisen, and Houlston 2005; A. H. Wu et al. 1988; Mayne, Buenconsejo, and Janerich 1999; Coté et al. 2005 ; Ann G. Schwartz and Cote 2016). Ces études ont été à la fois de type cas-témoins et de type cohorte, et étaient généralement contrôlées pour l'intoxication au tabac. Une étude sur le cancer pulmonaire chez les non-fumeurs a montré par exemple que le risque de cancer pulmonaire était augmenté chez les proches de premier degré (A. G. Schwartz, Yang, and Swanson 1996). Il a été envisagé que des variations familiales dans l'efficacité des processus de détoxification des carcinogènes environnementaux et professionnels puissent expliquer cette prédisposition (Vineis et al. 2003; Le Marchand et al. 2003). La glutathion-S-transférase détoxifie ses intermédiaires hautement toxiques, pour en permettre l'excrétion (H. Yang et al. 2015) et le génotype nul de cette enzyme est associé à un risque plus élevé de cancer pulmonaire (Simone Benhamou et al. 2002).

Enfin la prévalence plus importante de cancers pulmonaires avec addiction oncogénique, en particulier EGF-R, chez les malades ayant une histoire familiale de cette maladie, suggère une relation entre « drivers » oncogéniques des cancers pulmonaires non à petites cellules et ascendance familiale (J. S. Kim et al. 2017).

1.2.6. Rôle du métabolisme

La dérégulation du métabolisme énergétique permet aux cellules tumorales de proliférer, de métastaser, ou de résister à l'apoptose, c'est une des caractéristiques bien décrite du cancer en général, y compris le cancer broncho-pulmonaire (Douglas

Hanahan and Weinberg 2011b). Il faut évoquer en premier lieu le métabolisme glucidique, car le glucose est le « carburant » essentiel de la croissance tumorale. La prolifération des cellules tumorales entraîne essentiellement une fermentation du glucose à faible rendement d'ATP (en anaérobiose et également aérobie), phénomène communément appelé effet Warburg. Il détourne une grande partie des métabolites (glucides, lipides et protéines) à son profit, dérégulant ainsi un ensemble complexe d'interactions entre la tumeur et son hôte, notamment au niveau du microenvironnement tumoral (Heiden, Cantley, and Thompson 2009). Ces perturbations métaboliques liées au cancer pulmonaire sont de mieux en mieux connues et les mécanismes impliqués donnent lieu à un nombre croissant de protocoles de recherche visant à établir des biomarqueurs, des facteurs pronostiques ou cibles thérapeutiques métaboliques. Notre équipe s'intéresse à certains de ces mécanismes et a notamment mis en valeur le rôle fondamental du métabolisme dans le cycle cellulaire et la prolifération des cellules tumorales. En outre, certaines enzymes ou métabolites impliqués dans la néo-glucogénèse et la glycolyse sont de potentielles cibles thérapeutiques, en particulier par modification des concentrations de citrate (Icard, Wu, et al. 2019 ; Icard et al. 2018 ; Icard, Fournel, et al. 2019).

Les avancées récentes dans le domaine de l'onco-métabolisme ont également permis d'établir ou de suggérer l'influence de désordres métaboliques dans la survenue de cancers broncho-pulmonaires. En effet, des taux élevés de glucose sérique et la présence d'un diabète ont été associés à l'incidence d'un certain nombre de cancers « solides » dont le carcinome pulmonaire (Collaboration 2011). Au-delà de l'influence sur la survie et la réponse aux traitements, il semble que certains troubles métaboliques puissent induire une augmentation du risque de cancer broncho-pulmonaire comme cela peut être le cas chez les patients obèses

morbides ou cachectiques sévères, même si les études épidémiologiques montrent des résultats contrastés et les mécanismes encore explorés (Dewi et al. 2016 ; Carreras-Torres et al. 2017).

1.3. Facteurs pronostiques du CBNPC

Au moment du diagnostic, un CBNPC est caractérisé par des éléments propres à la tumeur, qui ont montré leur valeur pronostique sur de grands ensembles de patients et qui sont essentiellement constitués du TNM et du type histologique. De ces différents paramètres, ainsi que de facteurs liés au patient lui-même, dépendra en grande partie le type de traitement proposé.

1.3.1 Le stade TNM

La classification TNM du cancer broncho-pulmonaire met en avant des caractéristiques qui sont évoqués par son acronyme correspondent à l'extension locale de la tumeur primitive (taille et envahissement de structures adjacentes) pour le paramètre T, extension ganglionnaire loco-régionale ou distante pour le paramètre N, et enfin envahissement métastatique d'organes à distance pour le paramètre M. Le stade de la maladie est quant à lui une résultante de la combinaison des 3 paramètres ainsi évalués. Néanmoins cette classification a été remise à jour régulièrement en fonction de l'avancée des connaissances sur ce cancer, des observations cliniques, et des techniques d'investigation, la dernière version date de 2017 (Detterbeck et al. 2017). On peut, regrouper les cancers de stades précoces (0, I, IIA), les stades intermédiaires opérables (IIB, IIIA), les stades intermédiaires non

ou marginalement opérables (IIIB, IIIC) et les stades métastatiques (IV), représentant respectivement 14,5 %, 17,8 %, 9,5 % et 58,3 % des malades au moment du diagnostic (« Cancer Du Poumon/ Données Par Localisation/ Cancers/ Maladies Chroniques et Traumatismes/ Dossiers Thématiques/ Accueil” n.d.; Siegel, Miller, and Jemal 2018). Cette nouvelle classification tient compte du bilan initial étiologique et d’extension, et est présentée dans le tableau 1 ci-dessous.

T - Tumeur	Tx	Tumeur primaire non connue ou tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les sécrétions broncho-pulmonaires mais non visible aux examens radiologiques et endoscopiques.
	T0	Absence de tumeur identifiable.
	Tis	Carcinome <i>in situ</i> .
	T1	Tumeur de 3 cm ou moins dans ses plus grandes dimensions, entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale, sans évidence d'invasion plus proximale que les bronches lobaires à la bronchoscopie (c'est-à-dire pas dans les bronches souches).
	T1a	< 1cm
	T1b	≥ 1 cm et < 2 cm
	T1c	≥ 2 cm et < 3 cm
	T2	Tumeur de plus de 3 cm, mais moins de 5 cm , avec l'un quelconque des éléments suivants d'extension : -envahissement de la plèvre viscérale quelle que soit la taille de la tumeur, envahissement d'une bronche souche à toute distance de la carène -existence d'une atélectasie (lobaire ou pulmonaire) - de plus grand diamètre.
	T2a	≥ 3 cm mais < 4 cm
	T2b	≥ 4 cm mais < 5 cm
T3	Tumeur de plus de 5 cm et de moins de 7 cm , ou ayant au moins l'un des caractères invasifs suivants : -atteinte de la paroi thoracique (incluant les tumeurs du sommet), -atteinte du nerf phrénique, -atteinte de la plèvre pariétale ou du péricarde, -nodules tumoraux dans le même lobe.	
T4	Tumeur de plus de 7 cm ou comportant un envahissement quelconque parmi les suivants : -médiastin, -cœur ou gros vaisseaux, -trachée, -diaphragme, -nerf récurrent, -œsophage, -corps vertébraux, -carène, -nodules tumoraux séparés dans deux lobes différents du même poumon.	
N - Adénopathies	Nx	Envahissement loco-régional inconnu.
	N0	Absence de métastase dans les ganglions lymphatiques régionaux.
	N1	Métastases ganglionnaires péri-bronchiques homolatérales et/ou hilaires homolatérales incluant une extension directe.
	N1a	1 seule station N1 atteinte
	N1b	Plusieurs stations N1 atteintes
	N2	Métastases dans les ganglions médiastinaux homolatéraux ou dans les ganglions sous-carénaux
N2a	1 seule station N2 atteinte sans N1 « <i>skip metastasis</i> »	
N2b	1 seule station N2 avec atteinte N1	
N2c	Plusieurs stations N2 atteintes	
N3	Métastases ganglionnaires médiastinales contro-latérales ou hilaires contro-latérales ou scaléniques, sus-claviculaires homo- ou contro-latérales.	
Métastases	M0	Pas de métastase à distance.
	M1	Existence de métastases :
	M1a	Nodules tumoraux séparés dans un lobe controlatéral, ou nodules pleuraux ou pleurésie maligne ou péricardite maligne
	M1b	1 seule métastase dans un seul site métastatique
M1c	Plusieurs métastases dans un seul site ou plusieurs sites atteints	

Carcinome occulte	Tx N0 M0	Stade IIIA	T1,2 N2, M0
Stade 0	Tis N0 M0		T4 N0 M0
Stade IA-1	T1a N0 M0		T3, T4 N1 M0
Stade IA-2	T1b N0 M0	Stade IIIB	T3,4 N2 M0
Stade IA-3	T1c N0 M0		T1,2 N3 M0
Stade IB	T2a N0 M0	Stade IIIC	T3,4 N 3 M0
Stade IIA	T2b N0 M0	Stade IV-A	Tout M1a
Stade IIB	T3 N0 M0		Tout M1b
	T1,2 N1 M0	Stade IV-B	Tout M1c

1.3.2. Le type histologique

En plus du stade TNM de la tumeur, un élément déterminant pour la prise en charge thérapeutique est le type histologique. Depuis la classification des tumeurs broncho-pulmonaires et du thymus de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) établie en 1999 principalement sur la base de la morphologie observée en microscopie optique, et plus tard en 2004, les pratiques diagnostics, techniques et thérapeutiques ont évolué. La majorité des carcinomes pulmonaires étant diagnostiquée à un stade tardif (environ 70 %) le diagnostic est le plus souvent posé par la réalisation de biopsies par les techniques les moins invasives possible (endoscopie bronchique, ponction transcutanée, biopsies liquides, chirurgie mini-invasive) dont les performances diagnostiques se sont améliorées ces dernières décennies. En effet, la caractérisation morphologique, immuno-histochimique et moléculaire des tumeurs s'est améliorée et précisée, prenant en compte des paramètres adaptés aux évolutions thérapeutiques. C'est en 2015 que l'OMS a dernièrement actualisé la détermination des types et sous-types histologiques des tumeurs du poumon avec notamment des changements concernant les adénocarcinomes (Travis et al. 2015).

Ainsi, il existe de nombreuses catégories et sous catégories de carcinomes broncho-pulmonaires avec 4 types histologiques principaux : les carcinomes neuroendocrines broncho-pulmonaires à petites cellules (CPC) et les carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC) que représentent les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules. En plus de cela, il faut évoquer les tumeurs neuroendocrines non à petites cellules (carcinoïdes typiques et atypiques, et carcinomes neuroendocrines à grandes cellules), les autres types étant plus rares (carcinomes adénoquameux, sarcomatoïdes, lésions précancéreuses, tumeurs non classifiées, etc...).

Le carcinome épidermoïde

Ce type histologique se localise préférentiellement dans une bronche souche, lobaire ou segmentaire, et présente fréquemment un aspect de tumeur végétante (en chou-fleur) ou bourgeonnante plus ou moins obstructive dans la lumière bronchique. Simultanément à sa progression endoluminale, la tumeur peut envahir en profondeur la sous-muqueuse et le tissu péribronchique. Les trois sous-types sont dits kératinisants, non-kératinisants ou basloïdes (Figure 3). En immunohistochimie, la caractérisation des marqueurs TTF1, et P40 est importante, en outre, la majorité des épidermoïdes pulmonaires sont TTF1 négatifs et P40 positifs. D'un point de vue moléculaire, environ 60 % à 70 % des épidermoïdes présentent des mutations que des thérapies existantes peuvent cibler, notamment dans les effecteurs des voies de signalisation PI3K et RAS (Cancer Genome Atlas Research Network 2012).

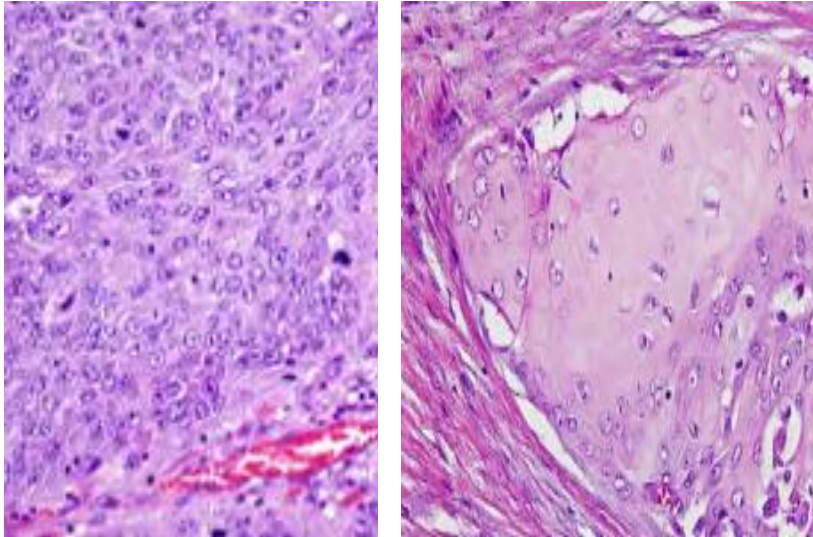


Figure 3 : Carcinomes epidermoïdes non kératinisant (gauche) et kératinisant (droite)

L'adénocarcinome bronchique

L'adénocarcinome est le type prédominant de carcinome pulmonaire dans de nombreux pays, à cause du changement des habitudes des fumeurs (voir paragraphe facteurs de risque). L'adénocarcinome se localise plus généralement en périphérie du poumon jusque dans les régions sous-pleurales. Les adénocarcinomes pulmonaires notamment précoces peuvent présenter un aspect de nodules en verre dépoli pur ou mixte (nodule solide associé à une plage de verre dépoli). Cette entité radiologique est encore actuellement controversée d'un point de vue diagnostique pour sa corrélation avec la pathologie, mais aussi pour sa prise en charge thérapeutique et son impact clinique (Fang et al. 2014 ; H. Y. Lee et al. 2014 ; Fournel et al. 2017). Les avancées récentes ont permis notamment une évolution de la classification des adénocarcinomes, avec une mise à jour de 2015 plus adaptée aux connaissances actuelles en termes de diagnostic et de thérapeutique, et inspirée de la classification IASLC/ATS/ERS de 2011 (Travis et al. 2011). Dans la classification de 2015, il existe une nouvelle entité qui fait suite au carcinome in situ

(anciennement bronchiolo-alvéolaire), il s'agit de l'adénocarcinome avec invasion minimale (<5 mm d'invasion en profondeur et <3 cm en taille). Les adénocarcinomes invasifs sont, quant à eux, classés en fonction du contingent architectural prédominant (incrémentation par tranche de 5 % pour chaque contingent de tumeurs mixtes), et sont catégorisés en lépidique, acineux, papillaire, micropapillaire et solide (avec mucines et TTF1+) (Figures 4, 5, 6).

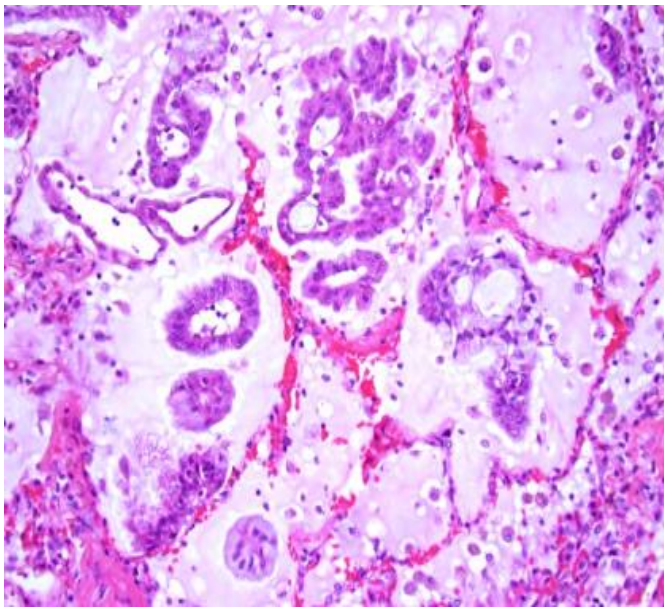


Figure 4 : Exemple d'adénocarcinome micropapillaire

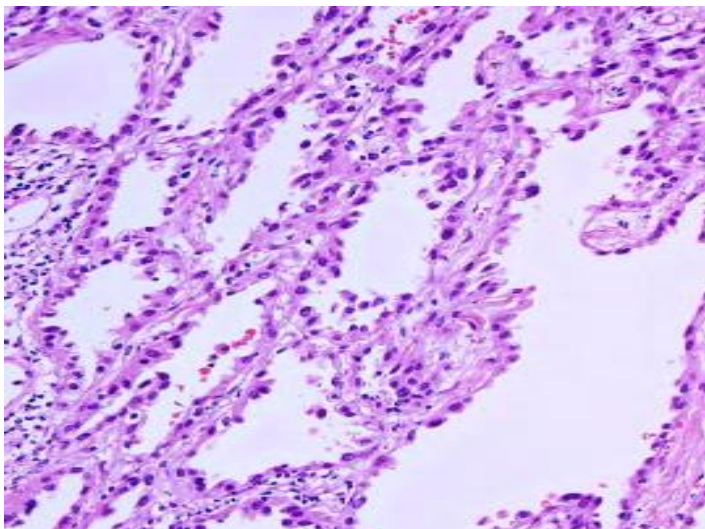


Figure 5 : Aspect d'adénocarcinome lépidique

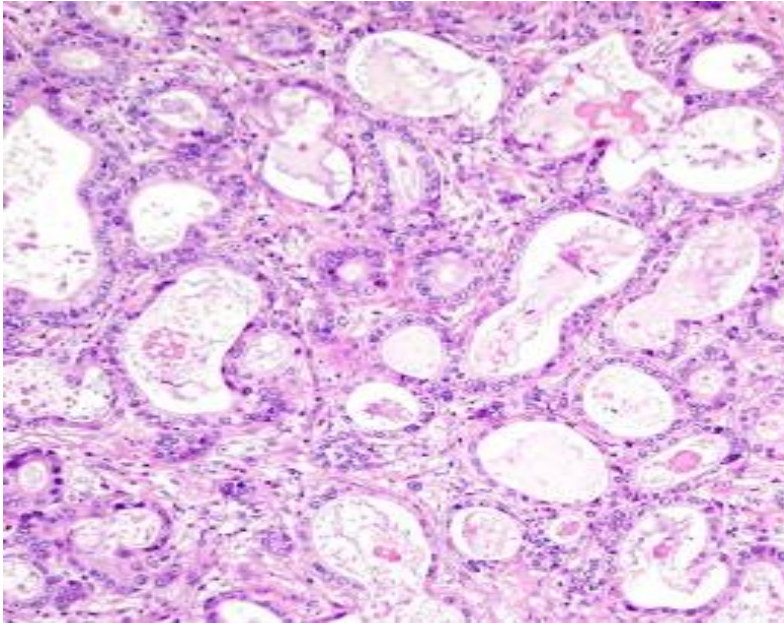


Figure 6 : Adénocarcinome de sous-type acineux

Le diagnostic différentiel des adénocarcinomes pulmonaires (primitifs par opposition aux localisations secondaires) se fait en particulier grâce à l'immunomarquage TTF-1 (Thyroid Transcription factor 1) qui est exprimé dans 85 % des cas de tumeur primitive pulmonaire (Penault-Llorca et al. 2016). D'un point de vue moléculaire, il existe 65 % d'adénocarcinomes présentant une modification génétique, une mutation activatrice comme EGF-R et KRAS (Kris et al. 2014) ou un réarrangement génique. La mise en évidence de ces anomalies moléculaires permet d'affiner le diagnostic d'extension de la maladie en aidant à la différenciation entre adénocarcinomes primitifs synchrones (tableau clinique relativement fréquent), et lésion primitive pulmonaire avec métastases dans le poumon homo- ou contro-latéral, un l'algorithme tenant compte de ces anomalies a été proposé par notre équipe (Mansuet-Lupo et al. 2019) .

Dans l'ensemble, les modifications qui ont été apportées à la classification IASLC/ATS/ERS 2015 s'appuient sur des observations démontrant une implication

pronostique et théranostique des différentes caractéristiques communes aux entités décrites dans cette nouvelle histo-classification des adénocarcinomes.

Les tumeurs neuroendocrines non à petites cellules

En dehors du carcinome à petites cellules, non abordé dans ce mémoire, les autres tumeurs neuroendocrines pulmonaires sont constituées par les tumeurs neuroendocrines bien différenciées (anciennement de bas grade) que sont les carcinoïdes typiques et atypiques (Figure 7), et par une autre entité des tumeurs neuroendocrines de haut grade que sont les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules (Figure 8). Les carcinoïdes sont observés souvent chez des patients plus jeunes que les autres cancers pulmonaires et ne sont pas significativement associés à l'intoxication tabagique (Hendifar, Marchevsky, and Tuli 2017). La distinction entre les deux sous-types typique et atypique a permis une stratification des patients selon leur risque de récurrence et leur survie notamment après exérèse chirurgicale, les carcinoïdes atypiques étant plus agressifs (Cusumano, Fournel et al. 2017).

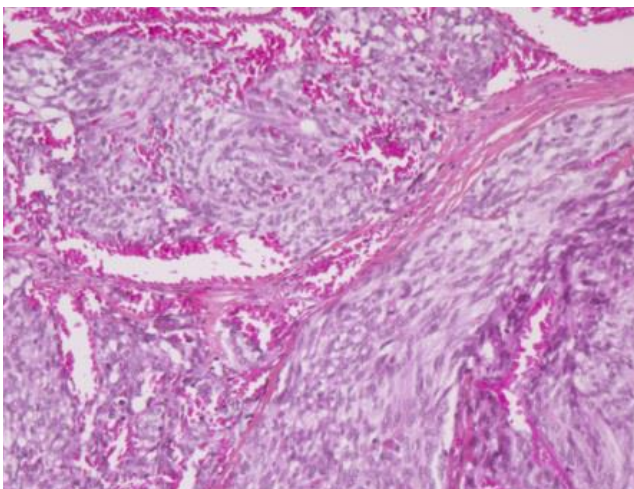


Figure 7 : Tumeur carcinoïde pulmonaire

Le carcinome neuroendocrine à grandes cellules est une catégorie plus rare dont la caractérisation pathologique est controversée. Ces tumeurs neuroendocrines peu différenciées présentent des caractéristiques phénotypiques globalement partagées entre les carcinomes non-neuroendocrines à grandes cellules et les carcinomes neuroendocrines à petites cellules. De même que pour le diagnostic, le traitement des carcinomes neuroendocrines à grandes cellules est également intermédiaire et partagé entre celui des carcinomes à grandes cellules et les petites cellules. Le phénotype et le pronostic plus péjoratif de ce type histologique par rapport aux autres CBNPC, peut influencer la nature et la pertinence du traitement adjuvant (Fournel et al. 2013).

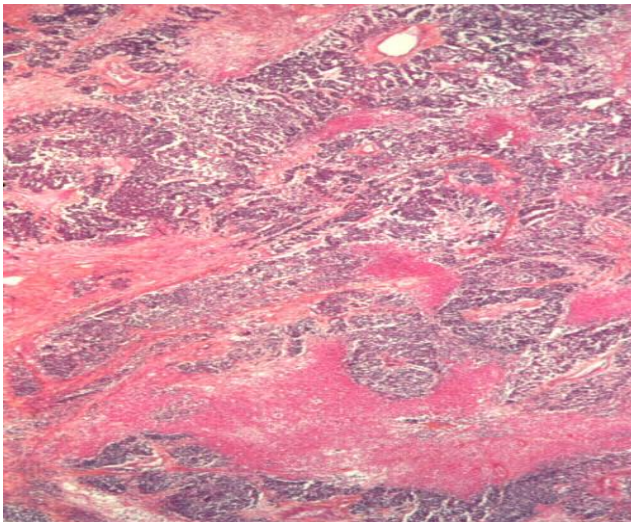


Figure 8 : Carcinome neuroendocrine à grandes cellules

Le carcinome à grandes cellules

Le carcinome bronchique à grandes cellules est essentiellement un diagnostic d'exclusion et s'applique aux tumeurs qui n'ont pas la morphologie typique d'un cancer bronchique à petites cellules et qui n'ont ni différenciation épidermoïde ni différenciation glandulaire (Figure 9). La proportion de cancers à grandes cellules varie donc largement selon les centres, en fonction des pratiques et du plateau technique anatomopathologique et moléculaire (Zachara-Szczakowski, Verdun, and Churg 2015).

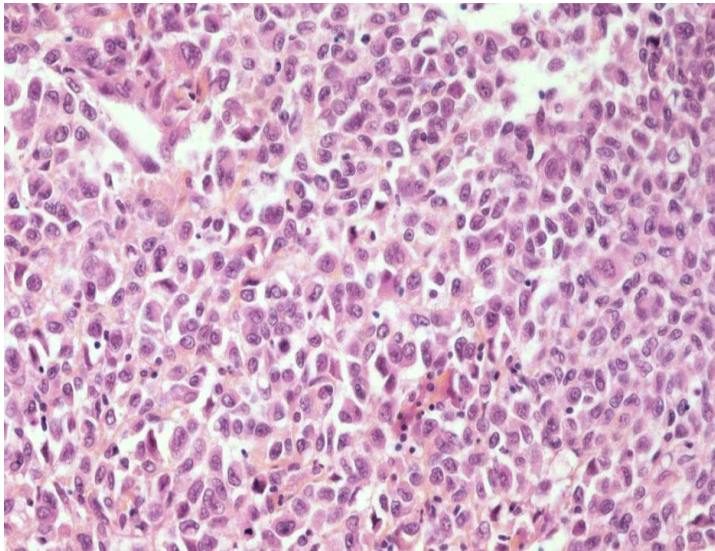


Figure 9 : Carcinome pulmonaire non à petites cellules (peu différencié)

1.4. Immunité antitumorale et immuno-édition

Au cours des dernières décennies, les facteurs classiques de risque de survenue, de progression et influençant le pronostic des CBNPC ont été agrémentés par d'autres facteurs constituant une discipline plus globale et en plein essor : l'onco-immunologie. En effet, sont venus s'ajouter aux piliers classiques de l'oncogénèse,

représentés par les « hallmarks of cancer » de Hanahan et Weinberg, un concept tout aussi fondamental, prenant en compte non seulement la tumeur, mais aussi son hôte, qui est celui de la rupture dans la surveillance immunitaire et de l'échappement à l'immunité anti-tumorale (Dunn et al. 2002; Zitvogel, Tesniere, and Kroemer 2006).

Le rôle du système immunitaire dans le développement des tumeurs se comprend assez globalement selon différents aspects : certains cancers sont « induits » par des virus contre lesquels le système immunitaire a un rôle de détection et d'élimination dont l'intégrité est protectrice contre le développement de ces pathogènes et des tumeurs associées (Leone 1973). Par ailleurs, un contexte local et/ou systémique d'inflammation chronique est favorable à la genèse et la prolifération tumorale, or en favorisant l'élimination d'agents pathogènes pro-inflammatoires le système immunitaire prévient, au moins partiellement, l'entretien d'un tel contexte (Ruppert et al. 2015). Enfin l'immunité de l'hôte a la capacité de repérer et détruire les cellules tumorales et ainsi de prévenir ou contrôler le développement de néoplasies.

Malgré ces différents éléments, certaines cellules tumorales échappent à cette surveillance immunitaire, introduisant le concept d'immuno-édition (Vesely and Schreiber 2013; Mittal et al. 2014; O'Donnell, Teng, and Smyth 2019). L'immuno-édition se décompose en trois principales phases qui sont la phase d'élimination, la phase d'équilibre et la phase d'échappement.

La phase d'élimination correspond à la reconnaissance d'antigènes de cellules tumorales « transformées » par le système immunitaire de l'hôte. Globalement, comme lors d'une agression par un organisme du non-soi, deux grands mécanismes se mettent en œuvre. Tout d'abord, la réponse immunitaire innée faisant intervenir majoritairement des cellules macrophagiques et des natural killer (T) puis secondairement une réponse immunitaire adaptative qui implique une réponse

humorale et une réponse à médiation cellulaire complexe incluant notamment les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques en particulier), les lymphocytes et différents signaux régulateurs dont le point de contrôle immunitaire (checkpoint) programmed cell death 1 (PD-1) et son ligand (PD-L1) (Vesely et al. 2011).

Le principe d'immunosurveillance est particulièrement illustré, au-delà de modèles expérimentaux multiples notamment chez la souris (DuPage et al. 2012 ; Teng et al. 2015 ; Buqué and Galluzzi 2018), par l'incidence élevée de pathologies tumorales malignes dans différentes situations cliniques d'immunodépression ou suppression. Ainsi, chez des patients greffés et traités par immunosuppresseurs le risque de cancers induits (cutanés, pulmonaires ou autres) est plus important que dans la population générale (Dinh and Chong 2007; Ekström, Riise, and Tanash 2017). De même, les malades porteurs de déficience entraînant un dysfonctionnement des différents effecteurs de l'immunité, comme une déficience des cellules NK ou ceux ayant une gammopathie monoclonale bénigne, sont prédisposés à la survenue d'une pathologie néoplasique (Hayakawa, Kobayashi, and Yata 1986; Landgren et al. 2019). De manière similaire, les patients infectés par le VIH qui entraîne une immunodéficience, ont un risque élevé de développement une pathologie tumorale (Vangipuram and Tying 2019).

Malgré cette immuno-surveillance, même fonctionnelle, certaines cellules cancéreuses ne sont pas éliminées, la progression et la croissance tumorale se poursuivent tout en restant contrôlées par le système immunitaire. A ce stade de développement, la tumeur et son hôte entrent dans une phase dite d'équilibre. Durant cette phase, la tumeur n'est pas détectable cliniquement, car maintenue en dessous d'une certaine taille. Cette phase de "latence", dont le concept et les

mécanismes associés sont plus difficiles à mettre en évidence et différencier des deux autres phases, est rendu possible grâce à l'immunité adaptative. En effet, certains auteurs ont pu montrer, sur des tumeurs induites à des souris déplétées en lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ ou en interféron γ (INF γ) que l'équilibre était une phase différente que l'élimination ou l'échappement, avec des cellules néoplasiques qui se transforment mais prolifèrent très peu *in vivo* (Koebel et al. 2007). C'est cette phase qui serait responsable du délai de latence entre la transformation cellulaire initiale et la possible détection clinique de la tumeur. Une conséquence de cette étape d'équilibre entre la tumeur en formation et le système immunitaire consiste en l'émergence, au sein d'une population tumorale hétérogène, de clones échappant à cette veille immunitaire, et auraient acquis un certain nombre de caractéristiques leur permettant d'assurer une transition vers la phase d'échappement (Jäger et al. 1996). Il s'agit de l'immuno-sélection.

La transition entre phase d'équilibre et d'échappement est très probablement progressive avec la poursuite de l'immuno-sélection des variants cellulaires tumoraux les moins immunogènes. A ce phénomène vient s'ajouter l'immuno-subversion correspondant au développement de mécanismes permettant l'augmentation de la tolérance de l'hôte envers sa tumeur. Le processus d'immuno-sélection permet en particulier de bloquer la reconnaissance et détection des cellules tumorales par l'immunité en diminuant l'immunogénicité de la tumeur par défaut de présentation antigénique (Zitvogel, Tesniere, and Kroemer 2006). Quant à l'immuno-subversion, il s'agit d'un processus plus dynamique qui a pour principe de réprimer un grand nombre de cellules immunitaires normalement impliquées dans la défense anti-tumorale, via des signaux inhibiteurs agissant directement ou indirectement sur les lymphocytes, les cellules dendritiques, les macrophages ou les cellules myéloïdes

suppressives (Quaranta and Schmid 2019; Kottke et al. 2017; Seo and Tokura 1999).

La barrière que représente le système immunitaire contre le développement tumoral peut donc être dépassée dans certaines conditions qui dépendent à la fois de la tumeur elle-même et de l'hôte. Les interactions dynamiques existant entre ces deux entités incluent notamment le système immunitaire dont la compréhension des mécanismes impliqués donne lieu au développement croissant d'outils thérapeutiques, pronostiques, ou prédictifs de réponse aux traitements.

Chapitre 2. Le microenvironnement immunitaire

Le microenvironnement tumoral est un système dynamique et diversifié composé de nombreux types cellulaires différents, présentant des interactions, comme des cellules épithéliales, endothéliales, ou immunitaires ainsi que d'une matrice extracellulaire constituée notamment de collagène et de fibronectine (voir Figure 11 à la fin du chapitre 2.1.). La localisation, le phénotype, l'organisation et le degré d'infiltration des cellules immunitaires peuvent varier d'une manière importante entre les patients pour un même type de tumeur, mais aussi en fonction du type de tumeur (Milette et al. 2019; Altorki et al. 2019; Wood et al. 2014). Selon le concept d'immuno-édition, les nombreuses interactions entre l'hôte et la tumeur via l'immunité et le microenvironnement ont une importance fondamentale dans l'émergence, la prolifération et la dissémination des tumeurs pulmonaires. Nous allons détailler ci-

dessous les principales cellules impliquées dans ce processus en insistant sur les points de contrôle (check-point) immunitaires, en particulier PD-1/PD-L1.

2.1. Principaux acteurs cellulaires de l'immunité antitumorale

Il existe deux grands systèmes de défense distincts qui interviennent dans la réponse immunitaire de l'hôte : la réponse immunitaire innée ou non spécifique et la réponse immunitaire adaptative dite spécifique qui se dichotomise en immunité à médiation cellulaire et à médiation humorale.

2.1.1. La réponse immunitaire innée

Physiologiquement, il s'agit de la première ligne de défense contre ce que l'organisme identifie comme du « non-soi ». Les cellules majeures de ce système de défense immunitaire sont les cellules dendritiques, les macrophages, et les lymphocytes dits « natural killer » (NK) :

- **Les cellules dendritiques** (CD) ont été initialement décrites par Langerhans au niveau de l'épiderme puis par Steinman et Cohn qui leur donnèrent leur dénomination définitive (Rowley and Fitch 2012). Les CD sont issues de précurseurs myéloïdes, communs avec les granulocytes et macrophages, qui vont se différencier grâce à des facteurs de croissance comme le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (R. M. Steinman and Banchereau 2007). Les CD immatures peuvent phagocytter des antigènes et migrer vers des organes lymphoïdes

où elles mûrissent secondairement. Elles sont également retrouvées dans des organes lymphoïdes dits tertiaires (peau, systèmes respiratoire et digestif,..), décrits dans le microenvironnement tumoral, en particulier des CBNPC (W. H. Fridman et al. 2014; de Chaisemartin et al. 2011 ; Dieu-Nosjean et al. 2008a). Leur maturation se traduit par une surexpression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH de classe I et II) et par une surexpression des molécules de co-stimulation servant notamment à l'activation des lymphocytes T. Les cellules dendritiques ainsi mûries ont perdu leur capacité de phagocytose, mais présentent à leur surface les épitopes reconnaissables par les lymphocytes. Les cellules dendritiques mûres expriment en particulier la molécule DC-LAMP (dendritic cell-lysosomal associated membrane protein), une glycoprotéine transmembranaire qui est un marqueur intéressant pour évaluer la présence de cette population cellulaire et de son phénotype au sein du microenvironnement (Salaun et al. 2004; L.-C. Zhu et al. 2007). Les trois fonctions principales des CD sont la présentation antigénique permettant d'initier la réponse immunitaire adaptative que nous détaillerons plus loin, la sélection négative de lymphocytes T permettant entre autres l'immunotolérance du « soi », et la sécrétion de chimio ou cytokines entraînant la différenciation des lymphocytes T. La réponse Th1, à médiation cellulaire, est mise en place lorsque les cellules dendritiques sécrètent de l'interleukine-12 (IL-12), permettant aux lymphocytes T CD4+ immatures de se différencier en cellules Th1 qui produisent de l'interféron gamma (IFN- γ) utile notamment à la défense contre les germes intracellulaires. Quant à la réponse à médiation humorale Th2, elle est mise en jeu en l'absence de sécrétion d'IL-12 par les CD, et les lymphocytes ainsi différenciés qui s'y associent participent à la maturation et à la différenciation des lymphocytes B via la sécrétion d'interleukines (IL-4,-5,-13) (L. Steinman 2007).

Le rôle des CD dans l'immunité anti-tumorale consiste, en particulier, à présenter des peptides exogènes sur leurs molécules du CMH II aux lymphocytes T CD4+ et sur leurs molécules du CMH I aux lymphocytes T CD8+ (Hansen and Andersen 2017).

- **Les macrophages**, observés et définis depuis le IXXème siècle, sont des cellules monocytaires ayant quitté la circulation sanguine pour atteindre les tissus. Il en existe deux grands types : les macrophages M1 induits par l'IL-12, l'IFN- γ , et le TNF- α ; puis les macrophages M2 induits eux par les interleukines IL-4 et -13. Les macrophages M1 servent à éliminer et contrôler les cellules tumorales quand les M2 ont plutôt un rôle favorisant l'échappement à l'immunité anti-tumorale (Najafi et al. 2019). Certains macrophages du microenvironnement ont notamment la capacité d'empêcher la pénétration des lymphocytes CD8+ cytotoxiques à l'intérieur des tumeurs où ils pourraient y exercer leur activité anti-tumorale (Peranzoni et al. 2018).

- **Les cellules natural killer (NK)**, décrites au cours des années 70, dérivent de précurseurs lymphoïdes médullaires (Herberman et al. 1975). Ce sont des lymphocytes qui n'ont pas de TCR (T cell receptor), ne sont pas classables en lymphocytes de type B ou T, et qui expriment les marqueurs CD56, NKp46, et CD16. Leurs fonctions principales sont le contrôle précoce d'infections (virales surtout), et l'immuno-surveillance des néoplasies (Terunuma et al. 2008). Les NK reconnaissent leur cible grâce à la présence à leur surface de récepteurs et exercent leurs fonctions cytolytiques par action directe et sécrétion de granules lytiques (granzyme et perforine), ou indirecte via des anticorps présentant une activité cytotoxique (ADCC, antibody dependant cell cytotoxicity), ou via la sécrétion d'IFN- γ ou autre cytokines. Dans les CBNPC et le cancer en général, les cellules NK sont activées par la perte

des molécules de CMH I par les cellules tumorales, ou par reconnaissance de ligands activateurs exprimés par les cellules transformées (Aktaş et al. 2018). Lors de l'échappement du contrôle immunitaire, il semble que certaines cellules NK aient un phénotype altéré entraînant leur perte de capacité de reconnaissance et de cytolysse des cellules néoplasiques (Platonova et al. 2011).

2.1.2. La réponse immunitaire adaptative

C'est cette partie du système immunitaire qui nous intéresse plus particulièrement dans ce travail, car elle met en jeu un ensemble complexe d'interactions, incluant des acteurs cellulaires et des signaux co-stimulateurs ou -inhibiteurs, dont le checkpoint PD-1/PD-L1, que nous allons détailler :

- **Les lymphocytes T** sont des piliers de l'immunité en général et anti-tumorale en particulier. Ces cellules se différencient, sont éduqués et sélectionnés dans le thymus qui involue à l'âge adulte en conditions physiologiques (Rodewald 2008). Les lymphocytes qui sont positivement sélectionnés sont ceux qui ont été en contact avec des antigènes présents sur des molécules du CMH tandis que ceux qui ne l'ont pas été entrent en apoptose. A l'inverse, la sélection négative permet une élimination de lymphocytes interagissant de manière trop intense avec des auto-antigènes.

L'ensemble des lymphocytes T expriment CD3 et le TCR primordial à l'induction d'un signal immunitaire par la reconnaissance des peptides présentés sur les molécules du CMH exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (Adiko et al. 2015; R. N. Germain 1994).

Il existe plusieurs types de lymphocytes T : les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+), auxiliaires (CD4+), régulateurs (Treg), et dits NKT, car présentant des caractéristiques intermédiaires entre lymphocytes T et cellules NK.

- **Les lymphocytes T auxiliaires CD4+** (helper, en anglais) ont pour rôle principal de recruter et de stimuler des effecteurs cellulaires de l'immunité. La différenciation des lymphocytes CD4+ naïfs se fait, après stimulation par des cytokines (IL-4, IL-12, TGF- β , en particulier), en différentes entités T helper de type 1, 2, ou 17 (Th1, Th2, et Th17), et en Treg (Seder and Paul 1994). Ces différents sous-types de lymphocytes T CD4+ se caractérisent par les cytokines qui s'y associent, ainsi les Th1 produisent de l'IFN- γ , de l'IL-2 et du tumor necrosis factor α (TNF- α) alors que les Th2 sécrètent les interleukines IL-4, -5, -6, -10, notamment et les Treg de l'IL-10 et -13 ainsi que du TGF- β . La différenciation et développement de ces sous-types cellulaires est (Kelso et al. 1991).

- **Les lymphocytes T CD8+** (cytotoxiques) sont également fondamentaux dans l'immunité anti-tumorale. Ces lymphocytes sont principalement activés par la présentation au niveau de leur TCR d'épitopes présents sur le complexe CMH I de cellules dites présentatrices d'antigène (CPA), comme les cellules dendritiques, et peuvent ensuite lyser leur cible via libération d'enzymes cytotoxiques, à la manière des NK décrits précédemment (Mitrücker, Visekruna, and Huber 2014). Plus précisément, la réalisation d'une réponse immunitaire spécifique à un antigène met en jeu des signaux d'immuno-modulation : un premier signal résultant de l'interaction du TCR porté par le lymphocyte et le complexe peptide-CMH porté par une CPA (le plus souvent une CD mature), puis un second signal dit co-stimulateur qui induit un

phénotype « actif » des lymphocytes CD8+. Cette deuxième étape fait intervenir des molécules B7-1 et B7-2 (CD80 et CD86, respectivement) présentes à la membrane des CD et qui sont reconnues par les lymphocytes T via CD28. L'activation des lymphocytes est, en situation physiologique, contrebalancée par des signaux inverses dits co-inhibiteurs, afin notamment de limiter les phénomènes d'auto-immunité. Ces signaux inhibiteurs représentent en particulier des couples ligand/récepteur appelés check-point immunitaires, incluant CTLA-4, TIM-3, LAG-3, et PD1/PD-L1 (Perez-Gracia et al. 2014). Enfin, après leur activation, les lymphocytes CD8+ ont besoin, pour proliférer, d'un 3^{ème} signal dépendant de voies de signalisation cellulaire de survie ou prolifération comme PI3K/AKT, et MAPK qui sont activées par les signaux co-stimulateurs ou par le TCR (Figure 5).

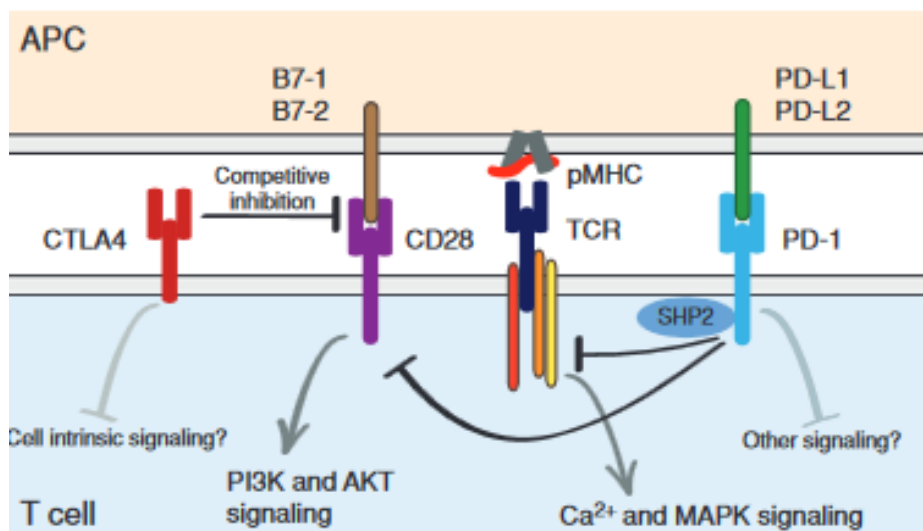


Figure 10 : Schéma des interactions moléculaires induites par la liaison de récepteurs induisant un signal co-inhibiteur (CTLA4 et PD-1) ou co-stimulateur (CD28) avec leurs ligands respectifs. L'activation de signal co-stimulateur ou du TCR, par interaction entre cellule présentatrice d'antigène (APC) et lymphocyte T, entraîne la stimulation de voies de signalisations de survie ou prolifération cellulaire comme PI3K/AKT et MAPK. On voit également que l'activation du point de contrôle immunitaire PD-1/ligand inhibe le TCR et le CD-28 (Wei, Duffy, and Allison 2018)

- **les lymphocytes B** sont responsables de la réponse immunitaire humorale par production d'anticorps faisant suite à leur activation consécutive à la reconnaissance d'antigène. Les lymphocytes B jouent également le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (Chung, Silverman, and Monroe 2003). Ces lymphocytes se trouvent généralement dans les ganglions, la rate, et la circulation systémique, mais peuvent également résider dans des ganglions lymphoïdes tertiaires notamment dans les cancers « solides » (Colbeck et al. 2017). L'importance de l'organisation lymphocytaire au sein de structures lymphoïdes tertiaires ainsi que la présence de cellules dendritiques matures associées, a été de nouveau, démontrée dans des études récentes notamment dans le cadre de tumeurs comme le sarcome et de leur réponse à l'immunothérapie (Petitprez et al. 2020). Au sein des différents types de néoplasies, le rôle des lymphocytes B dans l'immunité anti-tumorale est controversé, certains effets étant pro et d'autre anti-tumoraux. Dans les CBNPC tous stades confondus, la présence simultanée et dense de follicules lymphoïdes et de CD matures représenterait un biomarqueur significatif de bon pronostic (C. Germain et al.2014).

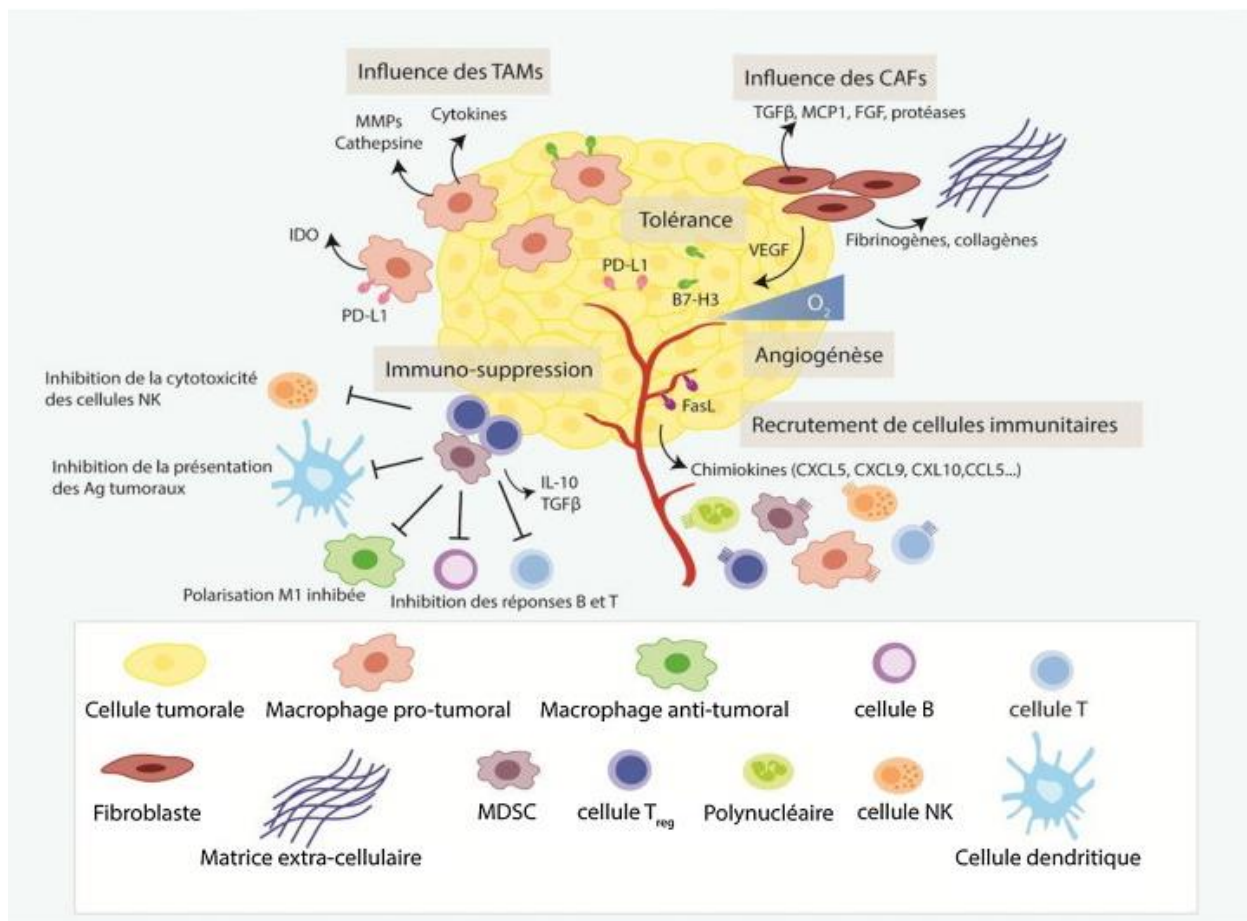


Figure 11 : Représentation d'une tumeur et de son microenvironnement incluant les différents types cellulaires endothéliaux, épithéliaux et surtout immunitaires qui sont détaillés à la suite de cette figure. On notera que sont reportés les effets sur la tolérance immunitaire et l'immuno-suppression engendrée sur les lymphocytes et cellules présentatrices d'antigènes, ainsi que l'influence des fibroblastes ou macrophages associés aux tumeurs. Les MDSC sont des cellules dérivées de la moelle ayant également un effet immunosuppresseur (Desbois, Champiat, and Chaput 2015)

- la présentation de néoantigènes et immunogénicité tumorale

Les mutations dans les cellules tumorales peuvent donner naissance à des protéines anormales, dont des fragments, appelés néoantigènes, sont affichés à la surface des cellules liées aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Si un néoantigène est reconnu par une cellule T CD8+, cette cellule peut cibler et détruire toutes les cellules tumorales qui expriment ce néoantigène. Cependant, cette réponse cytotoxique peut être bloquée, par exemple, par un micro-environnement immunosuppresseur. Les traitements d'immunothérapie ciblant les points de contrôle immunitaire peuvent permettre aux lymphocytes T CD8 de déclencher une réponse

immunitaire efficace contre la tumeur. De nombreuses recherches en immunothérapie se concentrent sur les cellules T CD8. Cependant, il semble de plus en plus que les lymphocytes T CD4 + puissent également jouer un rôle clé dans les réponses immunitaires ciblant les tumeurs (E. Tran et al. 2014; Borst et al. 2018). Les résultats d'une étude récente mettent en évidence la nécessité pour une tumeur d'exprimer des néoantigènes reconnus à la fois par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ pour générer une réponse efficace au blocage de check-points immunitaires (Alspach et al. 2019). Les données de cette étude démontrent que les lymphocytes T CD4 non seulement facilitent l'amorçage (ou priming en anglais) des lymphocytes T CD8, mais collaborent également avec ces lymphocytes T CD8 au niveau du site tumoral pour maintenir une réponse antitumorale significative de l'immunothérapie. Le mécanisme permettant cette collaboration reste à déterminer plus en profondeur même si l'implication de l'interféron- γ (IFN- γ) pourrait être nécessaire permettant cette collaboration. L'IFN- γ est produit par les lymphocytes T CD8 et les lymphocytes T auxiliaires CD4 et peut aider à contrebalancer un microenvironnement tumoral globalement immunosuppresseur (Castro et al. 2018). Les tumeurs qui répondent à l'immunothérapie sont associées à la présence de cellules immunitaires activées appelées macrophages qui expriment la protéine iNOS. Les lymphocytes T auxiliaires CD4 seuls ne sont pas suffisants pour entraîner cette expression iNOS dans les macrophages, et les lymphocytes T CD8 sont également nécessaires, suggérant une interaction entre ces trois types cellulaires (Corthay et al. 2005).

2.2. Le point de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1

Parmi les check-point immunitaires précédemment cités, le couple PD-1/PD-L1 joue un rôle fondamental dans l'immunité et dans les mécanismes d'échappement mis en

place par les tumeurs pulmonaires, c'est pourquoi il a fait et fait encore actuellement l'objet d'une multitude de travaux et de développement thérapeutiques.

2.2.1. Régulation de PD-L1

PD-L1 est codé par le gène PDCDL1 qui se trouve sur le chromosome 9 chez l'homme, à la position p24.1.2. Décrit pour la première fois par Dong et al en 1999 sous le nom de B7-H1. La longueur totale de PD-L1 est codée dans sept exons, ce qui correspond à une protéine de 40 kDa de 290 acides aminés (Figure 12).

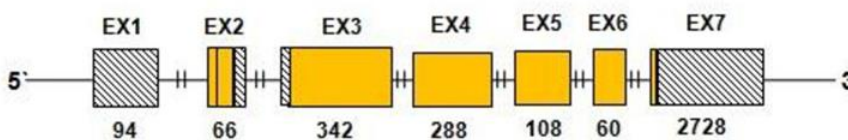


Figure 12 : Séquence de PD-L1 humain montrant les 7 exons et leur taille (Shi et al. 2013)

L'expression de PD-L1 peut être constitutive ou inducible. On peut trouver une expression constitutive faible de PD-L1 sur des lymphocytes non activés, des cellules présentatrices d'antigène et dans des cellules cornéennes, syncytio-trophoblastiques ou des cellules des îlots de Langerhans, où elle contribue à l'homéostasie tissulaire dans les réponses pro-inflammatoires. Dans le contexte d'une inflammation et / ou d'une infection, PD-L1 est induite afin d'induire les phénomènes de tolérance immunitaires. Des acteurs majeurs de la régulation de PD-L1 sont les récepteurs 1 et 2 de l'IFN- γ , qui vont pouvoir stimuler le promoteur de PD-L1 au niveau de son élément de réponse, en grande partie via stimulation de la voie Jak/STAT aboutissant à l'activation de facteurs de transcription (IRF), et (Figure 13).

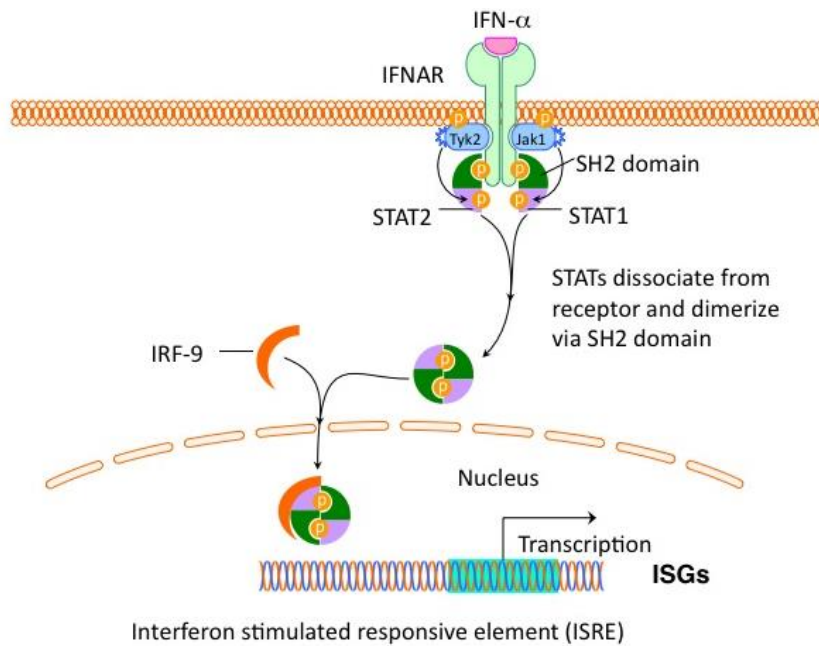


Figure 13 : Mécanismes impliqués dans la signalisation IFN- γ et son récepteur. Après liaison, JAK1 est activée permettant la phosphorylation et dissociation de STAT1/2 et leur dimérisation permettant l'association à IRF, leur entrée dans le noyau pour jouer leur rôle de facteur de transcription par stimulation de promoteur au niveau des éléments de réponse à l'interféron (ISRE) (Masumi 2013)

L'activation de la voie Jak/STAT par IFN- γ peut également up-réguler l'expression de PD-L1 par les voies de signalisation MEK/ERK et PI3K/AKT, et la phosphorylation de mTOR.

Dans un contexte de cancer, PD-L1 peut être surexprimé à la suite de l'activation de drivers oncogéniques évoqués précédemment. Les mutations du récepteur de l'EGF (EGF-R), par exemple, entraînent une addiction oncogénique de la tumeur et une suractivation des voies de signalisation d'aval de ces récepteurs entraînant potentiellement une augmentation de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales. Il existe d'ailleurs une expression de PD-L1 significativement plus importante dans les CBNPC présentant une mutation EGF-R et certains traitements développés pour inhiber EGF-R entraînent une down-régulation de la transcription de PD-L1. Dans d'autres types de tumeurs comme celles présentant une mutation de

PTEN, il existe une surexpression de PD-L1 qui est favorisée par une activation soutenue de la voie PI3K/AKT. Par ailleurs, dans le lymphome à cellules T, le gène de fusion NPM/ALK favorise l'up-régulation de PD-L1 via l'activation constitutive de STAT-3. Le rôle des différentes protéines de la famille STAT semble en effet important dans l'expression de PD-L1, celles-ci étant souvent évoquées dans les études investiguant les mécanismes impliqués dans cette régulation.

L'expression de PD-L1 est également influencée par les récepteurs de type toll (ou toll-like receptors, TLR), fortement exprimés par les CPA et activés par différents types de pathogènes et organismes du « non soi ». La régulation de PD-L1 par les TLR repose avant tout sur l'activation de kinases comme MEK/ERK (Figure 14).

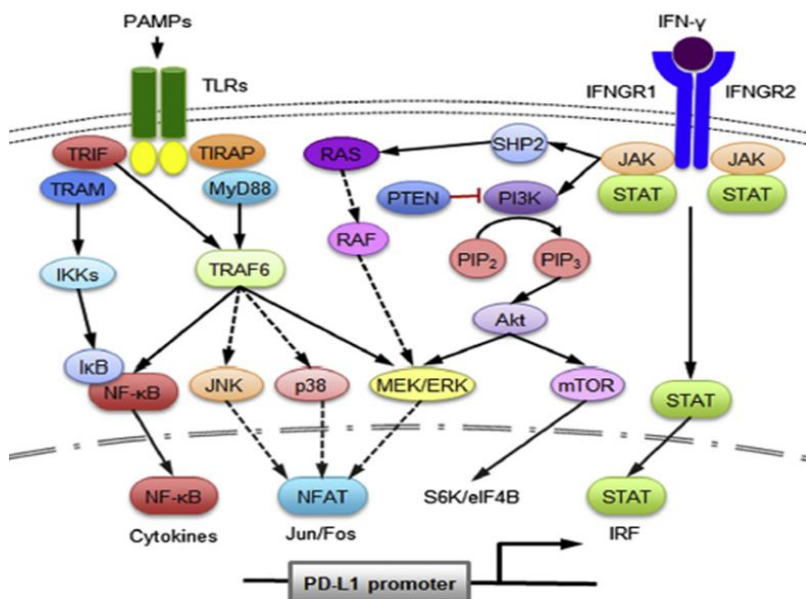


Figure 14 : Voies de signalisation régulant l'expression de PD-L1. La transduction du signal via PAMP et IFN- γ entraîne la phosphorylation de NF- κ B, MAPK (JNK, p38 et ERK), mTOR et STAT. La signalisation d'aval médiée par ces molécules déclenche la translocation nucléaire de divers facteurs de transcription qui se lient au promoteur de PD-L1 et induisent en outre la transcription et la traduction de PD-L1 (Ritprajak and Azuma 2015).

Comme dans tout type de protéines, la régulation de PD-L1 est complexe et peut intervenir à de nombreux niveaux, pas seulement transcriptionnel mais aussi par des

mécanismes de régulation post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle qui doivent encore être clarifiés (Zerdes et al. 2018).

2.2.2. Description et fonction

Le récepteur PD-1 est une protéine transmembranaire de la famille des protéines B7-CD28 qui, globalement, régulent l'équilibre entre signaux co-inhibiteurs et co-stimulateurs. Il possède deux ligands différents que sont PD-L1 (également nommé B7-H1 ou CD274), et PD-L2 (ou B7-DC et CD273) (Greenwald, Freeman, and Sharpe 2005). Le récepteur PD-1 se localise à la membrane des lymphocytes T CD4+, CD8+, NK, des lymphocytes B, et de certains monocytes. Les autres membres de la famille CD28 sur les lymphocytes T sont plus marginaux que celle de PD-1, de même PD-L1 est plus largement exprimé que PD-L2. Le ligand PD-L1 est lui, en effet, exprimé sur les cellules B, les CD, les macrophages, les mastocytes, les cellules T dérivées de la moelle osseuse, des cellules endothéliales et épithéliales, et par certaines cellules tumorales. Généralement la liaison d'un ligand à PD-1 sur les lymphocytes T entraîne leur inhibition (Keir, Francisco, and Sharpe 2007). C'est pourquoi, en situation physiologique, l'axe PD-1/PD-L1 joue un rôle pivot dans la tolérance immunitaire et la prévention des phénomènes d'auto-immunité.

PD-1 et ses ligands sont des protéines transmembranaires qui comprennent un domaine extracellulaire, une région transmembranaire et une partie terminale dans le cytoplasme. De même, PD-L1 est une glycoprotéine transmembranaire de type I composée de domaines typiques d'IgC et d'IgV (Figure 15).

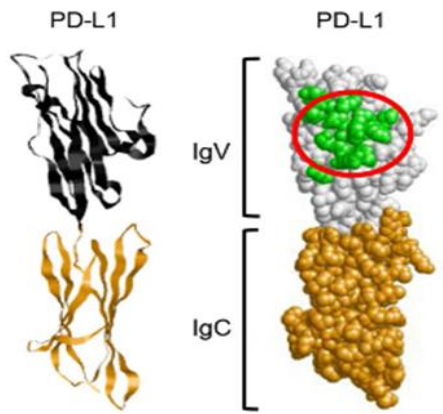


Figure 15 : Structure tridimensionnelle du ligand PD-L1 montrant un domaine proximal de type IgV, et un domaine distal de type IgC. La zone verte entourée de rouge correspond au site de liaison avec le récepteur PD-1 (Ostrand-Rosenberg, Horn, and Alvarez 2015).

Les fonctions biologiques de PD-L1 dépendent de la liaison avec son récepteur PD-1 dont la partie distale intracellulaire est appelée « immunoreceptor tyrosine-based switch motif » (ITSM). La phosphorylation d'un résidu tyrosine dans le domaine ITSM de PD-1 conduit au recrutement de la tyrosine phosphatase 2 contenant un domaine SH2 (SHP-2), qui est responsable de la déphosphorylation de certains transducteurs de signal à proximité du TCR dans la synapse immunologique, comme ZAP-70 (zeta-chain-associated protein kinase 70), JNK (c-Jun terminal kinase), CD3 ζ , PKC θ et ERK (Yokosuka et al. 2012). Ainsi, l'activité PI3K induite par CD28 (une molécule de costimulation) est diminuée et, par conséquent, conduit à une moindre activation d'AKT. La réponse inhibitrice induite est secondaire à l'inactivation de voies de signalisation comme PI3K/AKT et Ras/ERK. Plus en détail, la déphosphorylation de la caséine kinase 2 (CK-2), cible de SHP-2, conduit à l'activation de PTEN qui est un antagoniste physiologique de la voie PI3K/AKT. Concernant l'inhibition de la voie Ras/ERK par activation PD-1/PD-L1, elle dépend principalement de l'inhibition directe de Ras et de la déphosphorylation de phospholipase C γ (Bivona et al. 2003). Plus globalement la régulation négative entraînée par la signalisation PD-1/ligand

conduit à une diminution de la libération des cytokines et chimiokines, une diminution de la cytotoxicité des lymphocytes T ainsi qu'une inhibition des signaux de survie cellulaire (Figure 16).

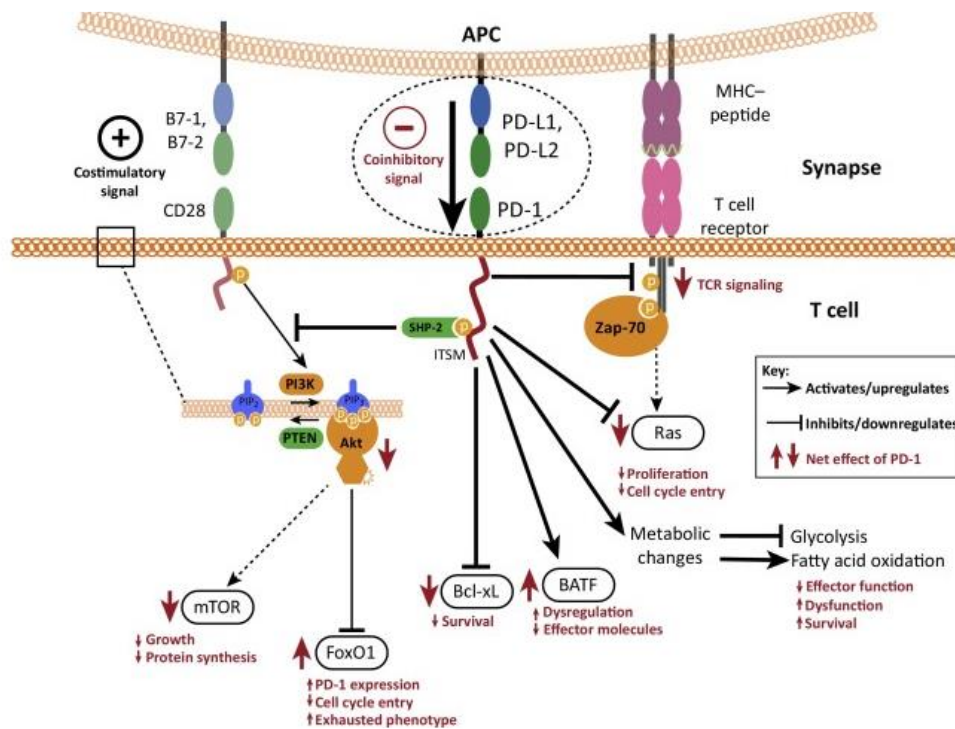


Figure 16 : « Synapse immunologique » réalisée entre une cellule présentatrice d'antigène (APC) et une cellule T. En dehors des interactions existant entre le peptide présenté sur le CMH et le TCR de la cellule T ainsi qu'entre B7-1 et CD28 (signal costimulateur), on peut constater la liaison PD-1/PD-L1 (signal co-inhibiteur). Cette liaison entraîne une cascade de signalisation inhibant la voie de prolifération PI3K/AKT/mTOR ainsi que Ras et Bcl, notamment. Les effets résultants consistent en une diminution de la croissance et survie des cellules T ainsi qu'une baisse de leurs capacités effectrices (Chinai et al. 2015).

Selon le type de cellules concernées, la liaison PD-1/PD-L1 ou dans une moindre mesure PD-L2, résulte en différents événements, et a notamment diverses conséquences sur le phénotype et l'activité des lymphocytes T. Par exemple, les lymphocytes T effecteurs CD8+ exprimant PD-1, la liaison de PD-L1 sur son récepteur inhibe la fonction du TCR et la signalisation co-stimulatrice, entraînant

l'apoptose, l'anergie et l'épuisement (ou exhaustion) des cellules T (Wherry 2011; Wherry and Kurachi 2015). L'épuisement ou exhaustion immunitaire, c'est-à-dire l'altération progressive des fonctions effectrices des lymphocytes T après présentation antigénique durable, est un mécanisme de régulation qui empêche la destruction des tissus lors d'une infection chronique. Une des principales caractéristiques de l'épuisement des lymphocytes T est qu'elle s'effectue par l'activation simultanée de plusieurs signaux co-inhibiteurs, dont PD-1/PD-L1. Ces phénomènes d'exhaustion ont notamment lieu dans des infections virales, comme le VIH et certaines hépatites, où les signaux co-inhibiteurs entraînent l'apoptose, l'inhibition de la réplication et de la maturation des lymphocytes T effecteurs, ainsi que l'induction parallèle de cellules T régulatrices (Butte et al. 2007 ; Charlton et al. 2013; L. Chen 2004). En effet, la liaison de PD-L1 à PD-1 sur des lymphocytes Treg favorise leur prolifération, et sur des cellules T naïves entraîne la différenciation des lymphocytes T CD4 + vers le sous-type TH1.

Dans certaines situations, l'activation de PD-1/PD-L1 peut protéger les cellules contre l'attaque de cellules T cytotoxiques en réduisant leur temps avec la cible (Keir, Francisco, and Sharpe 2007; Francisco, Sage, and Sharpe 2010; Fife and Pauken 2011). Dans le thymus, il a été montré qu'une expression importante de PD-L1 où son interaction avec PD-1 empêche la prolifération et la différenciation des lymphocytes T naïfs (Probst et al. 2005). La voie de signalisation PD-1/PD-L1 est physiologiquement cruciale pour permettre la tolérance immunitaire, un processus de sélection négative de lymphocytes autoréactifs se déroulant dans les organes lymphoïdes primaires (tolérance centrale) et secondaire (tolérance périphérique). En outre, l'inactivation de PD-1 / PD-L1, sur des modèles *in-vivo*, conduit à des phénomènes d'auto-immunité (Nishimura et al. 1999).

En résumé, l'axe PD-1/PD-L1 joue un rôle physiologique primordial dans la régulation des lymphocytes T et la découverte de l'expression « détournée » de PD-L1 par certaines cellules tumorales en vue d'échapper à leur détection et/ou élimination par le système immunitaire de l'hôte, en a naturellement fait une cible thérapeutique majeure.

2.2.3. Rôle de PD-1/PD-L1 dans la régulation de la réponse immunitaire anti-tumorale

La mise en évidence de l'importance du point de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1 dans la régulation des interactions cellulaires du microenvironnement tumoral a été un élément fondamental de nombreuses avancées dans le domaine de l'oncoimmunologie. En effet, une sur-activation de PD-1 se rencontre fréquemment dans les lymphocytes infiltrant de nombreux types de tumeurs « solides » (tumor infiltrating lymphocyte, TILS), où l'expression de PD-L1 est « exploitée » par les cellules malignes pour échapper à leur élimination par le système immunitaire. Globalement, en plus de l'interaction entre une CPA (cellule dendritique ici) et un lymphocyte T CD8+ la liaison PD-1/PD-L1 va entraîner une polarisation des lymphocytes CD4+ (via la voie du TGF β) en phénotype Treg qui vont à leur tour inhiber les CD8+ effecteurs. Il en va de même des macrophages M2 qui ont un rôle immunosuppresseur s'exerçant directement sur les CD8+ cytotoxiques par PD-1/PD-L1, ou indirectement via PD-1/PD-L2 et les lymphocytes Th2. La modulation des T CD8+ par des cellules stromales comme les fibroblastes associés aux tumeurs s'effectue aussi par l'intermédiaire de la signalisation PD-1/PD-L1. Enfin, les cellules tumorales échappent notamment à l'effet cytotoxique des CD8+ grâce au signal co-

inhibiteur PD-1/PD-L1 dont l'expression du ligand PD-L1 est elle-même entretenue par l'interferon- γ (IFN- γ) (Figure 17).

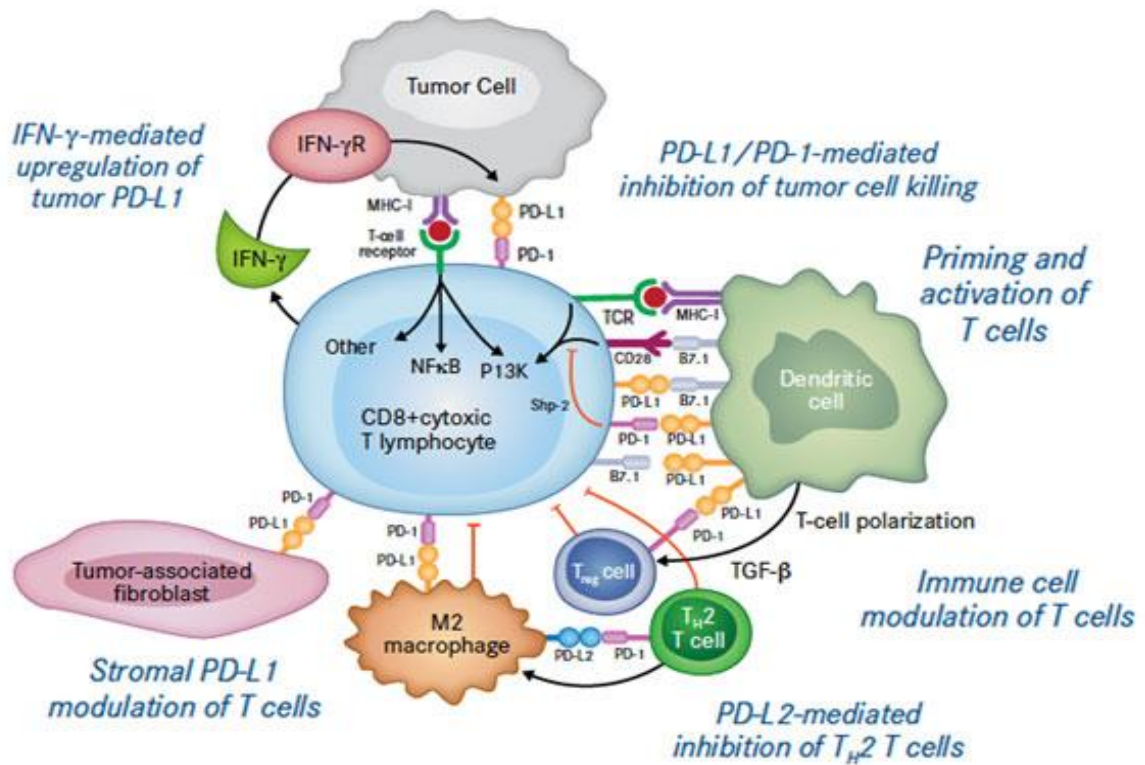


Figure 17: Impact de la signalisation impliquant PD-1/(PD-L1/PD-L2) sur les cellules du microenvironnement immunitaire et sur les cellules tumorales (Cohen and Sznol 2015).

Il est, par ailleurs, intéressant de noter que la liaison PD-1/PD-L1 up-régule l'expression de slug, snail et twist, facteurs de transcription intervenant dans la transition épithélio-mésenchymateuse et la migration cellulaire (Q. Yu et al. 2010), via une activation de la voie MAPK, suggérant un lien entre le caractère invasif des tumeurs et le contrôle immunitaire (Pece and Gutkind 2000). Il a été démontré que PD-L1 protège les cellules cancéreuses de l'effet cytotoxique des lymphocytes T CD8+. En effet, la liaison de cellules cancéreuses exprimant PD-L1 sur leur surface à PD-1 exprimée sur des lymphocytes T CD8+ activées, entraîne l'anergie, l'exhaustion et l'entrée en apoptose de ces derniers ainsi que l'affaiblissement des

capacités du système immunitaire de l'hôte à les sélectionner et les adresser correctement. De même, l'activation de l'axe PD-1/PD-L1 entre les cellules tumorales et les T CD8+ altère la fonction cytolytique directe de ces cellules via le TCR (H. Dong and Chen 2003; Azuma et al. 2008; H. Dong et al. 2002 ; Blank, Gajewski, and Mackensen 2005). Dans environ 20 % à 30 % des CBNPC on retrouve une expression de PD-L1 > 50 % des cellules tumorales en immunohistochimie (IHC) (Mei et al. 2019 ; Scheel et al. 2016), dans la limite des tissus analysés et en considérant l'hétérogénéité tumorale.

L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ainsi que par les cellules immunitaires du microenvironnement a un impact sur l'infiltrat lymphocytaire intratumoral et sur la survie, ce qui a été largement étudié dans ce type de cancer avec le plus souvent une influence péjorative sur la survie d'une forte expression de PD-L1 par les cellules tumorales de CBNPC (Konishi et al. 2004; Okita et al. 2017 ; Ohtaki et al. 2018). La valeur pronostique de l'infiltrat immunitaire dans une tumeur dépend de la nature des cellules immunitaires (caractéristiques phénotypiques), de leur densité et de leur localisation (Galon et al. 2012 ; Wolf Herman Fridman et al. 2012). Dans le CBNPC, deux tiers des cellules inflammatoires sont des lymphocytes, dont 80 % de cellules T (Al-Shibli et al. 2008). Dans la plupart des études, une densité importante de T CD8+ au sein de tumeurs pulmonaires est associée à un pronostic plus favorable (Feng et al. 2016 ; Ruffini et al. 2009 ; Horne et al. 2011). En l'occurrence, il a été également montré que la densité de T CD8+ pouvait être inversement corrélée à des facteurs histo-pronostics péjoratifs comme la présence d'embolies intra-vasculaires, suggérant que l'impact positif de l'infiltration lymphocytaire pourrait être liée à la neutralisation de phénomènes métastatiques (Al-Shibli et al. 2008). L'organisation des cellules immunitaires et leur localisation a

également une influence importante puisque la présence de structures lymphoïdes tertiaires également appelés Ti-BALT (tumor-induced bronchus associated lymphoid tissue) est associée à une survie plus élevée dans les CBNPC comme dans des métastases pulmonaires de primitifs extra-thoraciques (Dieu-Nosjean et al. 2008 b ; Goc et al. 2014 ; Schweiger et al. 2016). Certains auteurs ont proposé un score immunitaire basé sur l'identification et le calcul de la densité de populations cellulaires de l'immunité adaptative, notamment les lymphocytes T « mémoires », avec une évaluation de la densité qui était effectuée dans deux localisations distinctes des pièces tumorales (centrale et périphérie). Ce score immunitaire avait une valeur pronostique significative dans les cancers colorectaux, mais n'a pas été validé dans le CBNPC. En effet, l'impact thérapeutique ou pronostique de l'expression de PD-1/PD-L1 par les cellules immunitaires associées à la tumeur (périphérie ou stroma intra-tumoral) dans la prise en charge clinique « de routine » des CBNPC n'est pas consensuel car ne reposant pas sur un niveau d'évidence assez robuste malgré un rationnel solide et une traduction clinique significative dans certaines études (S.-P. Wu et al. 2018). Dans la méthodologie de la thèse nous verrons que nous avons notamment utilisé un score *PD-L1 immunitaire* allant de 0 à 2, afin d'analyser l'effet du cisplatine sur ce paramètre.

Chapitre 3. Cadres thérapeutiques du CBNPC

Les algorithmes de traitement du CBNPC sont en évolution constante et sont régulièrement mis à jour par les différentes sociétés savantes d'oncologie thorax en fonction des avancées et des résultats d'essais cliniques. Globalement, les grands cadres de traitements, que nous allons exposer ci-dessous, sont choisis en fonction du stade de la maladie avec des variantes et des associations qui dépendent des

facteurs pronostics précédemment décrits (nature de la tumeur, paramètres phénotypiques, altérations moléculaires...) et surtout de la condition générale du malade qui est le premier critère pris en compte par le clinicien responsable. Afin de résumer de manière simple les cadres thérapeutiques, il est possible de les répartir en 3 groupes : le traitement des stades précoces (I, II), des stades localement avancés non opérables et métastatiques (IIIB, IIIC, IV), et celui du cas particulier des stades intermédiaires opérables (IIIA) (Detterbeck et al. 2013). Pour rappel, la répartition de ces différents groupes et des traitements associés, précisément rapportée dans le paragraphe relatif au TNM, est globalement de 30% pour les stades précoces, 10% pour les intermédiaires opérables et 60% pour les localement avancés non opérables et métastatiques dont le traitement sera avant tout systémique.

3.1. Traitement des stades précoces

Pour le CBNPC de stade précoce (stades IA, IB et IIA, IIB), le traitement de référence reste la chirurgie d'exérèse malgré des avancées importantes dans l'identification des sous-groupes de patients qui bénéficient le plus de traitements complémentaires ou exclusifs non chirurgicaux qui, eux également, ont beaucoup évolué avec le temps.

Aujourd'hui, les évolutions techniques chirurgicales, l'amélioration de la réhabilitation post-opératoire ainsi que de la prise en charge multidisciplinaire dans des centres experts semblent être associées à un bénéfice pour le patient en termes de pronostic et de qualité de vie (Howington et al. 2013; Batchelor et al. 2019). Brièvement, les principes de l'exérèse oncologique étant de retirer l'ensemble de la maladie

macroscopique avec des marges saines (R0) et souvent d'y associer un prélèvement ou curage systématique des ganglions médiastinaux, à but curatif et surtout de classification de la tumeur (Darling 2013; Osarogiagbon et al. 2012).

Dans une proportion significative de patients, un traitement complémentaire à la chirurgie (adjuvant) permet d'améliorer les résultats en termes de survie sans récurrence et de survie globale. Après analyse de la pièce opératoire en anatomopathologie et évaluation clinique du malade, un traitement adjuvant peut donc être proposé, notamment de la chimiothérapie à base de sels de platine dont le bénéfice est fermement établi pour les tumeurs de stade II ou plus. Pour les malades de stade I pathologique, le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante est moins net et dépend notamment de la taille de la tumeur à l'analyse définitive ainsi que de la présence de facteurs histopronostiques péjoratifs comme des embols tumoraux.

Les autres traitements locaux comme la radiothérapie stéréotaxique ou la radiofréquence sont pour l'instant réservés aux malades inopérables (pour des raisons fonctionnelles, anatomiques ou autres) ou à des inclusions dans des protocoles de recherche.

3.2. Cas particulier des stades intermédiaires

Le cas des CBNPC de stade intermédiaire (IIB, IIIA), chez les patients présentant une tumeur résécable et qui sont fonctionnellement opérables, est beaucoup plus controversé. Le traitement de ces patients repose sur un arsenal thérapeutique varié dont le choix d'utilisation et la séquence dépendent de différents éléments cliniques propres au malade et à l'évaluation para-clinique pré-thérapeutique de l'extension tumorale. La chirurgie joue un rôle essentiel dans le cadre de la prise en charge multimodale de ces patients qui vise à remplir deux objectifs principaux : éradiquer la

pathologie tumorale intra-thoracique patente et réduire la survenue de métastases systémiques extra-thoraciques. En effet, elle peut permettre à la fois de guider le traitement par une évaluation pré-thérapeutique ou peropératoire, notamment ganglionnaire médiastinale, et constitue surtout une des deux options permettant d'effectuer le contrôle local de la maladie. Un des éléments clés permettant de déterminer les possibilités thérapeutiques et le pronostic de ce groupe de malades présentant un stade intermédiaire, est l'évaluation de l'atteinte ganglionnaire médiastinale N2. Si les stades IIIA dus à une atteinte T4 N0-1 sont le plus souvent éligibles à un traitement d'exérèse chirurgicale s'inscrivant dans une prise en charge multimodale (Postmus et al. 2017), les stades IIIA dus à une atteinte N2 représentent un sous-groupe plus hétérogène dont la prise en charge est moins univoque. Il existe cependant un certain consensus sur le fait de différencier au sein de ces malades deux situations différentes : les patients présentant une maladie N2 diffuse dite infiltrante ou « bulky » et ceux présentant une maladie N2 limitée. Les tumeurs « bulky » N2 sont normalement considérées non résecables, et dans ce cas un traitement systémique exclusif est recommandé (Detterbeck et al. 2013). En revanche, pour la maladie N2 non infiltrante, les débats restent plus ouverts concernant deux points principaux :

- L'intérêt d'un staging médiastinal extensif afin de diminuer le nombre de patients opérés d'une maladie « minimal » N2.

- Le choix du traitement de la maladie clinique N2 non bulky.

Concernant la première question, le type et la topographie de la tumeur primitive ainsi que la présence d'une atteinte clinique N1 doivent inciter à une exploration médiastinale selon les recommandations de l'ESMO (Postmus et al. 2017).

Toutefois, le pronostic relativement favorable des patients opérés d'une tumeur minimal N2 dans le cadre d'un traitement multimodal fait que la majorité des équipes françaises ne préconise pas de staging médiastinal extensif préopératoire mais indiquent une chirurgie d'emblée si une atteinte N2 n'est pas objectivée à l'évaluation radiologique et métabolique.

Concernant la deuxième question, les données actuelles de la littérature ne permettent pas de trancher entre les deux options thérapeutiques locorégionales constituées par la chirurgie précédée d'une chimiothérapie d'induction (néoadjuvante) et la radio-chimiothérapie exclusive (Xu et al. 2015). En effet, les essais randomisés comparant ces différentes modalités thérapeutiques sont controversés de par leur design et par la variabilité de la morbidité postopératoire. Globalement ces études ne permettent pas de conclure à la supériorité d'un traitement par rapport à l'autre (Albain et al. 2009; van Meerbeeck et al. 2007), et les prises en charge dépendent des centres experts, y compris le notre, qui se basent, au-delà des essais randomisés sur les résultats encourageants des séries chirurgicales après chimiothérapie néoadjuvante (environ 30% de survie à 5 ans) (Stefani et al. 2010; Alifano et al. 2008).

En pratique et pour simplifier, les principaux arguments avancés pour suggérer qu'un malade de stade IIIA est éligible à la chirurgie sont : la présence d'une seule station N2, un down-staging après chimiothérapie néo-adjuvante et un risque chirurgical faible ou modéré (Ramnath et al. 2013). Le niveau de preuves fourni par ces caractéristiques pour justifier du bénéfice apporté par une exérèse chirurgicale reste néanmoins insuffisant et il est nécessaire de mieux définir les sous-populations de patients IIIa éligibles, indépendamment de la tumeur elle-même, dont la nature précise n'est parfois déterminable qu'après chirurgie. En ce sens, la chirurgie

d'exérèse permet en outre d'effectuer une large analyse de la tumeur et des ganglions associés, en apportant une quantité importante de matériel biologique analysable sur différentes zones de tumeurs parfois très hétérogènes. Les résultats de l'analyse anatomo-pathologique en morphologie, immunohistochimie et étude moléculaire sont plus exhaustifs que sur des biopsies, et permettent la recherche de facteurs prédictifs de réponse aux traitements systémiques chez des malades qui vont généralement en recevoir à plus ou moins court terme.

Ce groupe de malades opérés d'un CBNPC va nous intéresser particulièrement dans ce mémoire puisqu'il permet d'analyser des échantillons tumoraux prélevés chirurgicalement, donc en quantité généralement supérieure aux biopsies, avant et après traitement systémique (chimiothérapie en l'occurrence).

3.3. Traitement des stades métastatiques et localement avancés non opérables

Lorsque la maladie est trop avancée et qu'un contrôle local n'est plus faisable ou « acceptable » en termes de balance-bénéfice/risque, la base du traitement, qu'il soit réalisé dans une optique curative, ou palliative active à but de chronicisation, est avant tout systémique. Sans traitement la médiane de survie de ce groupe de malade est évaluée entre 2 et 4 mois. Comme pour les stades moins avancés, l'association à un traitement local est possible (exemple des CBNPC oligo-métastatiques) dans des cas particuliers ou dans le cadre de protocoles, mais le but essentiel est le contrôle d'une maladie à expression clinique systémique pour lequel un traitement local exclusif serait probablement insuffisant. Là encore, les indications

des traitements systémiques ne cessent d'évoluer et l'essor récent des immunothérapies a fait encore plus bouger les lignes ces dernières années, rendant rapidement les recommandations et le choix des sous-populations cibles obsolètes.

Globalement, on peut regrouper les thérapies systémiques en trois grandes familles, les approches métaboliques exclusives ne faisant pas l'objet de recommandations claires pour le moment, avec par ordre chronologique de développement : les chimiothérapies conventionnelles, les thérapies ciblées, et les immunothérapies au sens large en particulier les immune checkpoint inhibitors (ICI). Le rationnel et les indications de la radiothérapie ou de traitements locaux, comme dans certains CBNPC oligo-métastatiques ou dans la chirurgie de rattrapage ne seront pas abordés dans ce mémoire.

3.3.1. Les chimiothérapies conventionnelles et sels de platine

Pendant longtemps dans le CBNPC, les recommandations de grade 1A, préconisaient de traiter les malades de stade métastatique dont l'état général le permettait, en première ligne, par une chimiothérapie systémique à base de sels de platine (cisplatine ou carboplatine) afin d'apporter un bénéfice en termes de survie et de qualité de vie (Socinski et al. 2013). Actuellement, ce type de traitement est instauré en l'absence d'altération moléculaire cible ou de facteurs prédictifs favorables à la réponse aux immunothérapies qui sont généralement mieux tolérées. Cette chimiothérapie à base de sels de platine s'effectue en combinaison avec un autre médicament dont le choix dépend en partie de l'histologie de la tumeur (adénocarcinomes 45% des CBNPC, épidermoïdes 23% et carcinomes à grandes cellules indifférenciés 3%, les autres types n'étant pas éligibles aux traitements de

première ligne). Les molécules utilisables dans les recommandations sont le paclitaxel, et le docetaxel qui sont des taxanes jouant un rôle de poison du fuseau par inhibition de la fonction des microtubules, de même que la vinorelbine un vinca-alcaloïde, la gemcitabine qui est un anti-métabolite s'incorporant dans l'ADN en mimant la cytidine et inhibant la synthèse nucléotidique, et surtout le pemetrexed qui est un autre membre de la classe des anti-métabolites, analogue de l'acide folique, bloquant des processus métaboliques folate-dépendants, essentiels à la réplication cellulaire par le biais de l'inhibition de la thymidylate synthétase. Le pemetrexed avait montré sa supériorité en termes de pronostic, ou de tolérance par certaines populations comme les asiatiques, en première ligne, en association avec un sel de platine (Scagliotti et al. 2008; X. Zhang et al. 2013).

Toutefois, les médianes de survie obtenues après le développement des chimiothérapies sont restées relativement faibles à cause, notamment, de la toxicité importante de ces agents anti-tumoraux résultant du peu de spécificité de leur mode d'action, qui entraîne une limitation des doses d'administration. A cela s'ajoute la problématique des phénomènes de résistance, notamment aux sels de platine. Cette résistance peut être intrinsèque, puisque seule une partie des patients répondent initialement aux chimiothérapies à base de platine, ou bien la résistance peut être acquise, résultant en des rechutes de la maladie. Le travail de thèse porte sur le type majeur de chimiothérapie du CBNPC que sont les sels de platine. Le carboplatine et le cisplatine ou cis-diaminedichloroplatine(II), son prédécesseur, sont les sels de platine les plus fréquemment utilisés pour le traitement du CBNPC. Ils présentent différentes structures mais ces deux formes ont globalement des modes d'action identiques (Figure 18).

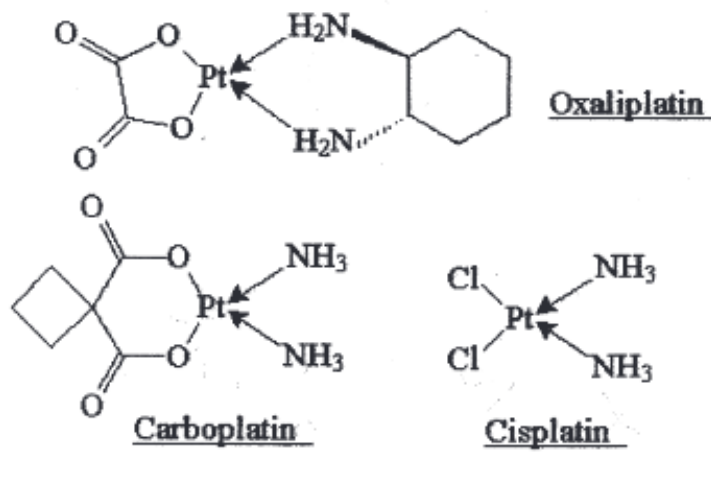


Figure 18 : structure chimique des principaux sels de platine (González-Mahave et al. 2005)

Les deux sels de platine sont des agents d'alkylants non spécifiques du cycle cellulaire, le carboplatine exerce effet anti-tumoral par le même mécanisme que son prédécesseur, le cisplatine. Généralement, ils fonctionnent par la formation de liaisons ou adduits sur les molécules ADN qui induisent des coupures simple ou double brinde ces molécules d'ADN ce que l'on appelle « dommages à l'ADN ». Lorsque l'ADN est suffisamment endommagé il y a induction de l'apoptose ou de mort cellulaire par nécrose. Plus en détail, les formes aqueuses actives du cisplatine pénètrent dans le noyau et se lient à l'ADN puis génèrent des ponts avec l'ADN entraînant des changements conformationnels et des cassures. Les dommages infligés à l'ADN entraînent la réponse attendue si les systèmes de détection et de réparation des lésions de l'ADN ne permettent pas de rétablir l'intégrité de l'ADN et si l'apoptose peut être déclenchée et exécutée par la voie extrinsèque et intrinsèque. L'effet cytotoxique induit par les complexes de platine est fortement lié à la quantité de platine accumulée dans les cellules et qui pénètre dans le noyau. La diminution

de l'accumulation de drogue est l'une des altérations fréquentes des cellules résistantes au cisplatine d'où l'importance fondamentale des processus d'influx et d'efflux qui permettent de faire rentrer la drogue ou de l'expulser de son site d'action, respectivement. En outre, le cisplatine est une molécule hautement polarisée qui ne diffuse pas facilement à travers les membranes lipidiques. Il a été montré que des cellules de levures ou de souris, dont l'expression du transporteur du cuivre de haute affinité (CTR1) était inhibée, devenaient résistantes au cisplatine, ce qui a permis d'identifier l'influence des transporteurs du cuivre dans le trafic cellulaire du cisplatine et son accès à sa cible ADN (Ishida et al. 2002; Katano et al. 2002). Il implique notamment CTR1 qui transporte à la fois le cuivre et le Cisplatine dans le cytoplasme (CTR2 ayant un rôle moins bien défini chez l'homme) et dont le rôle clé dans la quantité de platine intracellulaire a été amplement établi (Howell et al. 2010).

Au contraire, les transporteurs du cuivre ATP7-A et -B servent à l'efflux du cisplatine hors du cytoplasme et sont responsables d'une diminution du niveau de platine dans les cellules (Boal and Rosenzweig 2009). En conséquence, la modification de l'expression de ces transporteurs ou de leur localisation dans les cellules cancéreuses, dans des modèles précliniques et sur chez des patients présentant un CBNPC avec un faible taux d'expression de CTR1, a été significativement associé à une mauvaise réponse aux chimiothérapies à base de platine (Ishida et al. 2010; H. H. W. Chen et al. 2012). D'autres transporteurs membranaires sont impliqués dans les phénomènes d'efflux du cisplatine hors des cellules, en particulier CFTR/MRP (ATP-binding cassette subfamily C), ATP11B et MRP2 (multi-drug resistance-associated protein 2), mais leur rôle individuel serait moins important que celui des transporteurs du cuivre (Yamasaki et al. 2011). Parmi les mécanismes de trafic du cisplatine dans les cellules, il faut aussi évoquer le glutathion S-conjugué qui est une

pompe de détoxification qui permet d'éliminer les xénobiotiques des cellules. La libération du glutathion S-conjugué à partir de cellules est un processus dépendant de l'ATP et qui est médié par des glycoprotéines membranaires intégrales appartenant à la famille des protéines MRP (Keppler et al. 1999; Keppler 1999). Le métabolisme et la détoxification des xénobiotiques se composent de trois étapes : la phase I (d'oxydation), la phase II de conjugaison et la phase III d'élimination. Ces phases font notamment intervenir le cytochrome P450, MRP1, MRP2, MRP3 et MRP5 qui jouent un rôle dans la pharmacorésistance aux sels de platine en augmentant les efflux de médicaments (Young et al. 2001 ; A.-K. Yang et al. 2010).

Une fois rentré dans la cellule et en particulier dans le noyau, le cisplatine doit se lier à l'ADN pour créer les ponts et dommages. Avant l'interaction avec l'ADN, le cisplatine est activé par l'aquation dans le tampon chlorure puis il se lie de manière covalente à une base purique (adénosine ou guanine) et crée majoritairement des adduits bi-fonctionnels intra-brin (80 % à 90 % des cas) mais également inter-brins ou des ponts dits mono-fonctionnels (Figure 19) (Muggia et al. 2015; Rabik and Dolan 2007).

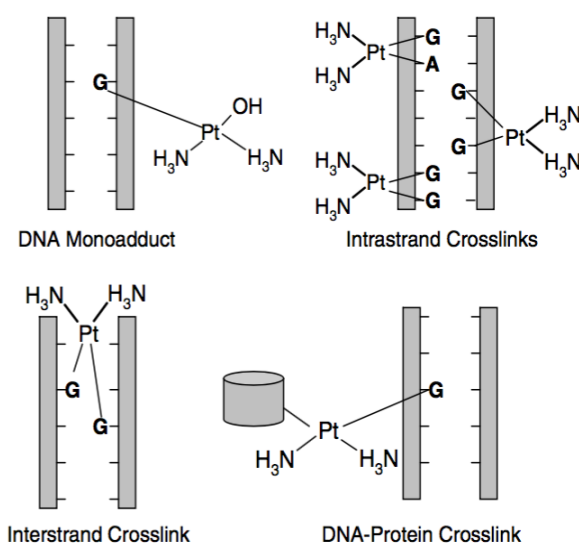


Figure 19 : Différents types de liaisons sels de platine-ADN. Ces liaisons peuvent se faire sur un seul brin (intra-strand ou via une protéine DNA-protein crosslink) ou par des ponts entre 2 brins (interstrand crosslink) (Rabik and Dolan 2007).

Ces différents adduits induisent donc des dommages en provoquant des changements stériques dont la présence perturbe les étapes de réplication et de transcription de l'ADN et modifie le comportement de protéines cellulaires qui reconnaissent ces lésions (Muggia et al. 2015; Ho and Schärer 2010 ; Enoiu, Jiricny, and Schärer 2012).

Le destin des cellules ayant subi les déformations structurelles de l'ADN induites par les adduits cisplatine dépend ensuite des capacités de systèmes de reconnaissance et de réparations des lésions de l'ADN. Ces systèmes, qui ne seront pas détaillés ici, comprennent des protéines cellulaires tels que les protéines à boîtes du groupe à haute mobilité (HMG) et différentes protéines comme ERCC1 ou MSH2 impliquées dans des voies de réparation de l'ADN de type NER (nucleotid excision repair) ou MMR (mismatch repair). Lorsque les systèmes de reconnaissances des lésions de l'ADN (induite par le cisplatine ici) sont défectueux ou que les systèmes de réparation sont surexprimés, l'activation des signaux déclenchant l'apoptose sont inhibés ou réduits, n'entraînant pas l'effet escompté de la drogue cytotoxique, ce qui participe aux phénomènes de résistance. Par exemple, il a été montré que les patients ayant un CBNPC dont l'ARNm ERCC1 était surexprimé avaient des survies médiocres après chimiothérapie à base de cisplatine (Rosell et al. 2003). De même, le rôle des PARP (poly [ADPribose] polymérase) dans la réparation des lésions de l'ADN induites par les sels de platine a aussi été mis en avant dans le CBNPC comme potentiel biomarqueur théranostique (notamment PARP1) et dont l'inhibition pourrait sensibiliser les tumeurs au cisplatine (Ken A. Olausson et al. 2013 ; Cheng et al. 2013). Après l'identification d'ERCC1 comme éventuel biomarqueur de réponse ou

cible thérapeutique, dans le CBNPC, visant à diminuer la résistance au cisplatine (Ken André Olaussen et al. 2011), de nombreuses études précliniques ou cliniques ont été initiées et ont malheureusement montré certaines limites, suggérant l'intérêt d'approches nouvelles (Friboulet et al. 2013).

La réponse aux dommages de l'ADN (DDR) est un processus compliqué qui implique la transduction du signal de dommage aux effecteurs d'aval, pour provoquer la mort cellulaire, si le dommage est irréparable, par apoptose ou nécrose. Deux principales voies conduisent à la mort cellulaire par apoptose : la voie extrinsèque passant par les récepteurs de mort cellulaire (Fas) et la voie intrinsèque mettant en jeu le relargage de facteurs proapoptotiques par la mitochondrie. L'activation de l'une ou de l'autre des voies conduit à l'activation d'une voie effectrice commune. Dans la voie extrinsèque, des caspases initiatrices sont activées en amont. Ces caspases initiatrices activent les caspases effectrices qui clivent, à leur tour, différents substrats, induisant la mort cellulaire. Les deux grandes voies sont connectées par l'intermédiaire d'un membre proapoptotique de la famille Bcl-2 (BID). Une troisième voie peut également entraîner l'apoptose dite caspase-indépendante et faisant intervenir p53 ("Apoptosis Inducers - Apoptosis and Cell Cycle" n.d.) (Figure 20).

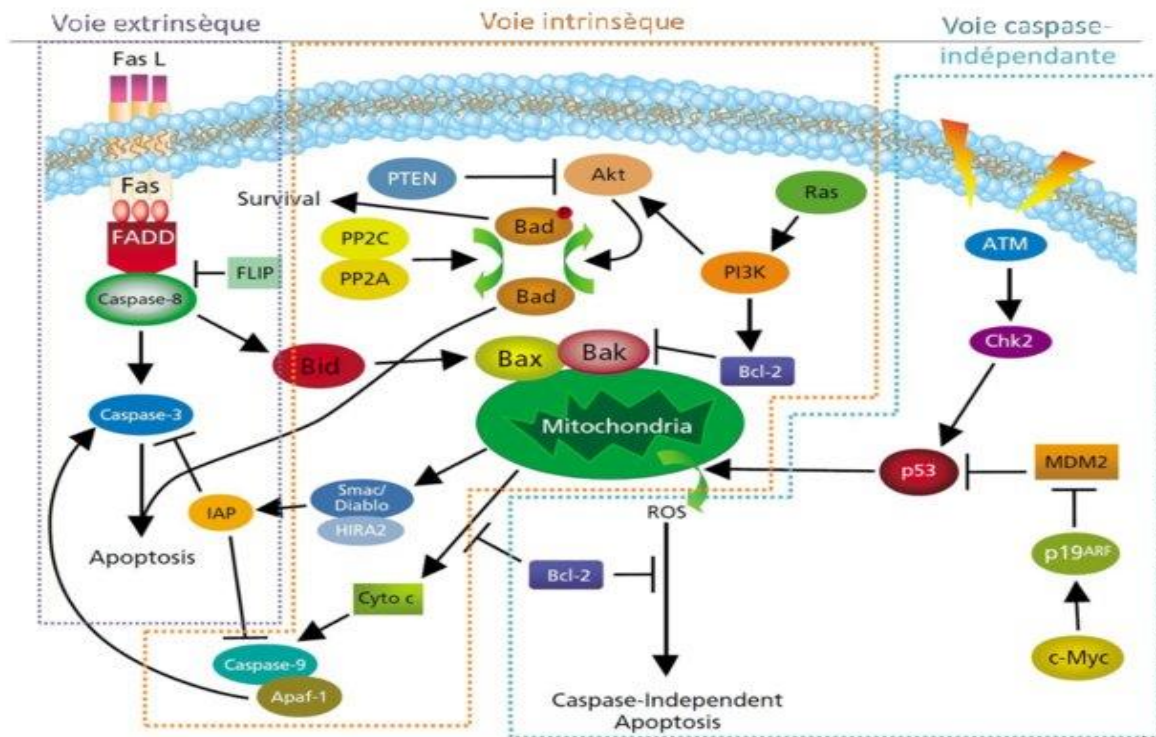


Figure 20 : Schéma des différentes voies apoptotiques. ("Apoptosis Inducers - Apoptosis and Cell Cycle" n.d.)

L'apoptose induite par le cisplatine se distingue de la nécrose par des caractéristiques de retraction cellulaire, de condensation de la chromatine, de fragmentation de l'ADN ATP-dépendante, et notamment par le rôle fondamental des ROS (reactive oxygen species) alors que la nécrose dépend plutôt d'une hyperactivation de PARP induisant une déplétion en NAD⁺/ATP (Lieberthal, Triaca, and Levine 1996). Le choix du mode de mort cellulaire dépend de multiples facteurs tels que la concentration de médicaments, la disponibilité énergétique, ou l'échec des voies apoptotiques par altération des protéines impliquées directement ou indirectement comme p53, Bax, Bcl-2 et les caspases (Gonzalez et al. 2001). Le mode d'action du cisplatine jusqu'à son effet sur la mort cellulaire sont résumés dans la figure ci-dessous (Figure 21).

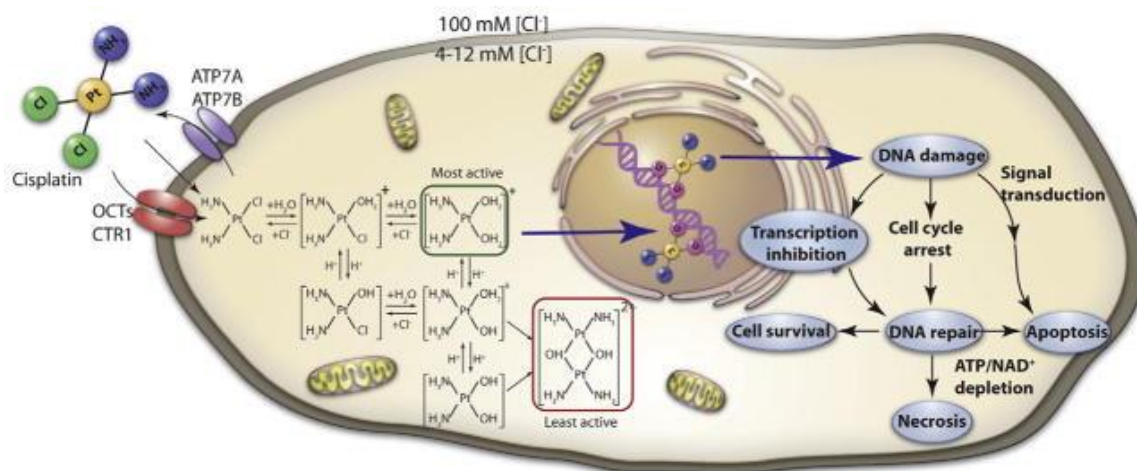


Figure 21 : Résumé du mode d'action du cisplatine avec les phénomènes d'influx et d'efflux, sa transformation en forme active, sa liaison à l'ADN, la création de dommages de l'ADN entraînant un arrêt du cycle cellulaire et une inhibition de la transcription, ainsi qu'une transduction de signaux pouvant entraîner l'apoptose, la nécrose, ou la survie cellulaire en fonction des systèmes de réparation de l'ADN (Oberoi et al. 2013).

De même que pour les étapes précédentes, les altérations de molécules impliquées dans le processus d'apoptose induite peuvent participer aux phénomènes de résistance au cisplatine de certaines tumeurs et patients qui nous intéressent particulièrement dans ce mémoire et font partie de la problématique du travail de thèse.

3.3.2. Les thérapies ciblées

Au cours des dernières décennies, les altérations moléculaires des CBNPC ont été largement étudiées à la fois pour décrypter les mécanismes d'oncogénèse, comme décrits précédemment, mais surtout, car ces modifications génétiques ou épigénétiques constituent des biomarqueurs théranostiques majeurs. Certaines tumeurs pulmonaires développent une dépendance vis-à-vis d'un oncogène ou d'une

voie de signalisation, un oncogène étant activé ou surexprimé, phénomène aussi appelé l'addiction oncogénique. Les principaux inducteurs oncogéniques dans le domaine de l'oncologie thoracique, également nommés dans la littérature anglo-saxonne « drivers » oncogéniques, sont les mutations des oncogènes EGF-R, et KRAS ou réarrangements d'ALK (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase). Ces altérations sont plus fréquemment associées aux adénocarcinomes, mais, ces dernières années, de nouvelles cibles moléculaires ont été mises en évidence et sont également rapportées pour d'autres types histologiques : par exemple les mutations de HER2, BRAF, et PI3K/AKT, ou les translocations RET et ROS1. De nombreuses stratégies thérapeutiques ont été et sont encore développées pour inhiber ces voies de signalisation dont certaines sont décrites ci-dessous.

Le récepteur EGF-R appartient à la famille des récepteurs à tyrosine kinase ERBB (Hynes and MacDonald 2009). Le gène EGF-R est situé sur le chromosome 7 (7p11.2) et code pour une glycoprotéine transmembranaire à activité tyrosine-kinase. Il est intéressant de noter que le récepteur EGF-R s'homo-dimérise ou se dimérise avec HER2 ou HER3. Selon l'association engagée, plusieurs voies impliquées dans la survie, la prolifération, et la résistance aux traitements des cellules tumorales, telles que PI3K/AKT, RAS/ERK et JAK/STAT, sont activées. La voie des RAS/RAF/MEK joue un rôle clé dans le cycle cellulaire, la migration et la survie cellulaire. L'activation de la voie des PI3K/AKT favorise l'angiogenèse, et les processus métastatiques (Gazdar 2009; Ayoola et al. 2012). L'analyse moléculaire des tumeurs a permis le développement des thérapies dites "ciblées", car elles s'adressent à des patients portant une altération génétique particulière, comme les mutations activatrices d'EGF-R. Il s'agit notamment des inhibiteurs de tyrosines Kinases (TKI) comme le gefitinib (Iressa®) et l'erlotinib (Tarceva®). Les mutations

somatiques du gène codant EGF-R chez les patients atteints de cancer du poumon ont été décrites en 2004, et sont présentes chez 10 % des patients occidentaux contrairement aux populations sud-est asiatiques où elles sont trois fois plus fréquentes (Lynch et al. 2004 ; Sequist et al. 2007). Cette découverte a suscité un engouement important et le développement des TKI qui ont été testés, en première ligne, pour les CBNPC stade IV de patients mutés EGF-R (Inoue et al. 2009 ; Sequist et al. 2008 ; Asahina et al. 2006 ; Inoue et al. 2006 ; Rosell et al. 2009). Les résultats étant très encourageants en termes de survie sans progression (9 à 14 mois) et de taux de réponse (55 % à 80 %), des essais randomisés ont suivi pour comparer les TKI aux chimiothérapies cytotoxiques à base de platine (Zhou et al. 2015 ; Mok et al. 2009). Ceux-ci ont permis d'établir des recommandations, de grade IA, préconisant l'utilisation de TKI en première ligne de traitement du CBNPC de stade IV pour les patients mutés EGF-R en se basant sur de meilleurs taux de réponse et une meilleure tolérance (Socinski et al. 2013 b).

ALK est un membre de la famille des tyrosines kinases du récepteur à l'insuline qui est codé par le gène ALK sur le chromosome 2. Plusieurs variantes d'ALK-EML4 ont par la suite été caractérisées dans le CBNPC (Takeuchi et al. 2008). Des réarrangements d'ALK surviennent chez un peu moins de 5 % des patients atteints de CBNPC, et sont plus fréquemment observés chez les patients jeunes, faiblement tabagiques, présentant un adénocarcinome non muté EGF-R ou KRAS (Shaw et al. 2009). De la même façon, ont été développés des TKI comme le crizotinib, molécule inhibant notamment ALK (dont 3 à 5 % des CBNPC présentent un réarrangement, et qui a montré sa supériorité en termes de survie sans progression et tolérance à une chimiothérapie à base de sels de platine en première ligne de traitement des stades IV (Soda et al. 2007 ; Solomon et al. 2014).

L'oncogène c-ros 1 (ROS1) est une cible relativement récente du cancer du poumon qui code également pour un récepteur de tyrosine-kinase de la famille des récepteurs d'insuline. Des réarrangements chromosomiques impliquant ROS1 ont été décrits à l'origine dans des glioblastomes puis dans des lignées cellulaires de CBNPC ainsi que des tumeurs, où la fusion ROS1 a été identifiée comme un « driver » oncogénique (Acquaviva, Wong, and Charest 2009; Vecchiarelli and Bennati 2018). Les réarrangements de ROS1 sont constatés dans 1 à 2 % des CBNPC (Lin and Shaw 2017).

Les mutations du gène KRAS sont caractérisées par une épidémiologie très fréquente et spécifique. Des mutations du gène KRAS sont observées dans 18 à 32 % des adénocarcinomes, 13 % des carcinomes à grandes cellules, et 2 à 7 % des carcinomes épidermoïdes chez les patients caucasiens (Mascaux et al. 2005 ; Graziano et al. 1999). L'association entre les mutations de KRAS et le tabac est indéniable comme rapporté dans différentes méta-analyses et sont plus fréquentes chez les patients afro-américains que chez les caucasiens (Ahrendt et al. 2001; Dearden et al. 2013). Les mutations du gène KRAS sont généralement décrites comme un biomarqueur défavorable (Ragusa et al. 2014 ; Ohtaki et al. 2014).

La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR a de nombreuses fonctions, notamment la régulation de la survie cellulaire, la différenciation et l'affichage des propriétés analogues à celles des cellules souches, la croissance, la prolifération, le métabolisme, la migration et l'angiogenèse (Cho 2014; P. Wu and Hu 2010). Il joue un rôle clé dans la signalisation en aval par la phosphorylation et l'activation de plusieurs effecteurs, dont la sérine/thréonine kinase, l'AKT et le mTOR, un régulateur essentiel de la croissance et du métabolisme cellulaires. Cette voie de signalisation

est également une cible de thérapies moléculaires émergentes ou en cours de développement (Fruman and Rommel 2014).

D'autres thérapies systémiques ont, en parallèle, été développées, testées et utilisées, pour améliorer les résultats des chimiothérapies. En 2006 un antiangiogénique, le bevacizumab (anti v-EGF), a reçu l'autorisation de mise sur le marché aux USA pour son association avec une chimiothérapie de première ligne à base de platine chez les patients avec un CBNPC non épidermoïde, suite à deux études randomisées montrant un bénéfice pronostique significatif, mais confirmant également l'incidence d'effets indésirables graves comme des saignements, en limitant parfois l'usage (Sandler et al. 2006; Johnson et al. 2004).

Toutefois l'ensemble de ces thérapies de type TKI ne s'adressent, d'une part, qu'à une minorité de patients sélectionnés pour exprimer des biomarqueurs spécifiques et d'autre part sont également soumis à un phénomène de résistance intrinsèque (mutations situées en aval d'EGF-R et parfois associées à une mutation d'EGF-R, notamment de la voie BIM) ou acquise définie par une progression de la maladie après réponse initiale (survenue 8 à 14 mois après le début du traitement) (Su et al. 2012 ; Karachaliou et al. 2014).

3.3.3. Les immunothérapies et les inhibiteurs de check-points immunitaires

L'influence de facteurs liés à l'interaction entre l'hôte et la tumeur dans le cancer est en particulier représentée par l'étude du microenvironnement immunitaire, dont l'impact a été largement évoqué plus haut, avec le rôle fondamental de l'infiltrat de

cellules immunitaires (CD matures et lymphocytes T CD8+), de leur organisation en structures lymphoïdes tertiaires, de même que de la charge mutationnelle des tumeurs et du niveau d'expression PD-1/PD-L1 (Remark et al. 2015). L'ensemble de ces différents éléments doit être appréhendé en considérant qu'il existe de nombreuses interactions entre hôte et tumeur comme en témoigne l'importance de la voie précédemment décrite PD1/PDL1, à laquelle nous nous intéressons particulièrement dans ce projet. A la complexité de ces interactions s'ajoute des éléments liés au traitement (chirurgie, chimiothérapie néo-adjuvante à base de Cisplatine...) qui pourraient modifier les rapports entre tumeur et microenvironnement immunitaire (Remark et al. 2016). Ce sont ces modifications du « contexte immunitaire » notamment l'expression de PD-L1 après chimiothérapie qui font l'objet principal de la thèse.

Comme évoqué dans un précédent chapitre, d'autres traitements systémiques ont été développés plus récemment faisant intervenir le système immunitaire de l'hôte contre sa tumeur. Ces différents traitements, regroupés sous le terme générique d'immunothérapies, représentent un large ensemble incluant de très nombreux acteurs de l'immunité, et allant de la conception de vaccinothérapies, de lymphocytes recombinés (CAR-T cells), jusqu'aux différentes méthodes de réactivation de l'immunité anti-tumorale (Helmy et al. 2013). Parmi celles-ci, se sont particulièrement développés et diffusés dans le traitement du CBNPC, les inhibiteurs de check-points immunitaires (Corrales et al. 2018). Il s'agit d'anticorps dirigés en outre contre PD-1/PD-L1, CTLA-4, TIM3, et qui visent à interrompre ces voies de signalisation afin de rétablir l'immunité anti-tumorale (Pardoll 2012). Dans le CBNPC, les ICIs dont l'essor a été initialement le plus important correspondent au blocage du check-point PD-1/PD-L1 dont le ligand fait l'objet principal de la thèse.

Le Nivolumab est un médicament correspondant à des anticorps anti-PD-1 et qui a été initialement testé en seconde ligne de traitement du CBNPC de stade IV, et même comparé à une chimiothérapie standard (docetaxel) pour les épidermoïdes, montrant une survie globale et sans progression supérieure ainsi que de meilleurs taux de réponse (Gettinger et al. 2015 ; Borghaei et al. 2015 ; Brahmer et al. 2015). En dehors du Nivolumab, d'autres bloqueurs de PD-1 ou de PD-L1 ont été développés comme notamment le Pembrolizumab, le Durvalumab et l'Atezolizumab. L'action de ces anticorps vise évidemment à agir sur différents types de cellules immunitaires qui sont normalement inactivées ou inhibées par le check-point PD-1/PD-L1, dont les cellules tumorales se servent notamment pour échapper aux systèmes de défense de l'hôte, comme précédemment décrit dans le mémoire et synthétisé dans le schéma ci-dessous (figure 22).

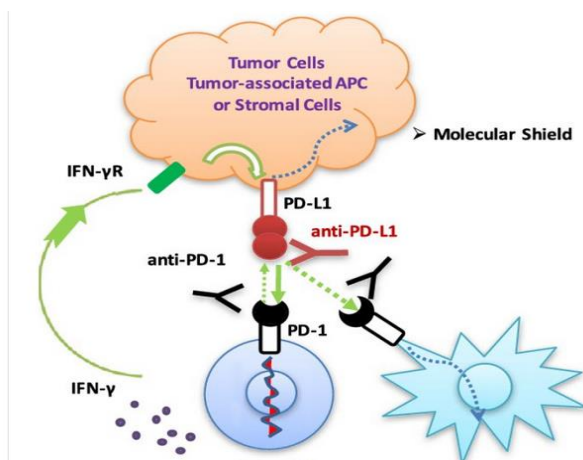


Figure 22 : Action des anticorps anti-PD-1 ou anti-PD-L1 cette signalisation PD-L1 pouvant servir de "bouclier moléculaire" protégeant les cellules tumorales contre la destruction induite par les lymphocytes T cytotoxiques. La présence d'anticorps anti PD-1 ou anti PD-L1 permet théoriquement de renverser ou d'atténuer les mécanismes schématisés ici en particulièrement sur les interactions entre cellules tumorales, cellules dendritiques et lymphocytes (Wang et al. 2017).

Ces ICIs ont été testés dans de nombreuses situations cliniques et ont montré une efficacité significative et une amélioration du pronostic du CBNPC métastatique tout

en ayant un profil de toxicité généralement plus favorable que les chimiothérapies traditionnelles (von Pawel et al. 2019; Roy S. Herbst et al. 2016 ; Reck et al. 2016). Les différents avantages, démontrés cliniquement, de ces ICI ont permis leur large diffusion et l'élargissement global des indications. Si dans certains cas de CBNPC appelés « long responders » une réponse spectaculaire et stable aux anti-PD-1/PD-L1 est observée, on n'observe ce type de bénéfice clinique que dans une minorité de malades. Par conséquent, l'identification des biomarqueurs de réponse pour la sélection des patients est un pan fondamental de l'optimisation des immunothérapies. A ce titre, l'importance de l'expression de PD-L1 par la tumeur a rapidement été mise en évidence. Même si les méthodes d'évaluation de PD-L1 ont mis du temps à se standardiser comme en témoignent les différences de résultats des différentes études et essais cliniques initiaux, de par l'hétérogénéité tumorale et la méthodologie immunohistochimique, ce marqueur reste la pierre angulaire de la prédiction du succès du blocage PD-1/PD-L1 en routine clinique (Guo et al. 2019 ; R. S. Herbst et al. 2019 ; Driver et al. 2017; Y. Liu et al. 2018 ; Munari et al. 2018 ; Takeda et al. 2019). En plus de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ou les cellules immunitaires, d'autres biomarqueurs ont été identifiés afin d'améliorer la prédiction de la réponse à l'inhibition PD-1/PD-L1. On peut citer en particulier l'évaluation en immunohistochimie du nombre et phénotype des cellules T, de la clonalité de leurs récepteurs T, le niveau de charge mutationnelle (mutational burden) somatique, qui ont montré leur importance dans la visualisation plus globale et dynamique du microenvironnement et donc secondairement de l'efficacité d'anti-PD-1 ou -PD-L1 (Maleki Vareki, Garrigós, and Duran 2017; Chae et al. 2016). Par ailleurs, certains critères purement cliniques ou épidémiologiques tels que le tabagisme ou le fait d'avoir une BPCO influencent la réponse aux ICI, comme nous

avons pu le montrer dans une étude clinique fruit d'une collaboration au sein de l'hôpital (Biton et al. 2018).

En plus d'autres marqueurs, l'évaluation de l'expression de PD-L1 reste donc un élément primordial avant d'instaurer un traitement anti-PD-1/PD-L1, les patients présentant une expression plus élevée de PD-L1 par les cellules tumorales étant les meilleurs répondeurs, ceci expliquant qu'un cut-off de 50 % de cellules tumorales PD-L1 positives ait été instauré dans de nombreux essais cliniques et par la suite pour poser les indications à ces traitements dans certaines situations (carcinomes épidermoïdes, 1^{ère} ligne de traitement...) (Reck et al. 2016; Carbone et al. 2017).

Les immunothérapies et ICIs sont en plein essor et font l'objet de nombreux protocoles de recherche pour développer de nouvelles molécules ou pour tester des combinaisons de traitements associant par exemple des ICIs entre eux ou des ICIs avec des thérapeutiques conventionnelles comme la chimiothérapie ou la radiothérapie. Ces développements actuels sont très divers et s'intéressent notamment à l'éventuel impact des immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 sur le parcours du patient atteint de CBNPC. Les interactions potentielles entre les différents traitements que peut recevoir un patient porteur de CBNPC au cours de sa maladie représentent une partie essentielle du rationnel de ma thèse.

Chapitre 4. Thérapie innovante du CBNPC : Un anticorps dirigé contre les formes immatures de la neurotensine (NTS)

L'avancée des nouvelles thérapies que ce soit les TKI ou les ICI a réellement amélioré le pronostic des patients du CBNPC, néanmoins ces thérapies s'adressent qu'à un nombre de patients sélectionnés, et sont très rarement curatives. La découverte de nouvelles approches s'impose, notamment afin de proposer des combinaisons thérapeutiques plus performantes, tout en restant peu toxique. Dans ce cadre, certains peptides jouant un rôle physiologique important sont dérégulés dans le cancer et peuvent avoir un impact sur la prolifération et progression tumorale, la résistance aux traitements ainsi que sur le métabolisme de l'hôte.

Parmi ces peptides, à la fois facteurs pronostics et cibles de développements thérapeutiques, la neurotensine est un domaine d'expertise particulier de notre laboratoire et fait l'objet de nombreux projets de recherche, dont le travail numéro 2 de cette thèse.

4.1. La neurotensine (NTS)

La neurotensine est un tridécapeptide linéaire de 1673 Daltons, découvert fortuitement à partir d'extraits d'hypothalamus et ensuite retrouvé dans des extraits intestinaux grâce à des techniques de dosage radio-immunologique (Hammer et al. 1980; R. Carraway, Kitabgi, and Leeman 1978). Ce peptide est avant tout un neuro-modulateur du système nerveux central (SNC) et en périphérie agit comme une hormone digestive impliquée dans l'absorption des graisses et plus globalement la digestion des nutriments. La séquence humaine, identique à celle de nombreux

mammifères, présente la séquence d'acides aminés suivante : pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-COOH (R. Carraway, Kitabgi, and Leeman 1978; R. E. Carraway and Mitra 1990). La partie hexapeptidique (8-13) C-terminale, hautement conservée chez la plupart des vertébrés, détient les propriétés biologiques et pharmacologiques de tout le peptide (Rostène and Alexander 1997 ; P. Kitabgi, De Nadai, Rovère, et al. 1992).

4.1.1. Biosynthèse et maturation

Comme la plupart des neuropeptides, NTS est libérée à partir d'un polypeptide précurseur de 170 acides aminés. La maturation de ce précurseur pro-NTS conduit à la libération de deux peptides apparentés que sont NTS et la neuromédine N (NN). Ces deux peptides partagent une même portion C-terminale et des activités pharmacologiques globalement comparables (de Nadai et al. 1994 ; P. Kitabgi, De Nadai, Labbe-Jullie, et al. 1992). Les peptides NTS et NN sont localisés près de l'extrémité C-terminale de leur précurseur et sont séparés par des séquences dibasiques KR (Lys-Arg) constituant les sites de reconnaissance pour le clivage par des endoprotéases (Dobner et al. 1987 ; Seidah and Prat 2012). Après maturation protéolytique spécifique à chaque tissu, différents produits biologiques sont générés incluant NTS, NN, et leur long fragment (LF-NTS et LF-NN, Figure 23), LF-NTS ayant probablement un rôle non négligeable dans la signalisation pro-tumorale neurotensinergique.

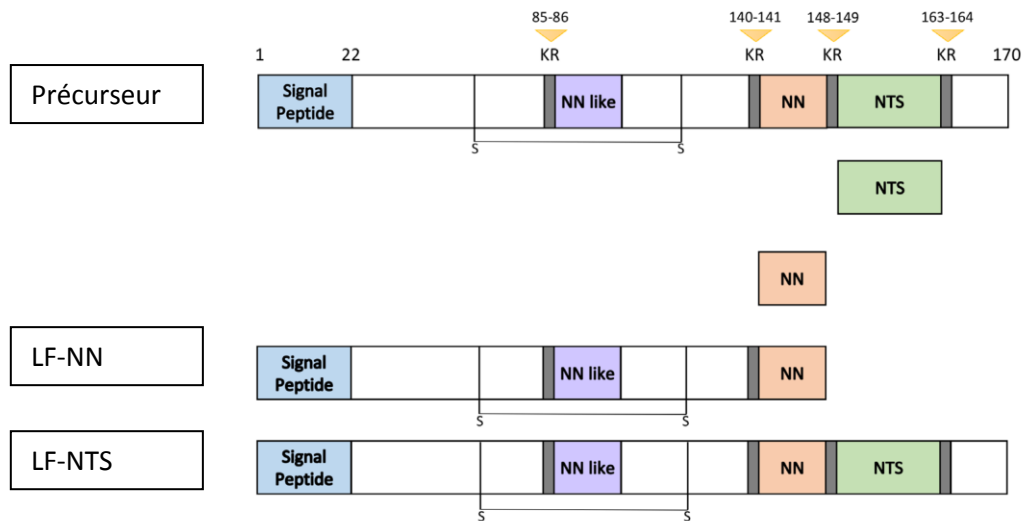


Figure 23 : Représentation schématique de la structure du précurseur NTS/NN et de ses produits de clivage. Pro-NTS/NN a une longueur de 170 résidus et les séquences NN et NTS sont localisées en tandem près de l'extrémité C-terminale 71 du précurseur. Les quatre sites de traitement dibasiques Lys-Arg (KR) sont représentés par des flèches jaunes en haut. Le pont disulfure Cys61-Cys110 est également représenté (figure adaptée à partir de travaux préalables du laboratoire).

4.1.2. Sécrétion de NTS et taux plasmatique

En périphérie, le précurseur NTS/NN est synthétisé et mûri par les cellules N endocrines de la muqueuse intestinale, en particulier du jéjunum et de l'iléon (Robert Carraway, Ruane, and Kim 1982; Helmstaedter et al. 1977). Le peptide NTS est directement libéré dans la circulation portale à partir de sites de stockage (granules cytoplasmiques) à la suite de divers stimulus. Le plus important de ces stimulus est la présence d'acides gras en quantité dans la lumière de l'intestin. Chez l'homme, l'ingestion massive d'acides gras entraîne une augmentation significative du taux plasmatique de NTS, passant d'un facteur 1 à 10, en moins d'une heure (Ferris et al. 1991). Cette augmentation du taux sérique reste stable pendant au moins 10 heures

après l'ingestion du repas (Gullo et al. 1998). D'autres facteurs, tels que la bombésine ou la substance P, stimulent plus modérément la libération de NTS. En revanche, l'acidité ou l'hyperosmolarité dans la lumière intestinale peuvent stimuler la sécrétion de NTS par les cellules entéro-endocrines afin notamment de contrebalancer la sécrétion d'acide gastrique (Schubert 2008).

4.2. Récepteurs de la NTS

Les actions de NTS sont principalement médiées par trois récepteurs NTSR1, NTSR2 et NTSR3. Le récepteur NTSR1 est le plus ubiquitaire et très largement présent dans le SNC, à la périphérie et dans une grande variété de tumeurs solides. Il est considéré comme le récepteur prédominant médiant les effets de NTS, en particulier dans le cancer, car favorisant la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion des tissus.

4.2.1. NTSR1

La séquence protéique du récepteur de haute affinité pour NTS de type 1 (NTSR1) humain, isolée à partir de lignées de cellules tumorales coliques, consiste en 418 acides aminés (46 kDa) (Vita et al. 1993). Ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G et contient sept domaines transmembranaires hydrophobes, trois boucles extracellulaires, trois boucles intracellulaires, une courte extrémité C-terminale intracellulaire ainsi qu'une plus longue extrémité N-terminale extracellulaire (Figure 24) (Patrick Kitabgi 2006). La liaison du NTS à la surface extracellulaire du NTSR1 induit des changements

conformationnels des domaines intracellulaires, leur permettant d'interagir avec les protéines G et de stimuler la signalisation d'aval (Pelaprat 2006).

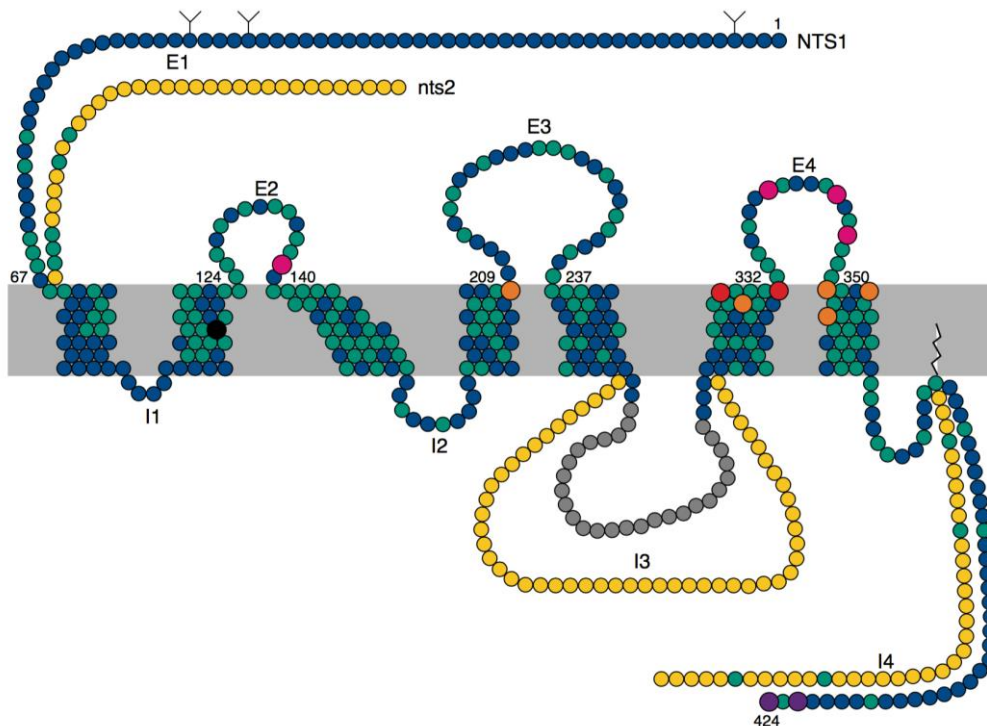


Figure 24 : Schéma représentant NTSR1 (bleu) et NTSR2 (jaune), les résidus communs entre les 2 récepteurs sont colorés en vert. Les résidus impliqués dans la liaison à NTS sont indiqués en rose, à SR48692 un inhibiteur chimique du récepteur en orange, et aux deux en rouge. Des résidus cruciaux pour l'internalisation de NTSR1 sont en violet. La région de la troisième boucle intracellulaire (I3) essentielle au couplage à la phospholipase C, est représentée en gris. Les Y représentent les sites de glycosylation, les E les boucles extracellulaires, et J intracellulaires (Vincent, Mazella, and Kitabgi 1999)

Dans tous les systèmes étudiés, l'interaction de la NTS avec le récepteur NTSR1 conduit à l'activation de la phospholipase C (PLC), à la production d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃), suivi d'une libération de calcium intracellulaire ainsi qu'à la production de diacylglycérol (DAG) et l'activation consécutive de la PKC. L'activation de cette voie résulte du couplage préférentiel du récepteur NTSR1 à une protéine G hétérotrimérique de type G $\alpha_{q/11}$. La Figure 25 résume les voies de signalisations

importantes associées au couple NTS/NTSR1 et ayant des conséquences sur les évènements cellulaires et leur implication dans la progression et l'agressivité tumorale. L'activation de la PKC est un événement majeur et central dans la signalisation oncogénique du NTSR1. Comme on peut le voir sur le schéma ci-dessous, trois voies majeures sont activées :

- La NTS induit la libération du calcium intracellulaire qui entraîne une augmentation de GMP cyclique, et à l'activation des histones deacétylases (HDAC) responsables des enzymes clés de la régulation épigénétique (voie mauve sur le schéma) (Bozou et al. 1989).

- La NTS active également la famille des petites GTPase, comme Rho, Rac, Cdc42. Ces protéines ont un rôle important dans le cycle et la mobilité cellulaires (voie bleue sur le schéma).

- Mais surtout, l'activation de la PKC engendre la stimulation de la cascade ERK. Cette activation se fait soit directement selon des voies dépendantes de l'activation de Raf-1 ou la de PKD. Ou par la transactivation du récepteur EGF-R suite à l'intervention des métalloprotéinases et la libération de ligands "EGF like". Cette cascade ERK est très impliquée dans l'induction de gènes associés dans la prolifération cellulaire, la survie ou la mobilité cellulaire (voie rouge et jaune) (Zhao et al. 2007).

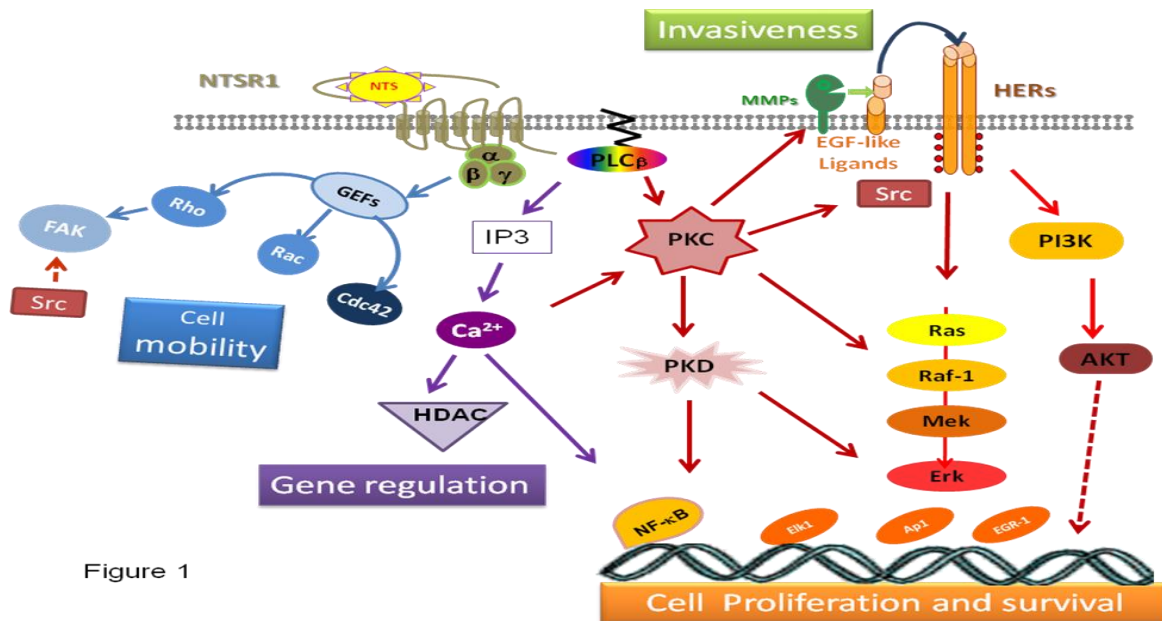


Figure 1

Figure 25 : Résumé des voies de signalisation par lesquelles le couple NTS/NTSR1 peut contribuer à la progression tumorale (Dupouy et al. 2011)

Dans ce mémoire, nous n'insisterons pas sur les médiateurs impliqués et les effets consécutifs de la stimulation neurotensinergique en situation physiologique, pour nous concentrer sur le rôle de la signalisation et stimulation NTS/NTSR1 dans le cancer broncho-pulmonaire, plus particulièrement.

4.2.2. Rôle de NTS/NTSR1 dans le cancer et le CBNPC

Le récepteur NTSR1 n'est que peu exprimé dans les cellules saines, mais il est déréprimé dans de nombreuses cellules cancéreuses et tumeurs solides en particulier les cancers bronchiques (Dupouy et al. 2011). Les mécanismes impliqués dans la surexpression de NTSR1 par les tumeurs sont la dérégulation de la voie wnt/bétacatéline, comme cela a été montré par notre équipe, et l'hyperméthylation du promoteur (Souazé, Viardot-Foucault, et al. 2006 ; Souazé, Dupouy, et al. 2006 ;

Z. Dong, Wang, and Evers 2000). Dans un contexte physiologique, après son activation par le ligand, NTSR1 est dégradé dans des vésicules de lysosomes inhibant ensuite la signalisation NTSR1. Au contraire, dans la pathologie tumorale, des boucles de régulation autocrines et/ou paracrines à NTS se mettent en place, entraînant une modification du trafic cellulaire de NTSR1. Celui-ci est dirigé vers le compartiment péri-nucléaire trans-golgien de recyclage, où il s'accumule, puis est ré-adressé à la membrane cellulaire. Les effets cumulatifs de la néosynthèse et du recyclage du NTSR1 restaurent et installent une sensibilité cellulaire permanente à la NTS. Ce mécanisme d'auto-entretien aboutit à l'activation chronique de toutes les signalisations et des cibles moléculaires de la NTS, en particulier la cascade MAPK, la libération du calcium intracellulaire, la famille des petites GTPases, et les gènes cibles associés comme Bcl-2, MMP9, ou IL-8 (détails Figure 26) (Dupouy et al. 2011).

Les stimulations autocrines et/ou paracrines de NTSR1 induisent et amplifient des effets cellulaires impliqués dans la croissance tumorale (prolifération et survie) et dans les processus métastatiques (la migration, l'adhérence, l'invasion cellulaire) (Alifano et al. 2010). Ces effets ont été retrouvés sur des tumeurs expérimentales avec une diminution de leur croissance et de l'émergence de métastases lorsque l'expression du NTSR1 est abolie et à l'inverse une augmentation de ces effets lorsque l'expression du NTSR1 ou de la NTS est forcée (Souazé, Dupouy, et al. 2006).

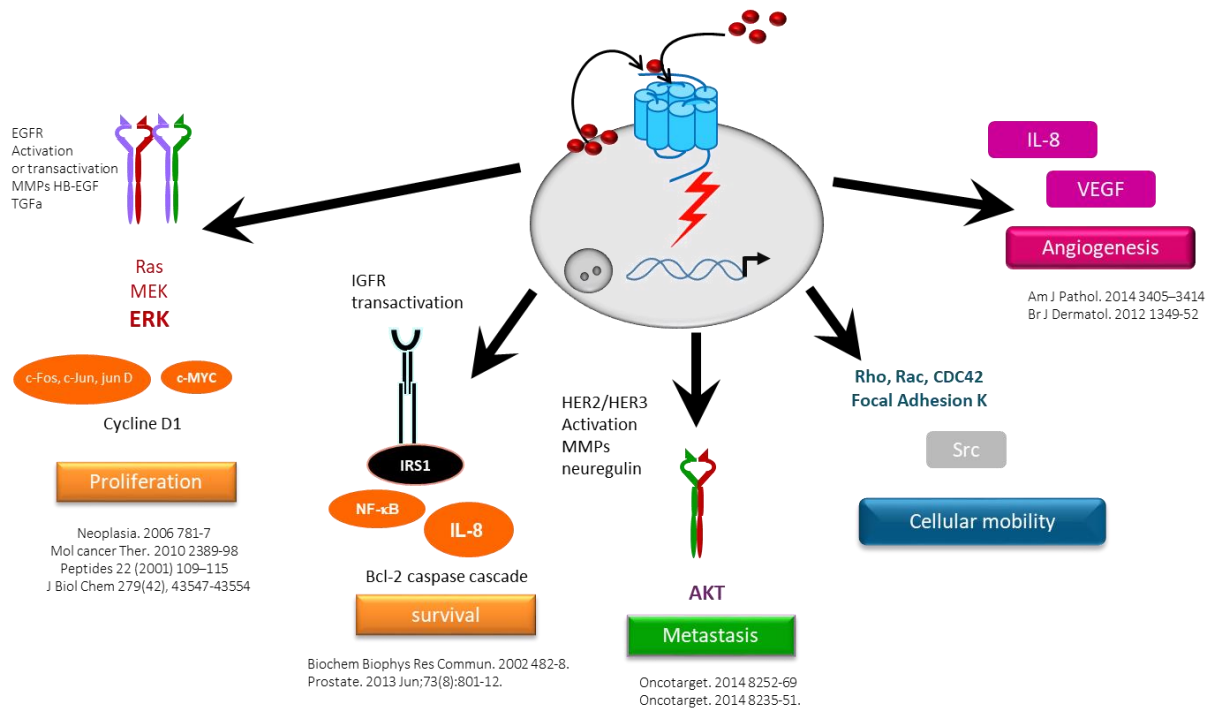


Figure 26 : Signalisation pro-oncogénique induite par la stimulation chronique du NTSR1 par NTS ou un agoniste de la NTS. L'activation de l'ensemble de ces drivers confère à la cellule tumorale un degré élevé d'agressivité, avec un haut pouvoir métastatique et une résistance aux traitements (Souazé, Dupouy, et al. 2006)

Dans des modèles cellulaires d'origine pulmonaires et mammaires, l'activation chronique du NTSR1 induit l'expression et l'activation (de 200 à 600 %) des trois récepteurs majeurs aux facteurs de croissance (HERs) : EGF-R, HER2 et HER3. Cette activation chronique des HERs résulte de l'activation des métalloprotéinases (MMP9 dans le modèle mammaire et MMP1 dans le modèle bronchique) et de la libération respective de ligands spécifiques pour EGF-R et HER3, à savoir Hb-EGF et Neuréguline 1 ou Neuréguline 2 (Younes et al. 2014a ; Dupouy et al. 2014a).

Le couple NTS/NTSR1 est donc un agent potentialisateur de la croissance et de la progression tumorale, en agissant sur l'activation concomitante de dimères et monomères des récepteurs aux facteurs de croissance.

4.2.3. Expression de NTSR1 dans le cancer et le CBNPC

Il a également été montré par notre équipe que l'expression de NTSR1 représente un marqueur de mauvais pronostic indépendant dans le CBNPC (Dupouy et al. 2011 ; Alifano et al. 2010a). L'expression du NTSR1 en immuno-histochimie a été étudiée sur une série de 138 patients présentant un adénocarcinome de stades 1 et sur 26 patients opérés de pneumothorax spontané (parenchyme pulmonaire non tumoral) où elle était absente alors qu'elle existait chez 60 % des cas d'adénocarcinomes (Figure 27). Ces patients étant naïfs de traitements d'induction (chimiothérapie ou radiothérapie), ces résultats montrent que l'activation du système neurotensinergique est associée à la progression tumorale du CBNPC.

	ADENO-CARCINOMAS (n=138)	PNEUMOTHORAX IDIOPATHIC : Pulmonary Parenchyma (n=26)
NTS	59.5%	0%*
NTSR1	65.8%	0%*
NTS <u>and</u> NTSR1	40.5%	0%**

Figure 27 : Comparaison de l'expression de NTS /NTSR1 en IHC entre adénocarcinomes pulmonaires humains (n=138) et parenchymes sains (n=26). L'expression des deux protéines est significativement supérieure pour les adénocarcinomes (Figure conçue par l'équipe)

De plus, dans une série de 228 patients présentant un primitif pulmonaire réséqué, la forte expression de NTSR1 en immunohistochimie était associée à un plus mauvais pronostic, mais seulement pour les adénocarcinomes lorsqu'on effectue une analyse de survie en fonction du type histologique (Figure 28). Or, pour les adénocarcinomes, le récepteur est localisé à l'intérieur de la cellule indiquant son activation chronique, alors que dans les autres types, en particulier les épidermoïdes, NTSR1 est plutôt localisé à la surface, évoquant son statut non activé (Alifano et al. 2010).

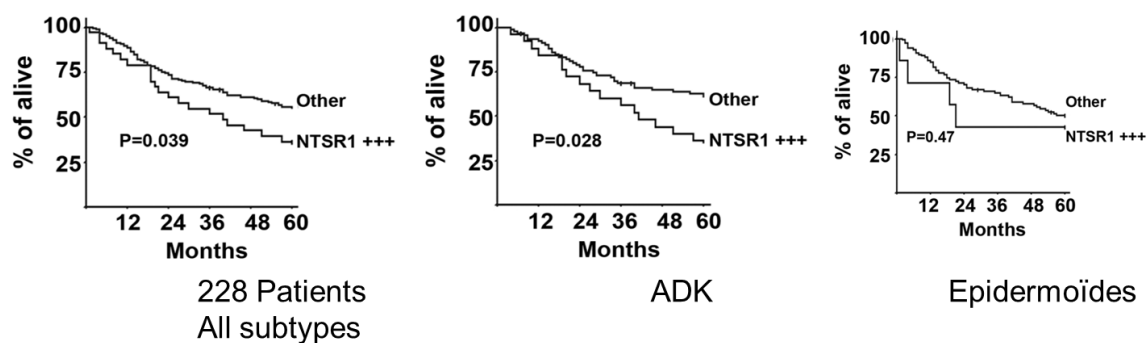


Figure 28 : Comparaison des taux de survie de patients opérés pour un CBNPC, tous types histologiques confondus, pour les adénocarcinomes (ADK), ou carcinomes épidermoïdes, en fonction de leur statut NTSR1. Le NTSR1 est donc un facteur pronostic significatif chez les patients opérés pour un adénocarcinome pulmonaire (Figure conçue par l'équipe)

4.2.4. Influence du couple NTS/NTSR1 sur la réponse aux traitements

L'activation concomitante de nombreuses signalisations à caractères oncogéniques non seulement favorise la progression tumorale, mais également impacte sur la sensibilité à certains traitements du CBNPC comme les sels de platine (J. Liu et al. 2017 ; Dupouy et al. 2014 b). Ainsi l'équipe a montré dans un modèle de cancer de l'ovaire qu'un antagoniste du NTSR1, le SR 48692 améliore la réponse aux carboplatine. Dans des modèles expérimentaux in vivo et in vitro, des expositions

chroniques de cellules d'origine de cancer de l'ovaire, SKOV3 et A2780, répondaient mieux au carboplatine, traitement standard de ce cancer. En effet, comme cela est décrit dans la Figure 29, le blocage de l'activation de NTSR1 augmente la quantité de platine dans la cellule et à l'ADN ; ceci en diminuant l'efflux du médicament grâce à la baisse du taux protéique d'ATP7A et ATP7B.

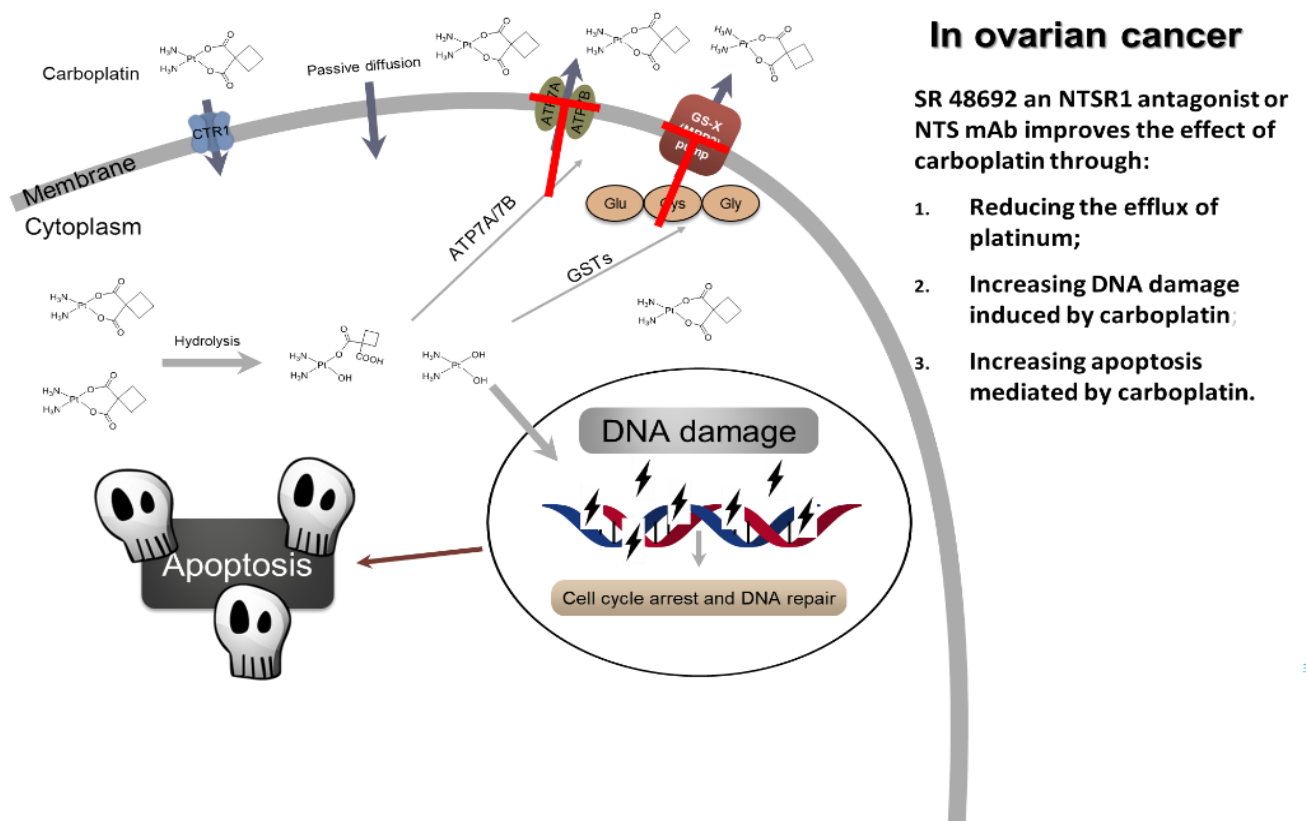


Figure 29 : Effets induits par le blocage de NTSR1 sur les mécanismes cellulaires d'influx et d'efflux des sels de platine (carboplatine) et les dommages associés (dans le cancer ovarien). Le blocage de NTSR1 est effectué par un antagoniste (SR-48692) représenté en rouge sur les protéines transmembranaires (Courtoisie Dr Liu J)

Dans le but de développer une thérapie anti-tumorale ciblant le système neurotensinergique, l'équipe a conçu et produit des anticorps monoclonaux visant à bloquer la stimulation neurotensinergique. Un anticorps a été développé à partir du peptide mature actif NTS et un deuxième à partir du long fragment LF-NTS. Ces

anticorps ont été sélectionnés sur leurs propriétés neutralisantes in vitro. Ils font partie des outils pharmacologiques majeurs utilisés dans le travail numéro 2 de cette thèse.

Chapitre 5. Rationnel et objectifs de la thèse

Malgré les progrès réalisés dans la détection et le traitement du CBNPC, le taux de survie à 5 ans, est de 18 % tous stades et toutes histologies confondus et descend jusqu'à 5 % pour les malades de stade IV (Figure 30) (Siegel, Miller, and Jemal 2018).

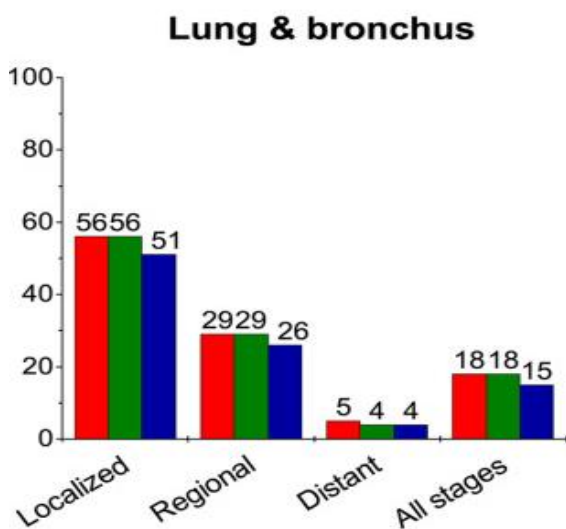


Figure 30 : Taux de survie à 5 ans des cancers broncho-pulmonaires (%), en fonction du stade localisé, à extension locorégionale, disséminé, puis tous stades confondus. En orange toutes les ethnies confondues, en vert caucasien, bleu non caucasien (Siegel, Miller, and Jemal 2018).

Les malades traités par chirurgie, qui comptent actuellement pour 30 % des CBNPC au moment du diagnostic, représentent la population au pronostic le plus favorable avec une survie à 5 ans de l'ordre de 50 %, variant aussi selon le stade clinique et

pathologique (stade Ia >80 %, stade Ib environ 60 %, stade II autour de 30-40 %, stade III 20-30 %). Le bénéfice démontré du traitement multimodal sur ces malades « chirurgicaux » est significatif, mais reste modeste comme en témoigne, par exemple, le gain de survie à 5 ans de 5 % pour la chimiothérapie adjuvante (à base de sels de platine la plupart du temps), dans des essais randomisés contrôlés (Arriagada et al. 2010; 2004). Pour les patients de stade plus avancé (certains IIIa, IIIb et IV) traités par thérapie systémique exclusive ou combinée à la radiothérapie les faibles taux de survie à 5 ans rapportés montrent clairement qu'un plateau a été atteint en termes de bénéfice thérapeutique.

Outre la prévention il semble donc nécessaire de bien comprendre les mécanismes de la carcinogenèse, de la progression tumorale, et de résistance aux traitements ainsi que leurs interactions éventuelles afin d'améliorer les résultats oncologiques à moyen ou long termes. Les grands axes de recherche mis en œuvre pour améliorer le pronostic comprennent notamment l'identification de biomarqueurs théranostiques permettant à la fois de prédire la réponse aux traitements existants ou de définir les cibles de nouveaux outils thérapeutiques à développer, puis de tester des combinaisons de traitements pour évaluer et optimiser leur efficacité. Dans cette thèse, deux aspects différents de l'arsenal thérapeutique du CBNPC sont explorés avec pour objectif final d'optimiser la prise en charge et améliorer le pronostic du cancer pulmonaire: le cisplatine et son influence sur l'expression de PD-1/PD-L1, puis la NTS et l'impact de son blocage spécifique sur la réponse aux sels de platine.

Le développement des immunothérapies et des ICIs ont représenté une avancée majeure du traitement du CBNPC et continuent de susciter beaucoup d'attente et d'espoir pour médecins et patients. Si les indications ne cessent d'évoluer et de

s'étendre, les ICIs comme les anti-PD-1/PD-L1 ne permettent un contrôle durable de la maladie que dans une proportion limitée de patients atteints par un CBNPC de stade avancé, notamment ceux dont la tumeur présente plus de 50% de cellules tumorales marquées PD-L1 (von Pawel et al. 2019; Reck et al. 2019). C'est pourquoi, ces dernières années, un intérêt prononcé pour l'expression de PD-L1 et sa régulation a été montré par différentes équipes de recherche (Maleki Vareki, Garrigós, and Duran 2017; Z.-Y. Dong et al. 2016).

Plusieurs études ont évalué l'impact des traitements systémiques sur le microenvironnement tumoral des CBNPC et sur les points de contrôle immunitaires, notamment pour les sels de platine (Shin et al. 2018; P. Zhang et al. 2016). En effet, les sels de platine restent une arme thérapeutique majeure dans la prise en charge multimodale des patients atteints de CBNPC de tout stade, que ce soit en modalité néo-adjuvante, adjuvante ou en traitement systémique exclusif. Ceci a poussé notre équipe, comme d'autres, à s'intéresser particulièrement à la capacité du cisplatine à augmenter ou diminuer l'immunogénicité tumorale et par extrapolation les capacités d'élimination de l'immunité adaptative.

Plus précisément, l'objectif principal de ce travail était d'étudier l'effet du cisplatine sur l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et immunitaires du microenvironnement, avec comme but corolaire de rationaliser l'association de thérapies combinant sels de platine et anti-PD-1/PD-L1. En effet, en cas d'augmentation de l'expression de PD-L1 par le cisplatine, on peut émettre l'hypothèse d'une meilleure réponse aux ICI anti-PD-1 ou PD-L1, apportant une justification logique aux essais cliniques de thérapies combinées, comme certains réalisés actuellement (Antonia et al. 2017; S. V. Liu et al. 2018; Paz-Ares et al. 2018; Gandhi et al. 2018). De plus, la mécanistique de la régulation de PD-L1 par les

sels de platine reste flou, et si certains auteurs ont proposé une régulation de la transcription du gène PD-L1 par l'intermédiaire de voies de signalisation oncogéniques telles que mTOR/PI3K/AKT (Zerdes et al. 2018), il semble nécessaire de continuer à explorer les mécanismes impliqués.

Afin de répondre à ces premiers objectifs, j'ai, dans ce travail, analysé la modification d'expression de PD-L1 par le cisplatine à trois niveaux différents :

- Une cohorte de patients opérés de CBNPC ayant reçu une chimiothérapie néoadjuvante.
- Des tumeurs pulmonaires expérimentales greffées à des souris
- Des lignées cellulaires de cancer broncho-pulmonaire permettant également d'initier une partie mécanistique.

Les résultats attendus étant une up-régulation de PD-L1 par les cellules tumorales après traitement par le cisplatine et une meilleure efficacité anti-tumorale des traitements anti-PD-1/PD-L1 combinés aux sels de platine par rapport aux monothérapies.

En parallèle, l'équipe de recherche développant un outil pharmacologique anti-neurotensine, le deuxième but de ce travail était de tester l'impact du blocage spécifique de la signalisation neurotensinergique sur la plasticité cellulaire et la croissance tumorale ainsi que sur la sensibilité au cisplatine, dans le CBNPC, tel que schématisé par la Figure 31 ci-dessous. Le but corolaire étant, là encore, d'évaluer et prédire l'utilité de thérapies combinant sels de platine et blocage ciblé du couple NTS/NTSR1, dans le traitement du CBNPC.

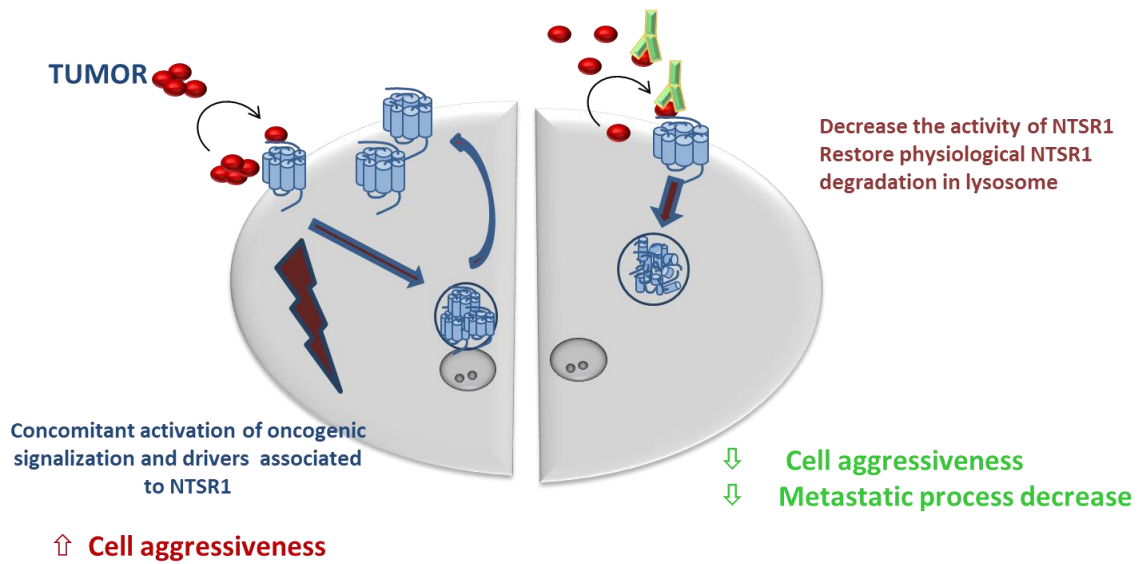


Figure 31 : Effets potentiels du blocage de la signalisation NTS/NTSR1 par un anticorps anti-NTS (en vert, partie droite) restaurant la dégradation physiologique de NTSR1 dans les lysosomes. Il en résulte une inhibition de l'activation en cascade de facteurs oncogéniques promouvant l'agressivité tumorale et son potentiel métastatique (Figure conçue par le laboratoire)

Chapitre 6. Résultats

6.1. Le cisplatine augmente l'expression de PD-L1 et optimise l'inhibition du point de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1 dans le CBNPC (Travail 1)

Cisplatin increases PD-L1 expression and optimizes immune check-point blockade in non-small cell lung cancer (Fournel et al. 2019, article publié, en annexe 1)

6.1.1. Introduction

Lors de la dernière décennie, le développement des immunothérapies a constitué une évolution majeure dans la prise en charge du cancer en général et du CBNPC en particulier. En effet, les indications de ce type de traitement sont de plus en plus nombreuses dans le parcours des patients ayant un cancer pulmonaire et il est important d'étudier les éventuelles interactions entre thérapies systémiques qui pourraient impacter leur efficacité anti-tumorale ainsi que le pronostic des malades.

Dans ce travail, nous évaluerons l'effet d'une drogue clé du CBNPC, le cisplatine, sur l'expression du ligand PD-L1, cible actuellement principale des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire dans les néoplasies pulmonaires.

6.1.2 Patients et spécimens chirurgicaux

Nous avons examiné rétrospectivement une cohorte de 122 patients opérés dans notre centre de référence tertiaire de chirurgie thoracique entre 2000 et 2007, pour une résection à visée curative d'un carcinome broncho-pulmonaire primitif localement

avancé après chimiothérapie néo-adjuvante qui avait permis d'objectiver une réponse partielle (PR) ou une maladie stable (SD), à l'évaluation tomodensitométrique (Eisenhauer et al. 2009). Tous les cas ont été préalablement discutés au sein d'une réunion de concertation multidisciplinaire. Finalement, pour 39 cas sur 122, des échantillons tumoraux étaient disponibles pour analyse en immunohistochimie de tissus appariés en pré- et post-chimiothérapie néo-adjuvante. En effet, dans le cas de cette cohorte de patients étaient disponibles des blocs inclus dans la paraffine de ganglions lymphatiques médiastinaux métastatiques, obtenus lors du bilan initial de stadification par médiastinoscopie ou médiastinotomie antérieure, ainsi que des blocs de tumeur primitive pulmonaire obtenus lors de la résection chirurgicale, tout ceci permettant une évaluation immunohistochimique comparative de l'expression de PD-L1.

Il est à noter que les analyses moléculaires telles que les mutations EGF-R ou K-ras et les tests de réarrangements ALK-ROS-1 n'étaient pas effectuées en routine à cette époque, rendant ces données inaccessibles à cause de l'absence de tumorotheque et d'échantillons congelés de manière systématique. Les données épidémiologiques ainsi que la réponse clinico-radiologique et pathologique à la chimiothérapie (exprimées en pourcentage de nécrose, ou fibrose par rapport au pourcentage de cellules tumorales viables) ont également été recueillies et analysées. La «viabilité» étant définie, lors de l'analyse de tissu post-chimiothérapie, par la présence de cellules tumorales présentant une chromatine nucléaire distincte et une membrane nucléaire ou cytoplasmique intacte, et par l'absence de signe de nécrose (caryorrhexis, caryolyse et pycnose).

Cohorte « contrôle »

En outre, nous avons évalué le statut PD-L1 en immunohistochimie sur une deuxième cohorte de 20 patients ayant subi une résection chirurgicale initiale du CPNPC avec évaluation du ganglion médiastinal pathologique postopératoire montrant une invasion tumorale de ganglions médiastinaux non diagnostiquée lors de la stadification préopératoire, ces cas étant aussi appelés minimal N2 ou plus communément N2 «de rencontre». Ces patients n'ayant reçu aucune chimiothérapie néo-adjuvante, l'évaluation de l'expression de PD-L1 entre ganglions lymphatiques tumoraux et tumeur primitive pulmonaire a servi de cohorte «témoin». Un consentement éclairé a été obtenu de tous les patients ou de leurs proches (dans le cas de patients décédés). Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique local (CPP Ile de France II, n ° 2008-133 et 2012 06-12) en accord avec la loi française et la déclaration d'Helsinki.

6.1.3. Résultats préliminaires

L'hypothèse d'une influence des sels de platine sur l'expression de PD-L1 avait été initialement évoquée par des résultats préliminaires obtenus *in vitro*. En effet, lors de la réalisation d'un travail sur la neurotensine et le carboplatine dans le cancer ovarien, nous avons constaté une amplification du niveau de l'ARNm de PDL-1 par exposition de cellules SKOV3 (lignée de carcinome ovarien) au carboplatine (Figure 32).

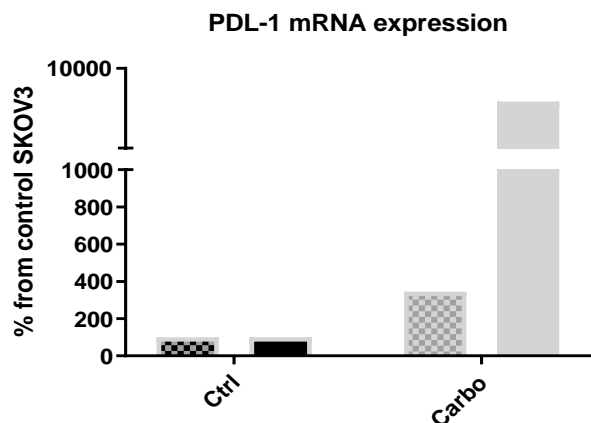


Figure 32 : niveau d'ARNm PD-L1 par PCR effectuée à 24h (colonne quadrillée) et 48h (colonne pleine) après exposition de cellules SKOV3 à confluence, au PBS (Ctrl) ou au carboplatine (150 μ M)

Suite à cette observation, nous avons testé l'effet du cisplatine sur une lignée cellulaire de carcinome pulmonaire humain, LNM-R, dans différentes conditions expérimentales en termes de concentration et durée d'exposition à la chimiothérapie. De même que pour les SKOV3, le traitement par un sel de platine augmentait la quantité d'ARNm PD-L1 par rapport au contrôle, cet effet semblant plus important à des concentrations plus élevées de cisplatine et se vérifiait à 24 et 48 heures d'exposition (Figure 33).

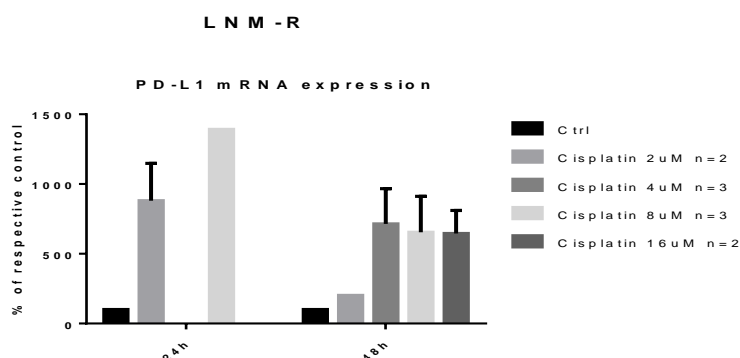


Figure 33 : niveau d'ARNm PD-L1 par PCR effectuée à 24h et 48h après exposition de cellules LNM-R à confluence, au PBS (Ctrl) ou au cisplatine à différentes concentrations

6.1.4. Résultats du travail 1

L'expression de PD-L1 n'est pas différente entre tumeur primitive pulmonaire et ganglions médiastinaux métastatiques

Nous avons analysé l'expression de PD-L1 en immunohistochimie sur des pièces de résection de primitifs pulmonaires et de ganglions médiastinaux envahis, sur une cohorte de 20 patients présentant un envahissement ganglionnaire médiastinal « inattendu » n'ayant pas été diagnostiqué au bilan d'extension radio-métabolique préopératoire (minimal N2). De ce fait, les malades de cette cohorte n'avaient reçu aucun traitement d'induction et donc pas de cisplatine. A l'analyse pathologique définitive des spécimens, ces carcinomes pulmonaires étaient classés pN2. Comme le montre la Figure 34, aucune différence significative de pourcentage de cellules marquées PD-L1 n'a été observée entre les deux sites, primitif pulmonaire et secondaire médiastinal ($p = 0,62$).

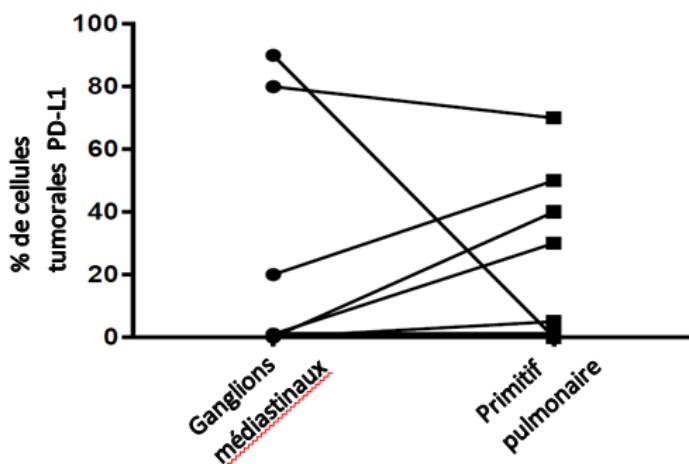


Figure 34 : Comparaison individuelle de % de cellules tumorales marquées PD-L1 entre tumeur primitive pulmonaire et ganglions médiastinaux métastatiques

Ceci représente un argument renforçant le postulat de base à l'analyse comparative de l'expression de PD-L1 avant et après chimiothérapie néo-adjuvante. En effet les tissus tumoraux disponibles pour l'analyse pré-chimiothérapie sont quasi exclusivement issus de biopsies ganglionnaires médiastinales. L'absence de différence d'expression constitutive entre les deux sites est donc un prérequis à l'analyse de l'effet d'un traitement sur l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, ce que semble confirmer les résultats préliminaires obtenus sur cette cohorte « contrôle ».

Il est intéressant de noter qu'un seul patient a présenté un marquage positif de PD-L1 $\geq 50\%$ des cellules tumorales dans le poumon primaire par rapport à $<50\%$ dans les ganglions lymphatiques. De plus, dans la plupart des cas, le statut de PD-L1 était similaire entre les deux sites et seules quelques tumeurs abritaient un pourcentage plus élevé de cellules colorées par PD-L1 dans les tumeurs primaires que dans les ganglions lymphatiques, dans cette cohorte de patients ne recevant pas de cisplatine (Tableau 2).

Tableau 2: Répartition des patients en fonction du statut PD-L1 et du site tumoral

% de cellules PD-L1 (+)	0%	1-49 %	$\geq 50\%$
Primitif pulmonaire	n=13	n=5	n=2
Ganglions médiastinaux	n=15	n=3	n=2

Au-delà des tests statistiques ne montrant pas de différence significative entre le statut de PD-L1 exprimé en tant que variable continue (dans une cohorte relativement petite d'une affection rare, N2 minimal), cette analyse descriptive catégorielle renforce notre hypothèse considérant que l'expression de PD-L1 à des

localisations nodales métastatiques peut être considérée comme représentative de celle de la tumeur primitive.

La chimiothérapie à base de cisplatine induit l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et immunitaires de CBNPC réséqués

Nous avons identifié trente-neuf patients ayant des échantillons de tumeur appariés permettant des analyses en immunohistochimie de tissus pré- et post chimiothérapie néo-adjuvante. Cette cohorte se composait de 29 (74,4 %) hommes et 10 (25,6 %) femmes, d'âge moyen 56,5 (\pm 8,1 ans). La plupart des patients étaient des fumeurs (76,9 %) avec une consommation moyenne de tabac de 37,1 (\pm 6,2) paquets-années (Tableau 3). Les patients atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) représentaient 51,3 % de l'ensemble de la cohorte. La chimiothérapie néo-adjuvante consistait en l'administration d'un doublet comprenant toujours du cisplatine associé à un second agent chimiothérapeutique, permettant d'obtenir, au bilan de réévaluation, une réponse partielle ou une maladie stable chez 15 (38,5 %) et 24 (61,5 %) des patients, respectivement. Ces malades étant considérés éligibles à un traitement local chirurgical étaient donc opérés, et bénéficiaient majoritairement de lobectomie pulmonaire associée à un curage ganglionnaire médiastinal (51,3 % des cas). L'analyse pathologique des pièces de résection révélait que les tumeurs étaient principalement des adénocarcinomes, et que les taux moyens de remaniements histologiques post-chimiothérapie étaient répartis comme suit: nécrose ($16,1 \pm 20,3$ %), fibrose ($48,2 \pm 27,7$ %) et cellules tumorales viables ($35,7 \pm 23,0$ %).

Tableau 3 : caractéristiques cliniques des patients opérés après chimiothérapie néo-adjuvante

Variable	Nombre de patients (%)
Genre	
Homme	29 (74,4%)
Femme	10 (25,6%)
Age	
≤ 60 ans	25 (64,1%)
> 60 ans	14 (35,9%)
Tabagisme	
Jamais	9 (23,1%)
Sevré ou actif	30 (76,9%)
BPCO	
Oui	20 (51,3%)
Non	19 (48,7%)
Stade clinique	
Ia,b-IIa,b	0 (0,0%)
IIIa	38 (97,4%)
IIIb	1 (2,6%)
IV	0 (0,0%)
Type de chimiothérapie	
Cis + gemci	18 (46,2%)
Cis + vino	13 (33,3%)
Cis + autre	8 (20,5%)
Nombre de cure de CT	
2	16 (41,0%)
3	16 (41,0%)
4	7 (18,0%)
Type de resection	
Lobectomie	20 (51,3%)
Bilobectomie	4 (10,3%)
Pneumonectomie	15 (38,5%)
Stade pathologique	
Ia,b	7 (17,9%)
IIa,b	8 (20,5%)
IIIa	22 (56,4%)
IIIb	2 (5,1%)
IV	0 (0,0%)
Histologie	
Adénocarcinome	21 (53,8%)
Epidermoïde	11 (28,2%)
CBNPC	6 (15,4%)
Neuroendocrine	1 (2,6%)
NPC	
yp % de tumeur viable	10 (25,6%)
≤50%	29 (74,4%)
>50%	
yp % de fibrose	13 (33,3%)
≤30%	26 (66,7%)
>30%	
yp % de nécrose	30 (76,9%)
≤30%	9 (23,1%)
>30%	

BPCO: broncho-pneumopathie chronique obstructive ; Cis: cisplatine; gemci: gemcitabine; vino: vinorelbine; CBNPC: carcinome non à petites cellules; CT : chimiothérapie ; yp: analyse pathologique post-chimiothérapie.

Il est à noter que parmi les 39 cas de cette cohorte de patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante et ayant été opérés de leur tumeur primitive pulmonaire avec curage ganglionnaire médiastinal associé :

– 15 malades ont été « downstagés » et ont présenté une diminution du stade de classification de la tumeur après analyse pathologique définitive, car les ganglions médiastinaux prélevés lors de la lymphadénectomie systématique étaient exempts de cellule tumorale après chimiothérapie (yp N2 négatifs). La chimiothérapie néo-adjuvante ayant permis une régression complète de la tumeur au niveau ganglionnaire médiastinal, ces tissus n'étaient plus utilisables pour évaluer prospectivement l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales.

– 2 malades n'avaient plus de tissu ganglionnaire médiastinal disponible pour effectuer une nouvelle analyse d'immunohistochimie (échantillons de base probablement trop petits ou non conservés, la cohorte datant du début des années 2000).

– 22 patients « seulement » ont présenté une atteinte tumorale résiduelle au niveau des ganglions médiastinaux malgré chimiothérapie d'induction (ypN2 +)

Nous avons tout d'abord évalué le pourcentage de cellules marquées PD-L1 sur les lames de ganglions lymphatiques appariés de ces 22 derniers patients. Dans cette cohorte de petite taille, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales de ces sites métastatiques ganglionnaires était plus élevée après chimiothérapie néo-adjuvante, sans pour autant atteindre la significativité statistique. En effet, le pourcentage moyen de cellules tumorales positives pour PD-L1 entre tissus pré- et post-chimiothérapie était respectivement de 5,7 et 13,3 ($p = 0,17$) (Figure 35).

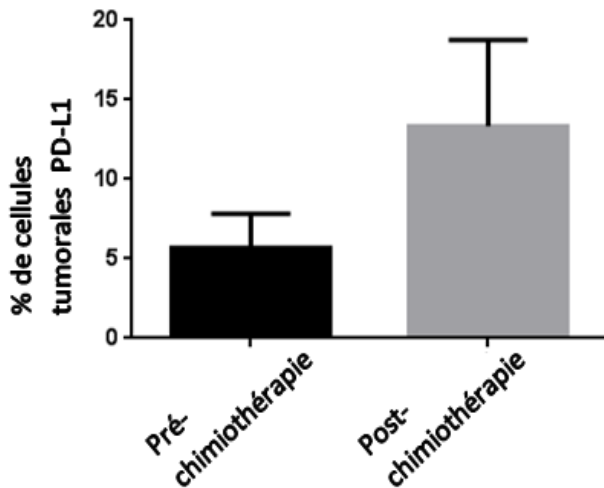


Figure 35 : Comparaison du % de cellules tumorales ganglionnaires médiastinales marquées PD-L1 avant et après chimiothérapie néo-adjuvante

Afin d'élargir la taille de la cohorte aux 39 patients ayant été opérés après chimiothérapie d'induction, nous avons également réalisé un marquage PD-L1 prospectif sur les échantillons de tumeur primitive pulmonaire réséquée (Figure 36).

Là encore, les résultats montraient que le pourcentage de cellules tumorales PD-L1 positives était plus élevé après chimiothérapie néo-adjuvante que pour les échantillons tumoraux initiaux (pré-chimiothérapie, 26 % contre 11 %, respectivement, $p = 0,017$), suggérant un effet inducteur du cisplatine sur l'expression de PD-L1 (Figure 37).

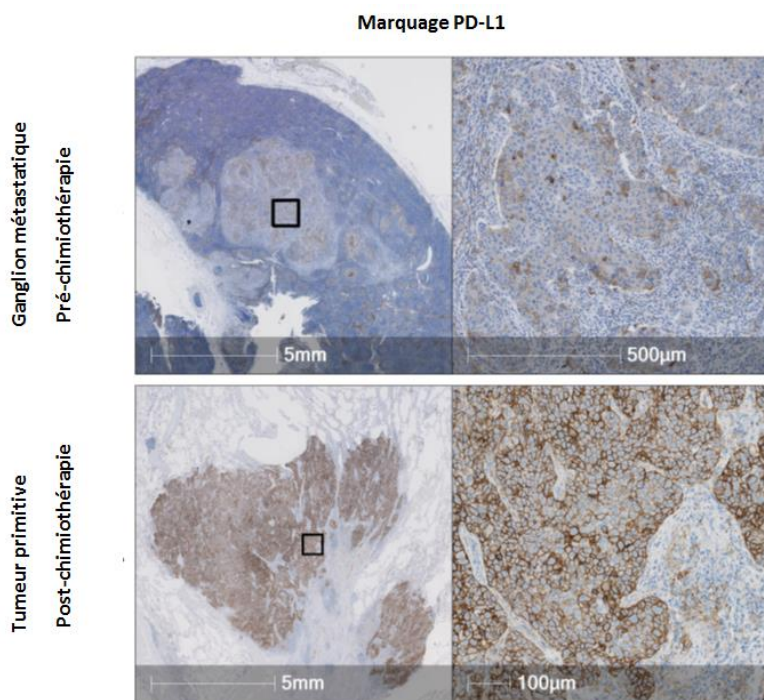


Figure 36 : Exemple de marquage PD-L1 en IHC, réalisé sur tissu tumoral ganglionnaire pré-chimiothérapie et pulmonaire post-chimiothérapie d'un même patient et à différents grossissements. Le marquage PD-L1 est de couleur marron et la morphologie permet de différencier cellules tumorales et cellules immunitaires ou stromales

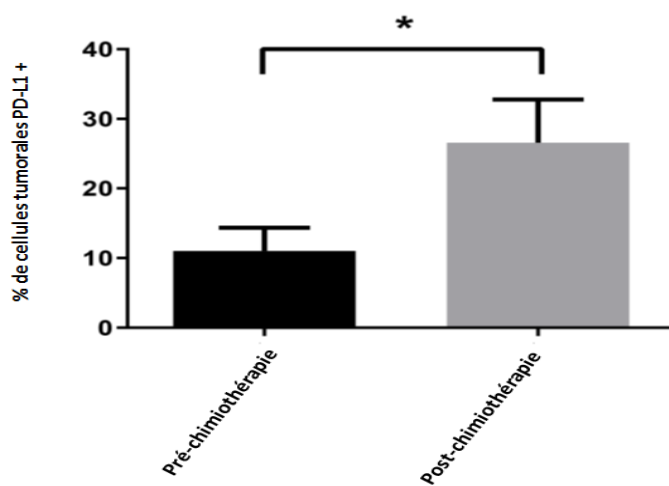


Figure 37 : Comparaison du % de cellules tumorales marquées PD-L1 avant (ganglions) et après (tumeur pulmonaire primitive) chimiothérapie néo-adjuvante ; * $p < 0.05$

Il est intéressant de noter que Δ PD-L1 (% cellules marquées PD-L1 après cisplatine - % cellules marquées PD-L1 avant cisplatine, voir méthodes) était positif, nul ou négatif dans 22 (56,4 %), 8 (20,5 %) et 9 (23,1 %) des cas, respectivement (Figure 38). Parmi les patients Δ PD-L1 positifs, 9 (23,1 % au total) ont présenté un changement de catégorie d'expression PD-L1, passant de <50 % à \geq 50 % de cellules marquées, et ont donc été classés comme Δ PD-L1₅₀ positifs.

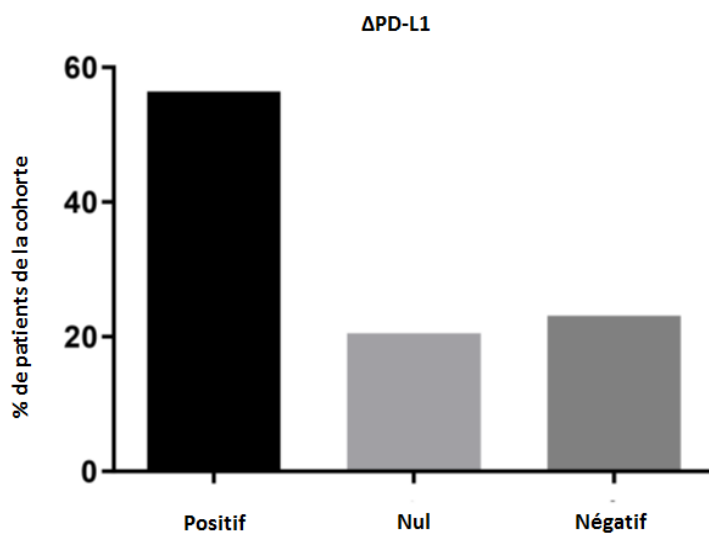


Figure 38 : Répartition catégorielle de Δ PD-L1 des cellules tumorales

En cherchant d'éventuelles associations entre l'expression de PD-L1 et des facteurs cliniques ou pathologiques (Tableau 4) , nous avons noté que le sous-groupe de patients qui présentaient <5 % de cellules tumorales PD-L1 positives avant traitement à base de cisplatine avaient des tumeurs avec un taux de fibrose significativement plus élevé ($p = 0,034$) et qui tendaient à être composées d'une proportion plus faible de cellules tumorales viables ($p = 0,101$) après chimiothérapie néo-adjuvante que les autres patients. A l'inverse, les primitifs pulmonaires qui présentaient plus de 50 % de cellules tumorales PD-L1 positives après

chimiothérapie avaient un taux moyen de fibrose significativement plus faible ($p = 0,030$), et un taux de nécrose significativement plus élevé ($p = 0,011$) que les autres. De plus, nous avons observé que la proportion de tumeurs présentant plus de 50 % de cellules tumorales viables après chimiothérapie était significativement plus élevée dans le sous-groupe de patients $\Delta PD-L1_{50}$ positifs par rapport aux cas négatifs ($p = 0,019$).

Tableau 4 : Association entre facteurs clinico-pathologiques et $\Delta PD-L1$

Variable	Moyenne (\pm SEM) $\Delta PD-L1$	Valeur du p	Proportion de patients $\Delta PD-L1_{50}$ positifs dans la catégorie (%)	Valeur du p
Genre				
Homme	13,7 (6,8)	0,78	20,7	0,66
Femme	17,6 (12,3)		30,0	
Age > 60 ans				
Oui	11,7 (8,4)	0,60	14,3	0,28
Non	17,8 (8,5)		28,0	
Tabagisme				
Actif/sevré	14,7 (6,9)	0,84	23,3	0,66
Jamais	17,7 (14,5)		22,2	
BPCO				
Oui	22,6 (8,2)	0,23	30,0	0,25
Non	7,8 (9,2)		15,8	
Type de Chimiothérapie				
Cis + gemci	16,7 (5,8)	0,67	22,2	0,80
Cis + vino	8,6 (4,2)		20,0	
Cis + autre	23,2 (8,3)		33,3	
Nombre de cures				
<4	17,3 (6,2)	0,40	20,0	0,67
≥ 4	1,8 (25,6)		23,5	
yp tumeur viable >50%				
Oui	30,8 (13,2)	0,09	50,0	0,02
Non	8,7 (6,3)		13,8	
yp Nécrose >30%				
Oui	6,6 (15,4)	0,47	22,2	0,66
Non	16,9 (6,3)		23,3	
yp Fibrose >30%				
Oui	17,2 (6,9)	0,55	19,2	0,33
Non	9,6 (11,3)		30,8	

De même que pour les cellules tumorales, nous avons également effectué un marquage PD-L1 des cellules immunitaires du microenvironnement tumoral sur des lames de tissus pré- (ganglions médiastinaux) et post-(primitifs pulmonaires) chimiothérapie néo-adjuvante des 39 patients de la cohorte précédente. Comme

décrit dans les méthodes, nous avons, en collaboration avec des pathologistes spécialistes du cancer pulmonaire, analysé de manière aléatoire les lames d'immunohistochimie PD-L1 et attribué un « score immunitaire » aux échantillons des différents patients. Les scores correspondant aux tissus pré- et post- chimio d'un même patient ont ensuite été appariés afin de pouvoir en effectuer la comparaison (Figure 39).

Le nombre de tumeurs présentant un marquage PD-L1 des cellules immunitaires avec score = 2 était significativement plus élevé dans le groupe post-traitement par rapport au groupe pré-chimiothérapie (25,6 % contre 10,3 %, respectivement, $p = 0,001$), suggérant une régulation positive du cisplatine sur l'expression de PD-L1 par les cellules immunitaires.

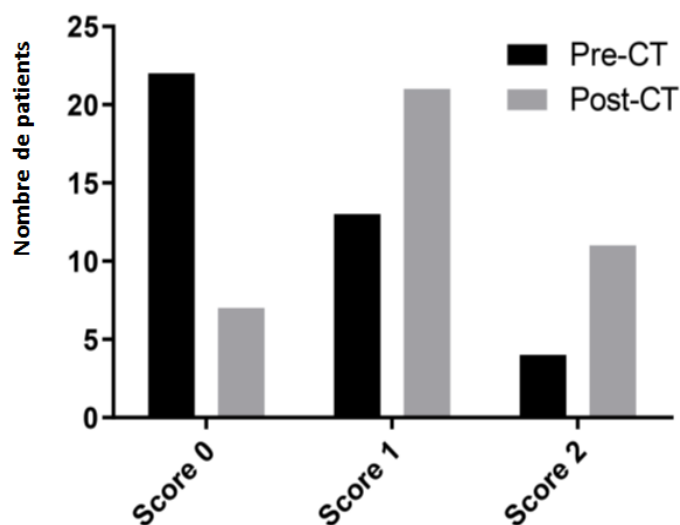


Figure 39 : Score PD-L1 des cellules immunitaires du microenvironnement sur échantillons appariés

Par ailleurs, il existait une tendance statistique signifiant que les patients chez qui une augmentation du score PD-L1 des cellules immunitaires avait été observée en post-chimiothérapie présentaient un taux de cellules tumorales viables supérieur aux

autres (taux moyen de cellules tumorales viables post-chimiothérapie de 43,6 % contre 31,8 %, $p = 0,11$). Ceci suggère qu'il pourrait exister un lien entre remaniements post chimiothérapie et variation d'expression de PD-L1, également pour les cellules immunitaires.

Nous avons ensuite effectué des analyses similaires, en évaluant le score PD-L1 des cellules immunitaires, mais cette fois sur les échantillons tumoraux issus des exérèses de tumeurs de la cohorte de 20 patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie et ayant un envahissement ganglionnaire pN2. La distribution des scores n'était pas identique entre ganglions métastatiques et primitif pulmonaire. Fait intéressant, il y avait plus de score immunitaire = 1 (intermédiaire) pour les localisations primitives pulmonaires que les localisations nodales secondaires. Néanmoins, en dichotomisant le score immunitaire PD-L1 comme nous l'avons fait pour la cohorte de patients ayant reçu un traitement néoadjuvant (score immunitaire 0 ou 1 opposé au score 2), il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les deux sites ($p = 0,27$).

En parallèle, nous avons réalisé un marquage CD8+ en immunohistochimie afin d'évaluer l'éventuelle influence de la chimiothérapie néo-adjuvante sur cette population de lymphocytes cytotoxiques. Comme montré dans la figure ci-dessous, et en analysant le marquage CD8+ dans l'ensemble de la zone tumorale étudiée (périphérie et centre des foyers tumoraux à proprement parler), la densité moyenne de lymphocytes CD8 + n'était pas modifiée de manière significative après traitement d'induction ($p = 0,59$, Figure 40). De plus, il n'y avait pas d'association significative entre les variations d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et le nombre correspondant de lymphocytes CD8 + dans les échantillons post-chimiothérapie ($p = 0,92$).

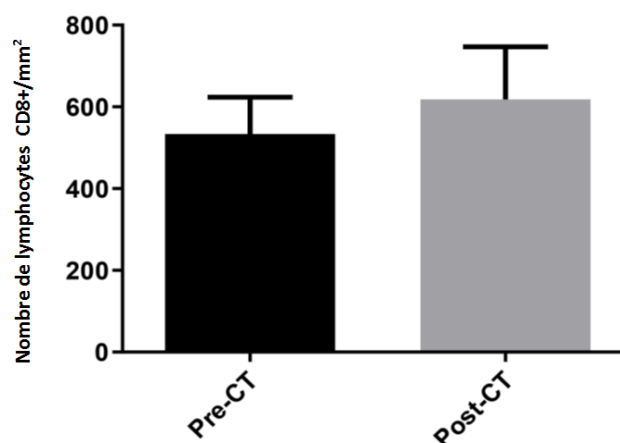


Figure 40: Densité moyenne de lymphocytes CD8+ sur les échantillons tumoraux avant et après chimiothérapie

Au final, les résultats de l'étude de cohorte réalisés sur les patients ayant reçu une chimiothérapie néoadjuvante suggèrent que ce traitement augmente l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et les cellules immunitaires du microenvironnement, sans modifier la densité de CD8+ sur les échantillons tumoraux. Ces changements du niveau d'expression de PD-L1 semblaient être associés à la réponse pathologique à la chimiothérapie d'induction, avec notamment une moins bonne réponse objective chez les patients dont le Δ PD-L1 était le plus important.

Le cisplatine augmente l'expression de PD-L1 dans les tumeurs expérimentales

Pour confirmer nos résultats cliniques et mieux étudier l'influence du cisplatine (et non d'un doublet de chimiothérapies néo-adjuvantes) sur la régulation de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, nous avons établi des tumeurs expérimentales en injectant des cellules issues de lignées de cancer pulmonaire humain (A549) à des souris nude, ou de carcinome pulmonaire murin (LLC1) à des

souris immunocompétentes (C57-Black6). Une fois que les tumeurs greffées avaient atteint un volume suffisant, nous avons réalisé des biopsies avant traitement et après injection de cisplatine, afin d'étudier l'expression de PDL-1 par PCR et Western blot. Tout d'abord, nous avons confirmé que les cellules LLC1 exprimaient bien PD-L1, le transcrit de l'ARNm PD-L1 était bien détectable en RT-PCR (Figure 41).

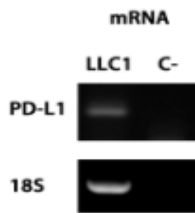


Figure 41: PCR montrant que les cellules injectées LLC1 expriment bien le ligand PD-L1. La bande 18S correspondant à l'ARNm d'une protéine de référence

Nous avons ensuite analysé le niveau de protéine PD-L1 dans les lysats de tumeurs LLC1 avant et après traitement par cisplatine. L'estimation semi-quantitative a mis en évidence une augmentation significative de la protéine PD-L1 dans la tumeur après 24 h de traitement avec 1mg/kg de cisplatine ($p = 0,02$, Figure 42).

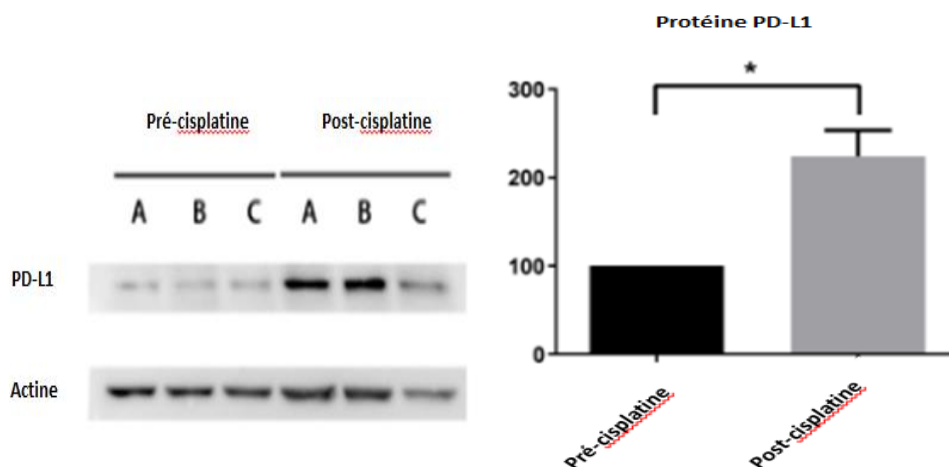


Figure 42 : Western-Blot montrant une augmentation de l'expression protéique de PD-L1 après injection de cisplatine aux souris portant une tumeur LLC1, le contrôle utilisé pour les gels étant l'actine, et pour le diagramme la quantification est faite en % du niveau basal pré-cisplatine mis à 100%

Pour éliminer l'influence du composant immunitaire dans cette régulation, en particulier des lymphocytes T, nous avons évalué l'expression de PD-L1 dans un modèle de souris « nude » athymiques portant des tumeurs issues de la lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire humain (A549). L'analyse comparative des échantillons de tumeurs a montré une augmentation significative du niveau d'ARNm PD-L1 après traitement par 1 mg/kg de cisplatine pendant 24 heures ($p = 0,03$, Figure 43).

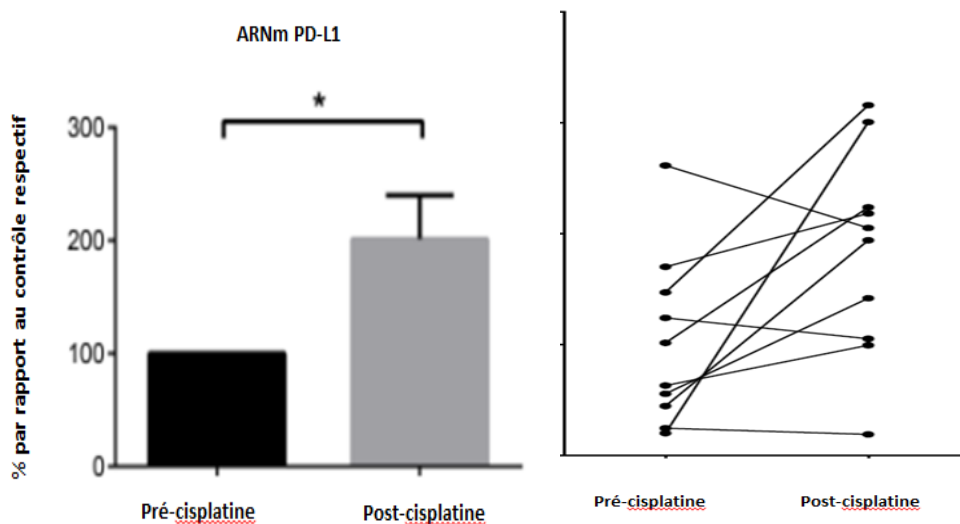


Figure 43 : Comparaison de l'expression de l'ARNm PD-L1 avant et après injection de cisplatine à des souris nude portant une tumeur A549, en moyenne sur le diagramme à gauche et en analyse comparative individuelle de chaque souris à droite

Dans les groupes témoins recevant l'injection de PBS seul, les niveaux de transcrits PD-L1 n'étaient pas significativement modifiés ($p = 0,53$).

Le cisplatine augmente rapidement l'expression de PD-L1 de manière dose-dépendante, via l'activation de l'AKT

Afin d'aborder les mécanismes impliqués dans l'induction de l'expression de PD-L1 par le cisplatine dans les cellules tumorales, nous avons tout d'abord étudié une dose réponse. Après le traitement des cellules LNM-R, les taux d'ARNm de PD-L1 étaient augmentés de 1,5 à 7,5 fois par rapport aux groupes témoins. Un plateau est atteint vers la concentration de 4 μ M de cisplatine. Sachant que la CI_{50} de cisplatine est de $12 \pm 3,1 \mu$ M, l'augmentation de l'expression de PD-L1 est observée à doses de cisplatine très en dessous, que l'on peut considérer comme subtoxique. De plus, l'augmentation de la concentration de cisplatine était corrélée positivement aux niveaux associés d'ARNm PD-L1 et atteignait un plateau autour de 8 μ M (Figure 44).

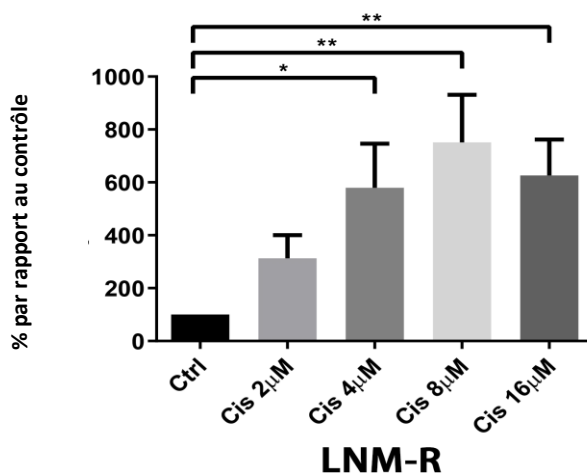


Figure 44 : Niveau d'expression de l'ARNm PD-L1 par des cellules de LNM-R en fonction des concentrations de cisplatine. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Nous avons également testé l'influence du cisplatine sur l'expression de PD-L1 dans d'autres populations cellulaires précédemment décrites (Figure 45). Comme pour la lignée cellulaire LNM-R, l'exposition des cellules tumorales au cisplatine pendant 24 heures entraînait une augmentation de la quantité d'ARNm PD-L1. Cette augmentation était de l'ordre de 2 à 3 fois.

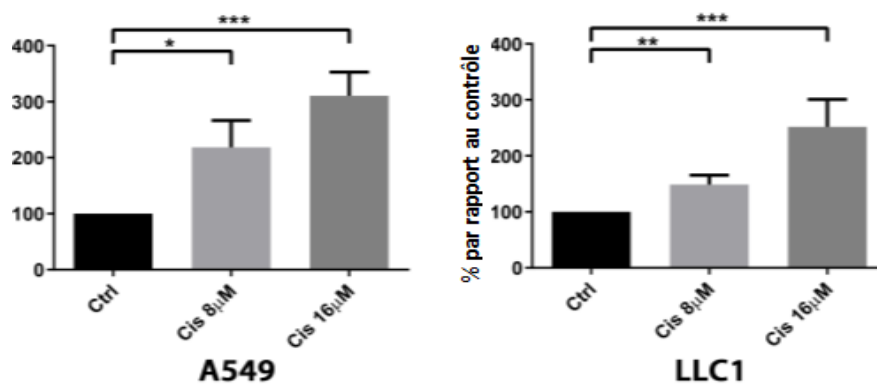


Figure 45 : Expression de l'ARNm PD-L1 selon différentes concentrations de cisplatine après 24 h d'incubation, sur des cellules A549 et LLC1. Le contrôle correspond à une incubation avec du PBS. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

De manière similaire, nous avons évalué in vitro l'impact du cisplatine sur l'expression de la protéine PD-L1. Après traitement de 24 heures avec 16 μ M de cisplatine. De même que pour l'ARNm PD-L1, les niveaux de protéine PD-L1 étaient augmentés dans les deux lignées cellulaires, par rapport aux témoins respectifs (Figure 46).

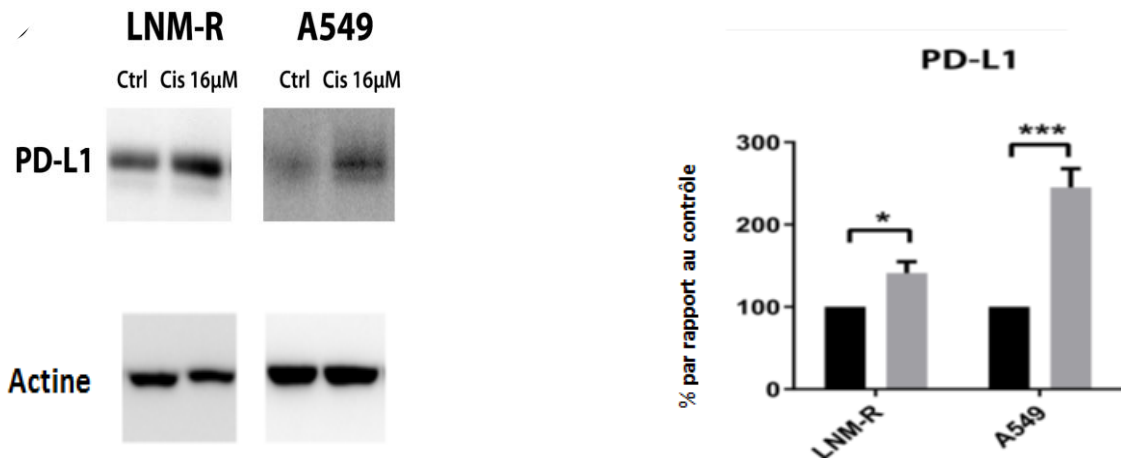


Figure 46 : Expression de la protéine PD-L1 après incubation de cellules LNM-R ou A549 avec du PBS (colonnes noires) ou du cisplatine à la concentration 16µM

Comme PD-L1 est une protéine transmembranaire, nous avons ensuite vérifié la localisation de ce ligand par immunocytochimie. Comme illustré dans la figure ci-dessous, le marquage PD-L1 était accru au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules tumorales A549 traitées au cisplatine par rapport au témoin (Figure 47). Ceci suggère que la protéine PD-L1 surexprimée par l'exposition au cisplatine est bien adressée au niveau de sa localisation fonctionnelle.

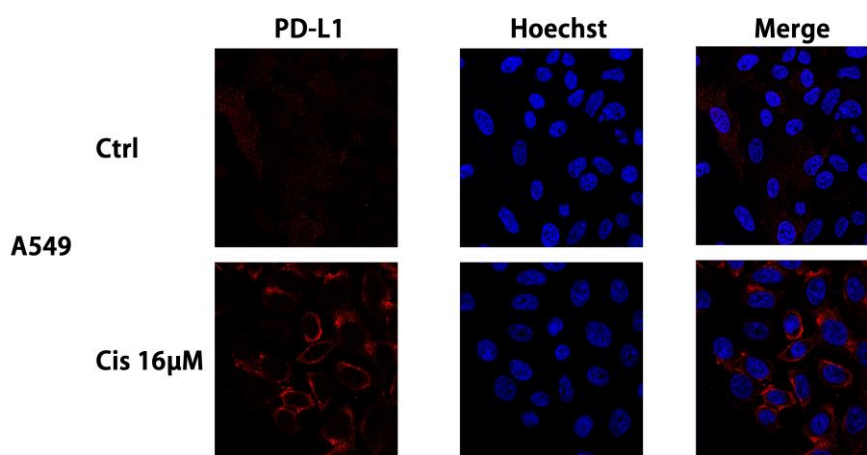


Figure 47 : Immuno-cytomarquage de PD-L1 (rouge) et nucléaire Hoechst (bleu) avec et sans traitement de cellules A549 par du cisplatine 16µM

Afin d'approfondir l'exploration de l'impact du cisplatine sur l'expression du ligand PD-L1 par les cellules tumorales, nous avons cherché à évaluer le rôle de la voie de signalisation PI3K/AKT dans cette régulation.

Tout d'abord, nous avons réalisé la quantification en Western-Blot de la protéine AKT ainsi que de sa forme phosphorylée dans les mêmes conditions que pour PD-L1 lors des expériences décrites plus haut. Inversement à PD-L1, nous avons constaté que l'expression d'AKT n'était pas significativement différente entre les cellules tumorales (A549 et LNM-R) traitées par du cisplatine pendant 24 heures et les cellules « contrôles », au contraire de la forme phosphorylée pAKT qui était largement augmentée (Figure 48). Ceci suggère une possible activation de la voie PI3K/AKT dans les mécanismes impliqués dans la surexpression de PD-L1 par le cisplatine..

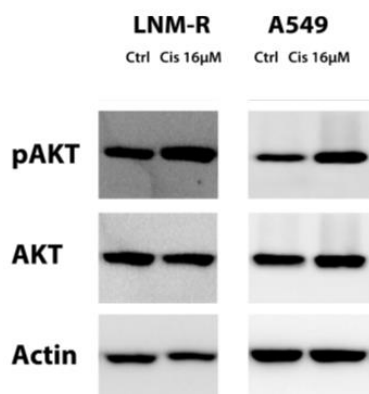


Figure 48 : Expression protéique d'AKT et pAKT sans et avec incubation avec du cisplatine (24h) de cellules A549 et LNM-R

De plus, nous avons traité des cellules LLC1 pendant 24 heures avec 8 μ M de cisplatine un bloqueur d'AKT, le MK2206, ou du DMSO en tant que contrôle, pour confirmer l'implication de la voie de signalisation PI3K/AKT.

La quantification de l'ARNm PD-L1, dans les mêmes conditions que précédemment, a révélé que le MK2206 neutralisait de manière significative l'uprégulation de PD-L1 induite par le cisplatine (Figure 49). Comme cela est visualisé sur la figure ci-dessous, les cellules traitées par la combinaison cisplatine plus l'inhibiteur d'AKT semblent exprimer un niveau de transcrite PD-L1 qui est égal au niveau basal (contrôle) alors que les cellules exposées au cisplatine plus DMSO (solvant du MK2206) montrent, comme lors des expériences initiales, des quantités augmentées d'ARNm PD-L1.

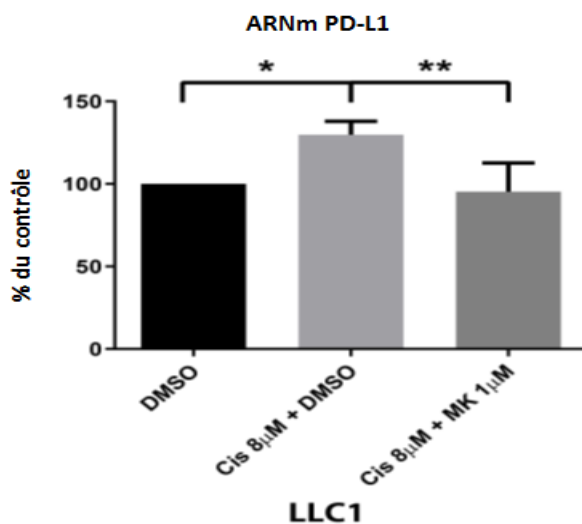


Figure 49 : Expression de l'ARNm PD-L1 par des cellules LLC1, 24h après incubation par du DMSO (contrôle), par du cisplatine + DMSO, et du cisplatine + du MK (inhibiteur d'AKT)

La réversibilité de l'effet d'augmentation de l'expression de PD-L1 après traitement au cisplatine par inhibition d'AKT a ensuite été confirmée au niveau protéique. De manière similaire à l'ARNm, les cellules LLC1 traitées par cisplatine en combinaison avec MK2206 présentaient un taux plus bas de protéine PD-L1 par rapport aux cellules traitées par cisplatine seul et qui était quasi identique à celui des cellules du groupe contrôle (DMSO seul) (Figure 50).

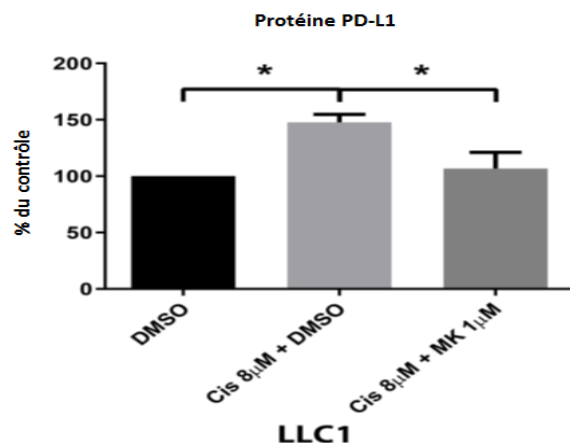


Figure 50 : Expression de la protéine PD-L1 par des cellules LLC1, 24h après incubation par du DMSO (contrôle), par du cisplatine + DMSO, et du cisplatine + du MK (inhibiteur d'AKT)

L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'un des mécanismes expliquant l'augmentation d'expression de PD-L1 par le cisplatine pourrait impliquer la voie de signalisation PI3K/AKT et notamment la forme active phosphorylée d'AKT (pAKT).

Le traitement combiné associant cisplatine et anticorps anti-PD-L1 améliore l'efficacité du traitement anti-tumoral

L'expression de PD-L1 étant accrue après exposition au cisplatine, nous avons abordé la question d'une amélioration potentielle de la réponse tumorale par un traitement combiné associant le cisplatine à des anticorps anti-PD-L1, par rapport à un schéma en monothérapie (cisplatine ou anti-PD-L1 seul) dans le modèle de tumeur expérimentale LLC1.

Comme décrit plus haut pour l'évaluation *in vivo* de l'expression de PD-L1, nous avons effectué des greffes de tumeurs syngéniques LLC1 à des souris C57-Black6 immunocompétentes. Nous avons ensuite réparti les souris dans différents groupes

de traitement. Le traitement intraveineux était initié lorsque la charge tumorale atteignait 90 à 100 mm³, soit généralement deux semaines après l'injection initiale des cellules de carcinome pulmonaire en hétérotopique (flanc). La croissance de ce modèle LLC1 étant assez intense, les souris du groupe témoin présentaient des tumeurs dont le volume atteignait approximativement 3 000 mm³ au bout de 15 jours après le début des traitements. Par conséquent, conformément aux directives d'éthique animale, ayant atteint des points limites, nous avons mis fin à l'expérience à ce moment (J15) pour l'ensemble des groupes de traitement. L'efficacité de la thérapie systémique antitumorale était évaluée et comparée entre les groupes, par la mesure du volume tumoral et le ralentissement de croissance tumorale puisqu'aucun des traitements ne permettait une réduction du volume dans le modèle proposé ici. Comme rapporté par les courbes ci-dessous, le taux de croissance de la tumeur (par rapport au volume tumoral à J0 de traitement) n'était pas significativement différent entre le groupe témoin et les groupes IgG totales, anti-PD-L1, et cisplatine seuls. Le traitement au cisplatine correspondait à une dose cumulative subtoxique, à savoir un premier cycle de trois injections intra veineuses à la dose de 1mg/kg à J1, 3 et 5, suivi d'un deuxième cycle à J9 et 11 à la même dose. La DL₅₀ du cisplatine injectée en intrapérionéal est de 12 mg/kg. En revanche, le volume tumoral moyen était significativement réduit (- 47 %) chez les souris traitées par le traitement associant cisplatine et anticorps anti-PD-L1 par rapport au groupe témoin (1530 ± 147 vs 2879 ± 400 mm³) (Figure 51). De même le traitement combiné était significativement plus efficace que les groupes comprenant un traitement par monothérapie de cisplatine ou anti-PD-L1.

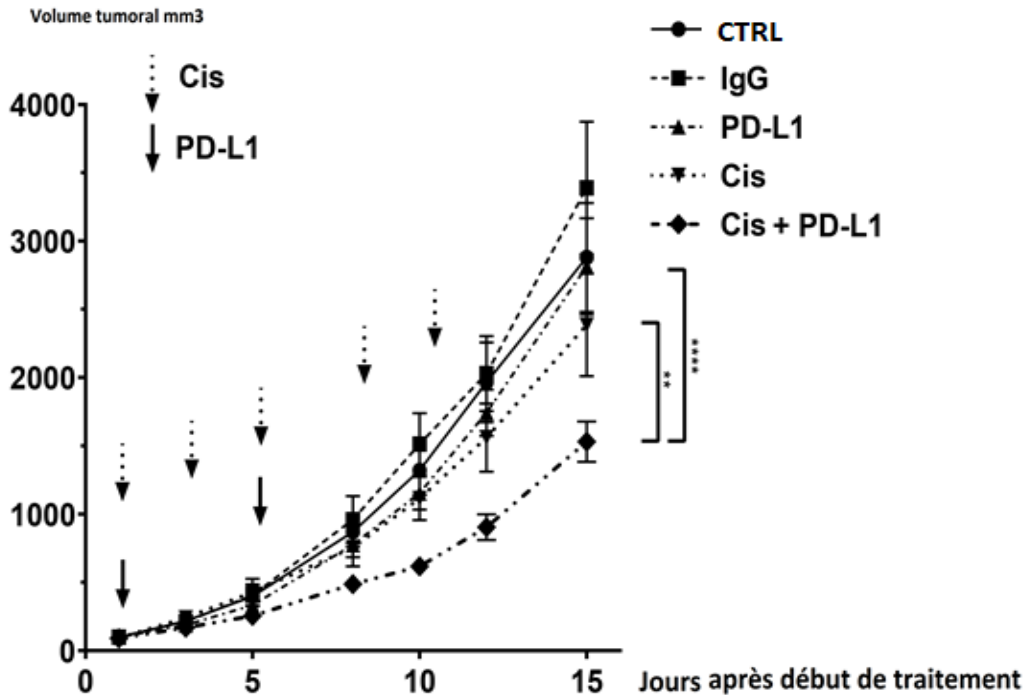


Figure 51 : Croissance de greffes de tumeurs syngéniques (cellules LLC1) sur une durée de 15 jours, selon différents groupes de traitement (cf légende). CTRL : contrôle PBS, IgG : IgG totales (contrôle anticorps), PD-L1 : Ac anti-PD-L1 (10 mg/kg), cis : cisplatine (1mg/kg). Les flèches discontinues représentent les injections de cisplatine et les flèches continues celles d'Ac anti-PD-L1

Les réponses individuelles aux traitements systémiques, illustrées à la Figure 52, ont révélé que, dans les groupes « contrôles » (témoins et IgG), les taux de croissance tumorale étaient assez dispersés parmi les animaux alors qu'ils étaient plus homogènes dans les groupes de traitements en monothérapie, à l'exception de quelques souris présentant une progression tumorale très élevée. La réponse tumorale dans le groupe d'animaux recevant du cisplatine associé à des anticorps anti-PD-L1 était également relativement homogène, les 10 souris porteuses de tumeurs présentant un ralentissement de croissance tumorale presque similaire.

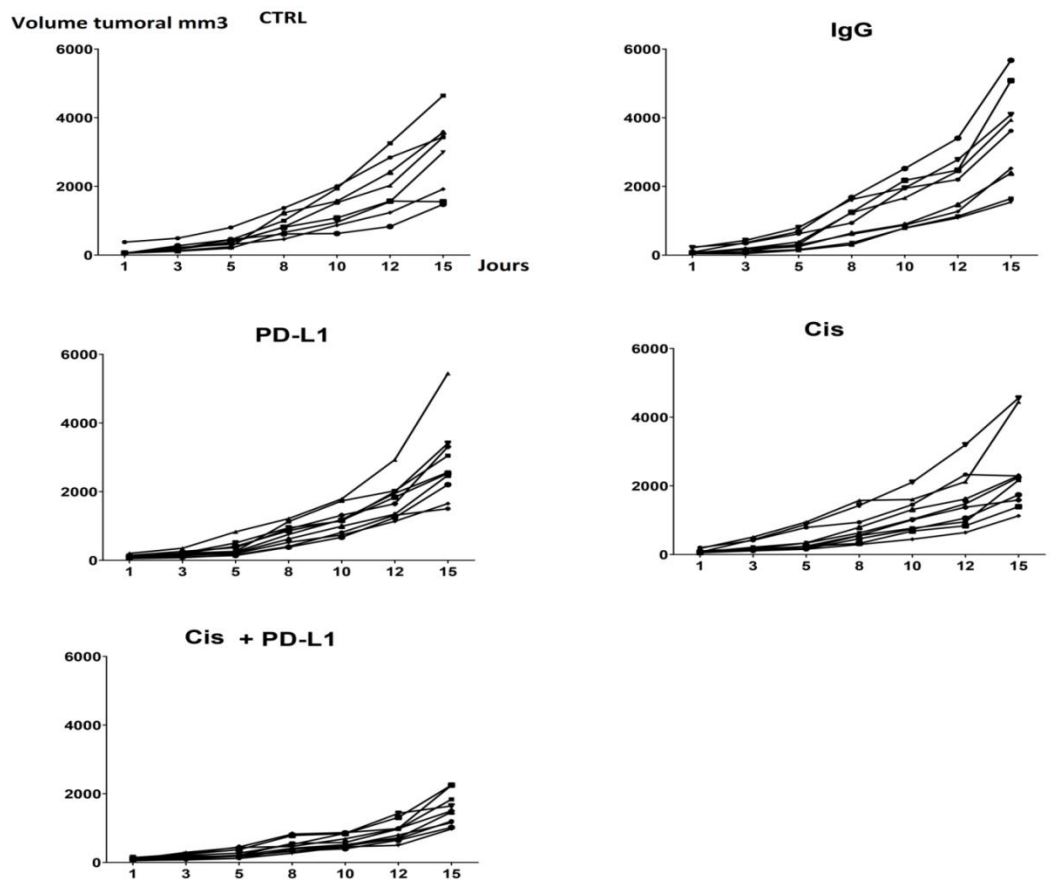


Figure 52 : Analyse individuelle de la croissance tumorale dans chaque groupe de traitement de l'expérience précédente.

6.1.5. Discussion

Notre approche expérimentale unique, consistant à étudier l'expression de PD-L1 dans une même cohorte de patients avant et après chimiothérapie néo-adjuvante pour un carcinome pulmonaire primitif, a confirmé les données rapportées dans d'autres types de tumeurs « solides » humaines : la chimiothérapie augmente le niveau d'expression de PDL-1. Ce résultat souligne et renforce les données existantes de la littérature scientifique et ouvre également le débat sur la pertinence et la séquence des schémas thérapeutiques incluant blocage du check-point immunitaire PD-1/PD-L1 et chimiothérapie conventionnelle à base de sels de platine dans le cancer du poumon.

En plus, des résultats cliniques et pathologiques observés dans cette série de malades ayant reçu une chimiothérapie d'induction à base de cisplatine, nos expériences précliniques, *in vitro et in vivo*, ont permis de mettre en évidence une induction précoce de PD-L1 par le cisplatine, associée à un effet biologique significatif. De même que l'effet précoce décrit ci-dessus, l'analyse d'échantillons appariés de tumeurs humaines a révélé une augmentation de l'expression de PD-L1 plusieurs semaines après l'administration de cisplatine, dans le cadre d'une résection chirurgicale intervenant le plus souvent plus de 2 mois après la première injection de chimiothérapie néo-adjuvante, ce qui suggère un effet d'up-régulation prolongée de PD-L1 sur les cellules tumorales. Ces derniers résultats contrastent avec les observations décrites dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, suggérant que l'augmentation d'expression de PD-L1 induite par le cisplatine pourrait ne pas être durable dans le temps (L. Tran et al. 2017). Une augmentation de l'expression de PD-L1 par le cisplatine, à la fois précoce et durable, aurait

probablement un impact majeur sur la conception de protocoles de thérapies systémiques combinées comprenant le cisplatine et les ICIs. Dans le même sens, certains auteurs ont précédemment démontré que la chimiothérapie d'induction à base de sels de platine pouvait induire l'expression de PD-L1 dans divers cancers, et concluaient que ce type de chimiothérapie systémique pourrait améliorer l'efficacité anti-tumorale d'un traitement consécutif par ICI (Tran et al. 2017; Grabosch et al. 2018; H. Y. Ng et al. 2018; Mesnage et al. 2017). Même si le véritable bénéfice d'une telle association thérapeutique doit probablement être contrebalancé par l'impact négatif théorique de la chimiothérapie sur les cellules immunitaires (effet immunosuppresseur), notre équipe avait préalablement montré que la chimiothérapie à base de platine n'affectait pas le contexte immunitaire du CBNPC après chimiothérapie d'induction (Remark et al. 2016 b). Dans ce travail de thèse, nous avons généralement cherché à concevoir des expériences dont les conditions permettraient de se rapprocher au maximum du contexte clinique. En effet, lors des expériences *in vivo* de greffes de tumeurs syngéniques, nous avons utilisé des doses sous-toxiques de cisplatine qui nous ont tout de même permis d'améliorer la réponse tumorale, en ralentissant la croissance, par combinaison avec des anticorps anti PD-L1 comparée à des traitements en monothérapie de ces mêmes agents anti-tumoraux. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'administration de cisplatine peut réguler positivement l'expression de PD-L1 sans altérer de manière significative l'immunité anti-tumorale globale.

L'impact réel et indépendant du cisplatine sur l'expression de PD-L1 pourrait bien sûr être contesté, car les différents doublets de chimiothérapies néo-adjuvantes comportaient effectivement du cisplatine, mais ce dernier était associé à d'autres agents chimiothérapeutiques qui pourraient également avoir un effet sur la régulation

de PD-L1. Cependant, nous n'avons trouvé aucune association statistiquement significative entre Δ PD-L1 et le type de doublet de chimiothérapies qu'avaient reçu les patients en préopératoire. De plus, plusieurs études rétrospectives analysant l'effet de la chimiothérapie néo-adjuvante à base de cisplatine, dans d'autres cancers que le CBNPC, ont rapporté des résultats similaires concernant son influence sur l'expression de PD-L1, alors que les protocoles thérapeutiques impliquent généralement des associations différentes de celles utilisées dans le cancer du poumon (Grabosch et al. 2018; H. Y. Ng et al. 2018). Il est donc légitime de penser que le cisplatine pourrait avoir un impact significatif et indépendant dans l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales.

La méthodologie consistant à analyser Δ PD-L1 après chimiothérapie d'induction en comparant le pourcentage de cellules tumorales exprimant PD-L1 entre des tissus issus de localisations métastatique (ganglionnaire) et primitive (poumon) semble pertinente et avantageuse. En effet, les résultats de nos analyses réalisées sur la cohorte « contrôle » de patients ayant été traités par chirurgie première, et présentant un envahissement ganglionnaire médiastinal à l'examen définitif postopératoire (minimal N2+), n'ont montré aucune différence significative de marquage PD-L1 entre tumeur pulmonaire primitive et ganglions médiastinaux tumoraux associés. Bien que reposant sur l'analyse de « seulement » 20 patients, en raison de la rareté de cette condition clinique (minimal N2, ou N2 « de rencontre » non diagnostiquée à l'imagerie préopératoire), ce résultat suggère que le marquage PD-L1 des cellules tumorales dans les ganglions lymphatiques médiastinaux est représentatif de celui des tumeurs primitives pulmonaires. Or, dans notre cohorte principale de patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante (39 patients), ce sont des tissus tumoraux issus de la même localisation métastatique (ganglions médiastinaux) qui

ont été utilisés pour évaluer le niveau d'expression de PD-L1 avant chimiothérapie à base de cisplatine. Même si les carcinomes pulmonaires N2 cliniques et N2 minimaux représentent potentiellement des entités clinicobiologiques légèrement différentes, ces résultats corroborent ceux rapportés par d'autres auteurs montrant une expression de PD-L1 similaire ou supérieure par les cellules tumorales des sites métastatiques par rapport aux sites primaires (Y. Liu et al. 2018 ; Uruga et al. 2017), ce qui valide la pertinence de notre méthodologie d'analyse de Δ PD-L1.

Nos analyses soulignent une forte association entre les modifications d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et les caractéristiques de réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante, ce qui corrobore des résultats précédemment rapportés dans la littérature existante (P. Zhang et al. 2016). De même, il a été décrit qu'une forte expression de PD-L1 dans les tumeurs était associée à une résistance au cisplatine, et également qu'une augmentation de PD-L1 (Δ PD-L1 positif) après traitement d'induction pourrait refléter une mauvaise sensibilité à la chimiothérapie, avec un Δ PD-L1 très faible ou négatif chez les patients répondant au cisplatine (P. Zhang et al. 2016 ; S. Y. Lee et al. 2016). Nos résultats concordent avec cette hypothèse sur la base du fait que les patients Δ PD-L1₅₀ positifs présentent moins de critères pathologiques de bonne réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante que les autres patients. Pour expliquer cette corrélation, nous pouvons supposer que le traitement néo-adjuvant a sélectionné les clones tumoraux résistants au cisplatine, toujours viables après traitement d'induction, résultant en une tumeur dont le pourcentage de cellules exprimant PD-L1 est plus élevé. De plus, cette dernière observation peut être reliée à certains mécanismes impliqués dans la surexpression de PD-L1. En effet, la régulation de cette protéine est très complexe et implique de nombreuses voies d'activation transcriptionnelles, post-transcriptionnelles et post-

traductionnelles, dont la clarification nécessite probablement des études et analyses dédiées (Zerdes et al. 2018). Nos explorations mécanistiques étaient vraiment préliminaires et se sont concentrées sur une voie de signalisation oncogénique relativement ubiquitaire, mais spécifiquement impliquée dans la régulation positive de PD-L1 et qui est d'autre part connue pour favoriser la survie et la résistance à l'apoptose induite par le cisplatine des cellules cancéreuses : la voie de signalisation PI3K/AKT (Lastwika et al. 2016; Mittendorf et al. 2014 ; Sarris, Saif, and Syrigos 2012). Les résultats obtenus dans ce travail de thèse corroborent ces observations et montrent que l'inhibition de la voie PI3K/AKT bloque de manière significative l'augmentation d'expression de PD-L1 des cellules tumorales exposées au cisplatine, suggérant une implication de cette voie de signalisation dans l'effet préalablement décrit.

Une surexpression de PD-L1 par les cellules immunitaires du microenvironnement après traitement des patients par de la chimiothérapie néo-adjuvante représente un autre résultat important. En effet, une stimulation soutenue de l'axe PD-1/PD-L1 pourrait altérer l'activité anti-tumorale, car il a été démontré que des proportions élevées de lymphocytes T régulateurs PD-L1 + et/ou de lymphocytes T CD8 + et PD-1 (+) dans le stroma des CBNPC étaient associées de manière significative avec une bonne réponse aux ICI (S.-P. Wu et al. 2018). Dans de futurs travaux, il serait, en outre, intéressant d'étudier l'impact des traitements associant une chimiothérapie à base de cisplatine et des ICI, de manière concomitante ou séquentielle chez l'homme, sur l'immunité anti-tumorale. Plus particulièrement, il serait pertinent d'étudier l'influence du nombre et du phénotype des cellules immunitaires du microenvironnement sur les résultats de traitements combinant blocage de PD-1/PD-L1 et chimiothérapie néo-adjuvante « classique » à base de sels de platine.

Principales limites du travail 1:

Tout d'abord, l'évaluation de l'expression de PD-L1 en IHC chez l'homme reposait sur une cohorte rétrospective comprenant un nombre limité de patients opérés et présentant des caractéristiques cliniques et pathologiques hétérogènes. De plus, les analyses moléculaires n'étaient pas effectuées systématiquement au moment de la prise en charge initiale (cohorte relativement ancienne) et n'ont pas pu être réalisées à posteriori pour l'étude en cours. Par conséquent, nous n'avons pas pu analyser l'impact d'éventuelles altérations moléculaires comme celles décrites dans l'introduction, et de la charge mutationnelle sur le Δ PD-L1 des cellules tumorales ou immunitaire du microenvironnement.

Par ailleurs, la représentativité et fiabilité des analyses comparant l'expression de PD-L1 avant et après cisplatine pourraient être remises en cause par l'hétérogénéité probable de l'expression de PD-L1 au sein même des tumeurs, surtout si l'on considère que les biopsies obtenues en médiastinoscopie ne sont qu'un « échantillonnage » parfois réalisé en zone non représentative de l'ensemble de la tumeur. Tout ceci suggère que l'interprétation des différences observées doit rester prudente (Ilie et al. 2016 ; Munari et al. 2018). Cette limitation méthodologique peut également être soulevée concernant les expériences impliquant des biopsies de tumeurs syngéniques greffées à des souris qui, de plus, ont l'inconvénient de ne mimer que de manière incomplète une tumeur humaine « normale ». En effet, les greffes expérimentales réalisées dans ce travail, étaient faites par injection de cellules tumorales en position hétérotopique et avaient généralement une croissance assez rapide ce qui limite la constitution « à l'identique » d'une tumeur pulmonaire avec son stroma, son microenvironnement (Zitvogel et al. 2016).

6.1.6. Matériel et méthodes du travail 1

Immunohistochimie

Pour chaque tumeur, nous avons réalisé un immunomarquage de PD-L1 sur des lames fraîchement coupées, à partir de blocs déparaffinés représentatifs de la tumeur, en utilisant un anticorps anti-PD-L1 (E1L3N, Signalisation cellulaire) et incubées sur Bond autom (Leica), comme décrit précédemment et validé par le collège français de pathologistes thoracique PATTERN (Adam et al. 2018). La coloration a été réalisée et analysée en aveugle par deux observateurs incluant au moins un anatomo-pathologiste expert en oncologie thoracique. L'évaluation du niveau d'expression PD-L1 par les cellules tumorales était basée sur les scores précédemment publiés (Roy S. Herbst et al. 2014). En bref, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales a été évaluée en pourcentage de cellules tumorales marquées de 0 à 100 %. La variable Δ PD-L1 a été calculée comme étant la différence entre le pourcentage de cellules tumorales marquées pour PD-L1, après et avant traitement par cisplatine. Les patients qui présentaient un marquage PD-L1 passant de $<50\%$ avant chimiothérapie néo-adjuvante à $\geq 50\%$ après, ont été catégorisés comme Δ PD-L1₅₀ positifs. Le marquage PD-L1 a également été exécuté et analysé sur les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral, ces cellules étant présentes au sein de massifs tumoraux comme en périphérie dans le stroma. Une catégorisation par analyse semi-quantitative a ensuite été réalisée comme suit : score 0 : aucune cellule immunitaire positive pour PD-L1 ; score 1 : 1 à 10 % de la surface tumorale occupée par des cellules immunitaires PD-L1 + ; score 2 : plus de 10 % de la surface tumorale occupée par des cellules immunitaires PD-L1 +. Les macrophages alvéolaires n'ont pas été comptabilisés dans cette analyse.

Le marquage spécifique des lymphocytes T CD8 a été réalisé en utilisant des anticorps anti-CD8 (SP16, Spring Bio). Après incubation, les sections ont été balayées avec Nanozoomer et les cellules CD8 + comptabilisées avec le logiciel Halo® permettant de calculer la densité cellulaire, exprimée en nombre de cellules marquées par mm². Une analyse secondaire a ensuite été réalisée dans une zone prédéfinie manuellement pour évaluer la densité des lymphocytes T au sein de la tumeur.

Xénogreffes de tumeurs

Des souris NMRI-Foxn1 nu/nu (Janvier™) et C57BL/6 j (Janvier™) athymiques mâles, âgés de quatre semaines, ont été utilisées pour générer des tumeurs expérimentales en greffant des cellules tumorales issues de lignées de carcinome pulmonaire humain (A549), ou murin (LLC1). Les souris ont été injectées dans les flancs lors d'injections uniques ou multiples, selon l'expérience, avec 5×10^6 cellules A549 ou 5×10^5 cellules LLC1.

Pour les expériences visant à caractériser in vivo la régulation de PD-L1 et l'impact du cisplatine sur cette dernière en PCR ou Western-Blot, les protocoles 1 (Figure 53) et 2 (Figure 54), schématisés ci-dessous, ont été réalisés.

Xénogreffes de tumeurs pulmonaires humaines (lignée A549) à des souris Nude

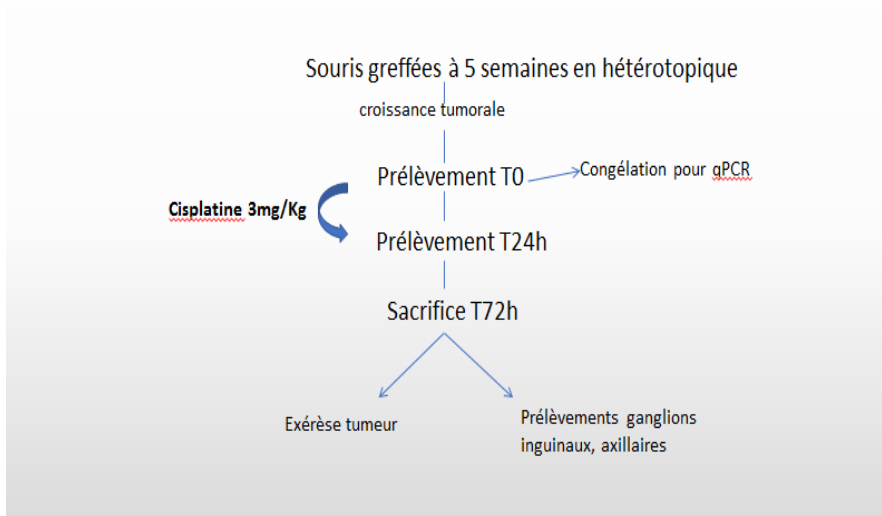


Figure 53: Protocole 1

Greffes de tumeurs syngéniques à souris Black6/C57, lignée LLC1 wt

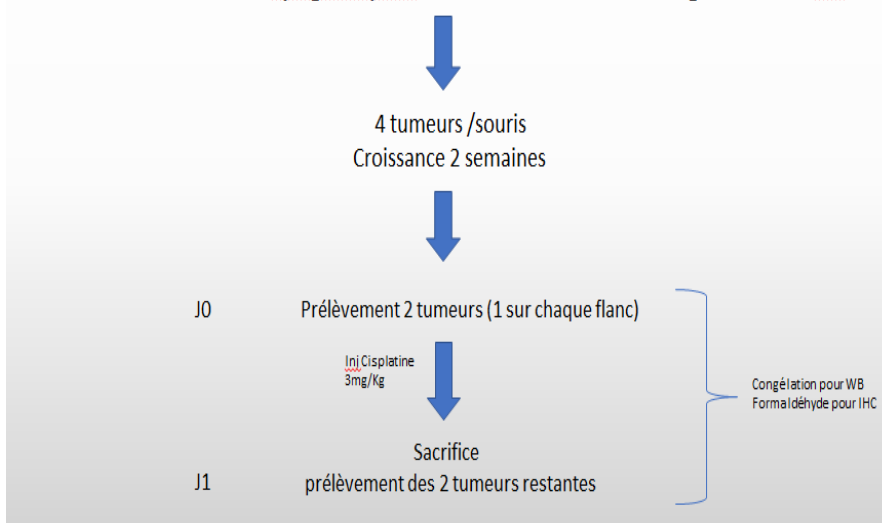


Figure 54: Protocole 2

Pour les expériences visant à comparer l'efficacité antitumorale de différents traitements, lorsque les tumeurs avaient atteint un volume de 90 à 100 mm³ (volume de tumeur ont été calculé à l'aide de la formule $(L \times W^2)/2$), les animaux étaient

randomisés dans 5 groupes différents pour recevoir, en injection rétroorbitale, les traitements suivants : cisplatine (cis-diamine dichloroplatin (II) : CDDP), véhicule (PBS), anti-PD-L1 (Bio X cell®, 10 mg / kg), IgG totale murine (groupe contrôle des anticorps anti-PD-L1), ou la combinaison CDDP et anti-PD-L1. Les anticorps ont été injectés à la dose de 10 mg/kg aux jours 1 et 5. Le CDDP a été injecté à la dose de 1 mg/kg aux jours 1, 3, 5, 8 et 10. Sur la base d'expériences préliminaires, la posologie de cisplatine était déterminée pour rester à une dose subléthale (DL50 de cisplatine était de 12 mg/kg en injection intrapéritonéale chez la souris).

Ethique animale

Toutes les procédures ont été effectuées conformément au « Guide de soin et d'utilisation des animaux de laboratoire ». « Le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale Charles Darwin # B751201 » a donné son approbation.

Lignées cellulaires, culture et réactifs

Pour les expériences *in vitro* et *in vivo* de greffes expérimentales, nous avons cultivé et traité des cellules tumorales issues de carcinomes bronchopulmonaires non à petites cellules :

– **La lignée A549** : Elles correspondent à des cellules épithéliales alvéolaires d'adénocarcinome humain. Elles constituent une lignée cellulaire décrite dans un premier temps par DJ Giard et al. en 1972, qui avaient cloné des cellules issues de la résection d'une tumeur pulmonaire chez un homme caucasien de 58 ans (Giard et al. 1973). Cette lignée cellulaire est probablement la plus utilisée pour créer des modèles de xéngreffes de tumeurs pulmonaires expérimentales.

– **La lignée LLC1** : acronyme de Lewis Lung Carcinoma 1, ces cellules sont issues d'une tumeur qui s'est développée spontanément sous la forme d'un carcinome épidermoïde dans le poumon d'une souris C57BL. Ces clones ont été caractérisés et isolés en 1951 par le Dr Margaret Lewis de l'Institut Wistar et cette lignée est devenue l'objet des premiers modèles de tumeurs transplantables (Rashidi et al. 2000). En règle générale, le carcinome pulmonaire du modèle de Lewis est hautement métastatique, même chez les souris immunocompétentes. Lorsque ces cellules sont injectées par voie sous-cutanée à des souris, les tumeurs hétérotopiques ainsi créées sont connues pour métastaser avidement au poumon (Bugge et al. 1997). Une étude de 1996 a pu mettre en évidence que le site préférentiel de métastases du modèle de Lewis correspondait aux poumons après injection de cellules en intraveineux. Les tumeurs LLC1 ont généralement l'apparence d'une masse homogène semi-ferme qui n'est pas manifestement hémorragique (Anderson et al. 1996). Selon un article de revue de 2015, le carcinome du poumon de Lewis est le seul modèle reproductible de greffe de tumeur pulmonaire primitive syngénique, donc utilisant un greffon immunologiquement compatible avec des souris (Kellar, Egan, and Morris 2015). Les lignées cellulaires A549 (CCL-185™) et LLC1 (CRL-1642™) ont été achetées chez ATCC®.

– **La lignée LNM-R** : comme décrit précédemment par notre équipe de recherche (Alifano et al. 2010 b), la lignée LNM-R a été sous-clonée à partir de cellules LNM-35, elle-même sélectionnée « in vivo » à partir de la lignée originale NCI-H460 (carcinome pulmonaire à grandes cellules) de façon à obtenir une sous-lignée caractérisée par un potentiel métastatique ganglionnaire très élevé (Kozaki et al. 2000). L'observation visuelle de cette lignée montrait qu'elle se composait de deux

sous-populations cellulaires distinctes que nous avons sous-cloné, au sein de notre laboratoire, selon les critères morphologiques suivants (Figure 55) : la lignée LNM-R se différencie par une morphologie plus bombée d'apparence plus arrondie que nous avons dénommée « ronde » (LNM-R), comparée à la lignée LNM-F plus adhérente, plus étalée et aplatie sur la boîte de culture, que nous avons dénommée « Flat » (plate). La lignée LNM-F présentant des caractéristiques de croissance et de culture inférieures à sa lignée sœur LNM-R, c'est cette dernière que nous avons sélectionnée pour les expériences de ce travail.

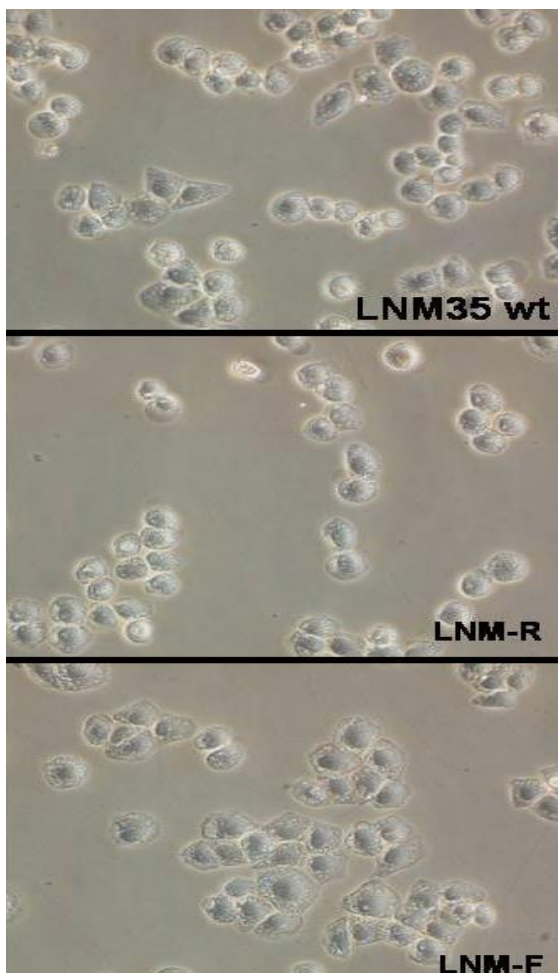


Figure 55 :

Aspects morphologiques des deux sous clones LNM-R (round) et -F (flat) issues de la lignée parentale LNM-35

Toutes les cellules ont été cultivées dans du DMEM (Gibco®) additionné à 10 % de sérum de veau fœtal (FBS) (Gibco®) et de glutamine 2 mM, à 37 °C, dans une

atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂ (Younes et al. 2014 b). Pour les expériences in vitro, les cellules ont été cultivées jusqu'à 80 % de confluence, puis exposées à différents traitements, dans un milieu supplémenté de 1 % de FBS.

L'inhibiteur d'AKT le *MK2206* a été acheté auprès de Selleckchem®. Il s'agit d'un inhibiteur allostérique hautement sélectif des trois isoformes d'AKT (AKT1, AKT2 et AKT3 mais avec moins d'efficacité sur AKT3) qui se lie au domaine PH et à la région hinge pour induire une conformation bloquant la translocation membranaire d'AKT. Le MK-2206 inhibe la signalisation d'AKT in vivo et peut ainsi freiner la croissance tumorale, du moins dans le cancer mammaire (Zardavas, Baselga, and Piccart 2013). Des études de phases I ont montré que le MK-2206 était capable de diminuer des taux de pAKT, PRAS40 et P-GSK3 β dans des cellules tumorales, des cellules sanguines mononucléées et des follicules pileux avec un profil de tolérance acceptable (Sangai et al. 2012).

RT-PCR et RT-PCR quantitative

Les analyses quantitatives de RT-PCR, SDS-Page, Western-blot et immunocytochimie ont été effectuées comme décrit précédemment par notre équipe (Z. Wu et al. 2019) :

2 μ g d'ARN total ont été soumis à une transcriptase inverse, pendant 1 heure à 37 °C, en utilisant 1 μ g d'amorces nucléotidiques aléatoires hexamériques (primers) non spécifiques dN, 1 mM de dNTP, 10 mM de dithiothréitol, 24 UI de RNase (RNaseOUT) et 200 UI de M-MLV RTenzyme (Invitrogen™). L'amplification PCR a été réalisée sur 400 ng d'ADNc issus de la réaction de transcription inverse et en

utilisant 0,2 mM de dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 1 UI d'ADN polymérase ThermoStart Taq (ThermoFisher Scientific™) et 25 pmol de chaque amorce spécifique :

– PD-L1 humain (5'-TGCCGACTACAAGCGAATTACTG-3' et 5' CTGCTTGTCCAGATGACTTCGG-3')

– Souris PD-L1 (5'-TGCGGACTACAAGCGAATCACG-3' et 5'-CTCAGCTTCTGGATAACCCTCG -3')

– 18S (5'-AGGAATTGACGGAAGGGCAC-3' et 5' -GTGCAGCCCCGGACATCTAAG-3')

- RPLP0 (5' -CACTGGTCTAGGACCCGAGAAG-3' et 5'-GGTGCCTCTGGAGATTTTCG-3')

La RT-PCR quantitative a été réalisée à l'aide du kit SensiFAST SYBR Hi-ROX (Bioline®) et l'amplification détectée dans un système de PCR rapide en temps réel 7900HT (ThermoFisher Applied Biosystems™). La quantité relative de gènes a été normalisée par rapport à 18S et à RPLP0 ; la quantification du niveau de transcrits a été faite en utilisant le coefficient d'amplification $2^{-\Delta CT}$.

Analyse SDS-PAGE et Western blot

Les protéines ont été extraites des cellules en utilisant un tampon RIPA supplémenté en cocktail d'inhibiteur de protéases et de phosphatases (Sigma-Aldrich®), séparées avec du SDS-PAGE et transférées sur des membranes de PDVF. Les bandes de transferts Western ont été révélées avec des anticorps primaires, anti-PD-L1 (1: 1000, Rockland®) et anti-Actine conjugués à la HRP de Santa Cruz Biotechnology®. Les anticorps primaires ont été incubés pendant une nuit à 4 °C. Des anticorps secondaires antichèvre (Santa Cruz Biotechnology®) conjugués à la HRP ont été utilisés à des dilutions de 1 : 1000 pendant 1 heure à température ambiante et les bandes spécifiques visualisés par chimioluminescence augmentée (substrat de transfert Western de Pierce™ ECL 2, Thermo Scientific™).

Immunocytochimie

Les cellules ont étéensemencées sur des lames de verre de 12 mm de diamètre, puis fixées avec 4 % de paraformaldéhyde, HEPES 250 mM pendant 20 minutes à température ambiante et saturés pendant 30 minutes par du PBS supplémenté de 10 % de sérum de cheval. Les lames ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS avec du sérum de cheval à 1,5 % (anticorps monoclonal anti-PD-L1, dilué à 1/1000) puis incubées pendant 2 heures à température ambiante avec des anticorps secondaires fluorescents : IgG anti-lapin conjugué Alexa Fluor 555 (H + L) (A-31572, Invitrogen®). Les noyaux ont été contrecolorés avec du Hoechst 1 : 50000 et du réactif ProLong® Gold Antifade (Life technologies®).

Statistiques

Les données descriptives ont été exprimées sous forme de fréquences pour les variables catégorielles et de moyenne (\pm écart type) ou médiane pour les variables continues, en fonction de la distribution observée. Pour les diagrammes à colonnes, les courbes ou les statistiques incluant la variable Δ PD-L1, les données ont été exprimées sous forme de moyenne (\pm SEM). Les données catégorielles ont été comparées en utilisant le test du Chi² ou de Mac-Nemar, selon le cas. Les variables continues et normalement distribuées résultant de l'analyse des tissus appariés a été réalisée en utilisant le test t de Student pour échantillons appariés. Les comparaisons inter-groupes ont été effectuées à l'aide d'un test ANOVA. Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA).



Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/canlet

Original Articles

Cisplatin increases PD-L1 expression and optimizes immune check-point blockade in non-small cell lung cancer



Ludovic Fournel^{a,b,c,*}, Zherui Wu^b, Nicolas Stadler^b, Diane Damotte^d, Filippo Lococo^e, Geoffroy Boulle^d, Evelyne Ségal-Bendirdjian^b, Antonio Bobbio^{b,c}, Philippe Icard^{c,f}, Jean Trédaniel^{b,g}, Marco Alifano^c, Patricia Forgez^b

^a Ecole Doctorale de Cancérologie, Paris-Saclay University, Paris, France

^b Inserm, UMR 1124, Cellular Homeostasis and Cancer Signaling, Paris-Descartes University, Paris, France

^c Thoracic Surgery Department, Cochin Hospital, Paris-Center University Hospitals, APHP, Paris-Descartes University, Paris, France

^d Pathology Department, Cochin Hospital, Paris-Center University Hospitals, APHP, Paris-Descartes University, Paris, France

^e Thoracic Surgery Department, Azienda Unità Sanitaria Locale/IRCCS of Reggio Emilia, Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy

^f Inserm U1086, BioTICLA Axis, Caen-Normandie University, F-14000, France

^g Respiratory Medicine and Thoracic oncology Department, Saint Joseph Hospital, Paris Descartes University, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Immune check-point inhibitors
Cisplatin
PD-L1
Lung cancer
Neoadjuvant treatment

ABSTRACT

The number of clinical protocols testing combined therapies including immune check-point inhibitors and platinum salts is currently increasing in lung cancer treatment, however preclinical studies and rationale are often lacking. Here, we evaluated the impact of cisplatin treatment on PD-L1 expression analyzing the clinicopathological characteristics of patients who received cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy followed by surgery and showed that cisplatin-based induction treatment significantly increased PD-L1 staining in both tumor and immune cells from the microenvironment. Twenty-two patients exhibited positive PD-L1 staining variation after neoadjuvant chemotherapy; including 9 (23.1%) patients switching from < 50% to ≥ 50% of stained tumor-cells. We also confirmed the up-regulation of PD-L1 by cisplatin, at both RNA and protein levels, in nude and immunocompetent mice bearing tumors grafted with A549, LNM-R, or LLC1 lung cancer cell lines. The combined administration of anti-PD-L1 antibodies (3 mg/kg) and cisplatin (1 mg/kg) to mice harboring lung carcinoma significantly reduced tumor growth compared to single agent treatments and controls. Overall, these results suggest that cisplatin treatment could synergize with PD-1/PD-L1 blockade to increase the clinical response, in particular through early and sustainable enhancement of PD-L1 expression.

1. Introduction

The survival of patients with metastatic lung cancer has significantly improved with platinum-based treatments and, more recently, with targeted therapies and immunotherapies. Despite therapeutic advances, lung cancer remains the world-leading cause of cancer-related death (approximately 2 million per year), due to innate or acquired tumor resistance to treatments [1]. Identifying theranostic biomarkers to target the right population remains a major objective in the clinical management of this disease. Indeed, programmed cell death 1 (PD-1) and ligand (PD-L1) check-point blockade allows durable disease control and increased survival rates as compared to conventional chemotherapy [2–4]. However, this advantage occurs in only a subset of metastatic non-small cell lung carcinoma (NSCLC) patients, as those

exhibiting more than 50% PD-L1-stained tumor cells [2,5]. Considering the widespread use of immune check-points inhibitors (ICIs) in different settings of the NSCLC multimodal treatment, a pronounced interest has been shown for PD-L1 expression and its regulation [6,7]. Several studies evaluated the impact of systemic treatments in tumor micro-environment, most notably with platinum-salts, and the ability of chemotherapy to modulate tumor immunogenicity and more generally to influence protagonists of the adaptive immunity [8,9]. Even though the implicated mechanisms remain undetermined, some authors proposed a transcriptional up-regulation of PD-L1 gene by oncogenic signaling pathways such as mTOR/PI3K/AKT [10,11]. This represented a rationale for clinically testing combination treatments associating chemotherapy to anti-PD-1/PD-L1 [12–15]. In the present study, we evaluated the impact of cisplatin on PD-L1 expression in patients

* Corresponding author. UMR 1124, Cellular homeostasis and cancer signalling, 45 rue des Saints-Pères, Faculté des Saints-Pères, 75006, Paris, France.
E-mail address: ludovic.fournel@aphp.fr (L. Fournel).

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.08.005>

Received 20 June 2019; Received in revised form 5 August 2019; Accepted 7 August 2019
0304-3835/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

List of abbreviations		IHC	immunohistochemistry
AKT	protein kinase B	K-ras	Kirsten rat sarcoma
ALK	anaplastic lymphoma kinase	LLC1	Lewis lung carcinoma 1
CDDP	cis-diamminedichloroplatinum, cisplatin	mTOR	mammalian target of rapamycin
COPD	chronic obstructive pulmonary disease	NAC	neoadjuvant chemotherapy
DMEM	Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium	NSCLC	non-small cell lung carcinoma
EGFR	epidermal growth factor receptor	PD-1/PD-L1	programmed cell death 1 and ligand
FBS	fetal bovine serum	PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
ICI	immune check-point inhibitor	PR	partial response
		SD	stable disease

receiving cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy (NAC) and in preclinical models of lung cancers, along with combined therapies involving ICIs.

2. Materials and methods

2.1. Patients and surgical specimens

We retrospectively reviewed a cohort of 122 patients operated in a single-center of thoracic surgery between 2000 and 2007, for curative-intent resection of locally-advanced lung-carcinoma after NAC which allowed partial response (PR) or stable disease (SD), at computed-tomography evaluation [16]. All cases were preliminarily discussed by a multidisciplinary board. In 39 out of 122 cases, paraffin embedded blocks of metastatic ipsilateral mediastinal lymph-nodes, obtained at initial staging by mediastinoscopy or anterior mediastinotomy, were available for performing matched analysis with post-chemotherapy tumor specimens, subsequently allowing comparative immunohistochemistry (IHC) assessment of PD-L1 expression. To note, molecular analyses such as EGFR or K-ras mutations and ALK-ROS1 rearrangements testing, were not performed, at that time. Epidemiologic data, clinical and pathological responses to chemotherapy (expressed as percentage of necrosis, fibrosis to viable tumor cells) were collected and analyzed. "Viability" was defined by the presence of tumor cells exhibiting distinct nuclear chromatin, and intact nuclear or cytoplasmic membrane, and the absence of sign of necrosis (i.e. karyorrhexis, karyolysis, and pyknosis).

In addition, we evaluated the PD-L1 status in a second cohort of 20 patients who underwent up-front surgical resection of NSCLC with postoperative pathological mediastinal lymph-node assessment showing minimal pN2 disease. As these patients did not receive any NAC, the comparative evaluation of PD-L1 status between invaded lymph nodes and pulmonary tissues was used as "control" group.

Informed consent was obtained from all patients or relatives (in case of deceased patients). The protocol was approved by the local ethics committee (CPP Ile de France II, n°2008-133 and 2012 06-12) in agreement with French law and declaration of Helsinki.

2.2. Immunohistochemistry staining and evaluation

For each tumor, we performed PD-L1 immunostaining on fresh-cut slides from representative blocks using an anti-PD-L1 antibody (E1L3N, Cell signaling) on Bond automat (Leica) as previously described and validated by the PATTERN French thoracic pathologists group [17]. Staining was double blinded analyzed by at least one expert pathologist. PD-L1 staining evaluation on tumor cells was based on previously published scores [18]. Briefly, tumor cell PD-L1 staining was scored as the percentage of positive cells. The variable Δ PD-L1 was calculated as the difference of the percentage of tumor cells labeled for PD-L1, before and after treatment. Patients who exhibited a switch of PD-L1 labeling from < 50% to \geq 50% tumor cells were categorized as Δ PD-L1₅₀ positive. The immune cells scoring for PD-L1 staining was attributed as

follows: score 0: no immune cells positive for PD-L1; score 1: 1–10% of the tumor surface occupied with PD-L1 + immune cells; score 2: more than 10% of the tumor surface occupied with PD-L1 + immune cells. Alveolar macrophages were not counted within the immune cells positive for PD-L1.

Staining of CD8 lymphocytes was performed using anti-CD8 antibodies (SP16, Spring Bio). After incubation sections were scanned using Nanozoomer, and count of CD8⁺ cells performed with Halo[®] software to calculate the cell density expressed as number of stained cells/mm². A secondary analysis was then performed in the tumor zone predefined manually to evaluate the density of intra-tumor T-lymphocytes.

2.3. Cell lines, culture and reagents

The human lung cancer cell lines A549 (CCL-185™), and murine cells from Lewis lung carcinoma model LLC1 (CRL-1642™) were purchased at ATCC[®]. LNM-R was subcloned from LNM-35 as described previously [19]. All cells were grown in DMEM (Gibco[®]) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco[®]) and 2 mM glutamine, at 37 °C, in a humidified atmosphere of 5% CO₂ [20]. For *in-vitro* experiments, cells were grown until 80% confluence and then exposed to different treatments in media supplemented with 1% FBS. The AKT-inhibitor MK2206 was purchased from Selleckchem[®].

2.4. Quantitative RT-PCR, SDS-Page, Western-blotting and immunocytochemistry assays

Were performed as previously described [21]. See details in supplementary methods.

2.5. Tumor xenografts

Four-week-old male athymic NMRI-Foxn1 nu/nu mice (Janvier™) and C57BL/6j (Janvier™) were used to generate experimental tumors by grafting human lung cancer cell lines (A549, or LNM-R), or mouse lung carcinoma cell line (LLC1), respectively. Mice were injected in the flanks at single or multiple injections, according to the experiment, with 10⁶ LNM-R cells, 5 × 10⁵ A549 cells, or 5 × 10⁵ LLC1 cells. LNM-R cells are a very aggressive cell line, highly metastatic, and isolated from LNM-35 [22]. This model is representative of "aggressive" late stage lung carcinoma. When tumors reached a volume of 90–100 mm³ (tumor volumes were calculated using the formula: (L × W²)/2), animals were randomized in the 5 following treatment groups and received retro-orbital injections of: cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum(II): CDDP), vehicle (PBS), anti-PD-L1 (Bio X cell[®], 10 mg/kg), murine total-IgGs, or the combination CDDP and anti-PD-L1. The antibodies were injected at the dose of 10 mg/kg at day 1 and 5. The CDDP was injected at the dose of (1 mg/kg) at day 1, 3, 5, 8, and 10. Basing on preliminary experiments, the posology of cisplatin was chosen to remain with a sub-toxic dose (LD₅₀ for cisplatin-injected i.p in mice of 12 mg/kg). In experiments requiring RT-PCR and Western-Blot comparative analyses for PD-L1 expression, a biopsy was performed under isoflurane-

anesthetized animals, when tumor burdens reached 100 mm³. Animals were then treated with cisplatin (1 mg/kg) or PBS i.v for 24 h, and the whole tumor specimen then was removed. Tumor samples were frozen for further protein or RNA extraction.

All procedures were performed in accordance with the “Guide of the Care and Use of Laboratory Animals”. An institutional review board approval was obtained by «Le Comité d’Ethique en l’Expérimentation Animale Charles Darwin #B751201».

2.6. Statistics

Descriptive data were expressed as frequencies for qualitative variables and mean (± SD) or median for continuous variables according to the observed distribution. In columns, curves, or ΔPD-L1 statistics, data were expressed as mean (± SEM). Categorical data were compared using Chi², or Mac-Nemar test, as appropriate. Continuous and normally distributed variable resulting from the analysis of matched tissues were performed using paired student t-test. Comparisons between groups were performed using two-way ANOVA. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA).

Table 1
Distribution of NAC free patients according to PD-L1 status and tumor site.

Percentage of PD-L1 stained cells	0%	1–49%	≥50%
Lung primary tumors	n = 13	n = 5	n = 2
Mediastinal lymph nodes	n = 15	n = 3	n = 2

3. Results

3.1. PD-L1 expression is not different in lung primary tumor and associated metastatic mediastinal lymph-nodes

We analyzed PD-L1 expression from both primary lung cancer and associated metastatic lymph nodes in 20 patients with N2 disease who did not receive any induction therapy (minimal N2). As shown in Fig. 1A, no significant difference was observed between the two sites (p = 0.62).

The distribution of PD-L1 status, using a three group classification (50% or higher/1–49%/0%), of primary lung tumors and metastatic mediastinal lymph nodes in the cohort of patients which did not receive neoadjuvant cisplatin based chemotherapy, was nearly identical (Table 1). In most cases (13/20), PD-L1 status was similar between the

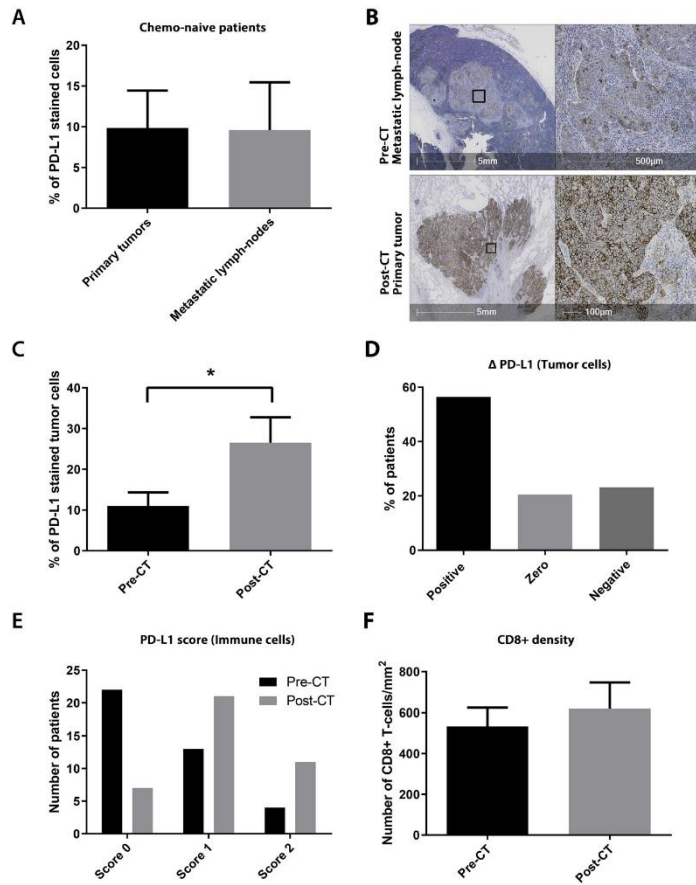


Fig. 1. Influence of neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy on PD-L1 expression in operated patients, IHC analyses. (A) PD-L1 staining of tumor cells in patients who underwent up-front surgery for resection of a minimal pN2 NSCLC (n = 20). Quantification was manually performed and expressed as percentage of labeled cells with subsequent matched-pairs comparison between primary tumors and associated metastatic mediastinal lymph-nodes. (B, C). IHC analysis from patients who received neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy (n = 39) for paired-comparison of PD-L1 staining in metastatic mediastinal lymph nodes (pre-CT) and resected primary lung tumors (post-CT), black square indicates the focus area. (D). Distribution of ΔPD-L1 (matched post-CT - pre-CT percentage of PD-L1 positive tumor cells) among patients who received induction therapy. (E) PD-L1 staining of tumor-infiltrating immune cells in the same cohort of patients, pre- and post-CT samples were classified into 3 different scores (see “methods”). (F) Density (number of cells/mm²) of CD8⁺ T-lymphocytes in the tumor area and comparison between matched samples. * indicates a P value < 0.05, error-bars: standard error of the mean.

two sites, with 5 tumors harboring a higher percentage of PD-L1 stained cells in the primary than in lymph nodes. Only one patient showed a positive PD-L1 staining $\geq 50\%$ of tumor cells in the lung primary versus $< 50\%$ in lymph nodes. Thus expression of PD-L1 by tumor cells at metastatic nodal locations can be considered as representative of those in the primary tumor, allowing comparative analysis of PD-L1 expression in lymph-nodes cancer cells (baseline) and post-NAC resected lung tumor specimen from the same patient. Respective data were used for calculating Δ PD-L1.

PD-L1 staining of immune cells in the microenvironment was also evaluated and compared between metastatic mediastinal lymph nodes and lung primary. The distribution of patients exhibiting a PD-L1 immune-score > 1 was not significantly different between nodal and pulmonary sites ($15 \pm 8.2\%$ versus $35 \pm 10.9\%$, $p = 0.27$).

3.2. Cisplatin-based NAC induces PD-L1 expression by tumor and immune cells in resected specimens of human NSCLC

Thirty-nine patients with available pre- and post-chemotherapy matched tumor tissues were identified. There were 29 (74.4%) men and 10 (25.6%) women, with mean age $56.5 (\pm 8.1)$ years. Most of patients were smokers (76.9%) with a mean tobacco consumption of $37.1 (\pm 6.2)$ pack-years. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients represented 51.3% of the whole cohort. Induction chemotherapy consisted in administrations of a doublet including cisplatin which allowed PR or SD in 15 (38.5%) and 24 (61.5%) patients, respectively.

The pathological analysis of resected lung specimens revealed that tumors were predominantly adenocarcinomas and that mean rates of histologic changes were distributed as follows: necrosis $16.1 \pm 20.3\%$, fibrosis $48.2 \pm 27.7\%$, and viable tumor cells $35.7 \pm 23.0\%$ (Table 2).

PD-L1 expression was evaluated on tissue of the resected primary lung tumor, in this cohort of 39 patients. The IHC results of PD-L1 staining showed a higher percentage of labeled tumor cells after NAC than baseline (26% versus 11%, respectively, $p = 0.017$), suggesting an inducing effect of cisplatin on PD-L1 expression (Fig. 1B and C). Interestingly, Δ PD-L1 was positive, zero or negative in 22 (56.4%), 8 (20.5%) and 9 (23.1%) of the cases, respectively (Fig. 1D). Among the 22 Δ PD-L1 positive patients, 9 (23.1% overall) exhibited a switch of PD-L1 labeling from $< 50\%$ to $\geq 50\%$ and were categorized as Δ PD-L1₅₀ positive. Analyzing the possible associations between PD-L1 expression and pathological changes after NAC, we noted that the subgroup exhibiting $< 5\%$ of PD-L1 positive tumor cells in lymph-nodes (pre-treatment) showed significantly higher rate of fibrosis ($p = 0.034$) and a trend towards lower rate of viable tumor cells ($p = 0.101$) after NAC. Inversely, more than 50% of PD-L1 positive tumor cells in the lung primary (post-treatment) was significantly associated to a lower rate of fibrosis ($p = 0.030$), but a higher rate of necrosis ($p = 0.011$) after NAC. Furthermore, we observed that the rate of specimens with more than 50% viable tumor cells was significantly higher in the subgroup of Δ PD-L1₅₀ positive cases versus Δ PD-L1₅₀ negative ones ($p = 0.019$) (Table 3). In exploring potential interrelationships between clinical characteristics and Δ PD-L1, we did not find significant association with clinical variables such as, age ($p = 0.60$), gender ($p = 0.78$), smoking ($p = 0.84$), COPD (0.23), histological type of the tumor ($p = 0.39$), or number of NAC cures ($p = 0.40$).

We also performed PD-L1 staining on resected metastatic mediastinal lymph-nodes after NAC. Amongst 39 patients, 15 were downstaged during definitive pathological analysis, as harvested mediastinal lymph nodes were tumor free (ypN2 negative). We were able to perform PD-L1 staining on 22 patients, with available metastatic nodal tissue, and found a trend ($p = 0.17$) towards higher PD-L1 expression after NAC, with a mean percentage of labeled tumor cells in pre- and post-NAC of $5.7 \pm 2.1\%$ and $13.3 \pm 5.4\%$, respectively. This suggested that NAC could increase PDL-1 expression of tumor cells in nodal secondary sites.

PD-L1 staining of immune cells in the microenvironment was also evaluated and compared between matched pre- and post-chemotherapy tissues. The percentage of tumors exhibiting a PD-L1 immune-score > 1 was significantly higher in the post-treatment group (25.6% versus 10.3%, $p = 0.001$), suggesting an up-regulation of PD-L1 by cisplatin in immune cells (Fig. 1E). The rate of viable tumor cells shows a pronounced trend towards an increase in the group of patients with positive immune-score variation (43.6% versus 31.8% mean rate of viable tumor cells in positive Δ PD-L1 immune-score versus others, $p = 0.11$).

Concerning CD8⁺ staining in matched samples, the mean number of CD8⁺ lymphocytes in the tumor area did not significantly change after induction therapy ($p = 0.59$, Fig. 1F). In addition, there was no significant association between variations of PD-L1 in tumor cells and corresponding number of CD8⁺ lymphocytes ($p = 0.92$).

Table 2
Characteristics of patients included in the NAC cohort.

Variable	Number of patients (%)
Gender	
male	29 (74.4%)
female	10 (25.6%)
Age	
≤ 60 years	25 (64.1%)
> 60 years	14 (35.9%)
Smoking	
Never	9 (23.1%)
Current/former	30 (76.9%)
COPD	
Yes	20 (51.3%)
No	19 (48.7%)
cStage	
Ia,b-IIa,b	0 (0.0%)
IIIa	38 (97.4%)
IIIb	1 (2.6%)
IV	0 (0.0%)
Type of NAC	
Cis + gemci	18 (46.2%)
Cis + vino	13 (33.3%)
Cis + other	8 (20.5%)
Number of Cures of NAC	
2	16 (41.0%)
3	16 (41.0%)
4	7 (18.0%)
Resection	
Lobectomy	20 (51.3%)
Bilobectomy	4 (10.3%)
Pneumonectomy	15 (38.5%)
pStage	
Ia,b	7 (17.9%)
Ia,b	8 (20.5%)
IIIa	22 (56.4%)
IIIb	2 (5.1%)
IV	0 (0.0%)
Histology	
ADK	21 (53.8%)
SCC	11 (28.2%)
NSCLC	6 (15.4%)
LCNEC	1 (2.6%)
yp Viable tumor	
$\leq 50\%$	10 (25.6%)
$> 50\%$	29 (74.4%)
yp Fibrosis	
$\leq 30\%$	13 (33.3%)
$> 30\%$	26 (66.7%)
yp Necrosis	
$\leq 30\%$	30 (76.9%)
$> 30\%$	9 (23.1%)

Cis: cisplatin; gemci: gemcitabine; vino: vinorelbine; ADK: adenocarcinoma; SCC: squamous-cell carcinoma; LCNEC: large-cell neuroendocrine carcinoma; yp: post-NAC pathological assessment.

Table 3
Interrrelationship between PD-L1 staining and clinicopathological features of NAC patients.

Variable	Mean (± SEM) APD-L1	P-value	Proportion of APD-L1 ₅₀ positive patients in the category (%)	P-value
Gender				
Male	13.7 (6.8)	0.78	20.7	0.66
Female	17.6 (12.3)		30.0	
Age > 60 years				
Yes	11.7 (8.4)	0.60	14.3	0.28
No	17.8 (8.5)		28.0	
Smoker				
Current/former	14.7 (6.9)	0.84	23.3	0.66
Never	17.7 (14.5)		22.2	
COPD				
Yes	22.6 (8.2)	0.23	30.0	0.25
No	7.8 (9.2)		15.8	
Type of NAC				
Cis + gemci	16.7 (5.8)	0.67	22.2	0.80
Cis + vino	8.6 (4.2)		20.0	
Cis + other	23.2 (8.3)		33.3	
Number of NAC cures				
< 4	17.3 (6.2)	0.40	20.0	0.67
≥ 4	1.8 (25.6)		23.5	
yp Viable tumor > 50%				
Yes	30.8 (13.2)	0.09	50.0	0.02
No	8.7 (6.3)		13.8	
yp Necrosis > 30%				
Yes	6.6 (15.4)	0.47	22.2	0.66
No	16.9 (6.3)		23.3	
yp Fibrosis > 30%				
Yes	17.2 (6.9)	0.55	19.2	0.33
No	9.6 (11.3)		30.8	

COPD: chronic obstructive pulmonary disease; Cis: cisplatin; gemci: gemcitabine; vino: vinorelbine; yp: post-NAC pathological assessment.

3.3. Cisplatin increases PD-L1 expression in experimental tumors

To confirm our clinical results and better investigate the influence of cisplatin on PD-L1 regulation, we established experimental tumors

using the syngeneic model of Lewis lung carcinoma. First, we confirmed that LLC1 cells express PD-L1, as a strong band for PD-L1 transcript was observed by RT-PCR (Fig. 2A). We then analyzed the level of PD-L1 protein content in the LLC1 tumors before or after cisplatin treatment for 24 h. An example of a Western blot is shown in Fig. 2B. The semi-quantitative estimation demonstrated a significant increase of PD-L1 protein in the tumor after treatment ($p = 0.02$, Fig. 2C).

To eliminate the influence of the immune component in this regulation, especially T-lymphocytes, we evaluated PD-L1 expression in a model of athymic nude mice bearing tumors from human lung adenocarcinoma cell line (A549). Comparative analysis of tumor samples showed a significant increase of PD-L1 mRNA level after treatment with 24-h cisplatin ($p = 0.03$, Fig. 2D). In control groups receiving injection of PBS alone, PD-L1 transcript levels were not modified ($p = 0.53$).

3.4. Cisplatin rapidly increases PD-L1 expression in a dose-dependent manner, via AKT activation

To further explore the modality of actions of cisplatin on tumor cells, we incubated different human and murine lung carcinoma cell-lines, expressing PD-L1 at baseline, with increasing concentrations of cisplatin. After treatment, the rates of PD-L1 mRNA were increased in both human and murine cell lines, by 1.5–7.5 folds as compared to control groups (Fig. 3A–C). In human LNM-R cells, in which we found an IC_{50} of $12 \pm 3.1 \mu\text{M}$ cisplatin, the enhancement of PD-L1 expression was observed at a very low dose, then dose escalation of cisplatin was positively correlated to PD-L1 mRNA levels and reached a plateau around $8 \mu\text{M}$ (Fig. 3A). This increase of PD-L1 transcript was also observed in others cell lines (Fig. 3B and C). Concomitantly, the PD-L1 protein levels were also increased in the three cell lines, as compared to respective controls. This PDL-1 overexpression was associated to AKT activation by cisplatin (Fig. 3D). As PD-L1 is a transmembranous protein, we subsequently performed an immunocytochemistry analysis showing cisplatin-induced enhanced labeling of the cytoplasmic membrane as compared to control (Fig. 3E).

Furthermore, we evaluated the role of the PI3K/AKT pathway in PD-L1 up-regulation by cisplatin. LLC1 cells were treated for 24 h with

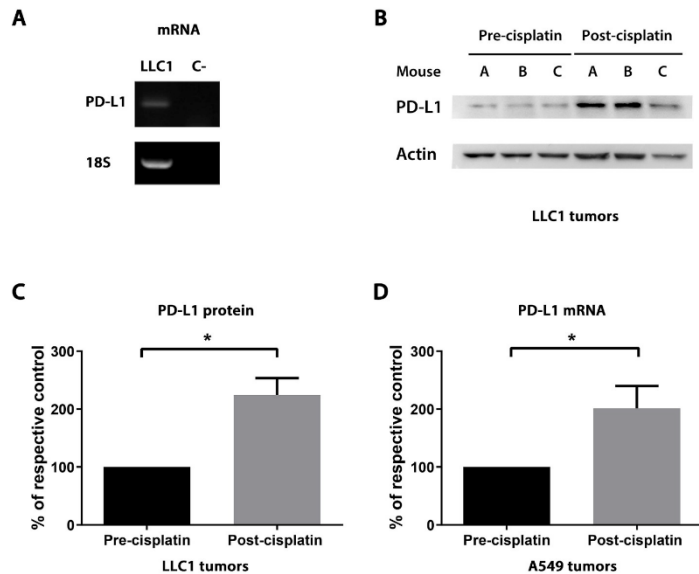


Fig. 2. Cisplatin increases PD-L1 expression in experimental tumor grafts. (A) Qualitative PCR showing PD-L1 and 18S mRNAs extracted from LLC1 cells and negative control. (B, C) Western blotting of PD-L1 protein in pre- and post-cisplatin treatment of LLC1 tumors ($n = 6$), each animal being its own control. Semi-quantification of PD-L1 protein content was performed and normalized with actin, and as calculated the percentage of each respective control. (D) Q-PCR quantification of PD-L1 mRNA extracted from A549 tumor-bearing nude mice ($n = 10$). A paired analysis was performed on matched samples to compare pre- and post-cisplatin treatment for 24 h. Results are expressed as the percentage of respective control. * means a P value < 0.05, error-bars: standard error of the mean.

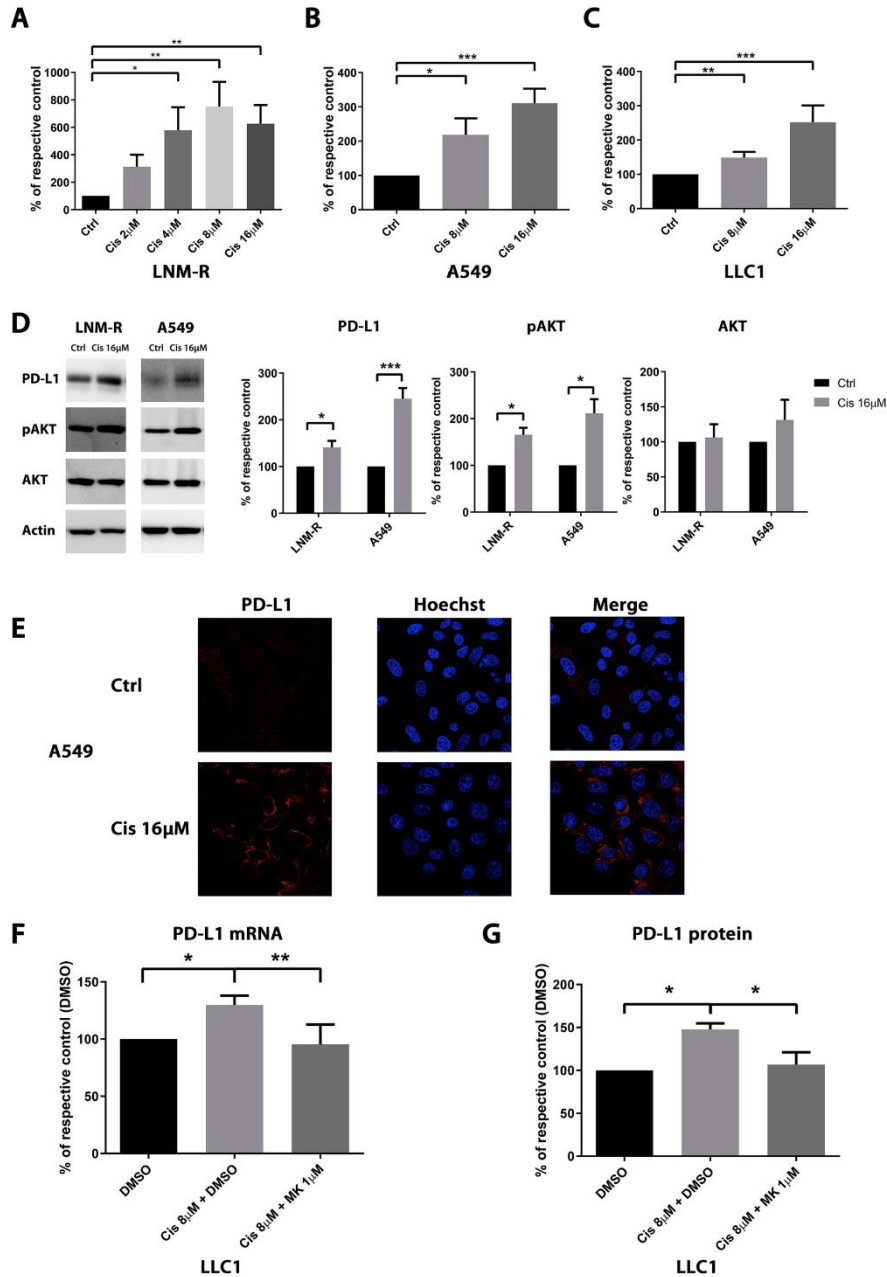
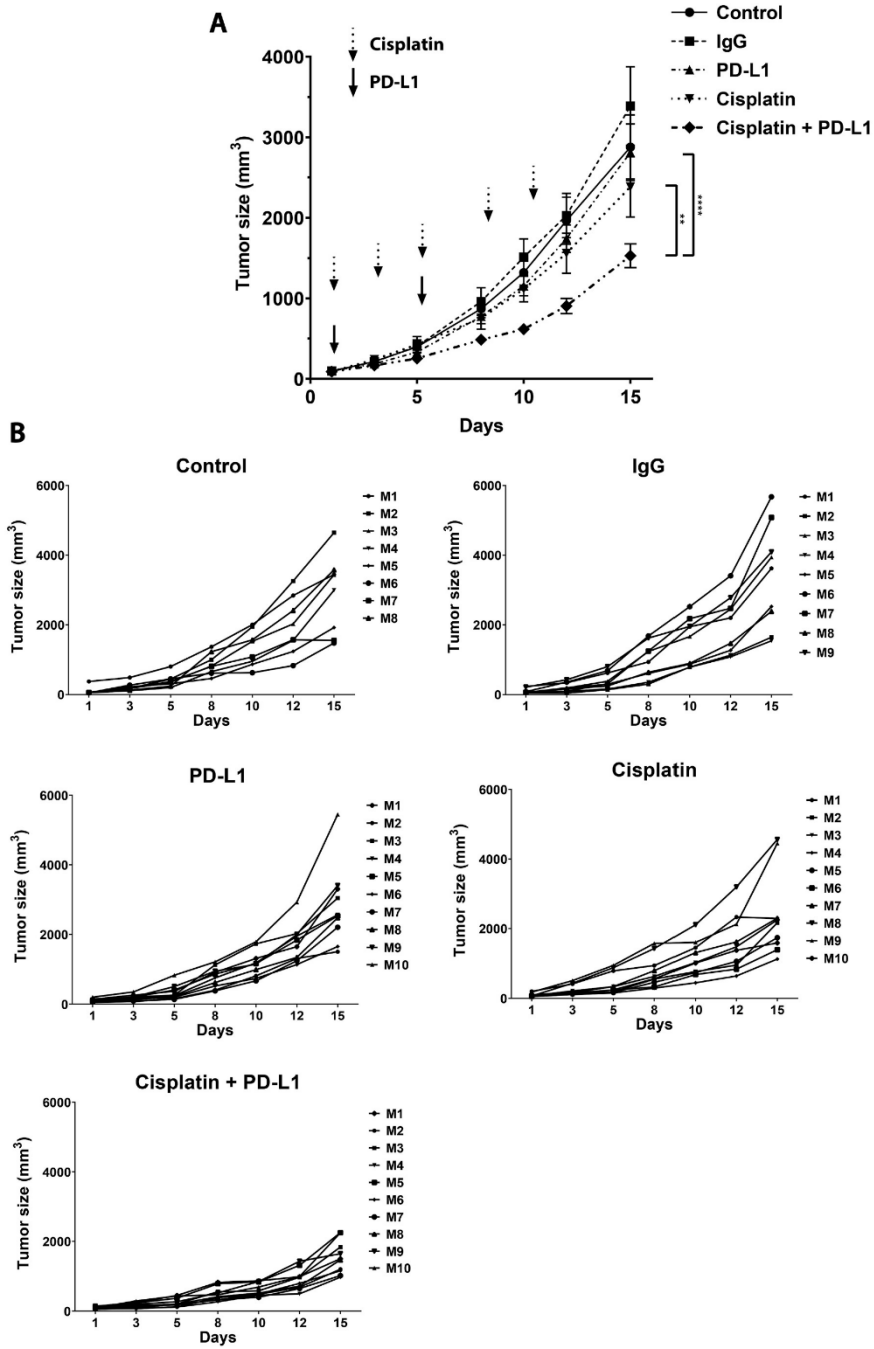


Fig. 3. Cisplatin-induced PD-L1 expression in NSCLC cell-lines. Q-PCR quantification of PD-L1 mRNA after 24-h incubation with cisplatin or equivalent concentrations of PBS (control) in (A) LNM-R (n = 6), (B) A549 (n = 8), and (C) LLC1 cells (n = 8). (D) Western-blot analyses of PD-L1, pAKT and AKT proteins after extraction from LNM-R (n = 4), and A549 (n = 8) cells, incubated during 24 h with PBS or 16 μM cisplatin, quantification is expressed as percentage of respective control. (E) Immunocytochemistry of A549 cells incubated during 24 h with PBS or 16 μM cisplatin, PD-L1 protein (red labeling), nuclei (Hoechst blue labeling). Quantification of PD-L1 expression at the mRNA (F) and protein (G) levels after 24-h incubation of LLC1 cells (n = 4) with DMSO (control), cisplatin (8 μM), or cisplatin and AKT-inhibitor (MK2206, 1 μM). * indicates a P value < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, error-bars: standard error of the mean.



(caption on next page)

Fig. 4. Cisplatin and anti-PD-L1 combined treatment reduced tumor growth, in the Lewis model. (A) Tumor growth curves of LLC1 grafted on C57BL/6Jrj mice. When tumors reached 90–100 mm³, mice were treated (i.v.) with PBS (n = 8), total IgG1 control (BioXcell®) (n = 9), anti-PD-L1 (n = 10), cisplatin (n = 10), or the combination cisplatin and anti-PD-L1 (n = 10). The arrow indicates the day of injection. **(B)** Individual follow up of LLC1 tumor size treated as described above. ** indicates a P value < 0.01, **** < 0.0001, error-bars: standard error of the mean.

8 μ M of cisplatin plus or without MK2206, an AKT blocker, or DMSO. The RNA quantification revealed that cisplatin-induced PD-L1 up-regulation was significantly counteracted by MK2206 (Fig. 3F). This effect was confirmed at the protein level with western-blot analyses showing a significantly lower PD-L1 expression in the group of cells incubated with combined cisplatin and MK2206 as compared to cisplatin and control (Fig. 3G). Concomitantly, pAKT was increased by 3 fold when LLC1 cells were treated with 8 μ M of cisplatin and return to half of the basal level in the presence of MK 2206 (data not shown). Overall, these results suggest that PD-L1 up-regulation by cisplatin could involve the PI3K/AKT signaling pathway.

3.5. The combined treatment associating cisplatin and anti-PD-L1 improves therapeutic response compared to single agent regimens

As PD-L1 expression was increased after cisplatin exposure, we addressed the question of a potential improvement of tumor response with the combined treatment associating cisplatin and anti-PD-L1 antibodies, as compared to single agent regimen. As previously described, we performed syngeneic grafts of LLC1 tumors to C57BL/6j mice. The treatment began when the tumor burden reached 90–100 mm³, two weeks after cell injection. The tumor growth was rapid as the control group reached 3000 mm³ after 15 days. Consequently, in accordance with ethical guidelines, we terminated the experiment. The tumor growth rate was not significantly different between the control, the isotope IgG, the PD-L1, and the cisplatin groups. In contrast, the tumor volume was reduced by 47% in mice treated with the combined treatment as compared to control (1530 \pm 147 vs 2879 \pm 400 mm³) (Fig. 4A). Individual responses, shown in Fig. 4B, revealed that in control, and IgG groups, the tumor growth rate was dispersed among animals, and more homogenous in the single agent regimen groups except some mice exhibiting high tumor progression. Tumor response in the group receiving combined cisplatin and anti-PD-L1 was also homogeneous, all 10 tumor-bearing mice showed almost similar tumor growth delay (Fig. 4B).

4. Discussion

Our unique experimental approach consisting of the study of PD-L1 expression in the same series of patients before and after NAC, confirmed the previous findings at the level of human tumor: chemotherapy increases the level of PDL-1. This result underscores and strengthens the existing data found in the literature, and thereby opens the debate for the positioning of PD-1/PD-L1 blockade within the sequence of systemic treatments for lung cancer.

In addition, the clinical and pathological results observed in the NAC cohort, our preclinical experiments revealed an early induction of PD-L1 by cisplatin associated with significant biological effect. The paired analysis of human tumor samples revealed an increase of PD-L1 expression several weeks following cisplatin administration, which suggests prolonged up-regulation in tumor cells. These results is in contrast to previous observations in head and neck squamous-cell carcinoma, suggesting that cisplatin-induced PD-L1 up-regulation might not be sustainable over time [23]. An up-regulation of PD-L1 by cisplatin, being both early and sustainable, would have a major impact in the design of combined systemic therapies protocols including cisplatin and ICIs. Similarly, some authors previously demonstrated that platinum-based NAC can induce PD-L1 expression in various cancers which could favor the results of consecutive ICIs treatment [23–26]. Even though true benefit of such therapeutic association probably needs

to be overbalanced with the theoretical negative impact of NAC on immune cells, our team previously demonstrated that platinum based chemotherapy does not affect the immune contexture of post-induction NSCLC [27]. In this study, we chose to mimic the clinical context by using a subtoxic dose of cisplatin, and obtained an improved tumor response combining cisplatin to anti-PD-L1 antibodies compared to single agent regimen. Thus we can emphasize that administration of cisplatin can up-regulate PD-L1 while not significantly impairing anti-cancer immunity.

The independent role of cisplatin on PD-L1 expression in NAC patients could be challenged as cisplatin was combined to other chemotherapeutic agents. However, we did not find any statistical association between Δ PD-L1 and type of doublet. In addition, several retrospective studies analyzing the effect of cisplatin-based NAC in other neoplasms than NSCLC found similar results concerning its influence on PD-L1 expression whereas regimen protocols generally involve different associations than in lung cancer [24,25]. Thus it can be concluded that cisplatin could play a significant role in PD-L1 expression by tumor cells.

The methodology consisting in analyzing Δ PD-L1 after NAC by comparing IHC results in metastatic and primary tissues seems relevant and advantageous. Indeed, our results on chemo-naïve minimal-N2 patients, showed no significant difference between PD-L1 staining in lung tumor and invaded mediastinal lymph nodes. Although relying on the analysis of “only” 20 patients, because of the rarity of minimal N2 condition, this result suggests that PD-L1 labeling in lymph-nodes is representative of those from primary lung tumors. Despite the potential for slightly different clinical and biological entities, other authors have corroborated findings and reported similar or higher PD-L1 expression in tumor cells of metastatic sites as compared to primary sites [28,29].

Our results outline a strong association between changes in PD-L1 expression by tumor cells and pathological features of tumors after NAC, in line with similar findings [9]. It has been reported that high PD-L1 expression in tumors was associated with resistance to cisplatin, and also that Δ PD-L1 after induction therapy might reflect chemosensitivity, with low or no Δ PD-L1 positivity in those patients responding to cisplatin [9,30]. Our results concur with this hypothesis based on the finding that Δ PD-L1₅₀ positive patients exhibit worse pathologic criteria of response to NAC. To explain this correlation, we may hypothesize that neoadjuvant treatment “selected” the subset of tumor cells resistant to cisplatin and, thus, still viable after induction therapy, these resistant clones exhibiting higher PD-L1 expression. Moreover, this latter observation possibly links to some mechanisms involved in PD-L1 up-regulation which are currently under investigation. Indeed, the regulation of this protein is very complex and involves many transcriptional, post-transcriptional and post-translational actions, the clarification of which would be best suited for individual studies [10]. Our preliminary mechanistic exploration focused on a relatively ubiquitous oncogenic signaling pathway but specifically reported as up-regulating PD-L1, and known to sustain survival and resistance to cisplatin-induced apoptosis in cancer cells: PI3K/AKT [11,31,32]. The present study supports these observations showing that inhibition of PI3K/AKT pathway resulted in a significant reduction of PD-L1 expression in tumor cells exposed to cisplatin.

Increased PD-L1 expression in immune cells of the microenvironment after NAC represents another important result. Indeed, sustained stimulation of the PD-1/PD-L1 axis may alter anti-tumor activity as it has been shown that high proportions of PD-L1 + regulatory and PD-1 + CD8⁺ T-lymphocytes in the stroma of NSCLCs were significantly associated with good response to ICIs [33]. In further studies, it would

be interesting to explore the impact of treatments combining cisplatin-based chemotherapy and ICIs, in a concomitant or sequential manner, on anti-tumor immunity. Interestingly, the influence of number and function of immune cells of the microenvironment on the outcome of combined ICIs and NAC should be further investigated.

4.1. Limitations

All PD-L1 IHC evaluations relied on a retrospective cohort including a limited number of operated patients harboring heterogeneous clinical and pathological characteristics. Molecular analyses were not routinely performed at time of initial management and could not be performed for the current study. Thus, we could not analyze the impact of tumor mutational burden on Δ PD-L1 and its microenvironment. In addition, the reliability of pre- and post-cisplatin matched tumor biopsies analyses could be challenged by the likely heterogeneity of PD-L1 expression within the whole tumor area, encouraging a cautious interpretation of observed differences [34,35]. This methodological limitation also occurs in our mice experiments which, moreover, harbor drawbacks for mimicking “normal” tumor stroma and microenvironment due to the heterotopic location and the rapid growth of injected pulmonary tumors [36].

5. Conclusion

In conclusion, cisplatin enhanced PD-L1 expression in both pre-clinical models and cohorts of patients with NSCLC. The results suggested reproducible, persistent, and a significant inducing impact on tumor cells. This study will hopefully provide a solid and reliable basis for further explorations, as well as reinforcing the rationale for several ongoing clinical trials testing combination therapies including PD-L1 and cytotoxic drugs like cisplatin. At the time of protocols combining chemo and/or radiotherapy with ICIs, it also raises the question of the relevance of performing sequential reevaluation of PD-L1 status to select the ideal subset of patients.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CRedit authorship contribution statement

Ludovic Fournel: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Writing - original draft. **Zherui Wu:** Data curation, Writing - review & editing. **Nicolas Stadler:** Data curation, Investigation. **Diane Damotte:** Methodology, Validation. **Filippo Lococo:** Supervision, Investigation. **Geoffroy Boule:** Software, Investigation. **Evelyne Ségal-Bendirdjian:** Methodology, Visualization. **Antonio Bobbio:** Visualization, Resources. **Philippe Icard:** Validation. **Jean Trédaniel:** Conceptualization, Writing - review & editing. **Marco Alifano:** Conceptualization, Writing - review & editing. **Patricia Forgez:** Conceptualization, Methodology, Project administration, Writing - review & editing.

Acknowledgements

We thank Dr Neil Insdorf for his kind help in editing the manuscript. We thank Tatiana Ledent (animal facility, Saint-Antoine Hospital, Paris, France) and staff of the microscopy platform SCM (Service Commun de Microscopie, Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales, Paris, France). We also thank Dr Cecilia Mengoli for her help in

immunochemistry analyses (pathology department of Santa-Maria-Nuova Hospital, Reggio Emilia, Italy).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.08.005>.

References

- [1] L.A. Torre, R.L. Siegel, A. Jemal, Lung cancer statistics, *Adv. Exp. Med. Biol.* 893 (2016) 1–19, https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_1.
- [2] J. von Pawel, R. Bordoni, M. Satouchi, L. Fehrenbacher, M. Cobo, J.Y. Han, T. Hida, D. Moro-Sibilot, P. Conkling, D.R. Gandara, A. Rittmeyer, M. Gandhi, W. Yu, C. Matheny, H. Patel, A. Sandler, M. Ballinger, M. Kowametz, K. Park, Long-term survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with atezolizumab versus docetaxel: results from the randomised phase III OAK study, *Eur. J. Cancer. Oxf. Engl.* 107 (2019) (1990) 124–132, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.11.020>.
- [3] R.S. Herbst, P. Baas, D.-W. Kim, E. Felip, J.L. Pérez-Gracia, J.-Y. Han, J. Molina, J.-H. Kim, C.D. Arvis, M. J. Ahn, M. Majem, M.J. Fidlar, G. de Castro, M. Garrido, G.M. Lubiniecki, Y. Shentu, E. Im, M. Dolled-Filhart, E.B. Garon, Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial, *Lancet. Lond. Engl.* 387 (2016) 1540–1550, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01281-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01281-7).
- [4] M. Reck, D. Rodríguez-Abreu, A.G. Robinson, R. Hui, T. Csösz, A. Fülöp, M. Gottfried, N. Peled, A. Tafreshi, S. Cuffe, M. O'Brien, S. Rao, K. Hotta, M.A. Leiby, G.M. Lubiniecki, Y. Shentu, R. Rangwala, J.R. Brahmer, KEYNOTE-024 investigators, pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 1823–1833, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>.
- [5] M. Reck, D. Rodríguez-Abreu, A.G. Robinson, R. Hui, T. Csösz, A. Fülöp, M. Gottfried, N. Peled, A. Tafreshi, S. Cuffe, M. O'Brien, S. Rao, K. Hotta, K. Vandormael, A. Riccio, J. Yang, M.C. Pietanza, J.R. Brahmer, Updated analysis of KEYNOTE-024: pembrolizumab versus platinum-based chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 tumor proportion score of 50% or greater, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 37 (2019) 537–546, <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00149>.
- [6] S. Maleki Vareki, C. Garrigós, I. Duran, Biomarkers of response to PD-1/PD-L1 inhibition, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 116 (2017) 116–124, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.06.001>.
- [7] Z.-Y. Dong, S.-P. Wu, R.-Q. Liao, S.-M. Huang, Y.-L. Wu, Potential biomarker for checkpoint blockade immunotherapy and treatment strategy, *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 37 (2016) 4251–4261, <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4812-9>.
- [8] J. Shin, J.-H. Chung, S.H. Kim, K.S. Lee, K.J. Suh, J.Y. Lee, J.-W. Kim, J.-O. Lee, J.-W. Kim, Y.-J. Kim, K.-W. Lee, J.H. Kim, S.-M. Bang, J.-S. Lee, Effect of platinum-based chemotherapy on PD-L1 expression on tumor cells in non-small cell lung cancer, *Canc. Res. Treat. Off. J. Korean Canc. Assoc.* (2018), <https://doi.org/10.4143/crt.2018.537>.
- [9] P. Zhang, Y. Ma, C. Lv, M. Huang, M. Li, B. Dong, X. Liu, G. An, W. Zhang, J. Zhang, L. Zhang, S. Zhang, Y. Yang, Upregulation of programmed cell death ligand 1 promotes resistance response in non-small-cell lung cancer patients treated with neo-adjuvant chemotherapy, *Cancer Sci.* 107 (2016) 1563–1571, <https://doi.org/10.1111/cas.13072>.
- [10] I. Zerdes, A. Matikas, J. Bergh, G.Z. Rassidakis, T. Foukakis, Genetic, transcriptional and post-translational regulation of the programmed death protein ligand 1 in cancer: biology and clinical correlations, *Oncogene* 37 (2018) 4639–4661, <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0303-3>.
- [11] K.J. Lastwika, W. Wilson, Q.K. Li, J. Norris, H. Xu, S.R. Ghazarian, H. Kitagawa, S. Kawabata, J.M. Taube, S. Yao, L.N. Liu, J.J. Gills, P.A. Dennis, Control of PD-L1 expression by oncogenic activation of the AKT-mTOR pathway in non-small cell lung cancer, *Cancer Res.* 76 (2016) 227–238, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CCR-14-3362>.
- [12] L. Paz-Ares, A. Luft, D. Vicente, A. Tafreshi, M. Güntüz, J. Mazières, B. Hermes, F. Çay Senler, T. Csösz, A. Fülöp, J. Rodríguez-Cid, J. Wilson, S. Sugawara, T. Kato, K.H. Lee, Y. Cheng, S. Novello, B. Halmos, X. Li, G.M. Lubiniecki, B. Piperdi, D.M. Kowalski, KEYNOTE-407 investigators, pembrolizumab plus chemotherapy for squamous non-small-cell lung cancer, *N. Engl. J. Med.* 379 (2018) 2040–2051, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1810865>.
- [13] L. Gandhi, D. Rodríguez-Abreu, S. Gadgeel, E. Esteban, E. Felip, F. De Angelis, M. Domine, P. Clingan, M.J. Hochmair, S.F. Powell, S.Y.-S. Cheng, H.G. Bischoff, N. Peled, F. Grossi, R.R. Jennens, M. Reck, R. Hui, E.B. Garon, M. Boyer, B. Rubio-Viqueira, S. Novello, T. Kurata, J.E. Gray, J. Vida, Z. Wei, J. Yang, H. Raftopoulos, M.C. Pietanza, M.C. Garassino, KEYNOTE-189 investigators, pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer, *N. Engl. J. Med.* 378 (2018) 2078–2092, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801005>.
- [14] S.V. Liu, D.R. Camidge, S.N. Gettinger, G. Giaccone, R.S. Heist, F.S. Hodi, N.E. Ready, W. Zhang, J. Wallin, R. Funke, D. Waterkamp, P. Foster, K. Iizuka, J. Powderly, Long-term survival follow-up of atezolizumab in combination with platinum-based doublet chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer, *Eur. J. Cancer. Oxf. Engl.* 101 (2018) (1990) 114–122, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.06.033>.

- [15] S.J. Antonia, A. Villegas, D. Daniel, D. Vicente, S. Murakami, R. Hui, T. Yokoi, A. Chiappori, K.H. Lee, M. de Wit, B.C. Cho, M. Bourhaba, X. Quantin, T. Tokito, T. Mekhail, D. Planchard, Y.-C. Kim, C.S. Karapetis, S. Hiet, G. Ostoros, K. Kubota, J.E. Gray, L. Paz-Ares, J. de Castro Carpeno, C. Wadsworth, G. Mellillo, H. Jiang, Y. Huang, P.A. Dennis, M. Özgüroglu, PACIFIC investigators, durvalumab after chemoradiotherapy in stage III non-small-cell lung cancer, *N. Engl. J. Med.* 377 (2017) 1919–1929, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709937>.
- [16] E.A. Eisenhauer, P. Therasse, J. Bogaerts, L.H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancy, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe, J. Verweij, New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1), *Eur. J. Canc. Oxf. Engl.* 45 (1990) 228–247, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>.
- [17] J. Adam, N. Le Stang, I. Rouquette, A. Cazes, C. Badoual, H. Pinot-Roussel, L. Tixier, C. Danel, F. Damiola, D. Damotte, F. Penault-Llorca, S. Lantuéjoul, Multicenter harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small-cell lung cancer, *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 29 (2018) 953–958, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy014>.
- [18] R.S. Herbst, J.-C. Soria, M. Kowametz, G.D. Fine, O. Hamid, M.S. Gordon, J.A. Sosman, D.F. McDermott, J.D. Powderly, S.N. Gettinger, H.E.K. Kohrt, L. Horn, D.P. Lawrence, S. Rost, M. Leabman, Y. Xiao, A. Mokatrih, H. Koepfen, P.S. Hegde, I. Mellman, D.S. Chen, F.S. Hodi, Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients, *Nature* 515 (2014) 563–567, <https://doi.org/10.1038/nature14011>.
- [19] M. Alifano, F. Souazé, S. Dupouy, S. Camilleri-Broët, M. Younes, S.-M. Ahmed-Zaid, T. Takahashi, A. Cancellieri, S. Damiani, M. Bearon, P. Broët, L.D. Miller, C. Gespach, J.F. Regnard, P. Forgez, Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16 (2010) 4401–4410, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0659>.
- [20] M. Younes, Z. Wu, S. Dupouy, A.M. Lupo, N. Moura, T. Takahashi, J.F. Fléjou, J. Trédaniel, J.F. Regnard, D. Damotte, M. Alifano, P. Forgez, Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib, *Oncotarget* 5 (2014) 8252–8269, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1633>.
- [21] Z. Wu, L. Fournel, N. Stadler, J. Liu, A. Boullier, N. Hoyeau, J.F. Fléjou, V. Duchatelle, N. Djebrani-Oussedik, M. Agopiantz, E. Ségal-Bendirdjian, A. Gompel, M. Alifano, O. Melander, J. Trédaniel, P. Forgez, Modulation of lung cancer cell plasticity and heterogeneity with the restoration of cisplatin sensitivity by neurotensin antibody, *Cancer Lett.* 444 (2019) 147–161, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.12.007>.
- [22] K. Kozaki, O. Miyaishi, T. Tsukamoto, Y. Tatematsu, T. Hida, T. Takahashi, T. Takahashi, Establishment and characterization of a human lung cancer cell line NCI-H460-LNM35 with consistent lymphogenous metastasis via both subcutaneous and orthotopic propagation, *Cancer Res.* 60 (2000) 2535–2540.
- [23] L. Tran, C.T. Allen, R. Xiao, E. Moore, R. Davis, S.-J. Park, K. Spielbauer, C. Van Waes, N.C. Schmitt, Cisplatin alters antitumor immunity and synergizes with PD-1/PD-L1 inhibition in head and neck squamous cell carcinoma, *Cancer Immunol. Res.* 5 (2017) 1141–1151, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CCR-17-0235>.
- [24] S. Grabosch, M. Bulatovic, F. Zeng, T. Ma, L. Zhang, M. Ross, J. Brozick, Y. Fang, G. Tseng, E. Kim, A. Gambotto, E. Elishaev, R.P. Edwards, A.M. Vlad, Cisplatin-induced immune modulation in ovarian cancer mouse models with distinct inflammation profiles, *Oncogene* (2018), <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0581-9>.
- [25] H.Y. Ng, J. Li, L. Tao, A.K.-Y. Lam, K.W. Chan, J.M.Y. Ko, V.Z. Yu, M. Wong, B. Li, M.L. Lung, Chemotherapeutic treatments increase PD-L1 expression in esophageal squamous cell carcinoma through EGFR/ERK activation, *Transl. Oncol. Times* 11 (2018) 1322–1333, <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.08.005>.
- [26] S.J.L. Mesnage, A. Auguste, C. Genestie, A. Dunant, E. Pain, F. Drusch, S. Gouy, P. Morice, E. Bentivegna, C. Lhomme, P. Pautier, J. Michels, A. Le Formal, B. Cheaib, J. Adam, A.F. Leary, Neoadjuvant chemotherapy (NACT) increases immune infiltration and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in epithelial ovarian cancer (EOC), *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 28 (2017) 651–657, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw625>.
- [27] R. Remark, A. Lupo, M. Alifano, J. Biton, H. Ouakrim, A. Stefani, L. Cremer, J. Goc, J.-F. Régnard, M.-C. Dieu-Nosjean, D. Damotte, Immune contexture and histological response after neoadjuvant chemotherapy predict clinical outcome of lung cancer patients, *Oncol. Immunology* 5 (2016) e1255394, <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1255394>.
- [28] Y. Liu, Z. Dong, T. Jiang, L. Hou, F. Wu, G. Gao, Y. He, J. Zhao, X. Li, C. Zhao, W. Zhang, Q. Tian, Y. Pan, Y. Wang, S. Yang, C. Wu, S. Ren, C. Zhou, J. Zhang, F.R. Hirsch, Heterogeneity of PD-L1 expression among the different histological components and metastatic lymph nodes in patients with resected lung adenocarcinoma, *Clin. Lung Cancer* 19 (2018) e421–e430, <https://doi.org/10.1016/j.clcl.2018.02.008>.
- [29] H. Uruga, E. Bozkurtlar, T.G. Huynh, A. Muzikansky, Y. Goto, M. Gomez-Caraballo, A.N. Hata, J.F. Gainor, E.J. Mark, J.A. Engelman, M.D. Lanuti, M. Mino-Kenudson, Programmed cell death ligand (PD-L1) expression in stage II and III lung adenocarcinomas and nodal metastases, *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Stud. Lung Cancer* 12 (2017) 458–466, <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.10.015>.
- [30] S.Y. Lee, D.K. Jung, J.E. Choi, C.C. Jin, M.J. Hong, S.K. Do, H.-G. Kang, W.K. Lee, Y. Seok, E.B. Lee, J.Y. Jeong, K.M. Shin, S.S. Yoo, J. Lee, S.I. Cha, C.H. Kim, J.Y. Park, PD-L1 polymorphism can predict clinical outcomes of non-small cell lung cancer patients treated with first-line paclitaxel-cisplatin chemotherapy, *Sci. Rep.* 6 (2016) 25952, <https://doi.org/10.1038/srep25952>.
- [31] E.A. Mittendorf, A.V. Phillips, F. Meric-Bernstam, N. Qiao, Y. Wu, S. Harrington, X. Su, Y. Wang, A.M. Gonzalez-Angulo, A. Akcahanat, A. Charvlat, M. Curran, P. Hwu, P. Shamma, J.K. Litton, J.J. Molkrem, G. Alatrash, PD-L1 expression in triple-negative breast cancer, *Cancer Immunol. Res.* 2 (2014) 361–370, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CCR-13-0127>.
- [32] E.G. Sarris, M.W. Saif, K.N. Syrigos, The biological role of PI3K pathway in lung cancer, *Pharm. Basel Switz.* 5 (2012) 1236–1264, <https://doi.org/10.3390/ph5111236>.
- [33] S.-P. Wu, R.-Q. Liao, H.-Y. Tu, W.-J. Wang, Z.-Y. Dong, S.-M. Huang, W.-B. Guo, L.-Y. Gou, H.-W. Sun, Q. Zhang, Z. Xie, L.-X. Yan, J. Su, J.-J. Yang, W.-Z. Zhong, X.-C. Zhang, Y.-L. Wu, Stromal PD-L1-positive regulatory T cells and PD-1-positive CD8-positive T cells define the response of different subsets of non-small cell lung cancer to PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy, *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Stud. Lung Cancer* 13 (2018) 521–532, <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.11.132>.
- [34] M. Ilie, E. Long-Mira, C. Bence, C. Butori, S. Lassalle, L. Bouhlef, L. Fazzalari, K. Zahaf, S. Lahvé, K. Washetine, J. Mouroux, N. Vénissac, M. Poudenx, J. Otto, J.C. Sabourin, C.H. Marquette, V. Hofman, P. Hofman, Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies, *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 27 (2016) 147–153, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv489>.
- [35] E. Munari, G. Zamboni, G. Lunardi, L. Marchionni, M. Marconi, M. Sommaggio, M. Brunelli, G. Martignoni, G.J. Netto, M.O. Hoque, F. Moretta, M.C. Mingari, M.C. Pegoraro, A. Inno, S. Paiano, A. Terzi, A. Cavazza, G. Rossi, F.R. Mariotti, P. Vacca, L. Moretta, G. Bogina, PD-L1 expression heterogeneity in non-small cell lung cancer: defining criteria for harmonization between biopsy specimens and whole sections, *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Stud. Lung Cancer* 13 (2018) 1113–1120, <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.04.017>.
- [36] L. Zitvogel, J.M. Pitt, R. Dailère, M.J. Smyth, G. Kroemer, Mouse models in oncoimmunology, *Nat. Rev. Cancer* 16 (2016) 759–773, <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.91>.

6.2. Modulation de la plasticité et de l'hétérogénéité cellulaire et restauration de la sensibilité au cisplatine par un anticorps anti-neurotensine, dans le CBNPC (travail 2)

Modulation of lung cancer cell plasticity and heterogeneity with the restoration of cisplatin sensitivity by neurotensin antibody (Wu Z, Fournel L, et al. 2019, article publié rapporté ci-dessous)

6.2.1. Introduction

Malgré des avancées thérapeutiques substantielles ces dernières décennies, avec les chimiothérapies, les thérapies ciblées puis les immunothérapies, le cancer du poumon reste la première cause de mortalité liée au cancer (Siegel, Miller, and Jemal 2018). Il s'agit d'une pathologie très hétérogène, composée majoritairement par les CBNPC qui représentent près de 85% des néoplasies pulmonaires. Dans au moins 60% des cas, la maladie, souvent asymptomatique, est diagnostiquée au stade métastatique (Locher et al. 2013), chez des patients qui recevront généralement un traitement systémique, avec une probabilité significative de recevoir une chimiothérapie à base de sels de platine à un moment donné de leur parcours de soins. Les régimes de chimiothérapie standard combinent la plupart du temps un composé de sel de platine avec un antimétabolite (principalement du pemetrexed) ou un poison du fuseau (paclitaxel). Ce traitement augmente la survie globale jusqu'à 12 mois ou plus, contre 4,5 mois avec les soins de support seuls (Sandler et al. 2006; Scagliotti et al. 2008). Malheureusement, les patients finissent en très grande majorité par progresser d'un point de vue tumoral, de par une interruption de traitement due à une mauvaise tolérance clinique ou par des phénomènes de résistance.

Ces processus de résistance peuvent être à la fois intrinsèques ou acquis. Récemment, la nature hétérogène des tumeurs a été révélée par des diagnostics

moléculaires avancés, décrivant la constitution génétique des clones intra-tumoraux. Il est devenu clair que l'hétérogénéité tumorale est, au moins partiellement, responsable de la variabilité initiale de réponse aux traitements des patients (Dagogo-Jack and Shaw 2018), tandis que des expériences supplémentaires ont révélé que l'hétérogénéité tumorale est dynamique dans l'espace et le temps. Une hétérogénéité spatiale, observée au sein de la tumeur primitive, a également été détectée entre sites distants, organes ou ganglions lymphatiques, comme le suggèrent les analyses génétiques (Suda et al. 2018). L'évolution tumorale dans le temps a également été montrée par la mise en évidence de modifications génétiques au cours de la maladie et l'apparition de nouvelles mutations ou la restauration du phénotype sauvage (Dagogo-Jack and Shaw 2018).

La plasticité tumorale devient également un problème majeur, car la résistance peut émerger de l'activation des voies de signalisation oncogénique secondaires, d'une sélection clonale ou de mutations acquises (H. A. Yu et al. 2013; Sequist et al. 2011). En effet, les caractéristiques physiologiques tumorales sont dynamiques, en fonction notamment de leur microenvironnement immunitaire, de leur accès aux facteurs de croissance, de leur vascularisation et/ou vasculature, et de leur adaptation aux traitements. Plusieurs études ont montré que cet aspect dynamique des tumeurs les entraîne au cours de la progression vers un état plus agressif et incontrôlable qui favorise finalement la résistance aux drogues anti-tumorales (Bhang et al. 2015; Jamal-Hanjani et al. 2017; Russo et al. 2016). Les caractéristiques dynamiques des cellules tumorales induites par leur plasticité rendent problématique le développement d'une thérapie systémique efficace. Ces caractéristiques adaptatives ne sont pas unidirectionnelles et peuvent être modulées, les cellules présentant un comportement plus ou moins agressif, indépendamment de leur statut mutationnel.

La modulation de la plasticité des cellules tumorales visant à les maintenir dans un état moins agressif constitue une approche thérapeutique pertinente pour améliorer les performances des thérapies systémiques, chimiothérapies en particulier.

Dans ce contexte, nous avons voulu démontrer que la diminution de l'activité du récepteur de haute affinité à la neurotensine de type 1 (NTSR1) impacte l'agressivité des cellules tumorales tout en améliorant la réponse à la chimiothérapie, en rétablissant la sensibilité aux sels de platine.

La neurotensine est synthétisée à partir d'une proforme de 170 acides aminés, clivée par des convertases pour produire du NTS et de la neuromédine N. Le clivage manqué de la proforme NTS produit un NTS à long fragment (LF-NTS) qui s'est révélé présenter la même activité biologique que le peptide mature mais avec une plus grande stabilité, ce qui permet également une facilitation du ciblage thérapeutique et de l'étude expérimentale (Friry et al. 2002). La LF-NTS circulante est active et significativement corrélée au développement du cancer du sein, du diabète, des maladies cardiovasculaires et de la mortalité totale (Melander et al. 2012). Sur la base des résultats précédemment évoqués, nous avons émis l'hypothèse que suite à une production anormale de NTS, le proforme immature serait préférentiellement libéré au voisinage des cellules tumorales, et induirait une activation NTSR1 soutenue et intense avec signalisation associée. En effet, une activation chronique avec des doses élevées d'agoniste NTS, dans des lignées cellulaires surexprimant NTSR1, induit une activation du gène NTSR1 et un recyclage permanent de NTSR1 à la surface cellulaire (Toy-Miou-Leong et al. 2004; Najimi et al. 1998). La surstimulation de NTSR1 se produisant dans les tumeurs, induit une cascade d'activation autocrine des trois principaux récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGF-R, HER2, HER3) (Younes et al. 2014). Dans une tentative pour

altérer ou inhiber ces effets en cascade, nous avons développé un anticorps neutralisant le LF-NTS. Dans ce travail, nous corrélons tout d'abord l'expression de NTSR1 avec la réponse à la combinaison de traitement au platine et au pemetrexed chez des patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires métastatiques primitifs. Nous démontrons que le mAb LF-NTS agit sur la plasticité des cellules tumorales des cellules cancéreuses du poumon. Ce traitement a entraîné l'altération de leur agressivité en diminuant la croissance et la réduction des processus métastatiques. En affectant la plasticité cellulaire, la réponse au traitement au cisplatine a été restaurée tout en améliorant l'activité physique et en augmentant le poids corporel

6.2.2. Principaux résultats

La forte expression du NTSR1 dans les cellules tumorales des stades avancés du CBNPC est inversement corrélée à la sensibilité à la chimiothérapie à base de sels de platine

– L'évaluation en immunohistochimie du score neurotensinergique (expression de NTS et NTSR1) a été réalisée sur des biopsies de 28 malades traités pour un CBNPC non épidermoïde de stade avancé (IIIB ou IV), et confronté aux données cliniques incluant en particulier la réponse à la chimiothérapie. Plus l'expression de NTS et/ou NTSR1 était importante et donc le score neurotensinergique élevé, moins les patients répondent à la chimiothérapie selon les critères RECIST.

– L'étude d'une sous populations de patients opérés d'un CBNPC issues d'un essai randomisé comparant chirurgie seule contre chirurgie plus chimiothérapie adjuvante (doublet incluant du cisplatine) a permis de constater que les malades ayant un niveau de transcrit NTSR1 élevé ($\geq 80^{\text{ème}}$ percentile) ont une survie plus courte que

les autres après chimiothérapie et que cette thérapie adjuvante ne permettait pas d'obtenir de meilleurs résultats oncologiques que pour les patients du groupe contrôle contrairement à ceux ayant une expression NTSR1 plus faible.

– L'analyse de base de données TCGA-LUAD a confirmé que l'expression de NTSR1 était significativement associée à la croissance tumorale et à la réponse à la chimiothérapie.

Développement un anticorps dirigé contre le fragment long de la neurotensine (LF-NTS)

– Comme le suggéraient les précédents travaux de notre équipe, nous souhaitons cibler la neurotensine, et notamment son fragment long (plus stable), afin de bloquer l'activation de son récepteur le NTSR1 par stimulations autocrines et paracrines. Nous avons donc développé un anticorps anti fragment long de la NTS/NN/proformNTS à partir d'un peptide conjugué à la thyroglobuline bovine puis sélectionné par Elisa.

– Les propriétés neutralisantes de l'anticorps anti LF-NTS sur NTSR1 ont été vérifiées *in vitro* sur le ralentissement de la croissance cellulaire de cellules surexprimant NTSR1 et la NTS les LNM-R. De plus, l'effet activateur de NTS/NTSR1 sur les drivers oncogéniques majeurs que sont par exemple HER3 et EGF-R et leurs voies de signalisation associées, comme montré dans les travaux de notre équipe, est contrecarré par l'anticorps anti LF-NTS, *in vitro* (Younes et al. 2014).

L'anticorps anti LF-NTS réduit la croissance et le potentiel métastatique de tumeurs expérimentales du CBNPC

La croissance tumorale a été testée sur plusieurs modèles de tumeurs expérimentales, des xéno-ou -orthogreffes avec les cellules LNM-R, A549, ou LLC-1 et sur des PDX provenant de patients avec un adénocarcinome PT2 NO et PT2N1. En comparant la croissance des tumeurs deux à deux sur chaque animal traité par des anticorps anti LF-NTS, on a pu constater que le traitement réduisait de 40 à 65 % la taille des tumeurs selon les modèles par rapport au groupe contrôle. En parallèle, nous avons observé que la croissance tumorale des cellules silencées pour le NTSR1, bien moins rapide par rapport aux cellules sauvages, n'était pas affectée par l'anticorps (voir Figure 4 de l'article en annexe 2).

L'invasion lymphatique ganglionnaire des tumeurs expérimentales a été évaluée dans les différents groupes de souris, montrant que les taux de ganglions métastatiques des animaux traités au LF-NTS étaient significativement plus bas que pour les contrôles. Un résultat similaire a également été observé pour les taux de métastases pulmonaires induites par le modèle de Lewis, LLC1 (voir Figure 6 de l'article en annexe 2).

Le co-traitement par anticorps anti LF-NTS restaure la sensibilité au cisplatine de tumeurs expérimentales

Nous avons vu que le couple NTS/NTSR1 est un marqueur d'agressivité tumorale et que l'activation du NTSR1 amplifie la signalisation à caractère oncogénique. En parallèle à ces études, un groupe de chercheur a mis évidence l'influence des sels de platine sur l'expression de la NTS. Mansour et collègues ont en effet montré que l'oxaliplatine et le cisplatine injectés en intrapéritonéal. Chez des rats normaux

induisaient une augmentation de la neurotensine circulante responsable des dommages du nerf sciatique et de troubles locomoteurs associés (Al Moundhri et al. 2013). Nous avons donc émis l'hypothèse que les sels de platine utilisés lors des traitements tumoraux pouvaient également induire une surexpression de la NTS, celle-ci pouvant, dès lors qu'elle active le NTSR1 exprimé à la surface de cellules cancéreuses, impacter la sensibilité cellulaire au cisplatine. Dans un premier temps nous avons confirmé, dans nos modèles, l'amplification de la NTS par le cisplatine dans la cellule tumorale. En effet, l'ARNm de la NTS était augmenté dans les cellules LNM-R lorsque celles-ci étaient traitées par du cisplatine pendant 24h, et cette augmentation est abolie en présence de l'anticorps anti NTS (Figure 56A). Lorsque des tumeurs expérimentales sont réalisées sur un modèle de souris nude portant en hétérotopique des tumeurs LNM-R, on peut constater en immunohistochimie que le marquage NTS est plus fort lorsque les animaux ont été traités au cisplatine (Figure 56B).

Afin de confirmer l'impact de la NTS sur la sensibilité aux sels de platine, j'ai comparé la CI_{50} du cisplatine sur la mortalité cellulaire dans des cellules exposées à un agoniste de la NTS (JMV 449), comme les cellules A549 ou LNM-R qui présentent une boucle autocrine à la NTS. De mêmes, des clones issus de ces lignées cellulaires avaient une expression de NTSR1 ou de NTS abolie par l'approche des shARN, et ont été également traités au cisplatine afin d'analyser et comparer leur sensibilité à cette drogue. La Figure 56C a ainsi confirmé notre hypothèse selon laquelle la NTS interfère sur la sensibilité cellulaire au cisplatine, du moins *in vitro*.

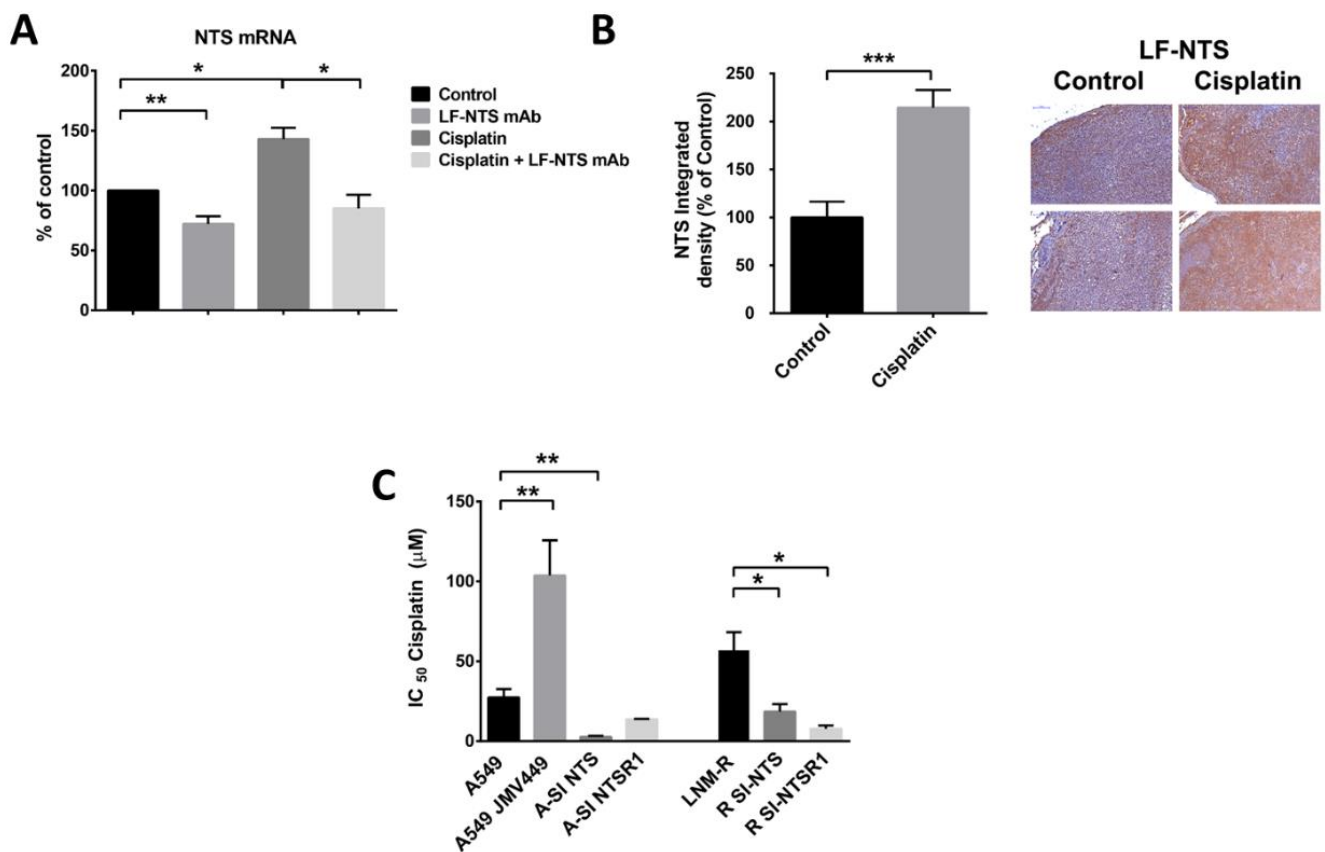


Figure 56 : (A) Quantification de l'expression ARNm de NTS par traitement de cellules LNM-R par du cisplatine. L'augmentation de l'ARNm NTS est abolie par l'exposition à un anticorps anti LF-NTS. (B) Coupes de tumeurs expérimentales LNM-R marquées pour la NTS et montrant une augmentation du marquage chez les animaux traités au cisplatine 1mg/kg, 5 injections. (C) IC_{50} du cisplatine après 72h de traitement de cellules de lignées A549 et LNM-R traitées à subconfluence. Le JMV ($10^8 M$), agoniste de NTS, a été utilisé sur les cellules A549 uniquement. Des clones issus de ces lignées ont été silencés pour la NTS (SI NTS) ou le NTSR1 (SI NTSR1).

– Pour confirmer ces résultats par un modèle *in vivo*, nous avons réalisé une expérience chez la souris nude portant des tumeurs doubles, en greffant des cellules LNM-R d'un côté qui expriment NTS et NTSR1 et de l'autre des cellules silencées pour le NTSR1 (R-SI NTSR1) (Figure 57). L'analyse de la croissance tumorale montrait que les tumeurs LNM-R étaient résistantes au cisplatine alors que les R-SI NTSR1 y étaient plus sensibles. De même, lorsque des souris portant des tumeurs LNM-R étaient traitées par des anticorps anti LF-NTS combinés au cisplatine, la croissance tumorale était significativement réduite par rapport au

groupe cisplatine seul suggérant une restauration de la sensibilité accrue au cisplatine. De plus, les ganglions prélevés homolatéraux à la tumeur LNM-R non silencée NTSR1 étaient moins envahis lorsque les animaux étaient traités avec les anticorps anti-NTS en combinaison avec le cisplatine que lorsqu'ils ne recevaient pas de traitement ou du cisplatine seul.

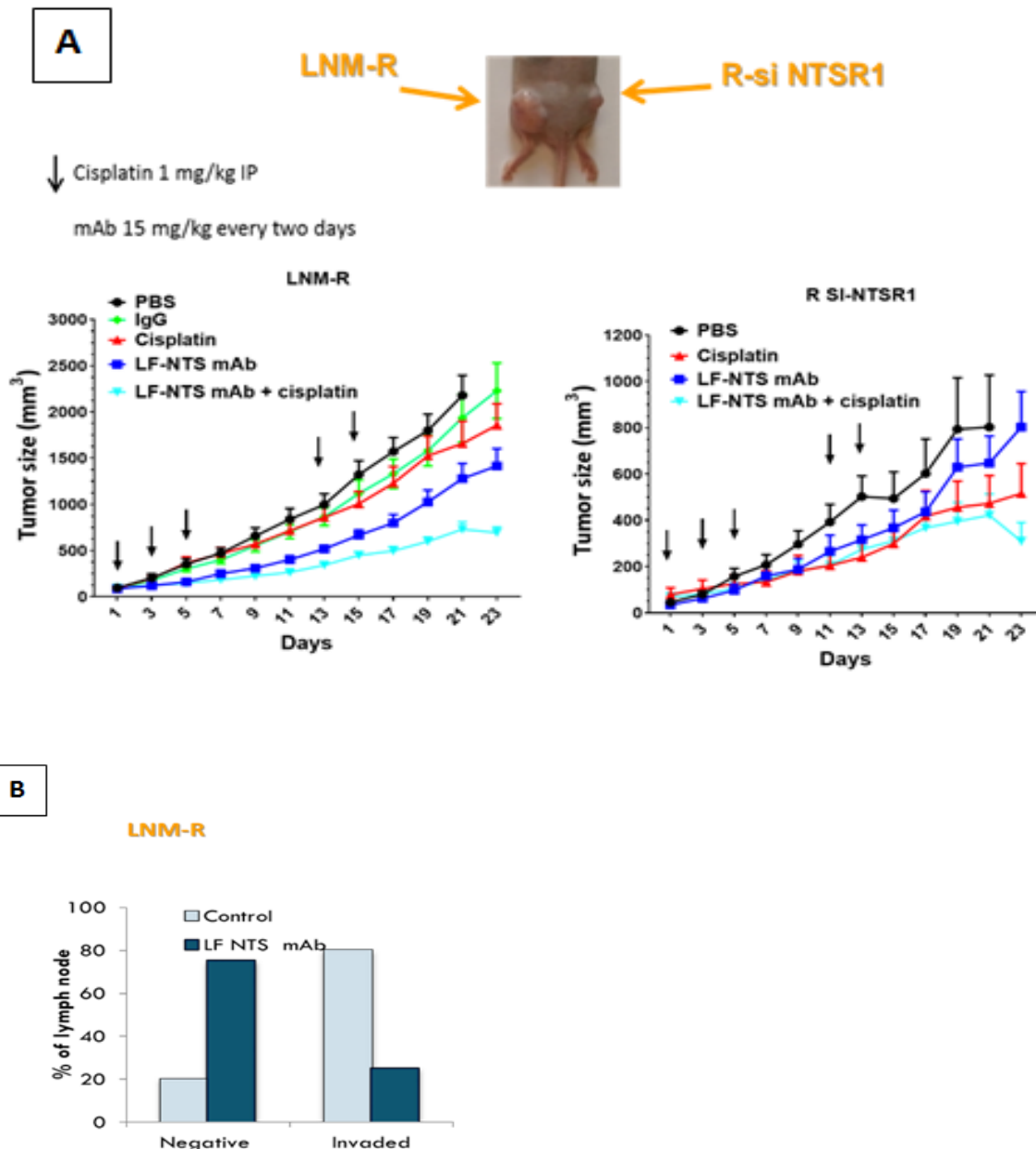


Figure 57: Modèle de doubles tumeurs établi à partir de cellules LNM-R, et d'un clone dont l'expression du NTSR1 a été éteinte de façon stable par des ARN interférents (sh-RNA). (A) La tumeur de gauche exprimant NTS et NTSR1 répond faiblement au Cisplatine mais cette réponse est augmentée de 2 à 3 fois en présence de mAbs LF-NTS. La tumeur de droite invalidée pour l'expression de NTSR1 répond au Cisplatine et l'association avec les mAbs NTS n'améliore pas cette

réponse. Cette expérience démontre l'efficacité et la spécificité des anticorps sur la croissance tumorale et la sensibilisation au Cisplatine. (B) Ratio de ganglions prélevés présentant un envahissement par des cellules tumorales sur les animaux contrôles (traités par cisplatine seul) par rapport à ceux traités par des anticorps anti-NTS en combinaison au cisplatine

– Des expériences réalisées *in vitro* sur des cellules A549 ou LNM-R traitées par anticorps anti LF-NTS ont permis de constater que ce traitement augmentait la quantité de platine dans le noyau (où il exerce son action principale), par spectrométrie de masse, ainsi que le marquage phospho- γ H2AX, témoignant de cassures double-brin d'ADN, par rapport aux groupes contrôles (Figure 58).

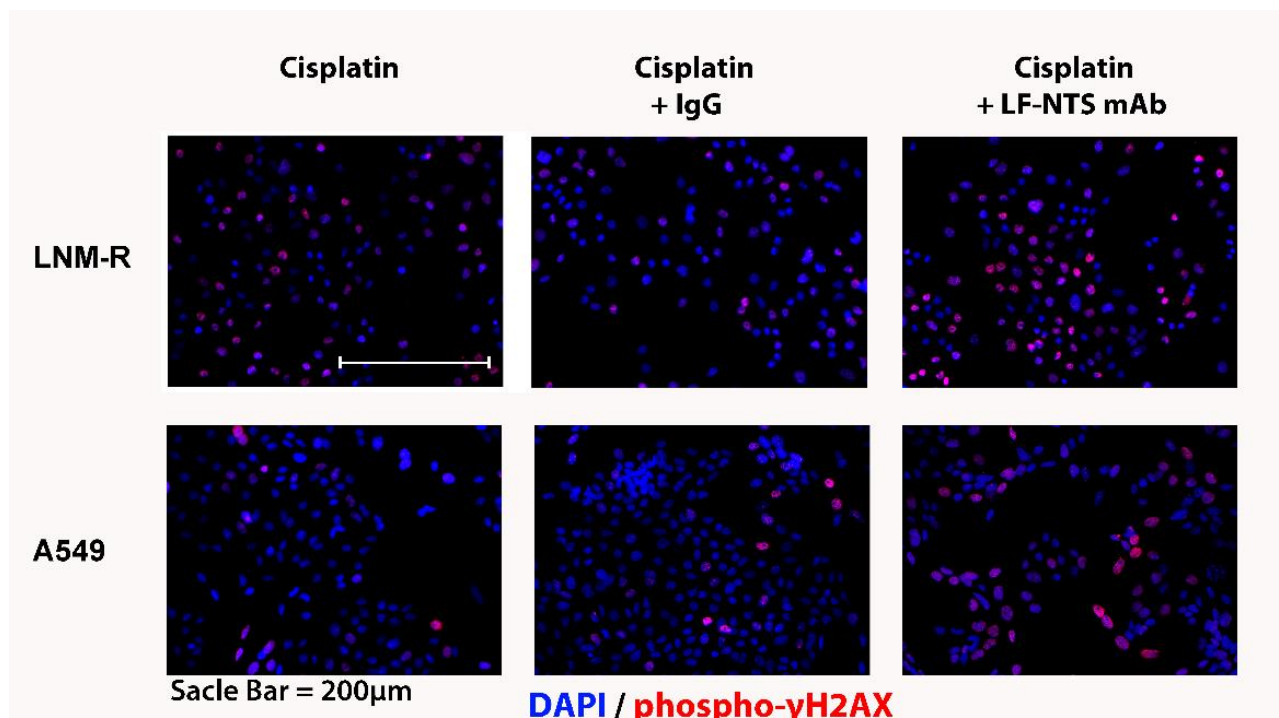


Figure 58 : Immunocytochimie montrant le marquage de phospho- γ H2AX sur des cellules A549 ou LNM-R traitées pendant 72h par du cisplatine seul, du cisplatine plus des IgG totales (contrôle), ou du cisplatine plus des anticorps anti LF-NTS. (en supplementary data par rapport au papier publié).

Ces différents modèles suggèrent que le blocage de la signalisation NTS/NTSR1 est susceptible d'améliorer la sensibilité au cisplatine de CBNPC, ce qui nécessitait une validation *in vivo* sur de plus grands ensembles, de réaliser une partie mécanistique,

et de poursuivre le développement de l'anticorps anti-FL-NTS dont les propriétés seraient parallèlement évaluées. Cette partie représente le travail numéro deux de la thèse.

Le traitement à long terme par anticorps anti LF-NTS n'induit pas d'effet secondaire significatif chez la souris

Des souris C57/BL6 ont reçu des anticorps anti LF-NTS pendant 180 jours à une dose hebdomadaire de 5 mg/kg. Les souris traitées prenaient plus de poids et avaient une activité physique plus intense que les souris « contrôle ». Les dosages sanguins de triglycérides, du glucose et du cholestérol n'étaient pas significativement différents entre les 2 groupes. Ce constat était stable et persistant le long de l'expérience (voir Figure 6 de l'article en annexe 2).

6.2.3 Matériel et méthodes du travail 2

Cf article publié (annexe 2)

Méthodes supplémentaires à l'article publié

Public Data Bases

Deux bases de données ont été analysées. JBR.10, un essai contrôlé randomisé mené en Amérique du Nord, a démontré un avantage du traitement adjuvant cisplatine / vinorelbine pour les stades réséqués IB à IIIA de CBNPC (Winton et al. 2005) .Dans cette analyse, des tissus tumoraux surgelés ont été collectés prospectivement auprès de patients canadiens. Le profilage de l'expression des

gènes a été complété dans 133 échantillons, en utilisant des puces à oligonucléotides U133A (Affymetrix, Santa Clara, CA), 62 étaient dans le groupe d'observation (OBS), tandis que 71 étaient dans le groupe adjuvant cisplatine / vinorelbine, (ACT) (C.-Q. Zhu et al. 2010).

La deuxième base de données sur l'adénocarcinome pulmonaire (LUAD) a été obtenue à partir des données du Cancer Genome Atlas (TCGA), via via cbiportal (<http://www.cbiportal.org>) (Gao et al. 2013; Cerami et al. 2012). Dans cette base de données, 305 patients de stade IB à IV ont bénéficié d'une chirurgie et d'une chimiothérapie. Des données normalisées sur l'expression génique des tissus tumoraux et des informations cliniques ont été fournies. L'âge moyen était de 64,6 ans, 81% étaient des fumeurs et 232 patients avaient un cancer du poumon de stade précoce (stades IB, IIA et IIB).

Extraction d'ARN, RT-PCR et RT-PCR quantitative (voir travail 1)

Primers

**NTS 5'-CAGCTCCTGGAGTCTGTGCT-3' and 5'-AGTATGTAGGGTCTTCTGGGTT-3';
NTS (qPCR)5'-ACAGCAGGGCTTTTCAACAC-3' and 5'-
AGGGTCTTCTGGGTTTATTCTCA-3'; NTSR1 5'-CCTTCAAGGCCAAGACCCTC-3' and 5'-
CAGCCAGCAGACCACAAAGG-3'; NTSR1 (qPCR) 5'-CGAGCACAGCACATTCAGCA-
3'and 5'-CAGCCAGCAGACCACAAAGG-3' 36B4 5'-CCTGGAGGGTGTCCGCAAT-3' and
5'-CAGGGGCAGCAGCCACAAA-3' 18S 5'-AGGAATTGACGGAAGGGCAC-3' and 5'-
GTGCAGCCCGGACATCTAAG-3'.**

SDS-PAGE et Western blot

Cf travail 1 et (Younes et al. 2014)

Mesures du platine

L'accumulation de platine dans la cellule entière et au niveau de l'ADN a été déterminée par analyse en spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) comme décrit dans (J. Liu et al. 2017). Pour l'accumulation intracellulaire de platine, les cellules ont été trypsinisées, lysées dans 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS (w / v) pendant 15 min sur de la glace, incubées dans 52,5% (v / v) d'acide nitrique à 65 ° C pendant 2 h, et enfin la concentration d'acide a été réduite à 5% pour le stockage. Le niveau de protéine totale a été déterminé avec le kit de dosage de protéine DC TM (Bio-Rad®). Pour l'accumulation de platine au niveau de l'ADN, les cellules ont été digérées pendant une nuit à température ambiante dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH = 8, 10 mM EDTA, SDS 0,6% (p / v), 50 µg / ml RNase A, 400 mM NaCl, 400 µg NaCl, 166 µg / ml de protéinase K). Après digestion, les échantillons ont été homogénéisés dans du NaCl 1 M par agitation. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 3000 tr / min pendant 15 min à 4 ° C et 2 volumes d'éthanol ont été ajoutés aux surnageants. L'ADN a été récupéré en enroulant l'ADN autour d'une pipette en verre, lavé dans de l'éthanol à 70%, séché à l'air et remis en suspension dans de l'eau. Les résultats ont été normalisés par les niveaux de protéines ou les quantités d'ADN.

Analyse des lipides fécaux

Les excréments ont été prélevés sur des souris hébergées individuellement sur une période de 48 heures. Les matières fécales ont été séchées à 60 ° C pendant 24h, pulvérisées dans de l'eau (5 ml pour 300 mg) puis incubées avec 5 ml de

chloroforme-méthanol (2: 1). Après agitation au vortex, la suspension a été centrifugée à 1000 x g pendant 10 min à température ambiante. La phase liquide inférieure contenant les lipides extraits a été évaporée à sec. Les échantillons ont été remis en suspension dans 500 µl de chloroforme contenant 2% de Triton X-100, évaporés à sec et finalement remis en suspension dans 500 µl d'eau. Avant l'analyse, les échantillons ont été chauffés pendant 10 min à 60 ° C. La concentration finale de solvant était de 2% de Triton X-100 dans l'eau. Le cholestérol total et les triglycérides ont été dosés en utilisant un analyseur de biochimie selon le protocole du fabricant (Randox Laboratories Ltd, Roissy en France, France). Les calibreurs et les contrôles de qualité ont été dilués avec 2% de Triton X-100 dans de l'eau.

6.2.4 Annexes du travail 2



Original Articles

Modulation of lung cancer cell plasticity and heterogeneity with the restoration of cisplatin sensitivity by neurotensin antibody

Zherui Wu^a, Ludovic Fournel^{a,b,c,1}, Nicolas Stadler^{a,1}, Jin Liu^{a,1}, Agnès Boullier^d, Nadia Hoyeau^e, Jean François Fléjou^e, Véronique Duchatelle^f, Nouzha Djebrani-Oussedik^g, Mikael Agopiantz^h, Evelyne Ségal-Bendirdjianⁱ, Anne Gompel^{a,1}, Marco Alifano^{a,b}, Olle Melander^j, Jean Trédaniel^{a,k,*}, Patricia Forgez^{a,**}

^aINSERM UMRS 1007, Paris Descartes University, 75270, Paris Cedex 06, France

^bDepartment of Thoracic Surgery, Cochin Hospital of Paris, AP-HP, Paris Descartes University, Paris, France

^cParis Sud, Paris Saclay University, Orsay, France

^dCBH Biochemistry Laboratory, CHU Amiens-Picardie, Amiens, France

^eDepartment of Pathology, Saint-Antoine Hospital, AP-HP, UPMC, Paris, France

^fDepartment of Pathology, Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, Paris Descartes University, Paris, France

^gToxicology Laboratory, Lariboisière Hospital, AP-HP, Paris, France

^hDepartment of Pathology, CHRU Nancy, University of Lorraine, Nancy, France

ⁱDepartment of Gynecology Obstetrics II and Reproductive Medicine, Paris Descartes University, AP-HP, Paris, France

^jDepartment of Clinical Sciences, Lund University, Skåne University Hospital, CRC, Malmö, Sweden

^kUnit of Thoracic Oncology, Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, Paris Descartes University, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Anti-tumor drug
Neurotensin antibody
Tumor cell plasticity
Advanced lung cancer
Restoration of platinum salt-based chemotherapy sensitivity

ABSTRACT

Overall survival of patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) has significantly improved with platinum-based salt treatments and recently with targeted therapies and immunotherapies. However, treatment failure occurs due to acquired or emerging tumor resistance.

We developed a monoclonal antibody against the proform of neurotensin (LF-NTS mAb) that alters the homeostasis of tumors overexpressing NTSR1. Neurotensin is frequently overexpressed along with its high affinity receptor (NTSR1) in tumors from epithelial origins. This ligand/receptor complex contributes to the progression of many tumor types by activation of the cellular effects involved in tumor progression (proliferation, survival, migration, and invasion).

We demonstrate that LF-NTS mAb operates on the plasticity of tumor cells overexpressing NTSR1 and lowers their aggressiveness. The mAb enables the restoration of platinum-based therapies responsiveness, while also decreasing metastatic processes. Efficacy dosage with long-term treatment showed no obvious adverse events, while demonstrating improvement in the performance status. Our data suggests that LF-NTS mAb is an ideal candidate to be safely added to the conventional standard of care in order to improve its efficacy.

1. Introduction

Recent advances in treatment of advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) have significantly improved the overall survival (OS) and the progression-free survival (PFS) of affected patients. Despite substantial improvements in NSCLC treatment, this cancer remains the leading cause of cancer-related death in the world [1].

Lung cancer is a very heterogeneous disease, with non-small cell

lung cancer (NSCLC) representing nearly 85% of lung tumors. It is mostly an asymptomatic disease diagnosed at the metastatic stage in at least 60% of cases [2].

Current standard chemotherapy regimens combine platinum-salt compound with an antimetabolite (mostly pemetrexed for adenocarcinoma), or a spindle poison (paclitaxel). This treatment increases the OS up to 12 months or more as compared to 4.5 months with best supportive care [3,4]. Unfortunately, patients still develop incurable and

* Corresponding author. INSERM UMR-S 1007, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75270, Paris cedex 06, France.

** Corresponding author.

E-mail addresses: jtrédaniel@hpsj.fr (J. Trédaniel), patricia.forgez@inserm.fr (P. Forgez).

¹ Contribute equally to the work.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.12.007>

Received 4 October 2018; Received in revised form 5 December 2018; Accepted 11 December 2018
0304-3835/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

List of abbreviations			
AKT	Protein kinase B	IgG	Immunoglobulin G
ALK	Anaplastic lymphoma kinase	LF-NTS	Long-fragment neurotensin
CHO	Chinese hamster ovary	mAb	monoclonal antibody
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2	MRP	Multidrug Resistance-Associated Protein
DFS	Disease-free survival	NSCLC	non small cell lung cancer
EGF	Epidermal growth factor	NTS	Neurotensin
EGFR	Epidermal growth factor receptor	NTSR1	Neurotensin receptor 1
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	OS	overall survival
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	PDX	Patient derived xenografts
FBS	Fetal bovine serum	RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors
GPCR	G protein-coupled receptor	RIPK	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase
GS-X	Glutathione S-conjugate pumps	SOC	Standard of care
HDL	High-density lipoprotein	TKI	Tyrosine kinase inhibitor
HER	Human epidermal growth factor	TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

progressively fatal disease.

Recently, the heterogeneous nature of tumors has been revealed by advanced molecular diagnostics, depicting the genetic constitution of intra-tumor clones. It has become clear that tumor heterogeneity is accountable for the variable range of patient responses [5], while additional experiments revealed that tumor heterogeneity is dynamic in space and time. Spatial heterogeneity, observed within the primary tumor, was also detected between distant sites, organs or lymph nodes, as proven with genetic analysis [6]. Tumor evolution with time was also revealed by genetic changes during the course of the disease, with emergence of new mutations or restoration of the wild type phenotype was observed [5].

The development of biomarkers, identifying driver mutations enabled the deployment of targeted therapies for NSCLC. Targeted therapies are now proposed to the 15–20% of NSCLC patients bearing specific genomic mutations or rearrangements (mainly EGFR and ALK, but also Ros-1 and B-RAF) [7–9]. These less toxic treatments significantly improve OS and quality of life. Nevertheless, the majority of patients ultimately develop resistance. Tumor heterogeneity was responsible for these treatment failures. Indeed, it was shown that resistance to T790M-targeting EGFR-TKI was related to the emergence of wild type clones [10]. In the same vein, immunotherapy (anti-PD-1/PD-L1) was successfully developed [11] and is now proposed as monotherapy to the fraction of patients whose malignant cells are at least 50% positive for PD-L1, representing approximately 30% of the patients. These therapies show satisfactory survival results, with a relatively safe therapeutic profile as compared to conventional chemotherapy [12]. However, only 20–30% of patients are responders, and the duration of response is globally limited and often associated with a panel of immune-related adverse events [13].

Tumor plasticity also becomes a major issue, because resistance can emerge from activation of bypass signaling pathways, cell-lineage changes, or acquired mutations [14–16]. Indeed, tumor physiological characteristics are dynamic, depending on their microenvironment, their access to growth factors by vascularization, the immune environment, and their adaptation to treatment. Several studies have shown that this dynamic aspect of tumors drives them along the progression to a more aggressive, and uncontrollable state, and ultimately promoting drug resistance [17–19]. The dynamic features of tumor cells inferred by their plasticity, makes the development of successful therapy problematic. These adaptive features are not unidirectional and can be modulated, with cells exhibiting a more or less aggressive behavior, independently of the level of its mutational state. The manipulation of tumor cell plasticity to maintain a less aggressive behavior creates a pertinent therapeutic approach to improve the performance of the anti-tumor drugs.

In this context, we show that the decrease of neurotensin receptor 1

activity impacts tumor cell aggressiveness while improving the response to chemotherapy by restoring platinum salt sensitivity. Neurotensin is synthesized from a proform of 170 amino acids, cleaved by convertases to produce NTS and neuromedin N. Missed cleavage of the NTS proform produces Long-Fragment NTS (LF-NTS) which was shown to exhibit the same biological activity as the mature peptide but with greater stability [20]. Circulating LF-NTS is active and is significantly correlated to the development of breast cancer, diabetes, cardiovascular disease, and total mortality [21]. Based on previous results, we hypothesized that following abnormal production of NTS, the immature proform will preferentially be released at the vicinity of the tumor cells, and would induce sustained and intense NTSR1 activation with associated signalization. Indeed, chronic activation with high doses of NTS agonist, in cell lines over expressing NTSR1, induced NTSR1 gene activation and a permanent NTSR1 recycling at the cell surface [22–24]. NTSR1 overstimulation, generated by a permanent NTS autocrine loop, as its occurs in tumors, induces a cascade of cellular events resulting in the activation of metalloproteinases and the release of “EGF like” ligands (Hb-EGF and neuregulins), creating autocrine activating control loops for three major epidermal growth factor receptors (EGFR, HER2, HER3) [25–27]. In an attempt to impair or inhibit these cascading effects, we developed a neutralizing antibody for LF-NTS to inhibit the effect of these cascades. In this paper, we first correlate NTSR1 expression with the response to the combination of platinum and pemetrexed treatment in patients with primitive metastatic lung adenocarcinomas. We demonstrate that LF-NTS mAb acts on the tumor cell plasticity of lung cancer cells. This treatment resulted in the alteration of their aggressiveness by decreasing growth, and the reduction of metastatic processes. By affecting the cellular plasticity, the response to cisplatin treatment was restored while improving physical activity and increasing body weight.

2. Materials and methods

2.1. Patients and tissue specimens for NTS and NTSR1 immunohistochemistry

The clinical files of 28 patients with metastatic stage non-squamous NSCLC, treated with a platinum-pemetrexed doublet regimen, were retrospectively reviewed. Most patients from this series, including 17 (60.7%) men and 11 (39.3%) women, exhibited conventional risk factors for NSCLC, such as smoking (82.1%), chronic obstructive pulmonary disease (15.0%) or professional exposure (6.1%). Pretreatment tumor biopsies established the diagnosis of lung adenocarcinomas in the majority of patients (86.7%) followed by large cell (10.0%) and sarcomatoid (3.3%) carcinomas. Histological slides of lung biopsies were obtained from paraffin wax embedded tissues. Standard

hematoxylin and eosin staining was used to confirm the cancerous character of the specimens, and adjacent sections were obtained for immunohistochemistry. Information concerning Public database are described in supplementary methods.

2.2. Ethics

Informed consent was obtained from all patients before biopsy. The database including pathological variables was established in accordance with the French data protection authority (Ile de France II # 2016-10-05).

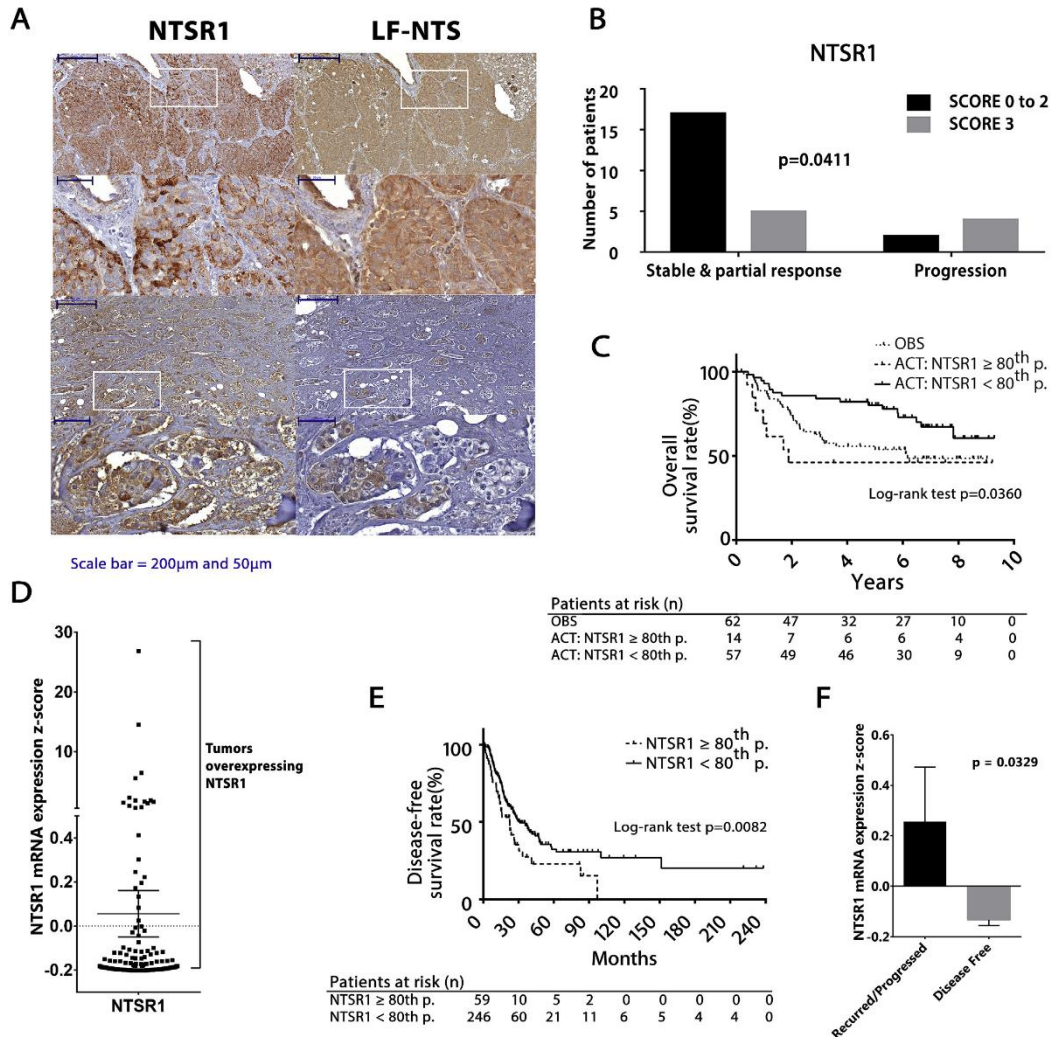


Fig. 1. NTSR1 expression in NSCLC and clinical outcome. (A) Immunohistochemistry of NTSR1 and LF-NTS in metastatic stages of non-squamous NSCLC patient biopsies. Examples of positive staining at X100 and X400 magnification. (B) Distribution of stable population or with a partial response vs in progression after platinum salt based therapy, according to NTSR1 expression (score from 0 to 2 vs score 3) (Pearson chi-square). (C) The Kaplan–Meier analysis of overall survival (OS) calculated from patients with NSCLC from stage IB to IIIA (GSE14814, n = 133). (ACT) 71 patients treated with vinorelbine/cisplatin following surgery, (OBS) 62 patients treated by surgery alone. In the ACT group, the OS is analyzed based on the NTSR1 mRNA expression. Patients at risk are noted below the graphs. (D) NTSR1 mRNA distribution (Z-score) of 305 tumor samples from stage IB to IV of lung adenocarcinoma (TCGA-LUAD). (E) The Kaplan–Meier analysis of disease-free survival (DFS) based on the NTSR1 mRNA expression in patients from stage IB to IV with lung adenocarcinoma (TCGA-LUAD, n = 305) who received surgery and chemotherapy as initial treatment. Patients at risk are noted below the graphs. (F) Distribution of NTSR1 mRNA expression (Z-scores) according to the response to initial treatment.

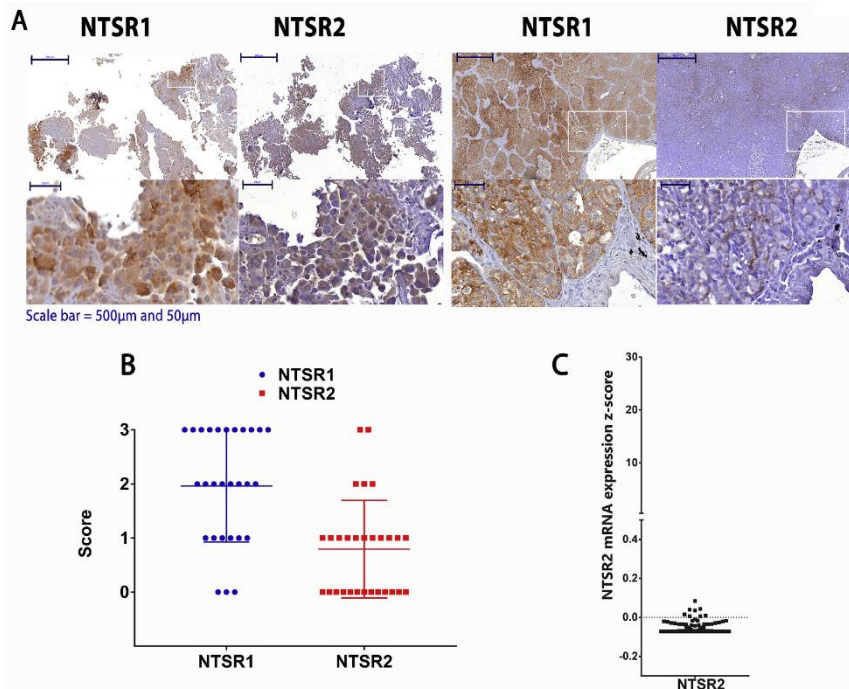


Fig. 2. NTSR2 expression in NSCLC. (A) Immunohistochemistry of NTSR1 and NTSR2 in metastatic stages of non-squamous NSCLC patient biopsies. Two examples of positive staining is shown at X50 and X400 magnification. (B) Score distribution for NTSR1 and NTSR2. (C) NTSR2 mRNA distribution (Z-score) of 305 tumor samples from stage IB to IV of lung adenocarcinoma (TCGA-LUAD).

2.3. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as previously described by Alifano et al. [28]. The slides were incubated at 4 °C overnight with primary antibody including LF-NTS mAb (1:200), anti-NTSR1 (1:100; SC-7596, Santa Cruz Biotechnology[®]), anti-NTSR2 (1:100; AN1-016, Alomone), Labs, anti-RIPK1 (1:400, NBP1-77077, Novus biological[®]), anti-RIPK3 (1:400, NBP1-77299, Novus biological[®]), anti-Ki67 (1:400, cell signaling[®]). The slides were then incubated with the kit starr trek universal HRP Detection System (Biocare medical[®]) or with Biotinylated anti-goat IgG (Vector laboratories, Inc) for NTSR1. The antigen-antibody complex was revealed with avidin-biotin peroxidase complex, according to the manufacturer's instructions (Trekavidin-HRP label, Biocare medical[®]). The staining was performed with diaminobenzidine tetrahydrochloride. All specimens were scored by pathologists (NH, JFF) as follows: 0: positive staining of < 10% of tumor cells; 1: positive staining involving > 10% and < 50% of tumor cells; 2: strong positive staining involving > 50% of tumor cells. For qualitative analysis (positive/negative) scores 0, 1 and 2 were pooled in the same group.

Detection of metastatic epithelial cells were performed with pan-cytokeratin (AE1/AE3 + 5D, 1/400, ab86734, Abcam[®]) antibodies for 30 min and revealed by the Novolink[™] Polymer Detection Systems (Leica[®]). *In situ* cell death detection kit (Roche[®], Germany) was used for TUNEL assay according to the manufacturer instructions. All the slides were scanned with 3DHISTECH scanner and analyzed with Panoramic viewer. The integrated density was calculated as follows; the chosen color was selected in adobe photoshop, copied into a new image and transformed in gray scale. The integrated density was calculated using

ImageJ software, after have inverted the image. This method was previously validated the score performed by a pathologist for the expression of NTSR1 in endometrial cancer [29].

2.4. Statistical analysis

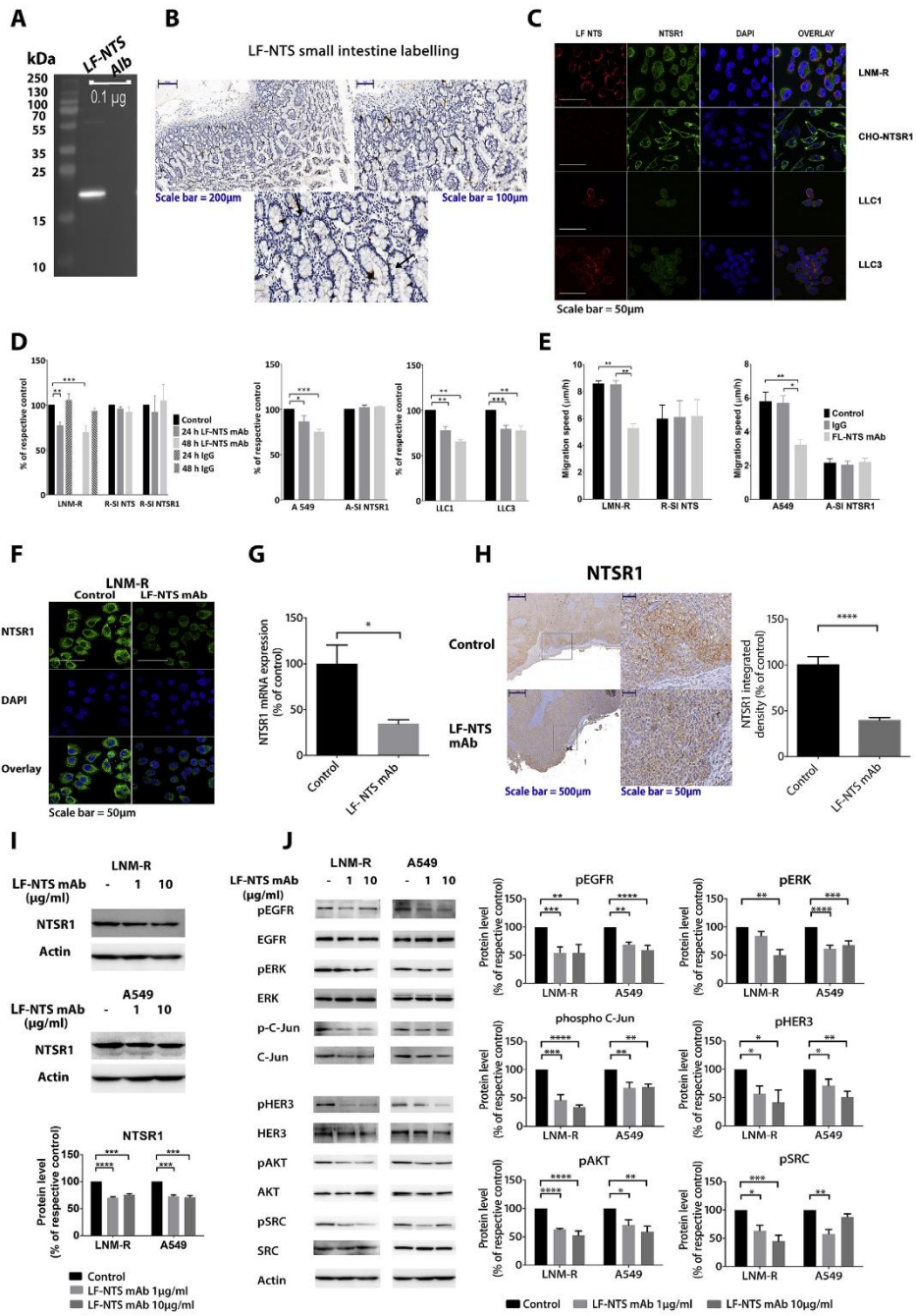
Overall survival rates were estimated using the Kaplan-Meier method and a comparison of survival curves was performed using the log-rank test. Disease-free survival (DFS) time was calculated from the date of the initial treatment until disease recurrence (either local or distant), or the last follow-up examination.

2.5. Antibody

Monoclonal long fragment NTS antibody (LF-NTS mAb) was generated against a peptide conjugated with bovine thyroglobulin as a carrier protein, then selected by ELISA using the peptide conjugated with albumin (BioGenex GmbH). To optimize the selection of neutralizing antibodies we located the antigen peptide just upstream of the N-terminal side of Neuromedin N.

2.6. Tumor xenografts

Athymic 4-week-old male NMRI-Foxn1^{nu/nu} mice (Janvier[™]), 5-week-old female NU (Ico)-Foxn1^{nu} mice, and 4-week-old male C57BL/6j (Janvier[™]) were used for human lung cancer cells xenografts, patient-derived xenografts (PDX) and the mouse lung carcinoma cell line, respectively. The ellipsoid formula was used to calculate the tumor



(caption on next page)

Fig. 3. NTS antibody characterization. (A) SDS PAGE loaded with 0.1 µg of human LF-NTS or albumin and revealed with LF-NTS mAb (2.5 µg/ml). (B) Immunohistochemistry of LF-NTS, example of positive staining in human intestine, at the X100, X200 magnification, below computerized magnification of a specific area. Arrows point to the labelled neuroendocrine cells. (C) Immunocytochemistry of LF-NTS and NTSR1 on LNM-R, CHO-NTSR1, LLC1 and LLC3 cells. Cells were stained with LF-NTS mAb (red), NTSR1 antibody (green), and DAPI (blue). (D) Effect of LF-NTS mAb on cell viability. LNM-R, R-SI NTSR1, R-SI NTS, A549, A-SI NTSR1, LLC1 and LLC3 were treated with 1 µg/ml of LF-NTS mAb for 24 and 48 h. This represents the mean ± SEM of at least 3 independent experiments. (E) Speed of migration of LNM-R and A549 cells treated or not with 10 µg/ml of LF-NTS mAb or IgG1 isotype control, on type 1 collagen. Results represent the mean ± SEM of three independent experiments. In two-way ANOVA, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. (F) NTSR1 immunocytochemistry of LNM-R cells treated or not for 48 h with 1 µg/ml of LF-NTS mAb. Shown is the central slide from confocal microscopy, green NTSR1 and, blue DAPI. (G) NTSR1 mRNA level evaluated by q-PCR on LNM-R cells treated or not for 24 h with 1 µg/ml of LF-NTS mAb. In *t*-test, *p < 0.05. (H) (left) Example of NTSR1 and immuno-histological labelling of experimental LNM-R tumors from animals treated with PBS or LF-NTS mAb as described Fig. 4A, at 50X and 400X magnification. (right), Integrated density calculated on area of LNM-R tumor exhibiting a strong NTSR1 labelling (R 77, B 12, G12) n = 7. In *t*-test, ****p < 0.0001. (I) Western blot analysis of NTSR1 from LNM-R and A549 cell lysates treated or not with LF-NTS mAb for 48 h. Histograms representing intensity-based quantification of Western blot, representing the mean ± SEM of 3 independent experiments. In one-way ANOVA, ***p < 0.001. (J) Western blot analysis of phosphorylated form and total protein for EGFR, ERK, C-Jun, HER3, AKT, and Src, from LNM-R and A549 cell lysates, treated or not with LF-NTS mAb for 48 h (left) An example of a representative western blot. (right) Histograms representing intensity-based quantification of Western blot, representing the mean ± SEM of at least 3 independent experiments. In one-way ANOVA, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

volumes from cancer cell lines whereas the $(L \times W^2)/2$ formula was used for PDX. When tumors reached 80–100 mm³, groups of 7–10 mice were randomized. All the procedures were in accordance with the “Guide of the Care and Use of Laboratory Animals”. Institutional Review Board approval was obtained by «Le Comité d’Ethique en l’Expérimentation Animale Charles Darwin #B751201».

2.7. PDX

This experiment was outsourced at the Curie Institute (Dr Decaudin). Lung adenocarcinomas LCF-9 PDX, scored PT2 N0, and LCF-26 PDX, scored PT2 N1, were grafted at the junction between the neck and the back in NU (Co)-Foxn1nu female mice at 5 weeks old.

2.8. Cell culture

The lung cancer cell lines, LNM-R [25], A549 (CCL-185™), LLC1 (CRL-1642™), were grown in DMEM (Gibco®). The LLC1 cell line was sub-cloned by limiting dilution. After few days of culture, clones containing exclusively fusiform cells at high density were named LLC3. All cells were purchased at ATCC®, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco®) and 2 mM glutamine and grown at 37 °C, in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

2.9. Cell viability assay and in vitro migration assay

15 000 cells/well were seeded in 48-well dishes. Medium was replaced by 1% FBS medium in presence or absence of LF-NTS mAb after 15 h of incubation. Cellular growth was evaluated by Z2 cell and particle counter (Beckman coulter®) after 24 h and 48 h of treatment [25]. The migration assays were carried out using two chamber inserts (ibidi®), in dishes coated with type I collagen (400 µl/well, 50 µg/ml, Sigma®) as previously described [27].

2.10. RNA extraction, RT-PCR, and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted with guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform acid method modified by Souza and colleagues [30]. Primer sequences and details are described in supplementary methods.

2.11. Immunocytochemistry

The primary antibody used were LF-NTS mAb, diluted to 1/500, goat polyclonal anti-NTSR1 antibody, C-20, Santa Cruz Biotechnology®, SC-7596, diluted to 1/100, rabbit anti-phosphoHistone H2A.X(Ser139) (1:400, #9718, Cell Signalling®, diluted to 1/400. Slides were incubated for 2 h at room temperature with their respective fluorescent secondary antibody. Nuclei were counterstained with DAPI 1:50000 then mounted

using ProLong® Gold Antifade Reagent (Life technologies®).

2.12. SDS-PAGE and Western blotting analysis

Western blots were processed as previously described [25] (see details in supplementary methods).

2.13. Measurement of platinum uptake in whole cell and accumulation in DNA

Platinum accumulation in whole cell and in DNA was determined by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) analysis as described by Liu et al. and detailed in supplementary methods [31].

2.14. Plasma biochemical analysis

Total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol, glucose, total protein and albumin were determined using a benchtop biochemistry analyzer according to the manufacturers’ protocol (Randox Laboratories Ltd, Roissy en France, France).

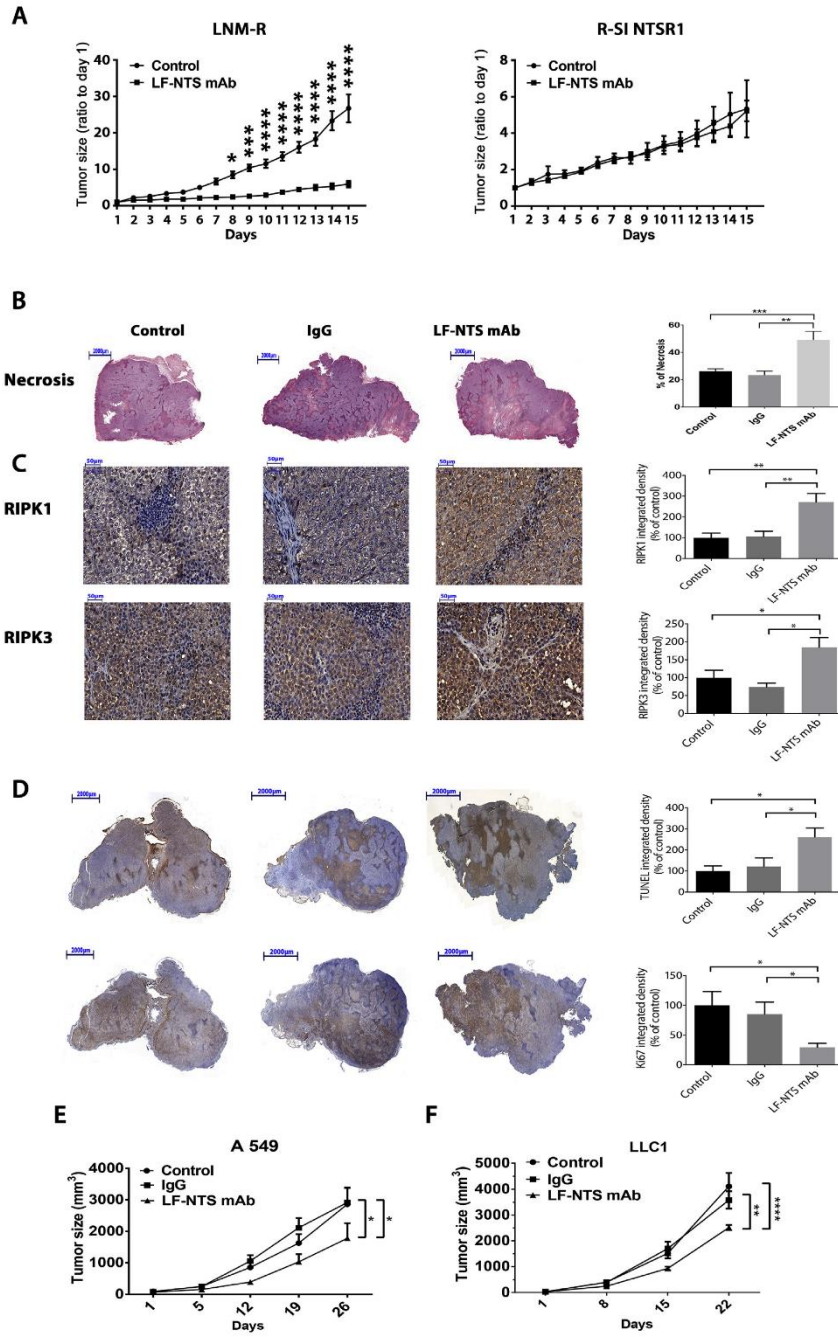
2.15. Fecal lipid content

Feces were collected from mice housed individually over a 48-h period. Feces were dried at 60 °C for 24 h, powderized in water (5 mL for 300 mg) and then incubated with 5 mL of chloroform-methanol (2:1). Details for fecal lipid extraction are described in supplementary methods.

3. Results

3.1. NTSR1 over-expression is correlated with worse sensitivity to platinum-based chemotherapy in NSCLC patients

LF-NTS and NTSR1 expression were analyzed by immunohistochemistry from the biopsies of 28 patients with advanced stage non-squamous NSCLC. An example is shown in Fig. 1A. NTSR1 labeling was mainly restricted to the cytoplasm with clear reinforcement in certain areas. In contrast, LF-NTS labeling was mostly intracytoplasmic with a similar strong intensity throughout the sample. The scoring of NTS and NTSR1 revealed the following distribution: 11% NTSR1/0; 21% NTSR1/1, 29% NTSR1/2, and 39% NTSR1/3, while NTS labeling was scored 2 and 3 in 42% and 58% of the specimens, respectively. Concomitant expression of NTSR1 and NTS within the tumor suggests a high and sustained autocrine neurotensinergic regulation. Using the first post-chemotherapy radio-clinical evaluation (RECIST criteria), a significant more progressive disease was detected in the subset of patients exhibiting the highest NTSR1 score. These results



(caption on next page)

Fig. 4. LF-NTS mAb reduces the tumor growth. (A) Tumor growth curves of LNM-R and R-SI NTSR1 tumors. R-SI NTSR1 cells (10^6) were injected subcutaneously into the right flank of male NMRI-Foxn1^{nu/nu} mice, LNM-R (10^6) were injected in the other flank. A week later, two groups were formed, one group was treated every other day with LF-NTS mAb (15 mg/kg) (i.p.) (n = 7). The second group was treated under the same condition with PBS (n = 9). (B to D) Analysis of LNM-R tumors from mice treated with PBS, LF-NTS mAb or IgG1 isotype control (15 mg/kg every 2 days for 15 days). Slides were scanned with 3DHISTECH scanner and analyzed with Panoramic viewer at the X1 and X40 magnification. Staining estimation was made on the entire sample using the integrated density calculation. In one-way ANOVA, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. (B) (left) Example of Hematoxylin-Eosin staining at X10 magnification. (Right) Quantification of the necrotic surface (R195, G110, B150) as compared to the entire surface of the sample. (C) (left) Example of RIPK1, RIPK3 labelling at X400 magnification. (Right) Graph of integrated density calculated on the strong labelling for RIPK1 (R132, G110, B108) and for RIPK3 (R150, G110, B105). Result is expressed as percentage of control. (D) (left) Example of TUNEL and Ki67 staining at X10 magnification. (Right) Graph of integrated density calculated on the labelling corresponding to the TUNEL assay after the necrosis zones were erased (R128, G99, B94), and the labelling corresponding to Ki67 (R130, G100, B95). Result is expressed as percentage of control. (E) A549 cells (5×10^5) were injected subcutaneously into a male NMRI-Foxn1^{nu/nu} mice (n = 6). When tumors reached 80 mm³, mice were treated once a week (i.v.) with PBS, or with 5 mg/kg of LF-NTS mAb, or mouse IgG1 isotype control (BioXcell[®]). (F) LLC1 cells (5×10^5) were injected subcutaneously into a male C57BL/6J (n = 8). When tumors reached 30 mm³, mice were treated once a week (i.v.) with PBS, or with 5 mg/kg of LF-NTS mAb, or mouse IgG1 isotype control (BioXcell[®]). For (E) and (F) Statistical analysis: In two-way ANOVA statistical analysis, *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001.

suggested a reverse correlation between NTSR1 expression in tumor tissue and response to platinum salt treatment (score NTSR1 0 to 2 versus 3, p = 0.041) (Fig. 1B).

We confirmed the correlation between NTSR1 mRNA expression and the chemotherapy response in resected NSCLC patients at stage IB to IIIA using the randomized controlled trial JBR.10, which compared 71 patients treated with vinorelbine/cisplatin (ACT) to 62 patients treated by surgery alone (OBS) [32]. In the ACT group, NTSR1 over-expression was correlated with a worse survival. The overall 5-year survival was 46.15% [19.16–69.65%], 80.19% (67.06–88.51%) and 53.93% [40.56–65.54%] for patients over-expressing NTSR1 ($\geq 80^{\text{th}}$ p), without over expression (< 80th p), and observational group, respectively. Interestingly, in the ACT group, log rank analysis was significantly different for NTSR1 ($\geq 80^{\text{th}}$ p) vs NTSR1 (< 80th p, p = 0.0360) (Fig. 1C). A significant difference was also detected between NTSR1 (< 80th p vs OBS group p = 0.0264), but no significant difference was seen between NTSR1 ($\geq 80^{\text{th}}$ p) vs the OBS group (p = 0.4151), suggesting that high expression of NTSR1 in treated group results in similar outcome as those in the absence of treatment.

Moreover, in a second study of 305 lung adenocarcinomas (stage IB to IV) from the TCGA-LUAD database [33,34], the NTSR1 mRNA (z-score) distribution was heterogeneous with 20% of the specimens overexpressing NTSR1 (Fig. 1D). The degree of NTSR1 expression significantly influenced the outcome (p = 0.0082), as patients with NTSR1 expression $\geq 80^{\text{th}}$ p showed 5-year DFS of 22.85% [10.02–38.78%] whereas those with < 80th p showed 5-year DFS of 31.65% [23.49–41.40%]. The median of DFS was 22.6 months for patients with overexpressed NTSR1 and 31.0 months for the others (Fig. 1E). In this database, 148 (48.5%) patients progressed or recurred after initial treatment and 157 (51.5%) were disease free. Higher NTSR1 mRNA expression was significantly associated with patients in disease progression or recurrence (p = 0.0329) (Fig. 1F). We concluded that NTSR1 is a protein marker associated with tumor aggressiveness and drug resistance.

NTSR2 was similarly studied. Immunohistochemistry performed on the 28 biopsies patients with advanced stage non-squamous NSCLC showed weak or no labelling. When expressed, NTSR2 labeling was mainly within the cytoplasm, showing a distribution different from that observed with NTSR1; examples are shown in Fig. 2A. The scoring of NTSR2 revealed the following distribution: 45% NTSR2/0, 38% NTSR2/1, 10% NTSR2/2, and 7% NTSR2/3. The scoring distribution is diametrically opposite of that from the NTSR1 scoring (Fig. 2B). The distribution of NTSR2 mRNA extracted from the TCGA-LUAD database confirmed the weak and homogenous expression as compared to NTSR1 (Fig. 2C). Analysis of patients based on the expression of NTSR2 in the JBR.10, and the TCGA-LUAD databases, showed no correlation with the OS as observed for NTSR1 (data not show).

3.2. Characterization of long fragment-neurotensin antibody

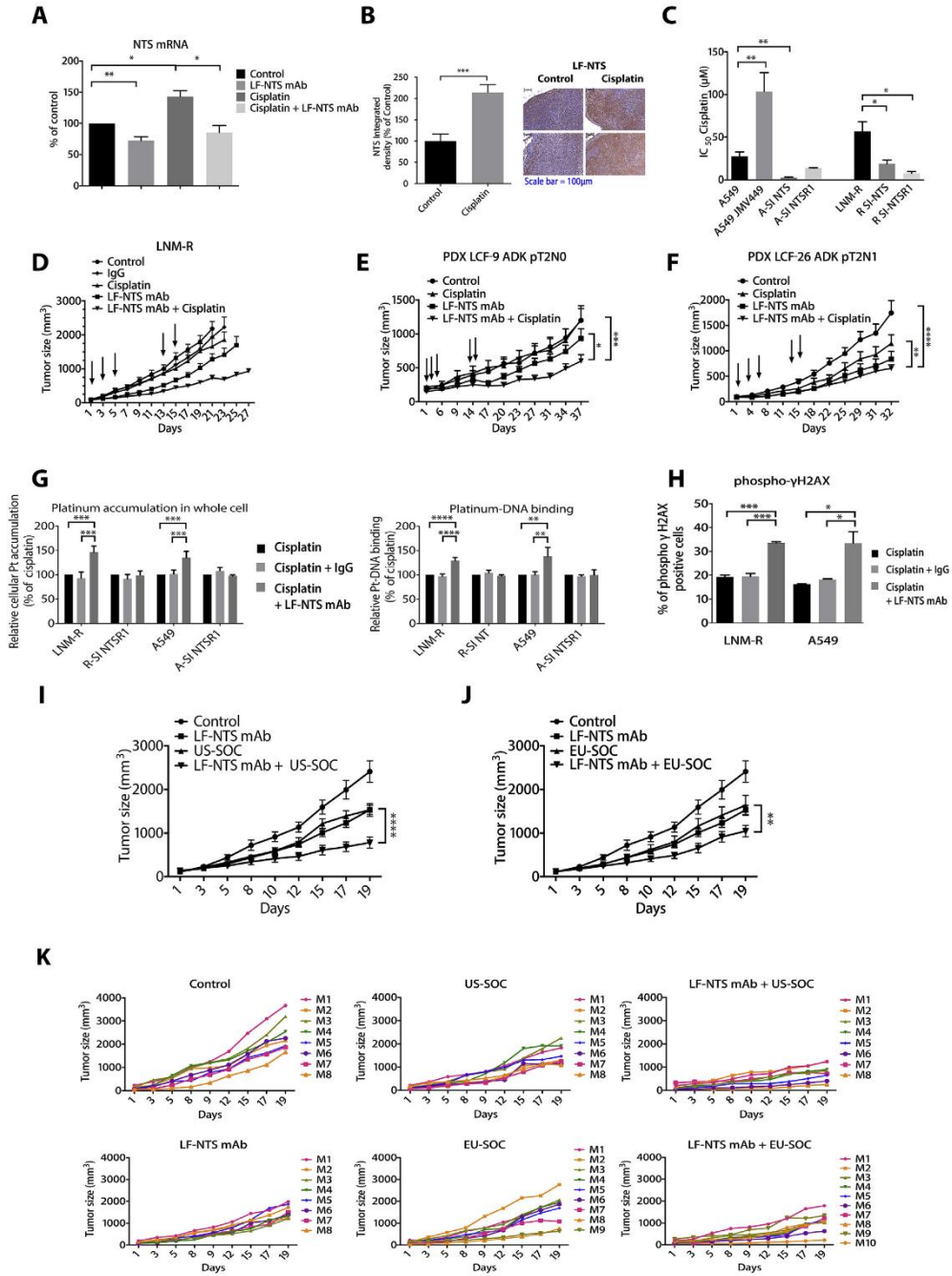
We developed an antibody against the human long-fragment

neurotensin, with the intent to disrupt the chronic activation of NTSR1. The monoclonal antibody (mAb) against LF-NTS was generated from a peptide, conjugated with bovine thyroglobulin as a carrier protein, and then selected by Elisa using the peptide conjugated with albumin (BioGenes GmbH). Neutralizing properties of the clones were screened by their ability to counteract the growth inhibition of CHO over-expressing NTSR1 cells induced by conditioned media from the LNM-R cells, a lung cancer cell line over-expressing NTS and NTSR1 [28], (data not shown see the procedure in Ref. [35]). The specificity of the purified antibody from selected clones was tested by western blots using a purified human long-fragment synthesized in *E. coli* (Antibodies-on line inc). A strong band was revealed by LF-NTS mAb on a western blot loaded with histidine tagged LF-NTS, whereas no band was detected on the lane loaded with albumin (Fig. 3A).

In the periphery, NTS is mainly synthesized and released by the enterendocrine cells (N cells) of the intestine, this area represents the site referent to localize NTS. We confirmed the antibody specificity by immunohistochemistry on human small intestine (Ileum). A strong labelling of neuroendocrine cells dispersed within the epithelial cell of the intestinal mucosa was detected (Fig. 3B). Immunocytochemistry performed on LNM-R, showed a strong labelling of LF-NTS at the periphery of the cells. In contrast, NTSR1 labeling was dispersed in the cytoplasm, corresponding to the internalized form of the receptor [22,23]. As a negative control for neurotensin, no red staining corresponding to LF-NTS was seen in CHO cells overexpressing NTSR1, while exhibiting a strong NTSR1 labelling at the membrane (Fig. 3C). LF-NTS mAb also cross-reacted with mouse LF-NTS. Immunocytochemistry performed on LLC1 cells, a mouse lung carcinoma, and its subclone LLC3 (both expressing NTS and NTSR1) showed LF-NTS labelling at the surface of the cells (Fig. 3C).

We validated the neutralizing effect of LF-NTS mAb on cell growth and migration. LF-NTS mAb inhibited cellular growth on several models (LNM-R, A549, LLC1 and LLC3) by 20–30% (Fig. 3D). We also showed that the LF-NTS mAb decreased the migration speed of the LNM-R and A549 cells when cultured on collagen type I (Fig. 3E). No alteration in the proliferation or migration speed was detected when mouse total IgG was used, or when NTS or NTSR1 expression was silenced (R-SI NTS and R-SI NTSR1 are LNM-R cells silenced for NTS and NTSR1 respectively, A-SI NTSR1 are A 549 cells silenced for NTSR1) [28].

Our previous work demonstrated that the chronic and sustained activation of cancerous cells by NTS, increased NTSR1 expression. In turn, this effect generated epidermal growth factor receptor autocrine loops, induced from the release and activation of their respective ligands [22–26]. The purpose of this work was to develop a NTS proform antibody to counteract NTSR1 expression and activation, with consequently a deactivation of the oncogenic endpoint targets associated with sustained activation of NTSR1. To address these questions, we first studied NTSR1 expression under LF-NTS mAb exposure. The labelling of NTSR1 declined when LNM-R cells cultured with 0% FBS are treated with LF-NTS mAb for 48 h (Fig. 3F). Similar observations were made when cells are cultures in 5% FBS (data not shown). NTSR1 mRNA



(caption on next page)

Fig. 5. LF-NTS mAb improves the response to platinum-salt based treatment. (A) NTSR1 mRNA quantification by qRT-PCR in LNM-R cells treated with cisplatin, LF-NTS mAb, or the combination for 24 h. Results represent the mean \pm SEM of 3–4 independent experiments. In one-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) (left) Integrated density calculated on area of the tumor exhibiting a strong LF-NTS labelling (R124, B95, G105). $n = 9$, In t -test, *** $p < 0.001$. (right) Example of NTS and immuno-histological labelling of LNM-R experimental tumors from animals treated with PBS, or cisplatin (see detail in Fig. 5D), at 200X magnification. (C) IC₅₀ calculation of A549, A-SI NTS, A-SI NTSR1, LNM-R, R-SI NTSR1 and R-SI NTS cells viability inhibition by cisplatin. Viability test was performed after 72 h of treatment. IC₅₀ calculation of A549 cells in the presence or not of 10^{-8} M NTS agonist, JMV 449. Results represent the mean \pm SEM of 3–4 independent experiments. In t -test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (D) LNM-R tumor size with time of mice bearing double tumors LNM-R and R-SI NTSR1 (10^6 cells). Groups of 8 mice were treated (i.p.) as followed; PBS, mouse IgG1 isotype control, LF-NTS mAb, cisplatin, or cisplatin + LF-NTS mAb. The doses were 1 mg/kg of cisplatin (indicated by the arrows) on day 1, 3, 5, 13, 15, and 15 mg/kg of LF-NTS mAb or IgG injected every other day, or both. In two-way ANOVA, at days 23, LF-NTS mAb vs. Cisplatin $p = 0.0206$; LF-NTS mAb vs. LF-NTS mAb + cisplatin $p = 0.0001$; Cisplatin vs. LF-NTS mAb + cisplatin $p < 0.0001$. R-SI NTSR1 tumor size with time is shown in Fig. S3. (E and F) This experiment was outsourced at institute Curie (Dr Decaudin). 2 mm^3 of tumor from two patients scored pT2N0 (E) and pT2N1 (F) were grafted at the junction between the neck and the back of NU (Ico)-Foxm1tm female mice. When tumors reached 100 mm^3 , mice were treated three times per week (i.p.) with PBS, or LF-NTS mAb (15 mg/kg), or 1 mg/kg cisplatin (indicated by the arrows) at day 1, 3, 5, 13, and 15 or both. In two-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (G) LF-NTS mAb increases platinum accumulation in whole-cell extracts and in purified DNA of LNM-R and A549 cells. The cells were treated with 4 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin alone, or with 1 $\mu\text{g/ml}$ IgG1 isotype control, or 1 $\mu\text{g/ml}$ LF-NTS mAb for 48 h. The results were normalized by the total protein or DNA content. The result represents the mean \pm SEM of at least three independent experiments. (H) Immunocytochemistry of phospho- γ H2AX, on LNM-R and A549 cells pretreated or not with 1 $\mu\text{g/ml}$ IgG1 isotype control or 1 $\mu\text{g/ml}$ LF-NTS mAb for 18 h prior to a treatment with 32 μM cisplatin for 6 h. Number of positive cells calculated on 10 fields of 3 independents experiments, expressed as % of positive cells. For (G) and (H) In a one-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (I) Xenograft of 1 million LNM-R cells treated with PBS or LF-NTS mAb (5 mg/kg once a week), or US-SOC (4 mg/kg carboplatin at day 1, 3, 5, and 30 mg/kg Pemetrexed (Alimta[™]) at day 1, 3, 5, and 8), or both. (J) Xenograft of 1 million LNM-R cells treated with PBS or LF-NTS mAb (5 mg/kg once a week), or EU-SOC (1 mg/kg cisplatin at day 1, 3, 5, and 10 mg/kg Paclitaxel (Taxol[™]) at day 1, 3, 5, and 8), or both. For (I) and (J) In a two-way ANOVA, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. (K) Individual follow up of LNM-R tumor size treated with PBS or LF-NTS mAb (5 mg/kg once a week), or US-SOC (4 mg/kg carboplatin at day 1, 3, 5, and 30 mg/kg Pemetrexed (Alimta[™]) at day 1, 3, 5, and 8), or both, or EU-SOC (1 mg/kg cisplatin at day 1, 3, 5, and 10 mg/kg Paclitaxel (Taxol[™]) at day 1, 3, 5, and 8), or both.

levels also decreased under the same conditions (Fig. 3G). NTSR1 immunohistochemistry performed on LNM-R experimental tumors showed a heterogeneous labelling toward all tumors, with large zones where NTSR1 labeling was exceedingly reinforced. In animals treated with LF-NTS mAb, these reinforced zones mostly disappeared. We compared the expression of NTSR1, based on these high staining zones, between animals treated with PBS or with LF-NTS mAb by calculating the integrated density for the NTSR1 staining. The results showed a 60% decrease in NTSR1 expression (Fig. 3H).

The NTS/NTSR1 signaling is known to be upstream of several major oncogenic pathways involved in the proliferation, invasion, and metastasis, such as MAPK and PI3K/AKT pathways, and Src kinase [36,37]. We used two human lung adenocarcinoma cell lines, LNM-R and A549, to monitor the inhibition of phosphorylated kinases following LF-NTS mAb treatment, and associated with the down regulation of NTSR1 expression (Fig. 3I and J). LF-NTS mAb markedly reduced phosphorylation of several proteins engaged in the cancer progression, including EGFR, HER3, Src, Akt and ERK. No significant change was observed in the total amount of these proteins (Fig. 3J).

3.3. LF-NTS mAb decreases tumor growth

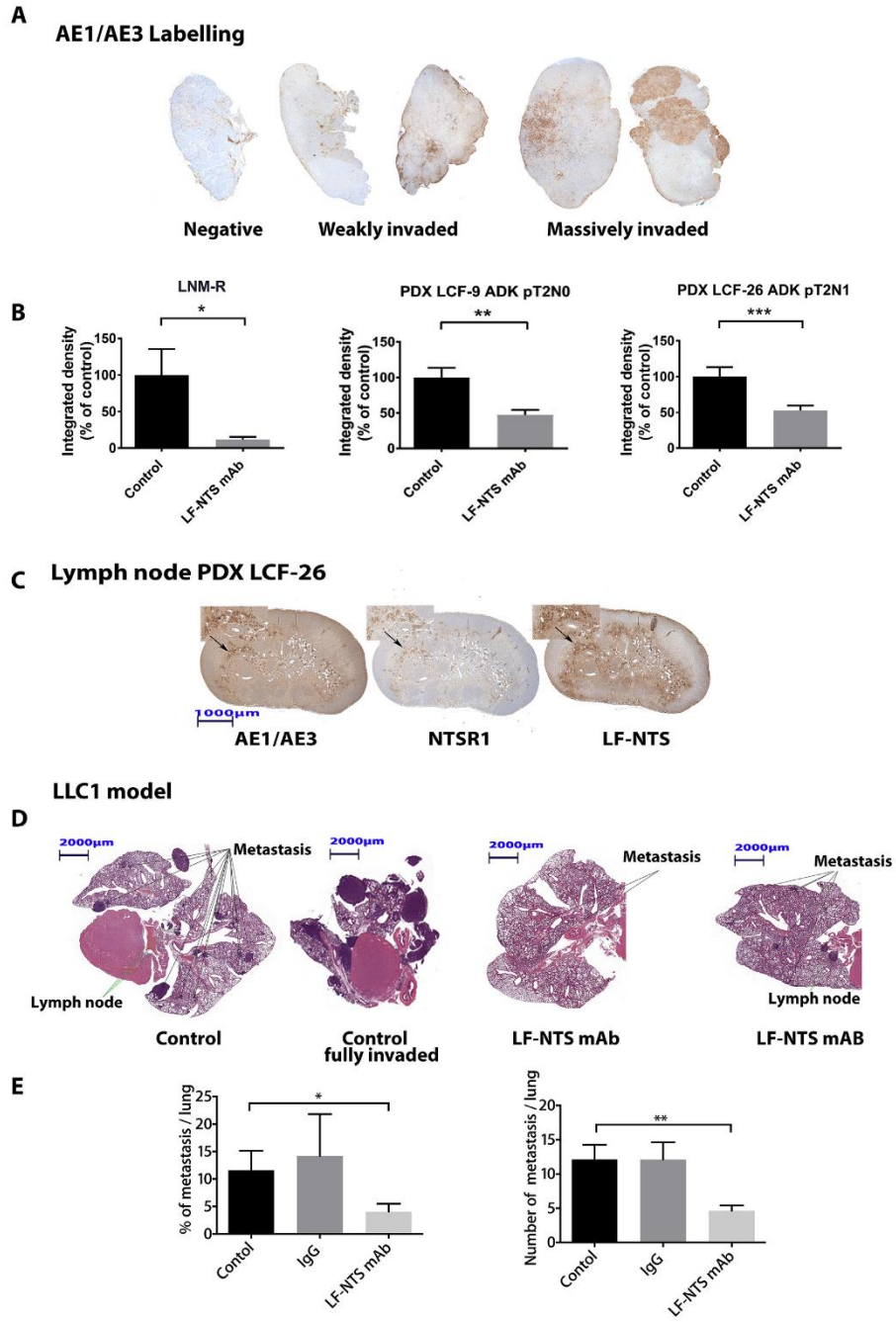
LF-NTS antibody was tested on tumor growth using a double tumor animal model grafted with LNM-R cells and R-SI NTSR1. The LNM-R cell line was chosen because it generates tumors with high growth speed and rapid lymph node metastasis [28], whereas R-SI NTS or R-SI NTSR1 display reduced tumor growth rates and metastasis processes [28]. As shown in Fig. 4A LNM-R tumor size was reduced by 65% in the LF-NTS mAb treated animals, whereas the tumor growth rate remained similar for R-SI NTSR1. At the end of the experiment, the tumors labeled with hematoxylin and eosin were analyzed. The integrated density calculated on the pale pink color, corresponding to the necrosis area showed two folds more necrosis in animals treated with LF-NTS mAb as compared to control animals (Fig. 4B). The same methodological approach showed a sharp increase in the expression of the major actors of the necroptosis pathway, RIPK1 and RIPK3, under LF-NTS mAb treatment (Fig. 4C). Moreover, twice more apoptosis (TUNEL assay), and thrice less proliferation (Ki67 assay) were observed when animals were treated with LF-NTS mAb, as compared to controls (Fig. 4D). Completing this experiment, the dose response and the schedule of the LF-NTS antibody were optimized on LNM-R cells, to 5 mg/kg injected intraperitoneal once a week (Fig. S1).

We also confirmed the effect of LF-NTS antibody on tumor growth generated by the human adenocarcinoma cell line, A549, and the mouse carcinoma cell line, LLC1 [28]. The tumor size was reduced by 40% when mice were treated intravenously with LF-NTS mAb as compared to controls (Fig. 4E and F). In summary, we observed reduced tumor aggressiveness due to LF-NTS mAb treatment.

3.4. LF-NTS mAb restores cisplatin response

It was previously shown on normal rats that platinum salts treatment significantly increased plasma neurotensin level, in association with peripheral neurotoxicity [38]. Based on this observation, we evaluated the effect of cisplatin on NTS expression, and accordingly on cisplatin resistance. A 50% increase of NTS mRNA was observed when LNM-R cells were exposed to cisplatin for 24 h. This increase was counteracted by LF-NTS mAb (Fig. 5A). Likewise, in LNM-R tumors, LF-NTS expression was higher by 50% in animals treated with cisplatin as compared to control animals (Fig. 5B). Additionally, as indicated in Fig. 5C, an alteration of cisplatin sensitivity of the lung cancer cells with NTS or NTSR1 expression was detected. A549 cells exhibited a sensitivity to cisplatin in dose-dependent manner with an IC₅₀ of $27.3 \pm 5.3 \mu\text{M}$. Addition of NTS agonist (JMV449) on A549 cells increased the IC₅₀ by four times to $103.7 \pm 22 \mu\text{M}$, whereas cells silenced for NTS and NTSR1 (A-SI NTS and A-SI NTSR1) showed a higher sensitivity to cisplatin (Fig. 5C). Similar observations were made with LNM-R cells (Fig. 5C).

In subsequent experiments, we tested the antibody in combination with cisplatin on tumor growth. In order to simulate clinical context, we purposely chose to treat the mice with a sub-toxic dose of cisplatin. The LD₅₀ for cisplatin-injected i.p. is 12 mg/kg. Therefore, mice bearing double tumors from LNM-R and R-SI NTSR1 cells were treated 5 times with 1 mg/kg cisplatin (see Fig. 5 legend). Tumors expressing NTS/NTSR1 from LNM-R did not respond to cisplatin, whereas tumors silenced for NTSR1 were responsive (Fig. 5D and S2). The LNM-R tumors became responsive to the treatment when mice were treated with a combination LF-NTS mAb and cisplatin. The tumor size was reduced by 60% as compared to cisplatin alone treated mice (Fig. 5D). The R-SI NTSR1 tumors were responsive to cisplatin and the combined treatment did not improve the tumor growth rate (Fig. S2). Similar experiments were performed on two lung adenocarcinoma PDX models expressing NTSR1 and LF-NTS. PDX LCF-9 did not respond to the cisplatin treatment, as expected since the patient was not a responder. When the PDX



(caption on next page)

Fig. 6. LF-NTS mAb reduces metastatic process. (A) Typical example of lymph node labelled with AE1/AE3. (B) Lymph node were labelled with a cocktail of these two antibodies AE1/AE3, that recognizes the acidic and basic (Type I and II) subfamilies of cytokeratins detecting most human epithelia. Images were acquired with a Nikon Diaphot microscope at the magnification X40; the entire lymph node was reconstituted with adobe Photoshop photomerge. Cells labelling was quantified by evaluating the integrated density. Calculation was performed on ipsilateral axillary lymph node of mice bearing LNM-R (n = 7 to 9) (R213, B129, G98), and on dorsal and axillary lymph node of mice bearing PDX LCF-9 and LCF-26 (R 139, B 59, G46) (n = 16 and 20), respectively. In *t*-test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. (C) Example of adjacent slide of lymph node from mice bearing PDX LCF-26, labelled with AE1/AE3, NTSR1 or LF-NTS, at 20X magnification. (D) C57BL/6j mice were grafted with 0.5 million of a mouse lung carcinoma cell line, LLC1, at day 22, mice were sacrificed and lung metastasis were analyzed by Hematoxylin-Eosin staining at 10X magnification. (E) Metastases were quantified according to the percentage of invaded surface per lung and the number of metastasis per lung. Between 9 and 10 lungs were analyzed per group. In one-way ANOVA, **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

LCF-9 was treated with LF-NTS mAb alone, a weak response was observed. Interestingly with the combined treatment, the tumor size was reduced by 50% (Fig. 5E). The PDX LCF-26 was partially sensitive to cisplatin with a decrease of 35% of tumor size. In combination with LF-NTS mAb the effect of cisplatin on the tumor growth was doubled (Fig. 5F).

In order to evaluate the impact of LF-mAb on cells plasticity, and understand the changes of cell homeostasis induced by LF-mAb, platinum accumulation was evaluated in whole cell extracts and in nuclei. In LNM-R and A549 cells, the platinum content of the whole cell and of the nuclei (platinum bound DNA) was largely increased after 48-h exposure to the combined treatment as compared to cisplatin alone (Fig. 5G). No increase was observed in cells silenced for NTSR1 (Fig. 5G). Moreover, we analyzed the labelling of phospho-Ser139 H2AX protein (γ -H2AX), a protein known to be recruited at the site of DNA double strand breaks, in LNM-R and A549 cells after treatment with cisplatin alone or in combination with LF-NTS mAb. We detected two fold increase in the amount of positive cells when cells were pre-treated with LF-NTS mAb for 18 h and then exposed to cisplatin plus LF-NTS mAb for another 6 h, as compared to cisplatin alone in both cell line (Fig. 5H and S3). These results indicated that LF-NTS mAb improved drug efficiency by enhancing the ratio of drug/target (platinum to DNA).

The first chemotherapy line of lung cancer treatment is primarily a combination of two compounds. In the USA, it is mainly the combination of carboplatin plus paclitaxel, and in Europe, it is mainly cisplatin combined with pemetrexed. Treatment of mice with a sub-toxic dose of these standards of care (SOC), showed a partial response; see US-SOC or EU-SOC (Fig. 5I and J). Co-treatment with LF-NTS mAb improved both US-SOC and EU-SOC responses. Individual responses, shown in Fig. 5K, revealed that the tumors grew at a very slow rate, or stop growing with the combination of SOC and LF-NTS mAb, especially with the US-SOC.

3.5. LF-NTS mAb reduces metastasis

We evaluated the contribution of LF-NTS mAb on metastatic processes using AE1/AE3 labelling, a cytokeratin marker for sentinel lymph node biopsies. Ipsilateral axillary lymph node of mice bearing LNM-R tumor and axillary and dorsal lymph node of mice bearing PDX were labelled with AE1/AE3. An example of the various scores of AE1/AE3 labelling is shown in Fig. 6A. Integrated density of the color corresponding to the invaded cells was calculated (Fig. 6B). The lymph nodes of mice treated with LF-NTS mAb clearly showed less metastasis (13%, 47% and 53% as compared to PBS treated mice, for LNM-R tumor, and LCF-9 or LCF-26 PDX, respectively). In addition, we observed that invasive epithelial cells in lymph node expressed NTSR1 and LF-NTS, as a representative example is shown in Fig. 6C.

We confirmed the effect of LF-NTS mAb on the metastatic process using the syngeneic LLC1 model from animals of the experiment described in Fig. 3F. The size and the number of lung metastasis were smaller in animals treated with LF-NTS mAb as compared to controls (Fig. 6D and E).

3.6. LF-NTS mAb long term treatments induced no obvious adverse events

No toxicity is expected with LF-NTS mAb long-term treatment

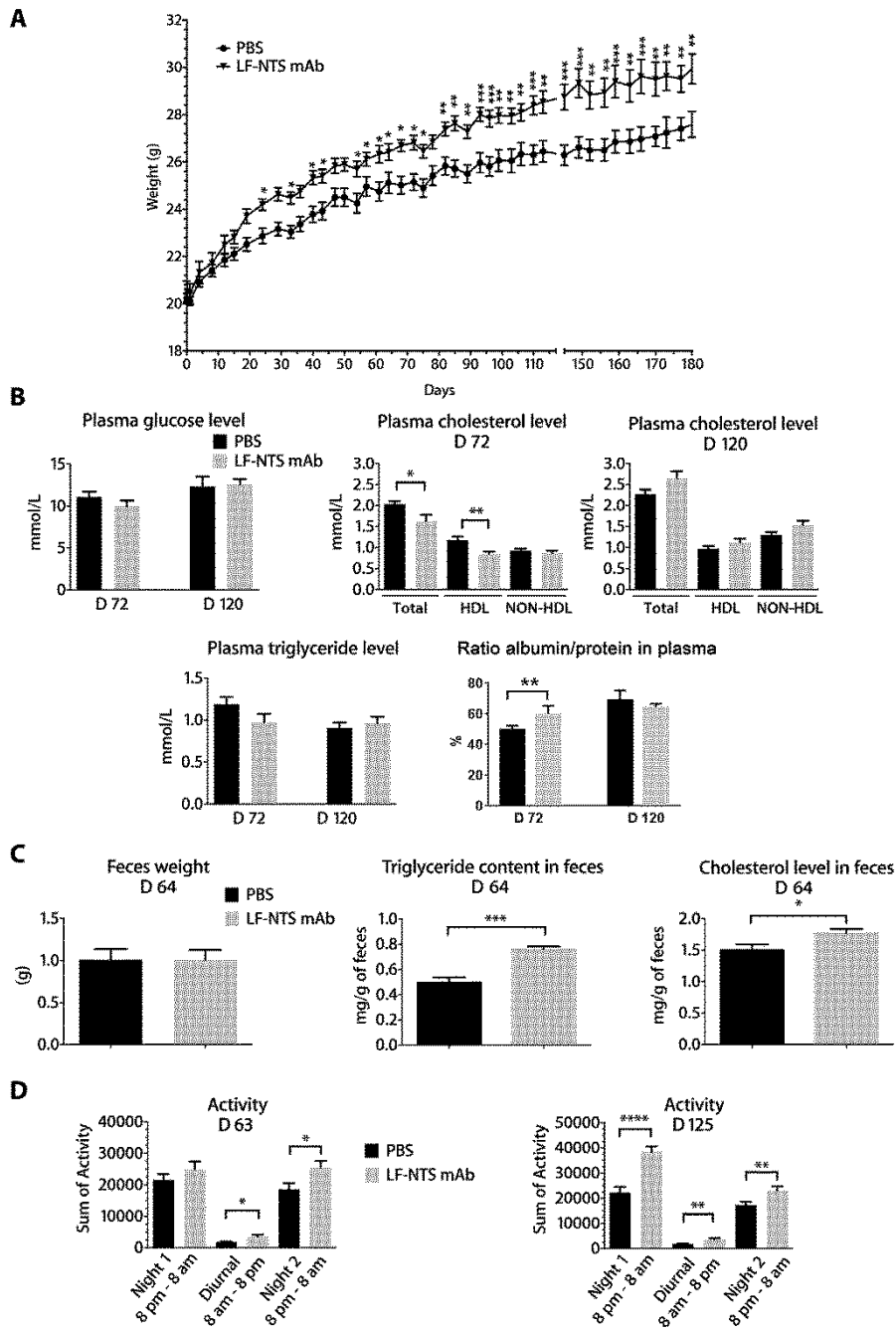
because the epitope is localized downstream from NTS sequence. Consequently, the functions of the mature peptide NTS should not be abrogated. Long-term effects of LF-NTS mAb treatment were evaluated on C57BL/6j mice, treated once a week with 5 mg/kg for 180 days. As seen on Fig. 7A, the mice treated with NTS mAb put on weight during the treatment as compared to control mice. At day 180, antibody treated mice were 9.2% heavier than control mice. No difference in food intake was observed (data not shown). Basic blood parameters, glucose cholesterol, and triglyceride levels were not modified by the treatment. The ratio albumin to protein was significant higher in LF-NTS mAb treated mice as compared to control (Fig. 7B). No difference in food intake was observed (data not shown). The weight of feces collected during 48 h was equivalent, but the feces triglyceride and the cholesterol content was significantly higher in animals treated with LF-NTS mAb (Fig. 7C). Finally, mice treated with LF-NTS mAb were more active than controls, persisting with time (Fig. 7D). Long-term treatment with LF-NTS mAb seems to improve the biological parameters associated with quality of life and a better survival.

4. Discussion

We developed a monoclonal antibody based on a strategy to neutralize the proform of neurotensin, and thereby eliminate the oncogenic activities of NTSR1. Taking advantage of this antitumor tool, we discovered that inhibition of neurotensin enhances the toxic effects of platinum-salt based therapy. Moreover, the apparent absence of toxicity on long term treatment designates antibody-based targeting proform of neurotensin as a therapeutic promise for the improvement of chemotherapy when combined with platinum salts.

On non-transformed cells, NTS is able to induce epithelial cell proliferation, and migration, known to be major cellular effects involved in neoplasms development and progression [36]. Accordingly, upon discovery of NTS, this peptide was suspected to contribute to carcinogenesis and progression of cancer. Initiated from these observations, a large variety of studies on the contribution of NTS on cancer cells growth, migration, invasion and adherence on different type of cancers cells and tumors were designed [37]. The high affinity NTS receptor (NTSR1), a GPCR mostly coupled to Galphaq/11, activates the cascade “phospholipase C-diacylglycerol-inositol triphosphate-protein kinase C”, as well as the mobilization of intracellular calcium that regulates gene transcription, cell proliferation, migration and death [37,39]. Concurrently, NTS activates HER family (EGFR, HER2, and HER3) and creates an activating autocrine loop for these receptors in several types of cancers [25,26,40–42]. These receptors act as they all bearing driver mutations, consequently cells expressing NTS or NTSR1 are sensitive to erlotinib and lapatinib whereas the same cells depleted for NTS or NTSR1 were not responsive to these tyrosine kinase inhibitors [25–27]. Finally, NTS can also modulate the activities of the small RhoGTPases (Rac1, RhoA and Cdc42), Focal adhesion kinase, and Src, responsible for the cytoskeleton dynamics and the formation of various cytoplasmic extensions [43]. NTS activity is therefore always associated with higher tumor aggressiveness, and advanced stages.

NTSR1 was shown to be expressed in many types of cancer, whereas the original normal tissue does not express or very weakly expresses NTSR1. Activation of the wnt/ β -catenin pathway and hypomethylation of the promoter were proposed as mechanisms involved in this



(caption on next page)

Fig. 7. LF-NTS mAb long term treatments induce no obvious adverse events. (A) Weight of mice treated once a week with PBS or 5 mg/kg (i.v.) LF-NTS mAb n = 10. (B) Glucose, cholesterol, triglyceride concentration, and ratio albumin/total protein from blood taking on fasted mice for 6 h at day 72 (n = 6), and day 120 (n = 10). (C) Feces weight, and triglyceride and cholesterol content in feces from 6 mice. (D) Mouse activity recorded from individual mouse during 48 h (ADDENFI, Les Cordeliers, Paris, France). Recording was spitted in three time period at Day 63 (n = 6), and D 120 (n = 8). From A to D In t -test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

upregulation [30,44–46]. Furthermore, high expression of NTSR1 was associated with a pejorative prognosis and disease free survival in lung, breast and ovarian cancers, hepatocellular, endometrial, and head and neck squamous carcinomas, and gliomas [25,28,29,37,47,48]. In tumors, NTSR1 labeling was detected mainly in the cytoplasm, suggesting that NTSR1 is in an activated state. When localized in the cytoplasm, as in lung adenocarcinoma, NTSR1 expression correlates with a poor prognosis, but when it is localized at the cell surface, as in lung squamous carcinoma, NTSR1 expression has no impact on the prognosis [25]. Similar observations were made for endometrial carcinoma [29], suggesting that NTSR1 expression in tumors is not only a marker but also an actor of cancer progression. In order to decrease NTSR1 activation, we developed an antibody directed against the ligand, as NTSR1 intracellular localization rendered difficult its inhibition with an antibody, or a small molecule.

Cisplatin efficiency is limited because cells exhibit innate and acquired resistance, and it is a very toxic nonspecific compound, with its dose limitation being crucial. Many mechanisms are involved in cisplatin resistance, notably cells are able to resist induced apoptosis in response to DNA damage. Cells bypass the activation of several signal transduction pathways, including calcium signaling, death receptor signaling, and the activation of mitochondrial pathways. NTS was described as a survival factor; this was demonstrated in several cellular models from diverse cancers [37]. In particular, in breast cancer cells, NTS agonist inhibited apoptosis induced by serum deprivation, which was accompanied by the enhancement of Bcl-2 gene transcription and cellular protein content [37]. Here we show that decreasing NTSR1 activity with LF-NTS mAb not only reduced tumor cell proliferation and induced apoptosis, but also induced necrosis and the proteins involved in the necroptosis RIPK1 and RIPK3 (Fig. 4).

Limiting influx and increasing efflux are other mechanisms related with cisplatin resistance. Before reaching the DNA, cisplatin enters the cell via passive infusion or by active uptake with a number of transport proteins. Platinum can be extruded from the cells by the GS-X pumps (MRP 1-5) after chelation with glutathione or via the copper efflux system (ATP7A/B) [49]. Here, we demonstrate that blocking NTS increase the quantity of platinum in the cell and in the nucleus and, a higher amount of double strand DNA breaks. LF-NTS mAb improves cisplatin drug efficiency by improving the drug ratio to target (platinum to DNA) and by forcing cell to enter and achieve apoptosis and necrosis.

From detection at diagnosis to the fatal issue, most patients with advanced lung cancer will experience, at one point or another, platinum salt therapy alone or in combination with another compound to improve outcome. Here, we show that adding LF-NTS mAb to the standard of care (carboplatin/paclitaxel or cisplatin/pemetrexed) improves the treatment efficiency. Taking together, we propose to combine LF-NTS targeted antibody to the standard of care, and eventually maintain the treatment after several cycles of platinum salt. Preliminary studies on long-term treatment (several months) of LF-NTS antibody show that no obvious toxicity can be detected on the major blood parameters. Chowfed animals actually gained weight under the treatment, and were more active, which may also contribute to improve the outcome. These points merit further exploration.

5. Conclusion

In summary, we have demonstrated that targeting LF-NTS enhances the response to platinum salt-based chemotherapy and reduces the tumor aggressiveness enhancing the chemotherapy-induced apoptosis

and necrosis. Therapeutic strategies elaborated with LF-NTS antibody would address the most aggressive cells within a heterogeneous tumor by acting on cell plasticity, and rendering the aggressive cells manageable. As a secondary benefit, no additional toxicity should occur when used in combination with conventional treatment.

Funding

This work was supported by INSERM TRANSFERT MAT-PI-07563-A-09 (PI. Forgez), SATT IDF innov Paris, France (PI. Forgez). Dr. J. Liu was supported by China Scholarship Council, and Lund University (Sweden), Dr Z; Wu was supported by SATT IDF innov Paris, France.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We thank Dr Neil Insdorf for his kind help in editing the manuscript. We thank Brigitte Solhonne and Fatima Merabtene (UPMC Univ Paris 06, UMS_30 LUMIC, St Antoine Histomorphology Platform, F-75012) for their excellent assistance with the immunohistochemistry. We thank Tatiana Ledet and other staff in the animal facility of St Antoine Hospital. We also thank the microscopy platform SCM (Service Commun de Microscopie- Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales-Paris)⁹.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.12.007>.

References

- [1] L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal, Global cancer statistics, 2012, *Ca - Cancer J. Clin.* 65 (2015) 87–108.
- [2] C. Locher, D. Debieuvre, D. Coetmeur, F. Goupil, O. Molinier, T. Collon, C. Dayen, J. Le Treut, B. Asselain, F. Martin, F. Blanchon, M. Grivaux, Major changes in lung cancer over the last ten years in France: the KBP-CPHG studies, *Lung Canc.* 81 (2013) 32–38.
- [3] A. Sandler, R. Gray, M.C. Perry, J. Brahmer, J.H. Schiller, A. Dowlati, R. Lilienbaum, D.H. Johnson, Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer, *N. Engl. J. Med.* 355 (2006) 2542–2550.
- [4] G.V. Scagliotti, P. Parikh, J. von Pawel, B. Biesma, J. Vansteenkiste, C. Manegold, P. Serwatowski, U. Gatzemeier, R. Digumarti, M. Zukin, J.S. Lee, A. Mellemaard, K. Park, S. Patil, J. Roliski, T. Gökseel, F. de Marinis, L. Simms, K.P. Sugarmann, D. Gandara, 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.: Offic. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26 (2008) 3543–3551.
- [5] I. Dagogo-Jack, A.T. Shaw, Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15 (2018) 81–94.
- [6] K. Suda, J. Kim, I. Murakami, L. Rozeboom, M. Shimoji, S. Shimizu, C.J. Rivard, T. Mitsudomi, A.C. Tan, F.R. Hirsch, Innate genetic evolution of lung cancers and spatial heterogeneity: analysis of treatment-naïve lesions, *J. Thorac. Oncol.: Offic. Publ. Int. Assoc. Study Lung Canc.* 13 (2018) 1496–1507.
- [7] F. Barlesi, J. Mazieres, J.P. Merlio, D. Debieuvre, J. Mosser, H. Lena, L. Ouafik, B. Besse, I. Rouquette, V. Westeel, F. Escande, I. Monnet, A. Lemoine, R. Veillon, H. Blons, C. Audigier-Valette, P.P. Bringuier, R. Lamy, M. Beau-Faller, J.L. Pujol, J.C. Sabourin, F. Penault-Llorca, M.G. Denis, S. Lantuejoul, F. Morin, Q. Tran, P. Missy, A. Langlais, B. Milleron, J. Cadranel, J.C. Soria, G. Zalcman, 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 (London, England)* 387 (2016) 1415–1426.
- [8] C.K. Lee, L. Davies, Y.L. Wu, T. Mitsudomi, A. Inoue, R. Rosell, C. Zhou, K. Nakagawa, S. Thongprasert, M. Fukuoka, S. Lord, I. Marschner, Y.K. Tu, R.J. Gralla, V. Gebski, T. Mok, J.C. Yang, Gefitinib or erlotinib vs chemotherapy for EGFR mutation-positive lung cancer: individual patient data meta-analysis of

- overall survival, *J. Natl. Cancer Inst.* 109 (2017).
- [9] S. Peters, D.R. Camidge, A.T. Shaw, S. Gadgeel, J.S. Ahn, D.W. Kim, S.I. Ou, M. Perol, R. Dziadziuszko, R. Rosell, A. Zelefer, E. Mitry, S. Golding, B. Balas, J. Noe, P.N. Morcos, T. Mok, Alectinib versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer, *N. Engl. J. Med.* 377 (2017) 829–838.
 - [10] Z. Piotrowska, K.J. Niederst, C.A. Karlovich, H.A. Wakelee, J.W. Neal, M. Mino-Kenudson, L. Fulton, A.N. Hata, E.L. Lockerman, A. Kalsy, S. Digumarthy, A. Muzikansky, M. Raponi, A.R. Garcia, H.E. Mulvey, M.K. Parks, R.H. DiCecca, D. Dias-Santagata, G. Iafrate, A.T. Shaw, A.R. Allen, J.A. Engelman, L.V. Sequist, Heterogeneity underlies the emergence of EGFR-T790 wild-type clones following treatment of T790M-positive cancers with a third-generation EGFR inhibitor, *Cancer Discov.* 5 (2015) 713–722.
 - [11] D.M. Pardoll, The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy, *Nature reviews, Cancer* 12 (2012) 252–264.
 - [12] M. Reck, D. Rodríguez-Abreu, A.G. Robinson, R. Hui, T. Czoszi, A. Fulop, M. Gottfried, N. Peled, A. Tafreshi, S. Cuffe, M. O'Brien, S. Rao, K. Hotta, M.A. Leiby, G.M. Lubiniecki, Y. Shentu, R. Rangwala, J.R. Brahmer, Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 1823–1833.
 - [13] M.A. Postow, R. Sidlow, M.D. Hellmann, Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade, *N. Engl. J. Med.* 378 (2018) 158–168.
 - [14] H.A. Yu, M.E. Arcila, N. Rekhtman, C.S. Sima, M.F. Zakowski, W. Pao, M.G. Kris, V.A. Miller, M. Ladanyi, G.J. Riely, Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers, *Clin. Canc. Res. Offic. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19 (2013) 2240–2247.
 - [15] L.V. Sequist, B.A. Waltman, D. Dias-Santagata, S. Digumarthy, A.B. Turke, P. Fidias, K. Bergethon, A.T. Shaw, S. Gettinger, A.K. Cosper, S. Akhavanfard, R.S. Heist, J. T. Cheng, J.G. Christensen, J.C. Wain, T.J. Lynch, K. Vernovsky, E.J. Mark, M. Lanuti, A.J. Iafrate, M. Mino-Kenudson, J.A. Engelman, Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 75m26.
 - [16] J.F. Gainor, L. Dardai, S. Yoda, L. Friboulet, I. Leshchiner, R. Katayama, I. Dagogo-Jack, S. Gadgeel, K. Schultz, M. Singh, E. Chin, M. Parks, D. Lee, R.H. DiCecca, E. Lockerman, T. Huynh, J. Logan, L.L. Ritterhouse, L.P. Le, A. Muniappan, S. Digumarthy, C. Channick, C. Keyes, G. Getz, D. Dias-Santagata, R.S. Heist, J. Lennerz, L.V. Sequist, C.H. Besses, A.J. Iafrate, M. Mino-Kenudson, J.A. Engelman, A.T. Shaw, Molecular mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer, *Cancer Discov.* 6 (2016) 1118–1133.
 - [17] H.E. Bhang, D.A. Ruddy, V. Krishnamurthy Radhakrishna, J.X. Caushi, R. Zhao, M.M. Hims, A.P. Singh, I. Kao, D. Rakiec, P. Shaw, M. Balak, A. Raza, E. Ackley, N. Keen, M.R. Schläpach, M. Palmer, R.J. Leary, D.Y. Chiang, W.R. Sellers, F. Michor, G. Cooke, J.M. Korn, F. Stegmeier, Studying clonal dynamics in response to cancer therapy using high-complexity barcoding, *Nat. Med.* 21 (2015) 440–448.
 - [18] M. Jamal-Hanjani, G.A. Wilson, N. McGranahan, N.J. Birkbak, T.B.K. Watkins, S. Veeriah, S. Shafi, D.H. Johnson, R. Mitter, R. Rosenthal, M. Salm, S. Horswell, M. Escudero, N. Matthews, A. Rowan, T. Chambers, D.A. Moore, S. Turacic, H. Xu, S.M. Lee, M.D. Forster, T. Ahmad, C.T. Hiley, C. Abbosh, M. Falzon, E. Borg, T. Manafioti, D. Lawrence, M. Hayward, S. Kolvekar, N. Panagiotopoulos, S.M. James, R. Thakrar, A. Ahmed, F. Blackhall, Y. Summers, R. Shah, L. Joseph, A.M. Quinn, P.A. Crosbie, B. Naidoo, G. Middleton, G. Langman, S. Trotter, M. Nicolson, H. Remmen, K. Kerr, M. Chetty, L. Gomersall, D.A. Fennell, A. Nakas, S. Rathinam, G. Anand, S. Khan, P. Russell, V. Ezhil, B. Ismail, M. Irvin-Sellers, V. Prakash, J.G. Lester, M. Komaszewska, R. Attanoos, H. Adams, H. Davies, S. Drento, P. Tanieri, B. O'Sullivan, H.L. Lowe, J.A. Hartley, N. Iles, H. Bell, Y. Ngai, J.A. Shaw, J. Herrero, S. Szallasi, R.F. Schwarz, A. Stewart, S.A. Quezada, J. Le Quesne, P. Van Loo, C. Dive, A. Hackshaw, C. Swanton, Tracking the evolution of non-small-cell lung cancer, *N. Engl. J. Med.* 376 (2017) 2109–2121.
 - [19] M. Russo, G. Siravegna, L.S. Blaszkowsky, G. Corti, G. Crisafulli, L.G. Ahronian, B. Mussolin, E.L. Kwak, M. Buscinaro, L. Lazzari, E. Valtorta, M. Truini, N.A. Jessop, H.E. Robinson, T.S. Hong, M. Mino-Kenudson, F. Di Nicolantonio, A. Thabet, A. Sartore-Bianchi, S. Siena, A.J. Iafrate, A. Bardelli, R.B. Corcoran, Tumor heterogeneity and lesion-specific response to targeted therapy in colorectal cancer, *Cancer Discov.* 6 (2016) 147–153.
 - [20] C. Friry, S. Feliciangeli, F. Richard, P. Kitabgi, C. Rovere, Production of recombinant large pro-neurotensin/neurotensin N-derived peptides and characterization of their binding and biological activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (2002) 1161–1168.
 - [21] O. Melander, A.S. Maisel, P. Almgren, J. Manjer, M. Belting, B. Hedblad, G. Engstrom, U. Kilger, P. Nilsson, A. Bergmann, M. Orho-Melander, Plasma pro-neurotensin and incidence of diabetes, cardiovascular disease, breast cancer, and mortality, *Jama* 308 (2012) 1469–1475.
 - [22] M. Toy-Miut-Leong, C.L. Cortes, A. Beaudet, W. Rostene, P. Forgez, Receptor trafficking via the perinuclear recycling compartment accompanied by cell division is necessary for permanent neurotensin cell sensitization and leads to chronic mitogen-activated protein kinase activation, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 12636–12646.
 - [23] M. Najimi, F. Souza, M. Mendez, E. Hermans, T. Berbar, W. Rostene, P. Forgez, Activation of receptor gene transcription is required to maintain cell sensitization after agonist exposure. Study on neurotensin receptor, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 21634–21641.
 - [24] F. Souza, W. Rostene, P. Forgez, Neurotensin agonist induces differential regulation of neurotensin receptor mRNA. Identification of distinct transcriptional and post-transcriptional mechanisms, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10087–10094.
 - [25] M. Younes, Z. Wu, S. Dupouy, A.M. Lupo, N. Mourra, T. Takahashi, J.F. Flejou, J. Tredaniel, J.F. Regnard, D. Damotte, M. Allifano, P. Forgez, Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib, *Oncotarget* 5 (2014) 8252–8269.
 - [26] S. Dupouy, V.K. Doan, Z. Wu, N. Mourra, J. Liu, O. De Wever, F.P. Llorca, A. Cayre, A. Kouchkar, A. Gompel, P. Forgez, Activation of EGFR, HER2 and HER3 by neurotensin/neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice, *Oncotarget* 5 (2014) 8235–8251.
 - [27] Z. Wu, A. Galmiche, J. Liu, N. Stadler, D. Wendum, E. Segal-Bendirdjian, V. Paradis, P. Forgez, Neurotensin regulation induces overexpression and activation of EGFR in HCC and restores response to erlotinib and sorafenib, *Cancer Lett.* 388 (2017) 73–84.
 - [28] M. Allifano, P. Souza, S. Dupouy, S. Camilleri-Broet, M. Younes, S.M. Ahmed-Zaid, T. Takahashi, A. Cancellieri, S. Damiani, M. Boaron, P. Broet, L.D. Miller, C. Gespach, J.F. Regnard, P. Forgez, Neurotensin receptor 1 antagonist SR48692 improves response to carboplatin by enhancing apoptosis and inhibiting drug efflux in ovarian cancer, *Clin. Canc. Res. Offic. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23 (2017) 6516–6528.
 - [29] M. Agopiantz, P. Forgez, J.M. Casse, S. Lacomme, C. Charra-Brunaud, I. Clerc-Urnes, O. Morel, C. Bonnet, J.L. Gueant, J.M. Vignaud, A. Gompel, G. Gauchotte, Expression of neurotensin receptor 1 in endometrial adenocarcinoma is correlated with histological grade and clinical outcome, *Virchows Arch.* 471 (2017) 521–530.
 - [30] F. Souza, V. Viardot-Foucault, N. Rouillet, M. Toy-Miut-Leong, A. Gompel, E. Bruyneel, E. Comperat, M.C. Faux, M. Mareel, W. Rostene, J.F. Flejou, C. Gespach, P. Forgez, Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/beta-catenin pathway is an early event in human colonic adenomas, *Carcinogenesis* 27 (2006) 708–716.
 - [31] J. Liu, M. Agopiantz, J. Poupon, Z. Wu, P.A. Just, B. Borghese, E. Segal-Bendirdjian, G. Gauchotte, A. Gompel, P. Forgez, Neurotensin receptor 1 antagonist SR48692 improves response to carboplatin by enhancing apoptosis and inhibiting drug efflux in ovarian cancer, *Clin. Canc. Res. Offic. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23 (2017) 6516–6528.
 - [32] T. Winton, R. Livingston, D. Johnson, J. Rigas, M. Johnston, C. Butts, Y. Cormier, G. Goss, R. Inculter, E. Vallieres, W. Fry, D. Bethune, J. Ayoub, K. Ding, L. Seymour, B. Graham, M.S. Tsao, D. Gandara, K. Kesler, T. Demmy, F. Shepherd, Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 2589–2597.
 - [33] J. Gao, B.A. Aksoy, U. Dogrusoz, G. Dresdner, B. Gross, S.O. Sumer, Y. Sun, A. Jacobsen, R. Sinha, E. Larsson, E. Cerami, C. Sander, N. Schultz, Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal, *Sci. Signal.* 6 (2013) p11.
 - [34] E. Cerami, J. Gao, U. Dogrusoz, B.E. Gross, S.O. Sumer, B.A. Aksoy, A. Jacobsen, C.J. Byrne, M.L. Heuer, E. Larsson, Y. Antipin, B. Reva, A.P. Goldberg, C. Sander, N. Schultz, The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data, *Cancer Discov.* 2 (2012) 401–404.
 - [35] W.Y. Xu-van Opstal, C. Ranger, O. Lejeune, P. Forgez, H. Boudin, J.C. Bisconte, W. Rostene, Automated image analyzing system for the quantitative study of living cells in culture, *Microsc. Res. Tech.* 28 (1994) 440–447.
 - [36] B.M. Evers, Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues, *Peptides* 27 (2006) 2424–2433.
 - [37] S. Dupouy, N. Mourra, V.K. Doan, A. Gompel, M. Allifano, P. Forgez, The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers, *Biochimie* 93 (2011) 1369–1378.
 - [38] M.S. Al Moundhri, S. Al-Salam, A. Al-Mahrrouge, S. Beegam, B.H. Ali, The effect of curcumin on oxaliplatin and cisplatin neurotoxicity in rats: some behavioral, biochemical, and histopathological studies, *J. Med. Toxicol. Offic. J. Am. Coll. Med. Toxicol.* 9 (2013) 25–33.
 - [39] C. Cui, R. Merritt, L. Fu, Z. Pan, Targeting calcium signaling in cancer therapy, *Acta Pharm. Sin. B* 7 (2017) 3–17.
 - [40] D. Zhao, Y. Zhan, H. Zeng, H.W. Koon, M.P. Moyer, C. Pothoulakis, Neurotensin stimulates expression of early growth response gene-1 and EGF receptor through MAP kinase activation in human colonic epithelial cells, *Int. J. Canc.* 120 (2007) 1652–1656.
 - [41] S. Hassan, P.R. Dobner, R.E. Carraway, Involvement of MAP-kinase, PI3-kinase and EGF-receptor in the stimulatory effect of Neurotensin on DNA synthesis in PC3 cells, *Regul. Pept.* 120 (2004) 155–166.
 - [42] K. Kislalvi, S. Guha, E. Rozenfurt, Neurotensin and EGF induce synergistic stimulation of DNA synthesis by increasing the duration of ERK signaling in ductal pancreatic cancer cells, *J. Cell. Physiol.* 202 (2005) 880–890.
 - [43] S. Servotte, I. Camby, O. Debeir, C. Deroanne, C.A. Lambert, C.M. Lapiere, R. Kiss, B. Nusgens, C. Decaestecker, The in vitro influences of neurotensin on the motility characteristics of human U373 glioblastoma cells, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 32 (2006) 575–584.
 - [44] Z. Wu, D. Martinez-Fong, J. Tredaniel, P. Forgez, Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy, *Front. Endocrinol.* 3 (2012) 184.
 - [45] Q. Wang, Y. Zhou, B.M. Evers, Neurotensin phosphorylates GSK-3alpha/beta through the activation of PKC in human colon cancer cells, *Neoplasia* 8 (2006) 781–787.
 - [46] A.C. Tan, A. Jimeno, S.H. Lin, J. Wheelhouse, F. Chan, A. Solomon, N.V. Rajeshkumar, B. Rubio-Viqueira, M. Hidalgo, Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome, *Mol. Oncol.* 3 (2009) 425–438.
 - [47] S. Shimizu, J. Tsukada, T. Sugimoto, N. Kikkawa, K. Sasaki, H. Chazono, T. Hanazawa, Y. Okamoto, N. Seki, Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway, *Int. J. Canc.* 123 (2008) 1816–1823.
 - [48] Q. Ouyang, X. Gong, H. Xiao, J. Zhou, M. Xu, Y. Dai, L. Xu, H. Feng, H. Cui, L. Yi, Neurotensin promotes the progression of malignant glioma through NTSR1 and impacts the prognosis of glioma patients, *Mol. Canc.* 14 (2015) 21.
 - [49] M.D. Hall, M. Okabe, D.W. Shen, X.J. Liang, M.M. Gottesman, The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48 (2008) 495–535.

Figures supplémentaires annexes au travail 2

Figure S1

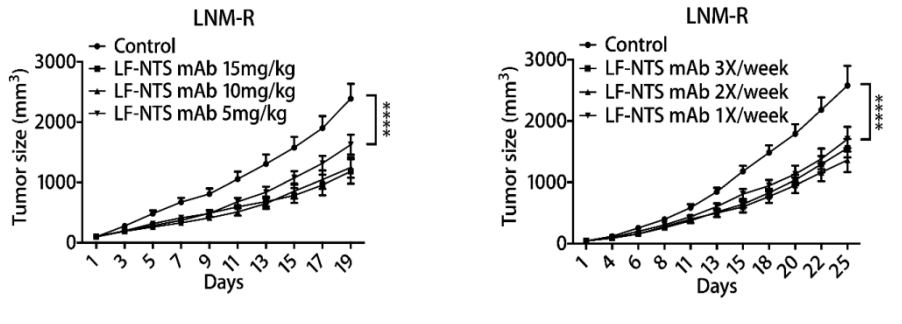


Figure S1 : Optimisation de la dose et de la fréquence d'administration des anticorps anti-LF-NTS sur des greffes expérimentales de tumeurs LNM-R.

Figure S2

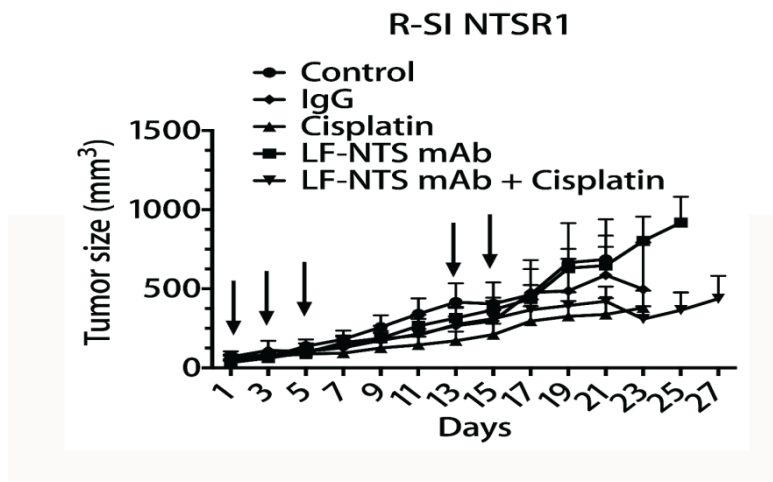


Figure S2 : Courbe de croissance tumorale de tumeurs LNM-R silencées pour NTSR1 dans différents groupes de traitements, contrôles, cisplatine ou anticorps anti-LF-NTS seuls ou combinaison cisplatine avec les anticorps anti-LF-NTS. Ce dernier traitement combiné n'apportait pas de diminution significative de la croissance tumorale par rapport aux monothérapies ou aux contrôles.

Chapitre 7. Conclusions générales et perspectives

Dans ce travail de thèse, nous avons montré que le cisplatine augmente l'expression de PD-L1 dans différents modèles précliniques corroborés par l'analyse de cohortes de patients atteints de CBNPC. Les résultats obtenus suggèrent un impact inducteur du cisplatine sur l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales qui serait significatif, reproductible, et persistant dans le temps avec un effet précoce et plus tardif. Ceci peut fournir une base solide et fiable pour des explorations ultérieures, ainsi que pour la justification rationnelle d'essais cliniques, en cours ou à venir, portant sur des thérapies combinées comprenant un blocage de PD-1/PD-L1 et des drogues cytotoxiques comme le cisplatine. Lors de protocoles associant chimiothérapie et/ou radiothérapie à des ICI administrés ultérieurement, la question de la pertinence de procéder à une réévaluation séquentielle du statut PD-L1 est également posée, afin notamment de sélectionner de manière optimale le sous-ensemble de patients éligibles à de tels traitements. La problématique liée à la représentativité des différentes méthodes d'évaluation du « statut » PD-L1 des tumeurs reste un point important à explorer, et se pose d'autant plus à l'heure du développement de prélèvements de moins en moins invasifs comme les biopsies liquides. Par ailleurs, les résultats préliminaires très récents obtenus avec des combinaisons d'immunothérapies, comme un anti-PD-1/PD-L1 associé à un anti-CTLA-4, sont encourageants dans le CBNPC de stade avancé et peuvent représenter une option thérapeutique intéressante dans certaines sous-populations de malades, sans pour autant supplanter les chimiothérapies seules ou en association avec un ICI (Landre et al. 2019 ; Hellmann et al. 2019). En effet, même si la recherche de biomarqueurs d'éligibilité à des immunothérapies ne cesse de s'accroître, et que les indications à ces traitements se multiplient, il est fort probable

que les sels de platine restent des drogues « clé » dans le cancer pulmonaire de par le recul important qui existe sur leur efficacité, sur la compréhension de leurs mécanismes d'action et de résistance associée, ainsi que sur le profil de toxicité significatif, mais globalement maîtrisé au contraire des immunothérapies. Dans cette optique, l'utilisation d'un anticorps ciblant la signalisation neurotensinergique représente une approche intéressante pour ses potentielles propriétés anti-tumorale intrinsèques, et sa capacité à restaurer la sensibilité aux sels de platine en facilitant l'accès à la cible ADN, tout en n'ayant que peu d'impact fonctionnel et donc que peu d'effets secondaires majeurs prévisibles.

La caractérisation mécanistique et clinico-pathologique des résultats associés à ces différentes combinaisons de traitement, ainsi que leur séquence et l'identification des populations éligibles, est un enjeu majeur en oncologie thoracique qui nécessite notamment une optimisation des modèles précliniques et la réalisation d'essais thérapeutiques. Une approche plus globale, prenant en compte non seulement la tumeur et son microenvironnement, mais aussi le patient, son métabolisme et état inflammatoire, devra probablement être envisagée afin d'individualiser les prises en charge thérapeutiques et d'améliorer le pronostic de cette pathologie.

Résumé visuel du travail 1

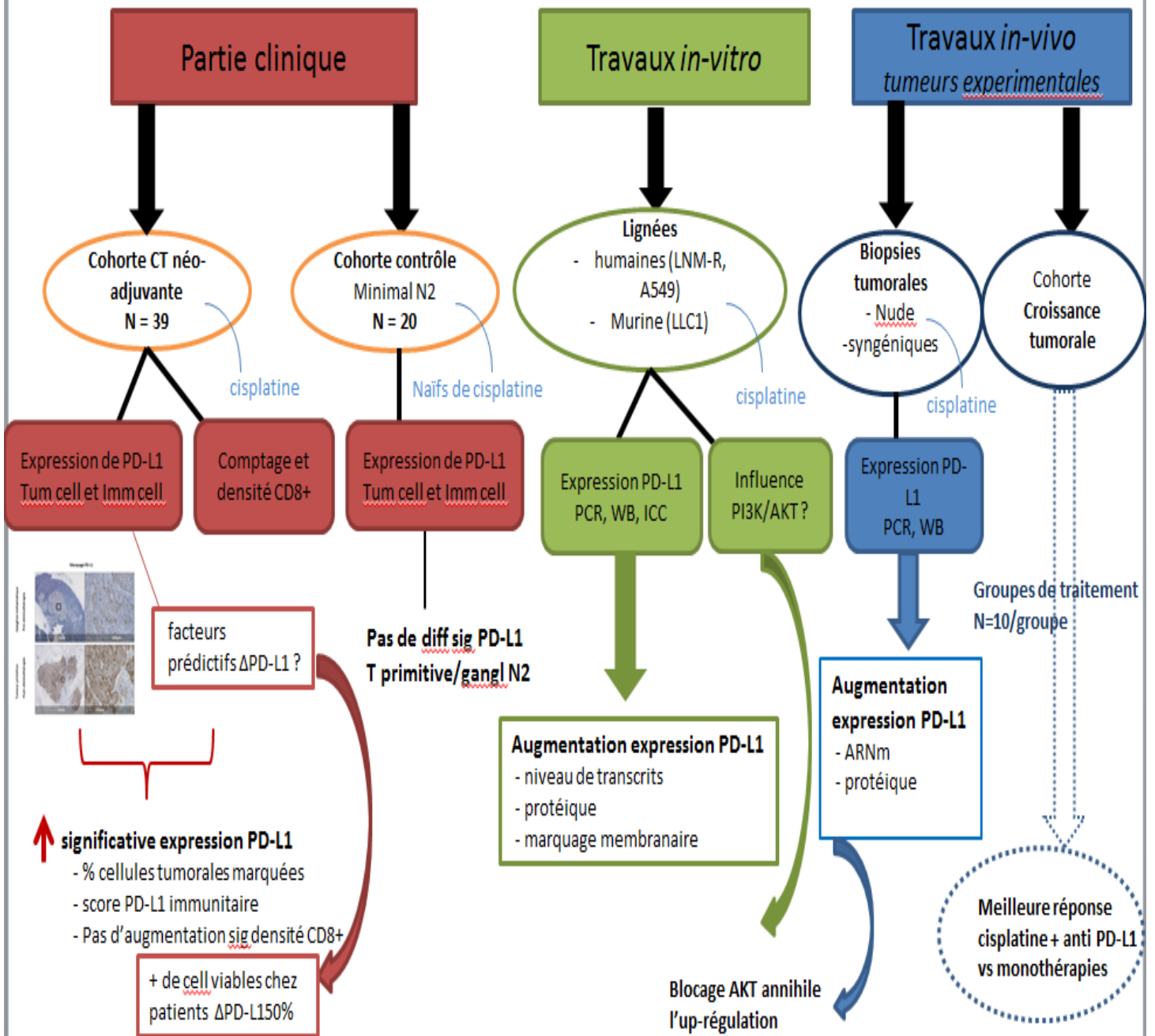


Figure S3 : résumé visuel des principales expériences du travail 1 et résultats associés. Tum cell : cellules tumorales, Imm cell : cellules immunitaires, WB : Western-Blot

Chapitre 8. Chronologie de thèse/place du travail 2

J'ai intégré l'équipe de Dr Patricia Forgez depuis 2011 lors de mon master 2, mon sujet abordait alors la régulation de l'expression de la neurotensine par le cisplatine dans la cellule tumorale bronchique. J'ai été membre de l'équipe depuis, et à ce titre j'ai participé en tant que clinicien à la réflexion du groupe sur le développement d'une thérapie antitumorale ciblant le couple neurotensine et son récepteur le NTSR1, avec notamment pour compétence attendue d'évaluer la pertinence clinique d'améliorer la réponse aux traitements standards. Ce projet a fait une première preuve de concept avec le développement d'un anticorps monoclonal murin contre le fragment long de la neurotensine. J'ai contribué à l'étude clinique des patients de l'hôpital Saint Joseph et aux traitements des bases de données, j'ai finalisé le travail de mon master 2, et participé aux études sur les tumeurs expérimentales.

Dans ce contexte, au moment de choisir mon sujet de thèse, et en tant que clinicien il m'est apparu important d'aborder à une question émergente dans la pratique clinique des stades avancés du CBNPC, qui est la place de l'immunothérapie PD-1/PDL-1 dans les lignes de traitements proposés aux malades. A partir des résultats préliminaires, et la possibilité de pouvoir comparer l'expression de PDL-1 dans une cohorte de patients avant et après chimiothérapie j'ai décidé d'étudier l'influence du cisplatine sur l'expression de PDL-1 dans les CBNPC. Grâce à mon acquis sur le projet neurotensine, j'ai pu élaborer les expériences nécessaires pour valider les hypothèses amenées par les résultats préliminaires.

Chapitre 9. Bibliographie

- Acquaviva, Jaime, Ricky Wong, and Al Charest. 2009. 'The Multifaceted Roles of the Receptor Tyrosine Kinase ROS in Development and Cancer'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1795 (1): 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.07.006>.
- Adam, J., N. Le Stang, I. Rouquette, A. Cazes, C. Badoual, H. Pinot-Roussel, L. Tixier, et al. 2018. 'Multicenter Harmonization Study for PD-L1 IHC Testing in Non-Small-Cell Lung Cancer'. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 29 (4): 953–58. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy014>.
- Adiko, Aimé Cézaire, Joel Babbdor, Enric Gutiérrez-Martínez, Pierre Guermontprez, and Loredana Saveanu. 2015. 'Intracellular Transport Routes for MHC I and Their Relevance for Antigen Cross-Presentation'. *Frontiers in Immunology* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00335>.
- Ahrendt, S. A., P. A. Decker, E. A. Alawi, Y. R. Zhu Yr, M. Sanchez-Cespedes, S. C. Yang, G. B. Haasler, A. Kajdacsy-Balla, M. J. Demeure, and D. Sidransky. 2001. 'Cigarette Smoking Is Strongly Associated with Mutation of the K-Ras Gene in Patients with Primary Adenocarcinoma of the Lung'. *Cancer* 92 (6): 1525–30. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20010915\)92:6<1525::aid-cncr1478>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010915)92:6<1525::aid-cncr1478>3.0.co;2-h).
- Aktaş, Ozge Nur, Ayşe Bilge Öztürk, Baran Erman, Suat Erus, Serhan Tanju, and Şükrü Dilege. 2018. 'Role of Natural Killer Cells in Lung Cancer'. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 144 (6): 997–1003. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2635-3>.
- Al Moundhri, Mansour S., Suhail Al-Salam, Ahmed Al Mahrouqee, S. Beegam, and Badreldin H. Ali. 2013. 'The Effect of Curcumin on Oxaliplatin and Cisplatin Neurotoxicity in Rats: Some Behavioral, Biochemical, and Histopathological Studies'. *Journal of Medical Toxicology: Official Journal of the American College of Medical Toxicology* 9 (1): 25–33. <https://doi.org/10.1007/s13181-012-0239-x>.
- Albain, Kathy S., R. Suzanne Swann, Valerie W. Rusch, Andrew T. Turrisi, Frances A. Shepherd, Colum Smith, Yuhchayou Chen, et al. 2009. 'Radiotherapy plus Chemotherapy with or without Surgical Resection for Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Randomised Controlled Trial'. *Lancet (London, England)* 374 (9687): 379–86. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60737-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60737-6).
- Alberg, Anthony J., Malcolm V. Brock, Jean G. Ford, Jonathan M. Samet, and Simon D. Spivack. 2013. 'Epidemiology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines'. *Chest* 143 (5 Suppl): e1S–e29S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2345>.
- Alberg, Anthony J., Rex C. Yung, Paul Timothy Strickland, and Jonas Nelson. 2002. 'Respiratory Cancer and Exposure to Arsenic, Chromium, Nickel, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons'. *Clinics in Occupational and Environmental Medicine* 2 (4): 779–801. [https://doi.org/10.1016/S1526-0046\(02\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S1526-0046(02)00056-0).
- Alderson, M. 1974. 'Mortality from Malignant Disease in Patients with Asthma'. *Lancet (London, England)* 2 (7895): 1475–77. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(74\)90217-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(74)90217-7).
- Alifano, Marco, Mohamed S. Boudaya, Maurizio Salvi, Jean-Yves Collet, Carmen Dinu, Sophie Camilleri-Broët, and Jean-François Régnard. 2008. 'Pneumonectomy after Chemotherapy: Morbidity, Mortality, and Long-Term Outcome'. *The Annals of Thoracic Surgery* 85 (6): 1866–72; discussion 1872–1873. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2008.01.103>.
- Alifano, Marco, Frédérique Souazé, Sandra Dupouy, Sophie Camilleri-Broët, Mohamad Younes, Sadi-Menad Ahmed-Zaïd, Takashi Takahashi, et al. 2010. 'Neurotensin Receptor 1 Determines the Outcome of Non-Small Cell Lung Cancer'. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 16 (17): 4401–10. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0659>.

- Al-Shibli, Khalid I., Tom Donnem, Samer Al-Saad, Magnus Persson, Roy M. Bremnes, and Lill-Tove Busund. 2008. 'Prognostic Effect of Epithelial and Stromal Lymphocyte Infiltration in Non-Small Cell Lung Cancer'. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14 (16): 5220–27. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0133>.
- Alspach, Elise, Danielle M. Lussier, Alexander P. Miceli, Ilya Kizhvatov, Michel DuPage, Adrienne M. Luoma, Wei Meng, et al. 2019. 'MHC-II Neoantigens Shape Tumour Immunity and Response to Immunotherapy'. *Nature* 574 (7780): 696–701. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1671-8>.
- Altorki, Nasser K., Geoffrey J. Markowitz, Dingcheng Gao, Jeffrey L. Port, Ashish Saxena, Brendon Stiles, Timothy McGraw, and Vivek Mittal. 2019. 'The Lung Microenvironment: An Important Regulator of Tumour Growth and Metastasis'. *Nature Reviews. Cancer* 19 (1): 9–31. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0081-9>.
- Anderson, I. C., M. A. Shipp, A. J. Docherty, and B. A. Teicher. 1996. 'Combination Therapy Including a Gelatinase Inhibitor and Cytotoxic Agent Reduces Local Invasion and Metastasis of Murine Lewis Lung Carcinoma'. *Cancer Research* 56 (4): 715–18.
- Antonia, Scott J., Augusto Villegas, Davey Daniel, David Vicente, Shuji Murakami, Rina Hui, Takashi Yokoi, et al. 2017. 'Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 377 (20): 1919–29. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709937>.
- 'Apoptosis Inducers - Apoptosis and Cell Cycle'. n.d. Sigma-Aldrich. Accessed 4 December 2019. <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/cell-biology-products.html?TablePage=9560323>.
- Arriagada, Rodrigo, Bengt Bergman, Ariane Dunant, Thierry Le Chevalier, Jean-Pierre Pignon, Johan Vansteenkiste, and International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. 2004. 'Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 350 (4): 351–60. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031644>.
- Arriagada, Rodrigo, Ariane Dunant, Jean-Pierre Pignon, Bengt Bergman, Mariusz Chabowski, Dominique Grunenwald, Miroslaw Kozlowski, et al. 2010. 'Long-Term Results of the International Adjuvant Lung Cancer Trial Evaluating Adjuvant Cisplatin-Based Chemotherapy in Resected Lung Cancer'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (1): 35–42. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.2272>.
- Asahina, H., K. Yamazaki, I. Kinoshita, N. Sukoh, M. Harada, H. Yokouchi, T. Ishida, et al. 2006. 'A Phase II Trial of Gefitinib as First-Line Therapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer with Epidermal Growth Factor Receptor Mutations'. *British Journal of Cancer* 95 (8): 998–1004. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603393>.
- Ayoola, Ayodele, Amit Barochia, Kiran Belani, and Chandra P. Belani. 2012. 'Primary and Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer: An Update'. *Cancer Investigation* 30 (5): 433–46. <https://doi.org/10.3109/07357907.2012.666691>.
- Azuma, Takeshi, Sheng Yao, Gefeng Zhu, Andrew S. Flies, Sarah J. Flies, and Lieping Chen. 2008. 'B7-H1 Is a Ubiquitous Antiapoptotic Receptor on Cancer Cells'. *Blood* 111 (7): 3635–43. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-123141>.
- Barta, Julie A., Charles A. Powell, and Juan P. Wisnivesky. 2019. 'Global Epidemiology of Lung Cancer'. *Annals of Global Health* 85 (1). <https://doi.org/10.5334/aogh.2419>.
- Batchelor, Timothy J. P., Neil J. Rasburn, Etienne Abdelnour-Berchtold, Alessandro Brunelli, Robert J. Cerfolio, Michel Gonzalez, Olle Ljungqvist, et al. 2019. 'Guidelines for Enhanced Recovery after Lung Surgery: Recommendations of the Enhanced Recovery After Surgery (ERAS®) Society and the European Society of Thoracic Surgeons (ESTS)'. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery* 55 (1): 91–115. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezy301>.

- Benhamou, S., E. Benhamou, and R. Flamant. 1986. 'Lung Cancer Risk Associated with Cigar and Pipe Smoking'. *International Journal of Cancer* 37 (6): 825–29.
- Benhamou, Simone, Won Jin Lee, Anna-Karin Alexandrie, Paolo Boffetta, Christine Bouchardy, Dorota Butkiewicz, Jurgen Brockmüller, et al. 2002. 'Meta- and Pooled Analyses of the Effects of Glutathione S-Transferase M1 Polymorphisms and Smoking on Lung Cancer Risk'. *Carcinogenesis* 23 (8): 1343–50. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.8.1343>.
- Bhang, Hyo-eun C., David A. Ruddy, Viveksagar Krishnamurthy Radhakrishna, Justina X. Caushi, Rui Zhao, Matthew M. Hims, Angad P. Singh, et al. 2015. 'Studying Clonal Dynamics in Response to Cancer Therapy Using High-Complexity Barcoding'. *Nature Medicine* 21 (5): 440–48. <https://doi.org/10.1038/nm.3841>.
- Biton, Jérôme, Hanane Ouakrim, Agnès Dechartres, Marco Alifano, Audrey Mansuet-Lupo, Han Si, Rebecca Halpin, et al. 2018. 'Impaired Tumor-Infiltrating T Cells in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Impact Lung Cancer Response to PD-1 Blockade'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 198 (7): 928–40. <https://doi.org/10.1164/rccm.201706-1110OC>.
- Bivona, Trevor G., Ignacio Pérez De Castro, Ian M. Ahearn, Theresa M. Grana, Vi K. Chiu, Peter J. Lockyer, Peter J. Cullen, Angel Pellicer, Adrienne D. Cox, and Mark R. Philips. 2003. 'Phospholipase Cγ Activates Ras on the Golgi Apparatus by Means of RasGRP1'. *Nature* 424 (6949): 694–98. <https://doi.org/10.1038/nature01806>.
- Blank, Christian, Thomas F. Gajewski, and Andreas Mackensen. 2005. 'Interaction of PD-L1 on Tumor Cells with PD-1 on Tumor-Specific T Cells as a Mechanism of Immune Evasion: Implications for Tumor Immunotherapy'. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 54 (4): 307–14. <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0593-x>.
- Boal, Amie K., and Amy C. Rosenzweig. 2009. 'Structural Biology of Copper Trafficking'. *Chemical Reviews* 109 (10): 4760–79. <https://doi.org/10.1021/cr900104z>.
- Borghaei, Hossein, Luis Paz-Ares, Leora Horn, David R. Spigel, Martin Steins, Neal E. Ready, Laura Q. Chow, et al. 2015. 'Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 373 (17): 1627–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507643>.
- Borst, Jannie, Tomasz Ahrends, Nikolina Bąbała, Cornelis J. M. Melief, and Wolfgang Kastenmüller. 2018. 'CD4+ T Cell Help in Cancer Immunology and Immunotherapy'. *Nature Reviews. Immunology* 18 (10): 635–47. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0044-0>.
- Bozou, J C, N Rochet, I Magnaldo, J P Vincent, and P Kitabgi. 1989. 'Neurotensin Stimulates Inositol Trisphosphate-Mediated Calcium Mobilization but Not Protein Kinase C Activation in HT29 Cells. Involvement of a G-Protein.' *Biochemical Journal* 264 (3): 871–78.
- Brahmer, Julie, Karen L. Reckamp, Paul Baas, Lucio Crinò, Wilfried E. E. Eberhardt, Elena Poddubskaya, Scott Antonia, et al. 2015. 'Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 373 (2): 123–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504627>.
- Bugge, T. H., K. W. Kombrinck, Q. Xiao, K. Holmbäck, C. C. Daugherty, D. P. Witte, and J. L. Degen. 1997. 'Growth and Dissemination of Lewis Lung Carcinoma in Plasminogen-Deficient Mice'. *Blood* 90 (11): 4522–31.
- Buqué, Aitziber, and Lorenzo Galluzzi. 2018. 'Modeling Tumor Immunology and Immunotherapy in Mice'. *Trends in Cancer* 4 (9): 599–601. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.07.003>.
- Butte, Manish J., Mary E. Keir, Theresa B. Phamduy, Arlene H. Sharpe, and Gordon J. Freeman. 2007. 'Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses'. *Immunity* 27 (1): 111–22. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.016>.
- 'Cancer Du Poumon / Données Par Localisation / Cancers / Maladies Chroniques et Traumatismes / Dossiers Thématiques / Accueil'. n.d. Accessed 1 July 2019. <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-chroniques-et-traumatismes/Cancers/Donnees-par-localisation/Cancer-du-poumon>.

- Cancer Genome Atlas Research Network. 2012. 'Comprehensive Genomic Characterization of Squamous Cell Lung Cancers'. *Nature* 489 (7417): 519–25. <https://doi.org/10.1038/nature11404>.
- Carbone, David P., Martin Reck, Luis Paz-Ares, Benjamin Creelan, Leora Horn, Martin Steins, Enriqueta Felip, et al. 2017. 'First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 376 (25): 2415–26. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1613493>.
- Carraway, R. E., and S. P. Mitra. 1990. 'Differential Processing of Neurotensin/Neuromedin N Precursor(s) in Canine Brain and Intestine'. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (15): 8627–31.
- Carraway, R., P. Kitabgi, and S. E. Leeman. 1978. 'The Amino Acid Sequence of Radioimmunoassayable Neurotensin from Bovine Intestine'. *The Journal of Biological Chemistry* 253 (22): 7996–98.
- Carraway, Robert, Susan E. Ruane, and Hye-Ryeong Kim. 1982. 'Distribution and Immunochemical Character of Neurotensin-like Material in Representative Vertebrates and Invertebrates: Apparent Conservation of the COOH-Terminal Region during Evolution'. *Peptides* 3 (2): 115–23. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(82\)90038-9](https://doi.org/10.1016/0196-9781(82)90038-9).
- Carreras-Torres, Robert, Mattias Johansson, Philip C. Haycock, Kaitlin H. Wade, Caroline L. Relton, Richard M. Martin, George Davey Smith, et al. 2017. 'Obesity, Metabolic Factors and Risk of Different Histological Types of Lung Cancer: A Mendelian Randomization Study'. *PloS One* 12 (6): e0177875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177875>.
- Castro, Flávia, Ana Patrícia Cardoso, Raquel Madeira Gonçalves, Karine Serre, and Maria José Oliveira. 2018. 'Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion'. *Frontiers in Immunology* 9: 847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>.
- Cerami, Ethan, Jianjiong Gao, Ugur Dogrusoz, Benjamin E. Gross, Selcuk Onur Sumer, Bülent Arman Aksoy, Anders Jacobsen, et al. 2012. 'The CBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data'. *Cancer Discovery* 2 (5): 401–4. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>.
- Chae, Young Kwang, Alan Pan, Andrew A. Davis, Kirtee Raparia, Nisha A. Mohindra, Maria Matsangou, and Francis J. Giles. 2016. 'Biomarkers for PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Non-Small-Cell Lung Cancer: Is PD-L1 Expression a Good Marker for Patient Selection?' *Clinical Lung Cancer* 17 (5): 350–61. <https://doi.org/10.1016/j.clc.2016.03.011>.
- Chaisemartin, Luc de, Jérémy Goc, Diane Damotte, Pierre Validire, Pierre Magdeleinat, Marco Alifano, Isabelle Cremer, Wolf-Herman Fridman, Catherine Sautès-Fridman, and Marie-Caroline Dieu-Nosjean. 2011. 'Characterization of Chemokines and Adhesion Molecules Associated with T Cell Presence in Tertiary Lymphoid Structures in Human Lung Cancer'. *Cancer Research* 71 (20): 6391–99. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0952>.
- Charlton, Joanna J., Ioannis Chatzidakis, Debbie Tsoukatou, Dimitrios T. Boumpas, George A. Garinis, and Clio Mamalaki. 2013. 'Programmed Death-1 Shapes Memory Phenotype CD8 T Cell Subsets in a Cell-Intrinsic Manner'. *The Journal of Immunology* 190 (12): 6104–14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201617>.
- Chen, Helen H. W., Jiang-Jou Yan, Wen-Chung Chen, Macus Tien Kuo, Yu-Hsuan Lai, Wu-Wei Lai, Hsiao-Sheng Liu, and Wu-Chou Su. 2012. 'Predictive and Prognostic Value of Human Copper Transporter 1 (HCTR1) in Patients with Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer Receiving First-Line Platinum-Based Doublet Chemotherapy'. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 75 (2): 228–34. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.06.011>.
- Chen, Lieping. 2004. 'Co-Inhibitory Molecules of the B7-CD28 Family in the Control of T-Cell Immunity'. *Nature Reviews. Immunology* 4 (5): 336–47. <https://doi.org/10.1038/nri1349>.
- Cheng, Haiying, Zhenfeng Zhang, Alain Borczuk, Charles A. Powell, Adayabalam S. Balajee, Howard B. Lieberman, and Balazs Halmos. 2013. 'PARP Inhibition Selectively Increases Sensitivity to Cisplatin in ERCC1-Low Non-Small Cell Lung Cancer Cells'. *Carcinogenesis* 34 (4): 739–49. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs393>.

- Chinai, Jordan M., Murali Janakiram, Fuxiang Chen, Wantao Chen, Mark Kaplan, and Xingxing Zang. 2015. 'New Immunotherapies Targeting the PD-1 Pathway'. *Trends in Pharmacological Sciences* 36 (9): 587–95. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.06.005>.
- Cho, Daniel C. 2014. 'Targeting the PI3K/Akt/MTOR Pathway in Malignancy: Rationale and Clinical Outlook'. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 28 (4): 373–81. <https://doi.org/10.1007/s40259-014-0090-5>.
- Chung, James B., Michael Silverman, and John G. Monroe. 2003. 'Transitional B Cells: Step by Step towards Immune Competence'. *Trends in Immunology* 24 (6): 343–49. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(03\)00119-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(03)00119-4).
- Cohen, Justine, and Mario Sznol. 2015. 'Therapeutic Combinations of Immune-Modulating Antibodies in Melanoma and Beyond'. *Seminars in Oncology*, Immunologic Checkpoints for Cancer Treatment: A Continuing Success, 42 (3): 488–94. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.02.014>.
- Colbeck, Emily Jayne, Ann Ager, Awen Gallimore, and Gareth Wyn Jones. 2017. 'Tertiary Lymphoid Structures in Cancer: Drivers of Antitumor Immunity, Immunosuppression, or Bystander Sentinels in Disease?' *Frontiers in Immunology* 8 (December). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01830>.
- Coleman, Blair N., Brian Rostron, Sarah E. Johnson, Bridget K. Ambrose, Jennifer Pearson, Cassandra A. Stanton, Baoguang Wang, et al. 2017. 'Electronic Cigarette Use among US Adults in the Population Assessment of Tobacco and Health (PATH) Study, 2013–2014'. *Tobacco Control* 26 (e2): e117–26. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2016-053462>.
- Collaboration, The Emerging Risk Factors. 2011. 'Diabetes Mellitus, Fasting Glucose, and Risk of Cause-Specific Death'. Research-article. <http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMoa1008862>. 2 March 2011. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1008862>.
- Corrales, Luis, Katherine Scilla, Christian Caglevic, Ken Miller, Julio Oliveira, and Christian Rolfo. 2018. 'Immunotherapy in Lung Cancer: A New Age in Cancer Treatment'. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 995: 65–95. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02505-2_3.
- Corthay, Alexandre, Dag K. Skovseth, Katrin U. Lundin, Egil Røsjø, Hilde Omholt, Peter O. Hofgaard, Guttorm Haraldsen, and Bjarne Bogen. 2005. 'Primary Antitumor Immune Response Mediated by CD4+ T Cells'. *Immunity* 22 (3): 371–83. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.02.003>.
- Coté, Michele L., Sharon L. R. Kardia, Angela S. Wenzlaff, John C. Ruckdeschel, and Ann G. Schwartz. 2005. 'Risk of Lung Cancer among White and Black Relatives of Individuals with Early-Onset Lung Cancer'. *JAMA* 293 (24): 3036–42. <https://doi.org/10.1001/jama.293.24.3036>.
- Cusumano, Giacomo, Ludovic Fournel, Salvatore Strano, Diane Damotte, Marie Christine Charpentier, Antonio Galia, Alberto Terminella, Maurizio Nicolosi, Jean Francois Regnard, and Marco Alifano. 2017. 'Surgical Resection for Pulmonary Carcinoid: Long-Term Results of Multicentric Study-The Importance of Pathological N Status, More Than We Thought'. *Lung* 195 (6): 789–98. <https://doi.org/10.1007/s00408-017-0056-8>.
- Dagogo-Jack, Ibiayi, and Alice T. Shaw. 2018. 'Tumour Heterogeneity and Resistance to Cancer Therapies'. *Nature Reviews. Clinical Oncology* 15 (2): 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>.
- Daniels, Craig E., and James R. Jett. 2005. 'Does Interstitial Lung Disease Predispose to Lung Cancer?' *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 11 (5): 431–37.
- Darling, Gail E. 2013. 'Current Status of Mediastinal Lymph Node Dissection versus Sampling in Non-Small Cell Lung Cancer'. *Thoracic Surgery Clinics* 23 (3): 349–56. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2013.05.002>.
- Dave, S. K., C. Edling, P. Jacobsson, and O. Axelson. 1988. 'Occupation, Smoking, and Lung Cancer'. *British Journal of Industrial Medicine* 45 (11): 790–92. <https://doi.org/10.1136/oem.45.11.790>.
- Dearden, S., J. Stevens, Y.-L. Wu, and D. Blowers. 2013. 'Mutation Incidence and Coincidence in Non Small-Cell Lung Cancer: Meta-Analyses by Ethnicity and Histology (MutMap)'. *Annals of*

- Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 24 (9): 2371–76.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdt205>.
- Desbois, Mélanie, Stéphane Champiat, and Nathalie Chaput. 2015. '[Breaking immune tolerance in cancer]'. *Bulletin Du Cancer* 102 (1): 34–52. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2014.12.002>.
- Detterbeck, Frank C., Daniel J. Boffa, Anthony W. Kim, and Lynn T. Tanoue. 2017. 'The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification'. *Chest* 151 (1): 193–203.
<https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.10.010>.
- Detterbeck, Frank C., Sandra Zelman Lewis, Rebecca Diekemper, Doreen Addrizzo-Harris, and W. Michael Alberts. 2013. 'Executive Summary: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines'. *Chest* 143 (5 Suppl): 7S-37S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2377>.
- Dewi, Nikmah Utami, Hendriek C. Boshuizen, Mattias Johansson, Paolo Vineis, Ellen Kampman, Annika Steffen, Anne Tjønneland, et al. 2016. 'Anthropometry and the Risk of Lung Cancer in EPIC'. *American Journal of Epidemiology* 184 (2): 129–39.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwv298>.
- Dieu-Nosjean, Marie-Caroline, Martine Antoine, Claire Danel, Didier Heudes, Marie Wislez, Virginie Poulot, Nathalie Rabbe, et al. 2008. 'Long-Term Survival for Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer with Intratumoral Lymphoid Structures'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (27): 4410–17.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0284>.
- Dinh, Quan Q., and Alvin H. Chong. 2007. 'Melanoma in Organ Transplant Recipients: The Old Enemy Finds a New Battleground'. *The Australasian Journal of Dermatology* 48 (4): 199–207.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-0960.2007.00387.x>.
- Dobner, P R, D L Barber, L Villa-Komaroff, and C McKiernan. 1987. 'Cloning and Sequence Analysis of cDNA for the Canine Neurotensin/Neuromedin N Precursor.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (10): 3516–20.
- Doll, R. 1993. 'Mortality from Lung Cancer in Asbestos Workers 1955'. *British Journal of Industrial Medicine* 50 (6): 485–90. <https://doi.org/10.1136/oem.50.6.485>.
- Doll, R., and R. Peto. 1978. 'Cigarette Smoking and Bronchial Carcinoma: Dose and Time Relationships among Regular Smokers and Lifelong Non-Smokers'. *Journal of Epidemiology and Community Health* 32 (4): 303–13. <https://doi.org/10.1136/jech.32.4.303>.
- Dong, Haidong, and Lieping Chen. 2003. 'B7-H1 Pathway and Its Role in the Evasion of Tumor Immunity'. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 81 (5): 281–87.
<https://doi.org/10.1007/s00109-003-0430-2>.
- Dong, Haidong, Scott E. Strome, Diva R. Salomao, Hideto Tamura, Fumiya Hirano, Dallas B. Flies, Patrick C. Roche, et al. 2002. 'Tumor-Associated B7-H1 Promotes T-Cell Apoptosis: A Potential Mechanism of Immune Evasion'. *Nature Medicine* 8 (8): 793–800.
<https://doi.org/10.1038/nm730>.
- Dong, Z., X. Wang, and B. M. Evers. 2000. 'Site-Specific DNA Methylation Contributes to Neurotensin/Neuromedin N Expression in Colon Cancers'. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 279 (6): G1139-1147.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.6.G1139>.
- Driver, Brandon R., Ross A. Miller, Tara Miller, Michael Deavers, Blythe Gorman, Dina Mody, Yimin Ge, et al. 2017. 'Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Expression in Either Tumor Cells or Tumor-Infiltrating Immune Cells Correlates With Solid and High-Grade Lung Adenocarcinomas'. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 141 (11): 1529–32.
<https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0028-OA>.
- Dunn, Gavin P., Allen T. Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old, and Robert D. Schreiber. 2002. 'Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape'. *Nature Immunology* 3 (11): 991–98. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>.

- DuPage, Michel, Claire Mazumdar, Leah M. Schmidt, Ann F. Cheung, and Tyler Jacks. 2012. 'Expression of Tumour-Specific Antigens Underlies Cancer Immunoediting'. *Nature* 482 (7385): 405–9. <https://doi.org/10.1038/nature10803>.
- Dupouy, Sandra, Van Kien Doan, Zherui Wu, Najat Mourra, Jin Liu, Olivier De Wever, Frédérique Penault Llorca, et al. 2014. 'Activation of EGFR, HER2 and HER3 by Neurotensin/Neurotensin Receptor 1 Renders Breast Tumors Aggressive yet Highly Responsive to Lapatinib and Metformin in Mice'. *Oncotarget* 5 (18): 8235–51. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1632>.
- Dupouy, Sandra, Najat Mourra, Van Kien Doan, Anne Gompel, Marco Alifano, and Patricia Forgez. 2011. 'The Potential Use of the Neurotensin High Affinity Receptor 1 as a Biomarker for Cancer Progression and as a Component of Personalized Medicine in Selective Cancers'. *Biochimie* 93 (9): 1369–78. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.04.024>.
- Eisenhauer, E. A., P. Therasse, J. Bogaerts, L. H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, et al. 2009. 'New Response Evaluation Criteria in Solid Tumours: Revised RECIST Guideline (Version 1.1)'. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 45 (2): 228–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>.
- Ekström, Magnus, Gerdt C. Riise, and Hanan A. Tanash. 2017. 'Risk of Cancer after Lung Transplantation for COPD'. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 12: 2841–47. <https://doi.org/10.2147/COPD.S147065>.
- Enoiu, Milica, Josef Jiricny, and Orlando D. Schärer. 2012. 'Repair of Cisplatin-Induced DNA Interstrand Crosslinks by a Replication-Independent Pathway Involving Transcription-Coupled Repair and Translesion Synthesis'. *Nucleic Acids Research* 40 (18): 8953–64. <https://doi.org/10.1093/nar/gks670>.
- Eriksson, N. E., A. Holmén, B. Högstedt, Z. Mikoczy, and L. Hagmar. 1995. 'A Prospective Study of Cancer Incidence in a Cohort Examined for Allergy'. *Allergy* 50 (9): 718–22. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1995.tb01212.x>.
- Everatt, Rūta, Irena Kuzmickienė, and Andrius Senulis. 2011. 'Cigarette Smoking and Trends in Lung Cancer Incidence in Lithuania: An Analysis by Histological Type'. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 47 (4): 222–29.
- Fang, Wentao, Yangwei Xiang, Chenxi Zhong, and Qunhui Chen. 2014. 'The IASLC/ATS/ERS Classification of Lung Adenocarcinoma—a Surgical Point of View'. *Journal of Thoracic Disease* 6 (Suppl 5): S552-560. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2014.06.09>.
- Feng, Wen, Yuan Li, Lei Shen, Xu-Wei Cai, Zheng-Fei Zhu, Jian-Hua Chang, Jia-Qing Xiang, Ya-Wei Zhang, Hai-Quan Chen, and Xiao-Long Fu. 2016. 'Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients with Completely Resected Stage IIIA(N2) Non-Small Cell Lung Cancer'. *Oncotarget* 7 (6): 7227–40. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6979>.
- Ferris, C.F., J.K. George, G. Eastwood, M. Potegal, and R.E. Carraway. 1991. 'Plasma Levels of Human Neurotensin: Methodological and Physiological Considerations'. *Peptides* 12 (2): 215–20. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(91\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0196-9781(91)90002-7).
- Fife, Brian T., and Kristen E. Pauken. 2011. 'The Role of the PD-1 Pathway in Autoimmunity and Peripheral Tolerance'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1217 (January): 45–59. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05919.x>.
- Fournel, Ludovic, Harry Etienne, Audrey Mansuet Lupo, Diane Damotte, Alexandra Rouquette, Marie-Pierre Revel, Claude Guinet, Marco Alifano, and Jean-François Regnard. 2017. 'Correlation between Radiological and Pathological Features of Operated Ground Glass Nodules'. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery* 51 (2): 248–54. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezw294>.
- Fournel, Ludovic, Pierre Emmanuel Falcoz, Marco Alifano, Marie-Christine Charpentier, Mohamed-Sadok Boudaya, Pierre Magdeleinat, Diane Damotte, and Jean-François Regnard. 2013. 'Surgical Management of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinomas: A 10-Year Experience'. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery* 43 (1): 111–14. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezs174>.

- Fournel, Ludovic, Zherui Wu, Nicolas Stadler, Diane Damotte, Filippo Lococo, Geoffroy Boule, Evelyne Ségal-Bendirdjian, et al. 2019. 'Cisplatin Increases PD-L1 Expression and Optimizes Immune Check-Point Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer'. *Cancer Letters* 464 (November): 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.08.005>.
- Francisco, Loise M., Peter T. Sage, and Arlene H. Sharpe. 2010. 'The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity'. *Immunological Reviews* 236 (July): 219–42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x>.
- Friboulet, Luc, Ken André Olausson, Jean-Pierre Pignon, Frances A. Shepherd, Ming-Sound Tsao, Stephen Graziano, Robert Kratzke, et al. 2013. 'ERCC1 Isoform Expression and DNA Repair in Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 368 (12): 1101–10. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1214271>.
- Fridman, W. H., R. Remark, J. Goc, N. A. Giraldo, E. Becht, Scott A. Hammond, D. Damotte, M.-C. Dieu-Nosjean, and Catherine Sautès-Fridman. 2014. 'The Immune Microenvironment: A Major Player in Human Cancers'. *International Archives of Allergy and Immunology* 164 (1): 13–26. <https://doi.org/10.1159/000362332>.
- Fridman, Wolf Herman, Franck Pagès, Catherine Sautès-Fridman, and Jérôme Galon. 2012. 'The Immune Contexture in Human Tumours: Impact on Clinical Outcome'. *Nature Reviews. Cancer* 12 (4): 298–306. <https://doi.org/10.1038/nrc3245>.
- Friry, Claire, Sylvain Feliciangeli, Françoise Richard, Patrick Kitabgi, and Carole Rovere. 2002. 'Production of Recombinant Large Proneurotensin/Neuromedin N-Derived Peptides and Characterization of Their Binding and Biological Activity'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290 (4): 1161–68. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6308>.
- Fruman, David A., and Christian Rommel. 2014. 'PI3K and Cancer: Lessons, Challenges and Opportunities'. *Nature Reviews. Drug Discovery* 13 (2): 140–56. <https://doi.org/10.1038/nrd4204>.
- Gabriel, R., B. M. Dudley, and W. D. Alexander. 1972. 'Lung Cancer and Allergy'. *The British Journal of Clinical Practice* 26 (5): 202–4.
- Galon, Jérôme, Franck Pagès, Francesco M. Marincola, Magdalena Thurin, Giorgio Trinchieri, Bernard A. Fox, Thomas F. Gajewski, and Paolo A. Ascierto. 2012. 'The Immune Score as a New Possible Approach for the Classification of Cancer'. *Journal of Translational Medicine* 10 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-1>.
- Gandhi, Leena, Delvys Rodríguez-Abreu, Shirish Gadgeel, Emilio Esteban, Enriqueta Felip, Flávia De Angelis, Manuel Domine, et al. 2018. 'Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 378 (22): 2078–92. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801005>.
- Gao, Jianjiong, Bülent Arman Aksoy, Ugur Dogrusoz, Gideon Dresdner, Benjamin Gross, S. Onur Sumer, Yichao Sun, et al. 2013. 'Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the CBioPortal'. *Science Signaling* 6 (269): p11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>.
- Gazdar, A. F. 2009. 'Activating and Resistance Mutations of EGFR in Non-Small-Cell Lung Cancer: Role in Clinical Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors'. *Oncogene* 28 Suppl 1 (August): S24-31. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.198>.
- Germain, Claire, Sacha Gnjatic, Fella Tamzalit, Samantha Knockaert, Romain Remark, Jérémy Goc, Alice Lepelley, et al. 2014. 'Presence of B Cells in Tertiary Lymphoid Structures Is Associated with a Protective Immunity in Patients with Lung Cancer'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 189 (7): 832–44. <https://doi.org/10.1164/rccm.201309-1611OC>.
- Germain, R. N. 1994. 'MHC-Dependent Antigen Processing and Peptide Presentation: Providing Ligands for T Lymphocyte Activation'. *Cell* 76 (2): 287–99. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90336-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90336-0).
- Gettinger, Scott N., Leora Horn, Leena Gandhi, David R. Spigel, Scott J. Antonia, Naiyer A. Rizvi, John D. Powderly, et al. 2015. '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'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (18): 2004–12.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3708>.
- Giard, D. J., S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik, and W. P. Parks. 1973. 'In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived from a Series of Solid Tumors'. *Journal of the National Cancer Institute* 51 (5): 1417–23.
<https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>.
- Gilhodes, Julia, Aurélien Belot, Anne-Marie Bouvier, Laurent Remontet, Patricia Delafosse, Karine Ligier, and Agnès Rogel. 2015. 'Incidence of Major Smoking-Related Cancers: Trends among Adults Aged 20-44 in France from 1982 to 2012'. *Cancer Epidemiology* 39 (5): 707–13.
<https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.07.001>.
- Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Christina Fitzmaurice, Tomi F. Akinyemiju, Faris Hasan Al Lami, Tahiya Alam, Reza Alizadeh-Navaei, Christine Allen, et al. 2018. 'Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study'. *JAMA Oncology* 4 (11): 1553–68.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2706>.
- Goc, Jérémy, Claire Germain, Thi Kim Duy Vo-Bourgais, Audrey Lupo, Christophe Klein, Samantha Knockaert, Luc de Chaisemartin, et al. 2014. 'Dendritic Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Signal a Th1 Cytotoxic Immune Contexture and License the Positive Prognostic Value of Infiltrating CD8+ T Cells'. *Cancer Research* 74 (3): 705–15.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1342>.
- Gonzalez, V. M., M. A. Fuertes, C. Alonso, and J. M. Perez. 2001. 'Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?' *Molecular Pharmacology* 59 (4): 657–63.
<https://doi.org/10.1124/mol.59.4.657>.
- González-Mahave, I., T. Lobera labairu, A. Blasco Sarramián, M. D. del Pozo Gil, M. Zorrilla, and E. Vélez de Mendizábal. 2005. 'Anaphylaxis Produced by Oxaliplatin'. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 15 (1): 75–77.
- Grabosch, Shannon, Mirna Bulatovic, Feitianzhi Zeng, Tianzhou Ma, Lixin Zhang, Malcolm Ross, Joan Brozick, et al. 2018. 'Cisplatin-Induced Immune Modulation in Ovarian Cancer Mouse Models with Distinct Inflammation Profiles'. *Oncogene*, December. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0581-9>.
- Graziano, S. L., G. P. Gamble, N. B. Newman, L. Z. Abbott, M. Rooney, S. Mookherjee, M. L. Lamb, L. J. Kohman, and B. J. Poiesz. 1999. 'Prognostic Significance of K-Ras Codon 12 Mutations in Patients with Resected Stage I and II Non-Small-Cell Lung Cancer'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 17 (2): 668–75.
<https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.2.668>.
- Greenwald, Rebecca J., Gordon J. Freeman, and Arlene H. Sharpe. 2005. 'The B7 Family Revisited'. *Annual Review of Immunology* 23: 515–48.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611>.
- Grudny, Jacek, Jacek Kořakowski, Marcin Kruszewski, Janusz Szopiński, Paweł Sliwiński, Elżbieta Wiatr, Jolanta Winek, Jolanta Załęska, Jacek Zych, and Kazimierz Roszkowski-Śliż. 2013. 'Association of Genetic Dependences between Lung Cancer and Chronic Obstructive Pulmonary Disease'. *Pneumonologia I Alergologia Polska* 81 (4): 308–18.
- Gullo, L., R. Pezilli, P. Tomassetti, and R. de Giorgio. 1998. 'Plasma Cholecystokinin and Neurotensin after an Ordinary Meal in Humans. A Prolonged Time Study'. *Gastroenterologie Et Biologique* 22 (1): 25–28.
- Guo, Xuejing, He Cao, Jianya Zhou, and Jianying Zhou. 2019. '[Progress on the Study of PD-L1 Detection Methods in Non-small Cell Lung Cancer]'. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi = Chinese Journal of Lung Cancer* 22 (1): 40–44. <https://doi.org/10.3779/j.issn.1009-3419.2019.01.08>.
- Hammer, R. A., S. E. Leeman, R. Carraway, and R. H. Williams. 1980. 'Isolation of Human Intestinal Neurotensin'. *The Journal of Biological Chemistry* 255 (6): 2476–80.

- Hammond, E. C., I. J. Selikoff, and H. Seidman. 1979. 'Asbestos Exposure, Cigarette Smoking and Death Rates'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 330: 473–90. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1979.tb18749.x>.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. 'Hallmarks of Cancer: The Next Generation'. *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hansen, Morten, and Mads Hald Andersen. 2017. 'The Role of Dendritic Cells in Cancer'. *Seminars in Immunopathology* 39 (3): 307–16. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0592-y>.
- Hayakawa, H., N. Kobayashi, and J. Yata. 1986. 'Primary Immunodeficiency Diseases and Malignancy in Japan'. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* 77 (1): 74–79.
- Heiden, Matthew G. Vander, Lewis C. Cantley, and Craig B. Thompson. 2009. 'Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation'. *Science* 324 (5930): 1029–33. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.
- Hellmann, Matthew D., Luis Paz-Ares, Reyes Bernabe Caro, Bogdan Zurawski, Sang-We Kim, Enric Carcereny Costa, Keunchil Park, et al. 2019. 'Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 381 (21): 2020–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910231>.
- Helmstaedter, V., G. Mühlmann, G. E. Feurle, and W. G. Forssmann. 1977. 'Immunohistochemical Identification of Gastrointestinal Neurotensin Cells in Human Embryos'. *Cell and Tissue Research* 184 (3): 315–20. <https://doi.org/10.1007/BF00219893>.
- Helmy, Karim Y., Shyam A. Patel, George R. Nahas, and Pranela Rameshwar. 2013. 'Cancer Immunotherapy: Accomplishments to Date and Future Promise'. *Therapeutic Delivery* 4 (10): 1307–20. <https://doi.org/10.4155/tde.13.88>.
- Hendifar, Andrew E., Alberto M. Marchevsky, and Richard Tuli. 2017. 'Neuroendocrine Tumors of the Lung: Current Challenges and Advances in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated Disease'. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 12 (3): 425–36. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.11.2222>.
- Herberman, R. B., M. E. Nunn, H. T. Holden, and D. H. Lavrin. 1975. 'Natural Cytotoxic Reactivity of Mouse Lymphoid Cells against Syngeneic and Allogeneic Tumors. II. Characterization of Effector Cells'. *International Journal of Cancer* 16 (2): 230–39. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910160205>.
- Herbst, R. S., P. Baas, J. L. Perez-Gracia, E. Felip, D.-W. Kim, J.-Y. Han, J. R. Molina, et al. 2019. 'Use of Archival versus Newly Collected Tumor Samples for Assessing PD-L1 Expression and Overall Survival: An Updated Analysis of KEYNOTE-010 Trial'. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, January. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy545>.
- Herbst, Roy S., Paul Baas, Dong-Wan Kim, Enriqueta Felip, José L. Pérez-Gracia, Ji-Youn Han, Julian Molina, et al. 2016. 'Pembrolizumab versus Docetaxel for Previously Treated, PD-L1-Positive, Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (KEYNOTE-010): A Randomised Controlled Trial'. *Lancet (London, England)* 387 (10027): 1540–50. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01281-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01281-7).
- Herbst, Roy S., Jean-Charles Soria, Marcin Kowanetz, Gregg D. Fine, Omid Hamid, Michael S. Gordon, Jeffery A. Sosman, et al. 2014. 'Predictive Correlates of Response to the Anti-PD-L1 Antibody MPDL3280A in Cancer Patients'. *Nature* 515 (7528): 563–67. <https://doi.org/10.1038/nature14011>.
- Ho, The Vinh, and Orlando D. Schärer. 2010. 'Translesion DNA Synthesis Polymerases in DNA Interstrand Crosslink Repair'. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 51 (6): 552–66. <https://doi.org/10.1002/em.20573>.
- Hoffmann, D., and I. Hoffmann. 1997. 'The Changing Cigarette, 1950-1995'. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 50 (4): 307–64. <https://doi.org/10.1080/009841097160393>.
- Horeweg, Nanda, Carlijn M. van der Aalst, Rozemarijn Vliegthart, Yingru Zhao, Xueqian Xie, Ernst Th Scholten, Willem Mali, et al. 2013. 'Volumetric Computed Tomography Screening for Lung

- Cancer: Three Rounds of the NELSON Trial'. *The European Respiratory Journal* 42 (6): 1659–67. <https://doi.org/10.1183/09031936.00197712>.
- Horne, Zachary D., Robert Jack, Zachary T. Gray, Jill M. Siegfried, David O. Wilson, Samuel A. Yousem, Katie S. Nason, Rodney J. Landreneau, James D. Luketich, and Matthew J. Schuchert. 2011. 'Increased Levels of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Are Associated with Improved Recurrence-Free Survival in Stage 1A Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The Journal of Surgical Research* 171 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.03.068>.
- Howell, Stephen B., Roohangiz Safaei, Christopher A. Larson, and Michael J. Sailor. 2010. 'Copper Transporters and the Cellular Pharmacology of the Platinum-Containing Cancer Drugs'. *Molecular Pharmacology* 77 (6): 887–94. <https://doi.org/10.1124/mol.109.063172>.
- Howington, John A., Matthew G. Blum, Andrew C. Chang, Alex A. Balekian, and Sudish C. Murthy. 2013. 'Treatment of Stage I and II Non-Small Cell Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines'. *Chest* 143 (5 Suppl): e278S–e313S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2359>.
- Hussain, Azhar, Parmvir Dulay, Megan N. Rivera, Carla Aramouni, and Vishal Saxena. 2019. 'Neoplastic Pathogenesis Associated with Cigarette Carcinogens'. *Cureus* 11 (1): e3955. <https://doi.org/10.7759/cureus.3955>.
- Hynes, Nancy E., and Gwen MacDonald. 2009. 'ErbB Receptors and Signaling Pathways in Cancer'. *Current Opinion in Cell Biology* 21 (2): 177–84. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.12.010>.
- Icard, Philippe, Ludovic Fournel, Antoine Coquerel, Joseph Gligorov, Marco Alifano, and Hubert Lincet. 2018. 'Citrate Targets FBpase and Constitutes an Emerging Novel Approach for Cancer Therapy'. *Cancer Cell International* 18: 175. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0676-y>.
- Icard, Philippe, Ludovic Fournel, Zherui Wu, Marco Alifano, and Hubert Lincet. 2019. 'Interconnection between Metabolism and Cell Cycle in Cancer'. *Trends in Biochemical Sciences* 44 (6): 490–501. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.12.007>.
- Icard, Philippe, Zherui Wu, Marco Alifano, and Ludovic Fournel. 2019. 'Gluconeogenesis of Cancer Cells Is Disrupted by Citrate'. *Trends in Cancer* 5 (5): 265–66. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.03.002>.
- Ilie, M., E. Long-Mira, C. Bence, C. Butori, S. Lassalle, L. Bouhrel, L. Fazzalari, et al. 2016. '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'. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 27 (1): 147–53. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv489>.
- Inoue, Akira, Kunihiro Kobayashi, Kazuhiro Usui, Makoto Maemondo, Shoji Okinaga, Iwao Mikami, Masahiro Ando, et al. 2009. 'First-Line Gefitinib for Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Epidermal Growth Factor Receptor Mutations without Indication for Chemotherapy'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (9): 1394–1400. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.7658>.
- Inoue, Akira, Takuji Suzuki, Tatsuro Fukuhara, Makoto Maemondo, Yuichiro Kimura, Naoto Morikawa, Hiroshi Watanabe, Yasuo Saijo, and Toshihiro Nukiwa. 2006. 'Prospective Phase II Study of Gefitinib for Chemotherapy-Naive Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer with Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (21): 3340–46. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.4692>.
- Institute of Medicine (US) Committee to Assess the Science Base for Tobacco Harm Reduction. 2001. *Clearing the Smoke: Assessing the Science Base for Tobacco Harm Reduction*. Edited by Kathleen Stratton, Padma Shetty, Robert Wallace, and Stuart Bondurant. Washington (DC): National Academies Press (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK222375/>.
- Ishida, Seiko, Jaekwon Lee, Dennis J. Thiele, and Ira Herskowitz. 2002. 'Uptake of the Anticancer Drug Cisplatin Mediated by the Copper Transporter Ctr1 in Yeast and Mammals'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (22): 14298–302. <https://doi.org/10.1073/pnas.162491399>.

- Ishida, Seiko, Frank McCormick, Karen Smith-McCune, and Douglas Hanahan. 2010. 'Enhancing Tumor-Specific Uptake of the Anticancer Drug Cisplatin with a Copper Chelator'. *Cancer Cell* 17 (6): 574–83. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.04.011>.
- Jäger, E., M. Ringhoffer, M. Arand, J. Karbach, D. Jäger, C. Ilsemann, M. Hagedorn, F. Oesch, and A. Knuth. 1996. 'Cytolytic T Cell Reactivity against Melanoma-Associated Differentiation Antigens in Peripheral Blood of Melanoma Patients and Healthy Individuals'. *Melanoma Research* 6 (6): 419–25.
- Jamal-Hanjani, Mariam, Gareth A. Wilson, Nicholas McGranahan, Nicolai J. Birkbak, Thomas B. K. Watkins, Selvaraju Veeriah, Seema Shafi, et al. 2017. 'Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 376 (22): 2109–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1616288>.
- Jett, James, Emily Stone, Graham Warren, and K. Michael Cummings. 2018. 'Cannabis Use, Lung Cancer, and Related Issues'. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 13 (4): 480–87. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.12.013>.
- Johnson, David H., Louis Fehrenbacher, William F. Novotny, Roy S. Herbst, John J. Nemunaitis, David M. Jablons, Corey J. Langer, et al. 2004. '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'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (11): 2184–91. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.11.022>.
- Karachaliou, Niki, Rafael Rosell, Miguel Angel Molina, and Santiago Viteri. 2014. 'Predicting Resistance by Selection of Signaling Pathways'. *Translational Lung Cancer Research* 3 (2): 107–15. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.02.04>.
- Katano, Kuniyuki, Akira Kondo, Roohangiz Safaei, Alison Holzer, Goli Samimi, Misako Mishima, Yien-Ming Kuo, Myriam Rochdi, and Stephen B. Howell. 2002. 'Acquisition of Resistance to Cisplatin Is Accompanied by Changes in the Cellular Pharmacology of Copper'. *Cancer Research* 62 (22): 6559–65.
- Keir, Mary E., Loise M. Francisco, and Arlene H. Sharpe. 2007. 'PD-1 and Its Ligands in T-Cell Immunity'. *Current Opinion in Immunology* 19 (3): 309–14. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.04.012>.
- Kellar, Amelia, Cay Egan, and Don Morris. 2015. 'Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications'. *BioMed Research International* 2015: 621324. <https://doi.org/10.1155/2015/621324>.
- Kelso, A., A. B. Troutt, E. Maraskovsky, N. M. Gough, L. Morris, M. H. Pech, and J. A. Thomson. 1991. 'Heterogeneity in Lymphokine Profiles of CD4+ and CD8+ T Cells and Clones Activated in Vivo and in Vitro'. *Immunological Reviews* 123 (October): 85–114. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1991.tb00607.x>.
- Keppler, D. 1999. 'Export Pumps for Glutathione S-Conjugates'. *Free Radical Biology & Medicine* 27 (9–10): 985–91. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00171-9](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00171-9).
- Keppler, D., Y. Cui, J. König, I. Leier, and A. Nies. 1999. 'Export Pumps for Anionic Conjugates Encoded by MRP Genes'. *Advances in Enzyme Regulation* 39: 237–46. [https://doi.org/10.1016/s0065-2571\(98\)00015-6](https://doi.org/10.1016/s0065-2571(98)00015-6).
- Kim, Claire H., Yuan-Chin Amy Lee, Rayjean J. Hung, Sheila R. McNallan, Michele L. Cote, Wei-Yen Lim, Shen-Chih Chang, et al. 2014. 'Exposure to Secondhand Tobacco Smoke and Lung Cancer by Histological Type: A Pooled Analysis of the International Lung Cancer Consortium (ILCCO)'. *International Journal of Cancer* 135 (8): 1918–30. <https://doi.org/10.1002/ijc.28835>.
- Kim, Jung Soo, Min Seong Cho, Jong Hyeon Nam, Hyun-Jung Kim, Kyeng-Won Choi, and Jeong-Seon Ryu. 2017. 'Prognostic Impact of EGFR Mutation in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients with Family History of Lung Cancer'. *PLoS One* 12 (5): e0177015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177015>.

- Kim, Yeon Wook, Kwang-Nam Jin, Eun Young Heo, Sung Soo Park, Hee Soon Chung, and Deog Kyeom Kim. 2015. 'The Association between Combined Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis and Lung Cancer in Patients with Chronic Obstructive Lung Disease'. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 10: 873–79. <https://doi.org/10.2147/COPD.S80439>.
- Kitabgi, P., F. De Nadai, C. Labbe-Jullie, I. Dubuc, D. Nouel, J. Costentin, Y. Masuo, W. Rostene, J. Woulfe, and L. Lafortune. 1992. 'Functional and Pharmacological Aspects of Central Neuropeptidergic Transmission Mediated by Neurotensin and Neuromedin n'. *Clinical Neuropharmacology* 15 Suppl 1 Pt A: 313A-314A. <https://doi.org/10.1097/00002826-199201001-00162>.
- Kitabgi, P., F. De Nadai, C. Rovère, and J. N. Bidard. 1992. 'Biosynthesis, Maturation, Release, and Degradation of Neurotensin and Neuromedin N'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 668: 30–42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb27337.x>.
- Kitabgi, Patrick. 2006. 'Functional Domains of the Subtype 1 Neurotensin Receptor (NTS1)'. *Peptides* 27 (10): 2461–68. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.02.013>.
- Koebel, Catherine M., William Vermi, Jeremy B. Swann, Nadeen Zerafa, Scott J. Rodig, Lloyd J. Old, Mark J. Smyth, and Robert D. Schreiber. 2007. 'Adaptive Immunity Maintains Occult Cancer in an Equilibrium State'. *Nature* 450 (7171): 903–7. <https://doi.org/10.1038/nature06309>.
- Konishi, Jun, Koichi Yamazaki, Miyuki Azuma, Ichiro Kinoshita, Hirotohi Dosaka-Akita, and Masaharu Nishimura. 2004. 'B7-H1 Expression on Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Its Relationship with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their PD-1 Expression'. *Clinical Cancer Research* 10 (15): 5094–5100. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0428>.
- Kottke, Tim, Laura Evgin, Kevin G. Shim, Diana Rommelfanger, Nicolas Boisgerault, Shane Zaidi, Rosa Maria Diaz, et al. 2017. 'Subversion of NK-Cell and TNF α Immune Surveillance Drives Tumor Recurrence'. *Cancer Immunology Research* 5 (11): 1029–45. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0175>.
- Kozaki, K., O. Miyaishi, T. Tsukamoto, Y. Tatematsu, T. Hida, T. Takahashi, and T. Takahashi. 2000. 'Establishment and Characterization of a Human Lung Cancer Cell Line NCI-H460-LNM35 with Consistent Lymphogenous Metastasis via Both Subcutaneous and Orthotopic Propagation'. *Cancer Research* 60 (9): 2535–40.
- Kris, Mark G., Bruce E. Johnson, Lynne D. Berry, David J. Kwiatkowski, A. John Iafrate, Ignacio I. Wistuba, Marileila Varella-Garcia, et al. 2014. 'Using Multiplexed Assays of Oncogenic Drivers in Lung Cancers to Select Targeted Drugs'. *JAMA* 311 (19): 1998–2006. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3741>.
- Landgren, Ola, Jonathan N. Hofmann, Charlene M. McShane, Loredana Santo, Malin Hultcrantz, Neha Korde, Sham Mailankody, et al. 2019. 'Association of Immune Marker Changes With Progression of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance to Multiple Myeloma'. *JAMA Oncology*, July. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.1568>.
- Landre, Thierry, Gaetan Des Guetz, Kader Chouahnia, Cherifa Taleb, Alain Vergnenègre, and Christos Chouaid. 2019. 'First-Line PD-1/PD-L1 Inhibitor plus Chemotherapy vs Chemotherapy Alone for Negative or < 1% PD-L1-Expressing Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancers'. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, November. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-03070-3>.
- Lastwika, Kristin J., Willie Wilson, Qing Kay Li, Jeffrey Norris, Haiying Xu, Sharon R. Ghazarian, Hiroshi Kitagawa, et al. 2016. 'Control of PD-L1 Expression by Oncogenic Activation of the AKT-MTOR Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer'. *Cancer Research* 76 (2): 227–38. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3362>.
- Laverty, Anthony A., Filippos T. Filippidis, Esteve Fernandez, and Constantine I. Vardavas. 2017. 'E-Cigarette Use and Support for Banning e-Cigarette Use in Public Places in the European Union'. *Preventive Medicine* 105 (December): 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2017.08.007>.

- Le Marchand, Loïc, Chuanfa Guo, Simone Benhamou, Christine Bouchardy, Ingolf Cascorbi, Margie L. Clapper, Seymour Garte, et al. 2003. 'Pooled Analysis of the CYP1A1 Exon 7 Polymorphism and Lung Cancer (United States)'. *Cancer Causes & Control: CCC* 14 (4): 339–46.
- Lee, Ho Yun, Yoon-La Choi, Kyung Soo Lee, Joungho Han, Jae Ill Zo, Young Mog Shim, and Jung Won Moon. 2014. 'Pure Ground-Glass Opacity Neoplastic Lung Nodules: Histopathology, Imaging, and Management'. *AJR. American Journal of Roentgenology* 202 (3): W224–233. <https://doi.org/10.2214/AJR.13.11819>.
- Lee, Hyun-Wook, Sung-Hyun Park, Mao-Wen Weng, Hsiang-Tsui Wang, William C. Huang, Herbert Lepor, Xue-Ru Wu, Lung-Chi Chen, and Moon-Shong Tang. 2018. 'E-Cigarette Smoke Damages DNA and Reduces Repair Activity in Mouse Lung, Heart, and Bladder as Well as in Human Lung and Bladder Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (7): E1560–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718185115>.
- Lee, Shin Yup, Deuk Kju Jung, Jin Eun Choi, Cheng Cheng Jin, Mi Jeong Hong, Sook Kyung Do, Hyo-Gyoung Kang, et al. 2016. 'PD-L1 Polymorphism Can Predict Clinical Outcomes of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with First-Line Paclitaxel-Cisplatin Chemotherapy'. *Scientific Reports* 6: 25952. <https://doi.org/10.1038/srep25952>.
- Leone, G. 1973. '[The relationship between immunological defence and the development of tumours]'. *Archivio Per Le Scienze Mediche* 130 (4): 273–82.
- Lieberthal, W., V. Triaca, and J. Levine. 1996. 'Mechanisms of Death Induced by Cisplatin in Proximal Tubular Epithelial Cells: Apoptosis vs. Necrosis'. *The American Journal of Physiology* 270 (4 Pt 2): F700–708. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1996.270.4.F700>.
- Lin, Jessica J., and Alice T. Shaw. 2017. 'Recent Advances in Targeting ROS1 in Lung Cancer'. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 12 (11): 1611–25. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.08.002>.
- Liu, Jin, Mikael Agopiantz, Joël Poupon, Zherui Wu, Pierre-Alexandre Just, Bruno Borghese, Evelyne Ségal-Bendirdjian, Guillaume Gauchotte, Anne Gompel, and Patricia Forgez. 2017. 'Neurotensin Receptor 1 Antagonist SR48692 Improves Response to Carboplatin by Enhancing Apoptosis and Inhibiting Drug Efflux in Ovarian Cancer'. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 23 (21): 6516–28. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0861>.
- Liu, Stephen V., D. Ross Camidge, Scott N. Gettinger, Giuseppe Giaccone, Rebecca S. Heist, F. Stephen Hodi, Neal E. Ready, et al. 2018. 'Long-Term Survival Follow-up of Atezolizumab in Combination with Platinum-Based Doublet Chemotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer'. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 101 (September): 114–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.06.033>.
- Liu, Yiwei, Zhengwei Dong, Tao Jiang, Likun Hou, Fengying Wu, Guanghui Gao, Yayi He, et al. 2018. 'Heterogeneity of PD-L1 Expression Among the Different Histological Components and Metastatic Lymph Nodes in Patients With Resected Lung Adenosquamous Carcinoma'. *Clinical Lung Cancer* 19 (4): e421–30. <https://doi.org/10.1016/j.clc.2018.02.008>.
- Lloyd, J. W. 1971. 'Long-Term Mortality Study of Steelworkers. V. Respiratory Cancer in Coke Plant Workers'. *Journal of Occupational Medicine.: Official Publication of the Industrial Medical Association* 13 (2): 53–68.
- Locher, Chrystèle, Didier Debievre, Daniel Coëtmeur, François Goupil, Olivier Molinier, Thierry Collon, Charles Dayen, et al. 2013. 'Major Changes in Lung Cancer over the Last Ten Years in France: The KBP-CPHG Studies'. *Lung Cancer* 81 (1): 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.03.001>.
- Lortet-Tieulent, Joannie, Elisenda Renteria, Linda Sharp, Elisabete Weiderpass, Harry Comber, Paul Baas, Freddie Bray, Jan Willem Coebergh, and Isabelle Soerjomataram. 2015. 'Convergence of Decreasing Male and Increasing Female Incidence Rates in Major Tobacco-Related Cancers in Europe in 1988-2010'. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 51 (9): 1144–63. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.10.014>.

- Lynch, Thomas J., Daphne W. Bell, Raffaella Sordella, Sarada Gurubhagavatula, Ross A. Okimoto, Brian W. Brannigan, Patricia L. Harris, et al. 2004. 'Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib'. *The New England Journal of Medicine* 350 (21): 2129–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>.
- Maleki Vareki, Saman, Carmen Garrigós, and Ignacio Duran. 2017. 'Biomarkers of Response to PD-1/PD-L1 Inhibition'. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 116 (August): 116–24. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.06.001>.
- Mansuet-Lupo, Audrey, Marc Barritault, Marco Alifano, Aurélie Janet-Vendroux, Makmoud Zarmaev, Jérôme Biton, Yoan Velut, et al. 2019. 'Proposal for a Combined Histomolecular Algorithm to Distinguish Multiple Primary Adenocarcinomas from Intrapulmonary Metastasis in Patients with Multiple Lung Tumors'. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 14 (5): 844–56. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.01.017>.
- Mascaux, C., N. Iannino, B. Martin, M. Paesmans, T. Berghmans, M. Dusart, A. Haller, et al. 2005. 'The Role of RAS Oncogene in Survival of Patients with Lung Cancer: A Systematic Review of the Literature with Meta-Analysis'. *British Journal of Cancer* 92 (1): 131–39. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602258>.
- Masumi, Atsuko. 2013. 'Hematopoietic Stem Cells and Response to Interferon'. *Stem Cell Biology in Normal Life and Diseases*, May. <https://doi.org/10.5772/54689>.
- Matakidou, A., T. Eisen, and R. S. Houlston. 2005. 'Systematic Review of the Relationship between Family History and Lung Cancer Risk'. *British Journal of Cancer* 93 (7): 825–33. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602769>.
- Mayne, S. T., J. Buenconsejo, and D. T. Janerich. 1999. 'Familial Cancer History and Lung Cancer Risk in United States Nonsmoking Men and Women'. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 8 (12): 1065–69.
- McCormack, Valerie A., Antonio Agudo, Christina C. Dahm, Kim Overvad, Anja Olsen, Anne Tjønneland, Rudolf Kaaks, et al. 2010. 'Cigar and Pipe Smoking and Cancer Risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)'. *International Journal of Cancer* 127 (10): 2402–11. <https://doi.org/10.1002/ijc.25252>.
- McDonald, J. Corbett, Alison D. McDonald, Janet M. Hughes, Roy J. Rando, and Hans Weill. 2005. 'Mortality from Lung and Kidney Disease in a Cohort of North American Industrial Sand Workers: An Update'. *The Annals of Occupational Hygiene* 49 (5): 367–73. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mei001>.
- Meerbeek, Jan P. van, Gijs W. P. M. Kramer, Paul E. Y. Van Schil, Catherine Legrand, Egbert F. Smit, Franz Schramel, Vivianne C. Tjan-Heijnen, et al. 2007. 'Randomized Controlled Trial of Resection versus Radiotherapy after Induction Chemotherapy in Stage IIIA-N2 Non-Small-Cell Lung Cancer'. *Journal of the National Cancer Institute* 99 (6): 442–50. <https://doi.org/10.1093/jnci/djk093>.
- Mei, Ping, Konstantin Shilo, Lai Wei, Rulong Shen, Dena Tonkovich, and Zaibo Li. 2019. 'Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Cytologic and Surgical Non-Small Cell Lung Carcinoma Specimens from a Single Institution: Association with Clinicopathologic Features and Molecular Alterations'. *Cancer Cytopathology* 127 (7): 447–57. <https://doi.org/10.1002/cncy.22140>.
- Melander, Olle, Alan S. Maisel, Peter Almgren, Jonas Manjer, Mattias Belting, Bo Hedblad, Gunnar Engström, et al. 2012. 'Plasma Proneurotensin and Incidence of Diabetes, Cardiovascular Disease, Breast Cancer, and Mortality'. *JAMA* 308 (14): 1469–75. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.12998>.
- Mesnage, S. J. L., A. Auguste, C. Genestie, A. Dunant, E. Pain, F. Drusch, S. Gouy, et al. 2017. 'Neoadjuvant Chemotherapy (NACT) Increases Immune Infiltration and Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Expression in Epithelial Ovarian Cancer (EOC)'. *Annals of Oncology: Official*

- Journal of the European Society for Medical Oncology* 28 (3): 651–57.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdw625>.
- Milette, Simon, Pierre O. Fiset, Logan A. Walsh, Jonathan D. Spicer, and Daniela F. Quail. 2019. 'The Innate Immune Architecture of Lung Tumors and Its Implication in Disease Progression'. *The Journal of Pathology* 247 (5): 589–605. <https://doi.org/10.1002/path.5241>.
- Mittal, Deepak, Matthew M. Gubin, Robert D. Schreiber, and Mark J. Smyth. 2014. 'New Insights into Cancer Immunoediting and Its Three Component Phases--Elimination, Equilibrium and Escape'. *Current Opinion in Immunology* 27 (April): 16–25.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>.
- Mittendorf, Elizabeth A., Anne V. Philips, Funda Meric-Bernstam, Na Qiao, Yun Wu, Susan Harrington, Xiaoping Su, et al. 2014. 'PD-L1 Expression in Triple-Negative Breast Cancer'. *Cancer Immunology Research* 2 (4): 361–70. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0127>.
- Mittrücker, Hans-Willi, Alexander Visekruna, and Magdalena Huber. 2014. 'Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8⁺ T Cells'. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 62 (6): 449–58. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>.
- Mok, Tony S., Yi-Long Wu, Sumitra Thongprasert, Chih-Hsin Yang, Da-Tong Chu, Nagahiro Saijo, Patrapim Sunpaweravong, et al. 2009. 'Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma'. *New England Journal of Medicine* 361 (10): 947–57.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810699>.
- Muggia, Franco M., Andrea Bonetti, James D. Hoeschele, Marcel Rozenzweig, and Stephen B. Howell. 2015. 'Platinum Antitumor Complexes: 50 Years Since Barnett Rosenberg's Discovery'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (35): 4219–26. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.60.7481>.
- Munari, Enrico, Giuseppe Zamboni, Gianluigi Lunardi, Luigi Marchionni, Marcella Marconi, Marco Sommaggio, Matteo Brunelli, et al. 2018. 'PD-L1 Expression Heterogeneity in Non-Small Cell Lung Cancer: Defining Criteria for Harmonization between Biopsy Specimens and Whole Sections'. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 13 (8): 1113–20. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.04.017>.
- Nadai, F. de, C. Rovère, J. N. Bidard, J. C. Cuber, A. Beaudet, and P. Kitabgi. 1994. 'Post-Translational Processing of the Neurotensin/Neuromedin N Precursor in the Central Nervous System of the Rat--I. Biochemical Characterization of Maturation Products'. *Neuroscience* 60 (1): 159–66.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90211-9).
- Najafi, Masoud, Nasser Hashemi Goradel, Bagher Farhood, Eniseh Salehi, Maryam Shabani Nashtaei, Neda Khanlarkhani, Zahra Khezri, et al. 2019. 'Macrophage Polarity in Cancer: A Review'. *Journal of Cellular Biochemistry* 120 (3): 2756–65. <https://doi.org/10.1002/jcb.27646>.
- Najimi, M., F. Souazé, M. Méndez, E. Hermans, T. Berbar, W. Rostène, and P. Forgez. 1998. 'Activation of Receptor Gene Transcription Is Required to Maintain Cell Sensitization after Agonist Exposure. Study on Neurotensin Receptor'. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (34): 21634–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21634>.
- National Lung Screening Trial Research Team, Timothy R. Church, William C. Black, Denise R. Aberle, Christine D. Berg, Kathy L. Clingan, Fenghai Duan, et al. 2013. 'Results of Initial Low-Dose Computed Tomographic Screening for Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 368 (21): 1980–91. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209120>.
- Newhouse, M. L., and G. Berry. 1979. 'Patterns of Mortality in Asbestos Factory Workers in London'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 330: 53–60. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1979.tb18709.x>.
- Ng, Hoi Yan, Jian Li, Lihua Tao, Alfred King-Yin Lam, Kwok Wah Chan, Josephine Mun Yee Ko, Valen Zhuoyou Yu, Michael Wong, Benjamin Li, and Maria Li Lung. 2018. 'Chemotherapeutic Treatments Increase PD-L1 Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma through EGFR/ERK Activation'. *Translational Oncology* 11 (6): 1323–33.
<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.08.005>.

- Ng, T. P. 1994. 'Silica and Lung Cancer: A Continuing Controversy'. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 23 (5): 752–55.
- Nishimura, H., M. Nose, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. 1999. 'Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor'. *Immunity* 11 (2): 141–51. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80089-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80089-8).
- Oberdörster, Günter. 2000. 'Pulmonary Effects of Inhaled Ultrafine Particles'. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 74 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1007/s004200000185>.
- Oberoi, Hardeep S., Natalia V. Nukolova, Alexander V. Kabanov, and Tatiana K. Bronich. 2013. 'Nanocarriers for Delivery of Platinum Anticancer Drugs'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (13–14): 1667–85. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.014>.
- O'Donnell, Jake S., Michele W. L. Teng, and Mark J. Smyth. 2019. 'Cancer Immunoediting and Resistance to T Cell-Based Immunotherapy'. *Nature Reviews. Clinical Oncology* 16 (3): 151–67. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>.
- Office of the Surgeon General, Assistant Secretary for Health (ASH). 2019. 'Tobacco Reports And Publications'. Text. HHS.Gov. 5 April 2019. <https://www.hhs.gov/surgeongeneral/reports-and-publications/tobacco/index.html>.
- Ohtaki, Yoichi, Kyoichi Kaira, Jun Atsumi, Toshiteru Nagashima, Osamu Kawashima, Takashi Ibe, Mitsuhiro Kamiyoshihara, et al. 2018. 'Prognostic Significance of PD-L1 Expression and Tumor Infiltrating Lymphocytes in Large Cell Neuroendocrine Carcinoma of Lung'. *American Journal of Translational Research* 10 (10): 3243.
- Ohtaki, Yoichi, Kimihiro Shimizu, Seiichi Kakegawa, Toshiteru Nagashima, Tetsuhiro Nakano, Jun Atsumi, Yasuaki Enokida, et al. 2014. 'Postrecurrence Survival of Surgically Resected Pulmonary Adenocarcinoma Patients According to EGFR and KRAS Mutation Status'. *Molecular and Clinical Oncology* 2 (2): 187–96. <https://doi.org/10.3892/mco.2013.237>.
- Okita, Riki, Ai Maeda, Katsuhiko Shimizu, Yuji Nojima, Shinsuke Saisho, and Masao Nakata. 2017. 'PD-L1 Overexpression Is Partially Regulated by EGFR/HER2 Signaling and Associated with Poor Prognosis in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer'. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 66 (7): 865–76. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-1986-y>.
- Olaussen, Ken A., Julien Adam, Elsa Vanhecke, Philippe Vielh, Robert Pirker, Luc Friboulet, Helmut Popper, et al. 2013. 'PARP1 Impact on DNA Repair of Platinum Adducts: Preclinical and Clinical Read-Outs'. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 80 (2): 216–22. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.01.014>.
- Olaussen, Ken André, David Planchard, Julien Adam, and Jean-Charles Soria. 2011. '[DNA repair pathways and non-small cell lung cancer: clinical perspectives]'. *Bulletin Du Cancer* 98 (3): 305–22. <https://doi.org/10.1684/bdc.2011.1327>.
- Osarogiagbon, Raymond U., Jeffrey W. Allen, Amer Farooq, and James T. Wu. 2012. 'Objective Review of Mediastinal Lymph Node Examination in a Lung Cancer Resection Cohort'. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 7 (2): 390–96. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31823e5e2d>.
- Ostrand-Rosenberg, Suzanne, Lucas A. Horn, and Juan A. Alvarez. 2015. 'Novel Strategies for Inhibiting PD-1 Pathway-Mediated Immune Suppression While Simultaneously Delivering Activating Signals to Tumor-Reactive T Cells'. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 64 (10): 1287–93. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1677-5>.
- Parascandola, Mark, and Lin Xiao. 2019. 'Tobacco and the Lung Cancer Epidemic in China'. *Translational Lung Cancer Research* 8 (Suppl 1): S21–30. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2019.03.12>.
- Pardoll, Drew M. 2012. 'The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy'. *Nature Reviews. Cancer* 12 (4): 252–64. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>.
- Pawel, J. von, R. Bordoni, M. Satouchi, L. Fehrenbacher, M. Cobo, J. Y. Han, T. Hida, et al. 2019. 'Long-Term Survival in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Treated with

- Atezolizumab versus Docetaxel: Results from the Randomised Phase III OAK Study'. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 107 (January): 124–32.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.11.020>.
- Paz-Ares, Luis, Alexander Luft, David Vicente, Ali Tafreshi, Mahmut Gümüş, Julien Mazières, Barbara Hermes, et al. 2018. 'Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 379 (21): 2040–51.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1810865>.
- Pece, Salvatore, and J. Silvio Gutkind. 2000. 'Signaling from E-Cadherins to the MAPK Pathway by the Recruitment and Activation of Epidermal Growth Factor Receptors upon Cell-Cell Contact Formation'. *Journal of Biological Chemistry* 275 (52): 41227–33.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M006578200>.
- Pelaprat, Didier. 2006. 'Interactions between Neurotensin Receptors and G Proteins'. *Peptides* 27 (10): 2476–87. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.04.027>.
- Penault-Llorca, Frédérique, Lucie Tixier, Loïc Perrot, and Anne Cayre. 2016. '[Strategy for molecular testing in pulmonary carcinoma]'. *Annales De Pathologie* 36 (1): 73–79.
<https://doi.org/10.1016/j.annpat.2015.11.005>.
- Peranzoni, Elisa, Jean Lemoine, Lene Vimeux, Vincent Feuillet, Sarah Barrin, Chahrazade Kantari-Mimoun, Nadège Bercovici, et al. 2018. 'Macrophages Impede CD8 T Cells from Reaching Tumor Cells and Limit the Efficacy of Anti-PD-1 Treatment'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (17): E4041–50.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1720948115>.
- Perez-Gracia, Jose Luis, Sara Labiano, Maria E. Rodriguez-Ruiz, Miguel F. Sanmamed, and Ignacio Melero. 2014. 'Orchestrating Immune Check-Point Blockade for Cancer Immunotherapy in Combinations'. *Current Opinion in Immunology* 27 (April): 89–97.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.002>.
- Petitprez, Florent, Aurélien de Reyniès, Emily Z. Keung, Tom Wei-Wu Chen, Cheng-Ming Sun, Julien Calderaro, Yung-Ming Jeng, et al. 2020. 'B Cells Are Associated with Survival and Immunotherapy Response in Sarcoma'. *Nature* 577 (7791): 556–60.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1906-8>.
- Platonova, Sophia, Julien Cherfils-Vicini, Diane Damotte, Lucile Crozet, Vincent Vieillard, Pierre Validire, Pascale André, et al. 2011. 'Profound Coordinated Alterations of Intratumoral NK Cell Phenotype and Function in Lung Carcinoma'. *Cancer Research* 71 (16): 5412–22.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4179>.
- Pope, C. Arden, Richard T. Burnett, Michael J. Thun, Eugenia E. Calle, Daniel Krewski, Kazuhiko Ito, and George D. Thurston. 2002. 'Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-Term Exposure to Fine Particulate Air Pollution'. *JAMA* 287 (9): 1132–41.
<https://doi.org/10.1001/jama.287.9.1132>.
- Postmus, P. E., K. M. Kerr, M. Oudkerk, S. Senan, D. A. Waller, J. Vansteenkiste, C. Escriu, S. Peters, and ESMO Guidelines Committee. 2017. 'Early and Locally Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up'. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 28 (suppl_4): iv1–21. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx222>.
- Probst, Hans Christian, Kathy McCoy, Taku Okazaki, Tasuku Honjo, and Maries van den Broek. 2005. 'Resting Dendritic Cells Induce Peripheral CD8+ T Cell Tolerance through PD-1 and CTLA-4'. *Nature Immunology* 6 (3): 280–86. <https://doi.org/10.1038/ni1165>.
- Qu, Yan-Liang, Jun Liu, Li-Xin Zhang, Chun-Min Wu, Ai-Jie Chu, Bao-Lei Wen, Chao Ma, et al. 2017. 'Asthma and the Risk of Lung Cancer: A Meta-Analysis'. *Oncotarget* 8 (7): 11614–20.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.14595>.
- Quaranta, Valeria, and Michael C. Schmid. 2019. 'Macrophage-Mediated Subversion of Anti-Tumour Immunity'. *Cells* 8 (7). <https://doi.org/10.3390/cells8070747>.

- Rabik, Cara A., and M. Eileen Dolan. 2007. 'Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents'. *Cancer Treatment Reviews* 33 (1): 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2006.09.006>.
- Ragusa, Mark, Jacopo Vannucci, Vienna Ludovini, Fortunato Bianconi, Stefano Treggiari, Francesca R. Tofanetti, Antonella Flacco, et al. 2014. 'Impact of Epidermal Growth Factor Receptor and KRAS Mutations on Clinical Outcome in Resected Non-Small Cell Lung Cancer Patients'. *American Journal of Clinical Oncology* 37 (4): 343–49. <https://doi.org/10.1097/COC.0b013e31827a7e7a>.
- Ramnath, Nithya, Thomas J. Dilling, Loren J. Harris, Anthony W. Kim, Gaetane C. Michaud, Alex A. Balekian, Rebecca Diekemper, Frank C. Detterbeck, and Douglas A. Arenberg. 2013. 'Treatment of Stage III Non-Small Cell Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines'. *Chest* 143 (5 Suppl): e314S–e340S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2360>.
- Rashidi, B., M. Yang, P. Jiang, E. Baranov, Z. An, X. Wang, A. R. Moossa, and R. M. Hoffman. 2000. 'A Highly Metastatic Lewis Lung Carcinoma Orthotopic Green Fluorescent Protein Model'. *Clinical & Experimental Metastasis* 18 (1): 57–60.
- Reck, Martin, Delvys Rodríguez-Abreu, Andrew G. Robinson, Rina Hui, Tibor Csősz, Andrea Fülöp, Maya Gottfried, et al. 2016. 'Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 375 (19): 1823–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>.
- Remark, Romain, Christian Becker, Jorge E. Gomez, Diane Damotte, Marie-Caroline Dieu-Nosjean, Catherine Sautès-Fridman, Wolf-Herman Fridman, et al. 2015. 'The Non-Small Cell Lung Cancer Immune Contexture. A Major Determinant of Tumor Characteristics and Patient Outcome'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 191 (4): 377–90. <https://doi.org/10.1164/rccm.201409-1671PP>.
- Remark, Romain, Audrey Lupo, Marco Alifano, Jerome Biton, Hanane Ouakrim, Alessandro Stefani, Isabelle Cremer, et al. 2016. 'Immune Contexture and Histological Response after Neoadjuvant Chemotherapy Predict Clinical Outcome of Lung Cancer Patients'. *Oncoimmunology* 5 (12): e1255394. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1255394>.
- Ritprajak, Patcharee, and Miyuki Azuma. 2015. 'Intrinsic and Extrinsic Control of Expression of the Immunoregulatory Molecule PD-L1 in Epithelial Cells and Squamous Cell Carcinoma'. *Oral Oncology* 51 (3): 221–28. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.11.014>.
- Rodewald, Hans-Reimer. 2008. 'Thymus Organogenesis'. *Annual Review of Immunology* 26: 355–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090408>.
- Rosell, Rafael, Teresa Moran, Cristina Queralt, Rut Porta, Felipe Cardenal, Carlos Camps, Margarita Majem, et al. 2009. 'Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 361 (10): 958–67. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904554>.
- Rosell, Rafael, Miguel Taron, Agusti Barnadas, Giorgio Scagliotti, Carme Sarries, and Barbara Roig. 2003. 'Nucleotide Excision Repair Pathways Involved in Cisplatin Resistance in Non-Small-Cell Lung Cancer'. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center* 10 (4): 297–305. <https://doi.org/10.1177/107327480301000404>.
- Rosenberger, Albert, Heike Bickeböller, Valerie McCormack, Darren R. Brenner, Eric J. Duell, Anne Tjønneland, Soren Friis, et al. 2012. 'Asthma and Lung Cancer Risk: A Systematic Investigation by the International Lung Cancer Consortium'. *Carcinogenesis* 33 (3): 587–97. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr307>.
- Rostène, W. H., and M. J. Alexander. 1997. 'Neurotensin and Neuroendocrine Regulation'. *Frontiers in Neuroendocrinology* 18 (2): 115–73. <https://doi.org/10.1006/frne.1996.0146>.
- Rowley, Donald A., and Frank W. Fitch. 2012. 'The Road to the Discovery of Dendritic Cells, a Tribute to Ralph Steinman'. *Cellular Immunology* 273 (2): 95–98. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.01.002>.

- Ruffini, Enrico, Sofia Asioli, Pier Luigi Filosso, Paraskevas Lyberis, Maria Cristina Bruna, Luigia Macrì, Lorenzo Daniele, and Alberto Oliaro. 2009. 'Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Neoplasms'. *The Annals of Thoracic Surgery* 87 (2): 365–71; discussion 371-372. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2008.10.067>.
- Ruppert, A.-M., N. Rozensztajn, T. Viera, M. Antoine, A. Lavolé, J. Cadranel, and M. Wislez. 2015. 'Cancer bronchique et inflammation'. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités* 7 (4): 554–63. [https://doi.org/10.1016/S1877-1203\(16\)30040-4](https://doi.org/10.1016/S1877-1203(16)30040-4).
- Russo, Mariangela, Giulia Siravegna, Lawrence S. Blaszkowsky, Giorgio Corti, Giovanni Crisafulli, Leanne G. Ahronian, Benedetta Mussolin, et al. 2016. 'Tumor Heterogeneity and Lesion-Specific Response to Targeted Therapy in Colorectal Cancer'. *Cancer Discovery* 6 (2): 147–53. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1283>.
- Salaun, Bruno, Blandine de Saint-Vis, Nathalie Pacheco, Yves Pacheco, Arnaud Riesler, Sylvie Isaac, Caroline Leroux, et al. 2004. 'CD208/Dendritic Cell-Lysosomal Associated Membrane Protein Is a Marker of Normal and Transformed Type II Pneumocytes'. *The American Journal of Pathology* 164 (3): 861–71. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63174-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63174-4).
- Sandler, Alan, Robert Gray, Michael C. Perry, Julie Brahmer, Joan H. Schiller, Afshin Dowlati, Rogerio Lilenbaum, and David H. Johnson. 2006. 'Paclitaxel-Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 355 (24): 2542–50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061884>.
- Sangai, Takafumi, Argun Akcakanat, Huiqin Chen, Emily Tarco, Yun Wu, Kim-Anh Do, Todd W. Miller, et al. 2012. 'Biomarkers of Response to Akt Inhibitor MK-2206 in Breast Cancer'. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (20): 5816–28. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1141>.
- Sarris, Evangelos G., Muhammad W. Saif, and Kostas N. Syrigos. 2012. 'The Biological Role of PI3K Pathway in Lung Cancer'. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 5 (11): 1236–64. <https://doi.org/10.3390/ph5111236>.
- Scagliotti, Giorgio Vittorio, Purvish Parikh, Joachim von Pawel, Bonne Biesma, Johan Vansteenkiste, Christian Manegold, Piotr Serwatowski, et al. 2008. 'Phase III Study Comparing Cisplatin plus Gemcitabine with Cisplatin plus Pemetrexed in Chemotherapy-Naive Patients with Advanced-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (21): 3543–51. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0375>.
- Scheel, Andreas H., Sascha Ansén, Anne M. Schultheis, Matthias Scheffler, Rieke N. Fischer, Sebastian Michels, Martin Hellmich, et al. 2016. 'PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer: Correlations with Genetic Alterations'. *Oncoimmunology* 5 (5): e1131379. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1131379>.
- Schubert, Mitchell L. 2008. 'Hormonal Regulation of Gastric Acid Secretion'. *Current Gastroenterology Reports* 10 (6): 523–27. <https://doi.org/10.1007/s11894-008-0097-5>.
- Schwartz, A. G., P. Yang, and G. M. Swanson. 1996. 'Familial Risk of Lung Cancer among Nonsmokers and Their Relatives'. *American Journal of Epidemiology* 144 (6): 554–62. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a008965>.
- Schwartz, Ann G., and Michele L. Cote. 2016. 'Epidemiology of Lung Cancer'. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 893: 21–41. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_2.
- Schweiger, Thomas, Anna Sophie Berghoff, Christoph Glogner, Olaf Glueck, Orsolya Rajky, Denise Traxler, Peter Birner, Matthias Preusser, Walter Klepetko, and Konrad Hoetzenecker. 2016. 'Tumor-Infiltrating Lymphocyte Subsets and Tertiary Lymphoid Structures in Pulmonary Metastases from Colorectal Cancer'. *Clinical & Experimental Metastasis* 33 (7): 727–39. <https://doi.org/10.1007/s10585-016-9813-y>.
- Seder, R. A., and W. E. Paul. 1994. 'Acquisition of Lymphokine-Producing Phenotype by CD4+ T Cells'. *Annual Review of Immunology* 12: 635–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.003223>.

- Seidah, Nabil G., and Annik Prat. 2012. 'The Biology and Therapeutic Targeting of the Proprotein Convertases'. *Nature Reviews. Drug Discovery* 11 (5): 367–83. <https://doi.org/10.1038/nrd3699>.
- Sekine, Yasuo, Atsushi Hata, Eitetsu Koh, and Kenzo Hiroshima. 2014. 'Lung Carcinogenesis from Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Characteristics of Lung Cancer from COPD and Contribution of Signal Transducers and Lung Stem Cells in the Inflammatory Microenvironment'. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery* 62 (7): 415–21. <https://doi.org/10.1007/s11748-014-0386-x>.
- Sekine, Yasuo, Hideki Katsura, Eitetsu Koh, Kenzo Hiroshima, and Takehiko Fujisawa. 2012. 'Early Detection of COPD Is Important for Lung Cancer Surveillance'. *The European Respiratory Journal* 39 (5): 1230–40. <https://doi.org/10.1183/09031936.00126011>.
- Seo, N., and Y. Tokura. 1999. 'Downregulation of Innate and Acquired Antitumor Immunity by Bystander Gammadelta and Alphabeta T Lymphocytes with Th2 or Tr1 Cytokine Profiles'. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 19 (6): 555–61. <https://doi.org/10.1089/107999099313686>.
- Sequist, Lecia V., Daphne W. Bell, Thomas J. Lynch, and Daniel A. Haber. 2007. 'Molecular Predictors of Response to Epidermal Growth Factor Receptor Antagonists in Non-Small-Cell Lung Cancer'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (5): 587–95. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.3585>.
- Sequist, Lecia V., Renato G. Martins, David Spigel, Steven M. Grunberg, Alexander Spira, Pasi A. Jänne, Victoria A. Joshi, et al. 2008. 'First-Line Gefitinib in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Somatic EGFR Mutations'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (15): 2442–49. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.8494>.
- Sequist, Lecia V., Belinda A. Waltman, Dora Dias-Santagata, Subba Digumarthy, Alexa B. Turke, Panos Fidias, Kristin Bergethon, et al. 2011. 'Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors'. *Science Translational Medicine* 3 (75): 75ra26. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002003>.
- Shaw, Alice T., Beow Y. Yeap, Mari Mino-Kenudson, Subba R. Digumarthy, Daniel B. Costa, Rebecca S. Heist, Benjamin Solomon, et al. 2009. 'Clinical Features and Outcome of Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (26): 4247–53. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.6993>.
- Shi, Li, Shaohua Chen, Lijian Yang, and Yangqiu Li. 2013. 'The Role of PD-1 and PD-L1 in T-Cell Immune Suppression in Patients with Hematological Malignancies'. *Journal of Hematology & Oncology* 6 (1): 74. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-74>.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, and Ahmedin Jemal. 2018. 'Cancer Statistics, 2018'. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (1): 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>.
- Siemiatycki, J., R. Dewar, L. Nadon, and M. Gérin. 1994. 'Occupational Risk Factors for Bladder Cancer: Results from a Case-Control Study in Montreal, Quebec, Canada'. *American Journal of Epidemiology* 140 (12): 1061–80. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a117207>.
- Simonato, L., A. Agudo, W. Ahrens, E. Benhamou, S. Benhamou, P. Boffetta, P. Brennan, et al. 2001. 'Lung Cancer and Cigarette Smoking in Europe: An Update of Risk Estimates and an Assessment of Inter-Country Heterogeneity'. *International Journal of Cancer* 91 (6): 876–87.
- Singh, Tushar, René A. Arrazola, Catherine G. Corey, Corinne G. Husten, Linda J. Neff, David M. Homa, and Brian A. King. 2016. 'Tobacco Use Among Middle and High School Students--United States, 2011-2015'. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 65 (14): 361–67. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6514a1>.
- Smith, A. H., P. A. Lopipero, and V. R. Barroga. 1995. 'Meta-Analysis of Studies of Lung Cancer among Silicotics'. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 6 (6): 617–24. <https://doi.org/10.1097/00001648-199511000-00010>.

- Socinski, Mark A., Tracey Evans, Scott Gettinger, Thomas A. Hensing, Lecia VanDam Sequist, Belinda Ireland, and Thomas E. Stinchcombe. 2013. 'Treatment of Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines'. *Chest* 143 (5 Suppl): e341S-e368S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2361>.
- Soda, Manabu, Young Lim Choi, Munehiro Enomoto, Shuji Takada, Yoshihiro Yamashita, Shunpei Ishikawa, Shin-ichiro Fujiwara, et al. 2007. 'Identification of the Transforming EML4-ALK Fusion Gene in Non-Small-Cell Lung Cancer'. *Nature* 448 (7153): 561–66. <https://doi.org/10.1038/nature05945>.
- Solomon, Benjamin J., Tony Mok, Dong-Wan Kim, Yi-Long Wu, Kazuhiko Nakagawa, Tarek Mekhail, Enriqueta Felip, et al. 2014. 'First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK-Positive Lung Cancer'. *New England Journal of Medicine* 371 (23): 2167–77. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408440>.
- Souazé, Frédérique, Sandra Dupouy, Véronique Viardot-Foucault, Erik Bruyneel, Samir Attoub, Christian Gespach, Anne Gompel, and Patricia Forgez. 2006. 'Expression of Neurotensin and NT1 Receptor in Human Breast Cancer: A Potential Role in Tumor Progression'. *Cancer Research* 66 (12): 6243–49. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0450>.
- Souazé, Frédérique, Véronique Viardot-Foucault, Nicolas Rouillet, Mireille Toy-Miou-Leong, Anne Gompel, Erik Bruyneel, Eva Comperat, et al. 2006. 'Neurotensin Receptor 1 Gene Activation by the Tcf/Beta-Catenin Pathway Is an Early Event in Human Colonic Adenomas'. *Carcinogenesis* 27 (4): 708–16. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi269>.
- Stefani, Alessandro, Marco Alifano, Antonio Bobbio, Madalina Grigoriu, Rami Jouni, Pierre Magdeleinat, and Jean-Francois Regnard. 2010. 'Which Patients Should Be Operated on after Induction Chemotherapy for N2 Non-Small Cell Lung Cancer? Analysis of a 7-Year Experience in 175 Patients'. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 140 (2): 356–63. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2010.02.018>.
- Steinman, Lawrence. 2007. 'A Brief History of T(H)17, the First Major Revision in the T(H)1/T(H)2 Hypothesis of T Cell-Mediated Tissue Damage'. *Nature Medicine* 13 (2): 139–45. <https://doi.org/10.1038/nm1551>.
- Steinman, Ralph M., and Jacques Banchereau. 2007. 'Taking Dendritic Cells into Medicine'. *Nature* 449 (7161): 419–26. <https://doi.org/10.1038/nature06175>.
- Su, Kang-Yi, Hsuan-Yu Chen, Ker-Chau Li, Min-Liang Kuo, James Chih-Hsin Yang, Wing-Kai Chan, Bing-Ching Ho, et al. 2012. 'Pretreatment Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) T790M Mutation Predicts Shorter EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Response Duration in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (4): 433–40. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.3224>.
- Suda, Kenichi, Jihye Kim, Isao Murakami, Leslie Rozeboom, Masaki Shimoji, Shigeki Shimizu, Christopher J. Rivard, Tetsuya Mitsudomi, Aik-Choon Tan, and Fred R. Hirsch. 2018. 'Innate Genetic Evolution of Lung Cancers and Spatial Heterogeneity: Analysis of Treatment-Naïve Lesions'. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 13 (10): 1496–1507. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.05.039>.
- Takeda, Maiko, Takahiko Kasai, Maiko Naito, Akihiro Tamiya, Yoshihiko Taniguchi, Nobuhiko Saijo, Yoko Naoki, et al. 2019. 'Programmed Death-Ligand 1 Expression With Clone 22C3 in Non-Small Cell Lung Cancer: A Single Institution Experience'. *Clinical Medicine Insights. Oncology* 13: 1179554918821314. <https://doi.org/10.1177/1179554918821314>.
- Takeuchi, Kengo, Young Lim Choi, Manabu Soda, Kentaro Inamura, Yuki Togashi, Satoko Hatano, Munehiro Enomoto, et al. 2008. 'Multiplex Reverse Transcription-PCR Screening for EML4-ALK Fusion Transcripts'. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14 (20): 6618–24. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1018>.

- Teng, Michele W. L., Jerome Galon, Wolf-Herman Fridman, and Mark J. Smyth. 2015. 'From Mice to Humans: Developments in Cancer Immunoediting'. *The Journal of Clinical Investigation* 125 (9): 3338–46. <https://doi.org/10.1172/JCI80004>.
- Terunuma, Hiroshi, Xuewen Deng, Zahidunnabi Dewan, Shigeyoshi Fujimoto, and Naoki Yamamoto. 2008. 'Potential Role of NK Cells in the Induction of Immune Responses: Implications for NK Cell-Based Immunotherapy for Cancers and Viral Infections'. *International Reviews of Immunology* 27 (3): 93–110. <https://doi.org/10.1080/08830180801911743>.
- Thun, M. J., C. A. Lally, J. T. Flannery, E. E. Calle, W. D. Flanders, and C. W. Heath. 1997. 'Cigarette Smoking and Changes in the Histopathology of Lung Cancer'. *Journal of the National Cancer Institute* 89 (21): 1580–86. <https://doi.org/10.1093/jnci/89.21.1580>.
- Toy-Miou-Leong, Mireille, Catherine Llorens Cortes, Alain Beaudet, William Rostène, and Patricia Forgez. 2004. 'Receptor Trafficking via the Perinuclear Recycling Compartment Accompanied by Cell Division Is Necessary for Permanent Neurotensin Cell Sensitization and Leads to Chronic Mitogen-Activated Protein Kinase Activation'. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (13): 12636–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303384200>.
- Tran, Eric, Simon Turcotte, Alena Gros, Paul F. Robbins, Yong-Chen Lu, Mark E. Dudley, John R. Wunderlich, et al. 2014. 'Cancer Immunotherapy Based on Mutation-Specific CD4+ T Cells in a Patient with Epithelial Cancer'. *Science (New York, N.Y.)* 344 (6184): 641–45. <https://doi.org/10.1126/science.1251102>.
- Tran, Linda, Clint T. Allen, Roy Xiao, Ellen Moore, Ruth Davis, So-Jin Park, Katie Spielbauer, Carter Van Waes, and Nicole C. Schmitt. 2017. 'Cisplatin Alters Antitumor Immunity and Synergizes with PD-1/PD-L1 Inhibition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma'. *Cancer Immunology Research* 5 (12): 1141–51. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0235>.
- Travis, William D., Elisabeth Brambilla, Andrew G. Nicholson, Yasushi Yatabe, John H. M. Austin, Mary Beth Beasley, Lucian. R. Chirieac, et al. 2015. 'The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification'. *Journal of Thoracic Oncology* 10 (9): 1243–60. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>.
- Travis, William D., Elisabeth Brambilla, Masayuki Noguchi, Andrew G. Nicholson, Kim R. Geisinger, Yasushi Yatabe, David G. Beer, et al. 2011. 'International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma'. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6 (2): 244–85. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318206a221>.
- Trichopoulos, D., A. Kalandidi, L. Sparros, and B. MacMahon. 1981. 'Lung Cancer and Passive Smoking'. *International Journal of Cancer* 27 (1): 1–4.
- Uruga, Hironori, Emine Bozkurtlar, Tiffany G. Huynh, Alona Muzikansky, Yasushi Goto, Maria Gomez-Caraballo, Aaron N. Hata, et al. 2017. 'Programmed Cell Death Ligand (PD-L1) Expression in Stage II and III Lung Adenocarcinomas and Nodal Metastases'. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 12 (3): 458–66. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.10.015>.
- Van der Heyden, J. H. A., M. M. Schaap, A. E. Kunst, S. Esnaola, C. Borrell, B. Cox, M. Leinsalu, et al. 2009. 'Socioeconomic Inequalities in Lung Cancer Mortality in 16 European Populations'. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 63 (3): 322–30. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.06.006>.
- Vangipuram, Ramya, and Stephen K. Tyring. 2019. 'AIDS-Associated Malignancies'. *Cancer Treatment and Research* 177: 1–21. https://doi.org/10.1007/978-3-030-03502-0_1.
- Vecchiarelli, Silvia, and Chiara Bennati. 2018. 'Oncogene Addicted Non-Small-Cell Lung Cancer: Current Standard and Hot Topics'. *Future Oncology (London, England)* 14 (13s): 3–17. <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0095>.

- Vesely, Matthew D., Michael H. Kershaw, Robert D. Schreiber, and Mark J. Smyth. 2011. 'Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer'. *Annual Review of Immunology* 29: 235–71. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>.
- Vesely, Matthew D., and Robert D. Schreiber. 2013. 'Cancer Immunoediting: Antigens, Mechanisms, and Implications to Cancer Immunotherapy'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1284 (May): 1–5. <https://doi.org/10.1111/nyas.12105>.
- Vincent, J. P., J. Mazella, and P. Kitabgi. 1999. 'Neurotensin and Neurotensin Receptors'. *Trends in Pharmacological Sciences* 20 (7): 302–9. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(99\)01357-7](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(99)01357-7).
- Vineis, Paolo, Fabrizio Veglia, Simone Benhamou, Dorota Butkiewicz, Ingolf Cascorbi, Margie L. Clapper, Vita Dolzan, et al. 2003. 'CYP1A1 T3801 C Polymorphism and Lung Cancer: A Pooled Analysis of 2451 Cases and 3358 Controls'. *International Journal of Cancer* 104 (5): 650–57. <https://doi.org/10.1002/ijc.10995>.
- Vita, N., P. Laurent, S. Lefort, P. Chalon, X. Dumont, M. Kaghad, D. Gully, G. Le Fur, P. Ferrara, and D. Caput. 1993. 'Cloning and Expression of a Complementary DNA Encoding a High Affinity Human Neurotensin Receptor'. *FEBS Letters* 317 (1–2): 139–42. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81509-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81509-x).
- Wang, Jun, Ruirong Yuan, Wenru Song, Jingwei Sun, Delong Liu, and Zihai Li. 2017. 'PD-1, PD-L1 (B7-H1) and Tumor-Site Immune Modulation Therapy: The Historical Perspective'. *Journal of Hematology & Oncology* 10 (1): 34. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0403-5>.
- Wei, Spencer C., Colm R. Duffy, and James P. Allison. 2018. 'Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy'. *Cancer Discovery* 8 (9): 1069–86. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0367>.
- Weng, Mao-Wen, Hyun-Wook Lee, Sung-Hyun Park, Yu Hu, Hsing-Tsui Wang, Lung-Chi Chen, William N. Rom, et al. 2018. 'Aldehydes Are the Predominant Forces Inducing DNA Damage and Inhibiting DNA Repair in Tobacco Smoke Carcinogenesis'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (27): E6152–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804869115>.
- Wherry, E. John. 2011. 'T Cell Exhaustion'. *Nature Immunology* 12 (6): 492–99. <https://doi.org/10.1038/ni.2035>.
- Wherry, E. John, and Makoto Kurachi. 2015. 'Molecular and Cellular Insights into T Cell Exhaustion'. *Nature Reviews. Immunology* 15 (8): 486–99. <https://doi.org/10.1038/nri3862>.
- Winton, Timothy, Robert Livingston, David Johnson, James Rigas, Michael Johnston, Charles Butts, Yvon Cormier, et al. 2005. 'Vinorelbine plus Cisplatin vs. Observation in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 352 (25): 2589–97. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043623>.
- Wood, Steven L., Maria Pernemalm, Philip A. Crosbie, and Anthony D. Whetton. 2014. 'The Role of the Tumor-Microenvironment in Lung Cancer-Metastasis and Its Relationship to Potential Therapeutic Targets'. *Cancer Treatment Reviews* 40 (4): 558–66. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.10.001>.
- Wu, A. H., M. C. Yu, D. C. Thomas, M. C. Pike, and B. E. Henderson. 1988. 'Personal and Family History of Lung Disease as Risk Factors for Adenocarcinoma of the Lung'. *Cancer Research* 48 (24 Pt 1): 7279–84.
- Wu, P., and Y.-Z. Hu. 2010. 'PI3K/Akt/MTOR Pathway Inhibitors in Cancer: A Perspective on Clinical Progress'. *Current Medicinal Chemistry* 17 (35): 4326–41. <https://doi.org/10.2174/092986710793361234>.
- Wu, Si-Pei, Ri-Qiang Liao, Hai-Yan Tu, Wen-Jun Wang, Zhong-Yi Dong, Shu-Mei Huang, Wei-Bang Guo, et al. 2018. 'Stromal PD-L1-Positive Regulatory T Cells and PD-1-Positive CD8-Positive T Cells Define the Response of Different Subsets of Non-Small Cell Lung Cancer to PD-1/PD-L1 Blockade Immunotherapy'. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 13 (4): 521–32. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.11.132>.

- Wu, Zherui, Ludovic Fournel, Nicolas Stadler, Jin Liu, Agnès Boullier, Nadia Hoyeau, Jean François Fléjou, et al. 2019. 'Modulation of Lung Cancer Cell Plasticity and Heterogeneity with the Restoration of Cisplatin Sensitivity by Neurotensin Antibody'. *Cancer Letters* 444 (March): 147–61. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.12.007>.
- Wynder, E. L., and K. Mabuchi. 1972. 'Does the Smoking of Filter Cigarettes Reduce the Incidence of Tobacco-Related Disease as Compared with the Smoking of Non-Filter Cigarettes?' *Preventive Medicine* 1 (1): 249–52.
- Wynder, E. L., and J. E. Muscat. 1995. 'The Changing Epidemiology of Smoking and Lung Cancer Histology'. *Environmental Health Perspectives* 103 Suppl 8 (November): 143–48. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103s8143>.
- Xu, Ya-Ping, Bo Li, Xiao-Ling Xu, and Wei-Min Mao. 2015. 'Is There a Survival Benefit in Patients With Stage IIIA (N2) Non-Small Cell Lung Cancer Receiving Neoadjuvant Chemotherapy and/or Radiotherapy Prior to Surgical Resection: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *Medicine* 94 (23): e879. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000879>.
- Yamasaki, M., T. Makino, T. Masuzawa, Y. Kurokawa, H. Miyata, S. Takiguchi, K. Nakajima, et al. 2011. 'Role of Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2) in Chemoresistance and Clinical Outcome in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma'. *British Journal of Cancer* 104 (4): 707–13. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606071>.
- Yang, An-Kui, Zhi-Wei Zhou, Min Qian Wei, Jun-Ping Liu, and Shu-Feng Zhou. 2010. 'Modulators of Multidrug Resistance Associated Proteins in the Management of Anticancer and Antimicrobial Drug Resistance and the Treatment of Inflammatory Diseases'. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 10 (17): 1732–56. <https://doi.org/10.2174/156802610792928040>.
- Yang, Haiyan, Siyu Yang, Jing Liu, Fuye Shao, Haiyu Wang, and Yadong Wang. 2015. 'The Association of GSTM1 Deletion Polymorphism with Lung Cancer Risk in Chinese Population: Evidence from an Updated Meta-Analysis'. *Scientific Reports* 5 (March): 9392. <https://doi.org/10.1038/srep09392>.
- Yokosuka, Tadashi, Masako Takamatsu, Wakana Kobayashi-Imanishi, Akiko Hashimoto-Tane, Miyuki Azuma, and Takashi Saito. 2012. 'Programmed Cell Death 1 Forms Negative Costimulatory Microclusters That Directly Inhibit T Cell Receptor Signaling by Recruiting Phosphatase SHP2'. *The Journal of Experimental Medicine* 209 (6): 1201–17. <https://doi.org/10.1084/jem.20112741>.
- Younes, Mohamad, Zherui Wu, Sandra Dupouy, Audrey Mansuet Lupo, Najat Mourra, Takashi Takahashi, Jean François Fléjou, et al. 2014. 'Neurotensin (NTS) and Its Receptor (NTSR1) Causes EGFR, HER2 and HER3 over-Expression and Their Autocrine/Paracrine Activation in Lung Tumors, Confirming Responsiveness to Erlotinib'. *Oncotarget* 5 (18): 8252–69. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1633>.
- Young, L. C., B. G. Campling, S. P. Cole, R. G. Deeley, and J. H. Gerlach. 2001. 'Multidrug Resistance Proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in Lung Cancer: Correlation of Protein Levels with Drug Response and Messenger RNA Levels'. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 7 (6): 1798–1804.
- Yu, Helena A., Maria E. Arcila, Natasha Rekhtman, Camelia S. Sima, Maureen F. Zakowski, William Pao, Mark G. Kris, Vincent A. Miller, Marc Ladanyi, and Gregory J. Riely. 2013. 'Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers'. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (8): 2240–47. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2246>.
- Yu, Qinchao, Kejun Zhang, Xincheng Wang, Xiangping Liu, and Zemi Zhang. 2010. 'Expression of Transcription Factors Snail, Slug, and Twist in Human Bladder Carcinoma'. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 29 (1): 119. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-119>.
- Zachara-Szczakowski, Susanna, Tyler Verdun, and Andrew Churg. 2015. 'Accuracy of Classifying Poorly Differentiated Non-Small Cell Lung Carcinoma Biopsies with Commonly Used Lung

- Carcinoma Markers'. *Human Pathology* 46 (5): 776–82.
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.02.001>.
- Zardavas, Dimitrios, José Baselga, and Martine Piccart. 2013. 'Emerging Targeted Agents in Metastatic Breast Cancer'. *Nature Reviews. Clinical Oncology* 10 (4): 191–210.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.29>.
- Zerdes, Ioannis, Alexios Matikas, Jonas Bergh, George Z. Rassidakis, and Theodoros Foukakis. 2018. 'Genetic, Transcriptional and Post-Translational Regulation of the Programmed Death Protein Ligand 1 in Cancer: Biology and Clinical Correlations'. *Oncogene* 37 (34): 4639–61.
<https://doi.org/10.1038/s41388-018-0303-3>.
- Zhang, Panpan, Yuanyuan Ma, Chao Lv, Miao Huang, Mingzhen Li, Bin Dong, Xijuan Liu, et al. 2016. 'Upregulation of Programmed Cell Death Ligand 1 Promotes Resistance Response in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated with Neo-Adjuvant Chemotherapy'. *Cancer Science* 107 (11): 1563–71. <https://doi.org/10.1111/cas.13072>.
- Zhang, Xinji, Jian Lu, Jinfang Xu, Hui Li, Jingyi Wang, Yingyi Qin, Pilin Ma, Lixin Wei, and Jia He. 2013. 'Pemetrexed plus Platinum or Gemcitabine plus Platinum for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Final Survival Analysis from a Multicentre Randomized Phase II Trial in the East Asia Region and a Meta-Analysis'. *Respirology (Carlton, Vic.)* 18 (1): 131–39.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2012.02248.x>.
- Zhao, Dezheng, Yanai Zhan, Huiyan Zeng, Hon Wai Koon, Mary P. Moyer, and Charalabos Pothoulakis. 2007. 'Neurotensin Stimulates Expression of Early Growth Response Gene-1 and EGF Receptor through MAP Kinase Activation in Human Colonic Epithelial Cells'. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 120 (8): 1652–56.
<https://doi.org/10.1002/ijc.22407>.
- Zhou, C., Y. L. Wu, G. Chen, J. Feng, X.-Q. Liu, C. Wang, S. Zhang, et al. 2015. 'Final Overall Survival Results from a Randomised, Phase III Study of Erlotinib versus Chemotherapy as First-Line Treatment of EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (OPTIMAL, CTONG-0802)'. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 26 (9): 1877–83. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv276>.
- Zhu, Chang-Qi, Keyue Ding, Dan Strumpf, Barbara A. Weir, Matthew Meyerson, Nathan Pennell, Roman K. Thomas, et al. 2010. 'Prognostic and Predictive Gene Signature for Adjuvant Chemotherapy in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (29): 4417–24.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.4325>.
- Zhu, Lee-Ching, Joon Yim, Luis Chiriboga, Nicholas D. Cassai, Gurdip S. Sidhu, and Andre L. Moreira. 2007. 'DC-LAMP Stains Pulmonary Adenocarcinoma with Bronchiolar Clara Cell Differentiation'. *Human Pathology* 38 (2): 260–68.
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.07.018>.
- Zitvogel, Laurence, Jonathan M. Pitt, Romain Dailière, Mark J. Smyth, and Guido Kroemer. 2016. 'Mouse Models in Oncoimmunology'. *Nature Reviews. Cancer* 16 (12): 759–73.
<https://doi.org/10.1038/nrc.2016.91>.
- Zitvogel, Laurence, Antoine Tesniere, and Guido Kroemer. 2006. 'Cancer despite Immunosurveillance: Immunoselection and Immunosubversion'. *Nature Reviews. Immunology* 6 (10): 715–27. <https://doi.org/10.1038/nri1936>.

Titre : Influence Du Cisplatine sur l'expression du Check-Point Immunitaire PD-1/PD-L1 Dans Le Cancer Broncho-Pulmonaire Non A Petites Cellules

Mots clés : cancer pulmonaire, PD1/PD-L1, immunothérapie, cisplatine, neurotensine

Résumé : Malgré les nombreux progrès réalisés ces dernières années dans la prise en charge thérapeutique du cancer broncho-pulmonaire, cette pathologie reste la première cause de décès lié au cancer dans le monde. L'enjeu majeur pour cette maladie est donc de développer de nouveaux traitements et d'optimiser l'utilisation des drogues existantes, en particulier les sels de platine. Les protocoles combinant des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire avec des sels de platine est actuellement en plein essor malgré un certain manque en études précliniques. Dans ce travail, j'ai cherché à évaluer l'impact du cisplatine sur l'expression de PD-L1 en analysant des patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante à base de cisplatine. Le traitement d'induction augmentait considérablement le marquage PD-L1 des cellules tumorales et immunitaires du microenvironnement. Vingt-deux patients présentaient une variation positive du pourcentage de cellules tumorales PD-L1+ après chimiothérapie néoadjuvante; dont 9 (23,1%) passant de <50% à ≥50% des cellules tumorales marquées. Nous avons également confirmé la régulation positive de PD-L1 par le cisplatine, tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique, in-vitro et in-vivo sur des souris nude et des souris immunocompétentes greffées par des tumeurs expérimentales issues de lignées cellulaires de cancer du poumon A549, LNM-R ou LLC1. L'up-régulation de PD-L1 par le cisplatine fait intervenir la voie de signalisation PI3K/AKT. De plus, l'administration combinée d'anticorps anti-PD-L1 (3 mg / kg) et de cisplatine (1 mg / kg) à des souris portant un carcinome pulmonaire réduisait significativement la croissance tumorale par rapport aux traitements en monothérapie et par rapport aux contrôles. Le cisplatine augmente donc précocément et durablement l'expression de PD-L1 et pourrait donc agir de manière synergique avec un blocage de PD-1 / PD-L1 pour améliorer la réponse tumorale aux traitements. En parallèle, nous avons pu développer une thérapie ciblée anti-neurotensine permettant de bloquer ses effets paracrines stimulants la prolifération, la croissance, et les capacités d'invasion des cellules de tumeurs pulmonaires. Les anticorps anti-neurotensine amélioraient également la sensibilité au cisplatine de tumeurs préalablement résistantes par des mécanismes qui impliquent probablement l'augmentation de l'influx et la diminution de l'efflux de platine au niveau de sa cible intra-nucléaire qu'est l'ADN. L'ensemble de ces résultats apportent du rationnel à la réalisation d'essais cliniques impliquant le cisplatine et visant par différents biais à améliorer l'efficacité de traitements systémiques de cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules.

Title : impact of cisplatin on the expression of immune check-point PD-1/PD-L1 in non small cell lung carcinoma

Keywords : lung cancer, PD-1/PD-L1, immune therapy, cisplatine, neurotensin

Abstract : Despite many advances in the recent years in the therapeutic management of bronchopulmonary cancer, it remains the leading cause of death linked to cancer in the world. The major challenge for this disease is therefore to develop new treatments and optimize the use of existing drugs, in particular platinum salts. The number of clinical protocols testing combined therapies including immune check-point inhibitors and platinum salts is currently increasing in lung cancer treatment, however preclinical studies and rationale are often lacking. Here, we evaluated the impact of cisplatin treatment on PD-L1 expression analyzing the clinicopathological characteristics of patients who received cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy followed by surgery and showed that cisplatin-based induction treatment significantly increased PD-L1 staining in both tumor and immune cells from the microenvironment. Twenty-two patients exhibited positive PD-L1 staining variation after neoadjuvant chemotherapy; including 9 (23.1%) patients switching from <50% to ≥50% of stained tumor-cells. We also confirmed the up-regulation of PD-L1 by cisplatin, at both RNA and protein levels, in nude and immunocompetent mice bearing tumors grafted with A549, LNM-R, or LLC1 lung cancer cell lines. Up-regulation of PD-L1 by cisplatin involved the PI3K / AKT signaling pathway. The combined administration of anti-PD-L1 antibodies (3mg/kg) and cisplatin (1mg/kg) to mice harboring lung carcinoma significantly reduced tumor growth compared to single agent treatments and controls. Overall, these results suggest that cisplatin treatment could synergize with PD-1/PD-L1 blockade to increase the clinical response, in particular through early and sustainable enhancement of PD-L1 expression. Simultaneously, we were able to develop a targeted anti-neurotensin therapy to block its paracrine effects which stimulate proliferation, growth, and metastatic potential of lung tumor cells. Anti-neurotensin antibodies also improved the sensitivity to cisplatin of previously resistant tumors by mechanisms which probably involve increased influx and decreased efflux of platinum at the intra-nuclear level where resides its target DNA. All of these results provide a rationale for carrying out clinical trials involving cisplatin and aiming, by various ways, to improve the effectiveness of systemic treatments for non-small cell broncho-pulmonary cancers.