



HAL
open science

Caractérisation des clusters de lymphocytes T CD8+, T régulateurs FoxP3+ et des neutrophiles CD66b+ dans le cancer broncho-pulmonaire et son impact dans l'immunothérapie

Yoan Velut

► To cite this version:

Yoan Velut. Caractérisation des clusters de lymphocytes T CD8+, T régulateurs FoxP3+ et des neutrophiles CD66b+ dans le cancer broncho-pulmonaire et son impact dans l'immunothérapie. Cancer. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS457 . tel-04041454

HAL Id: tel-04041454

<https://theses.hal.science/tel-04041454v1>

Submitted on 22 Mar 2023

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

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



Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

UMRS 1138 / Equipe 13 : « Inflammation, Complément et Cancer »

Caractérisation des clusters de lymphocytes T CD8+, T régulateurs FoxP3+ et des neutrophiles dans le cancer broncho-pulmonaire et son impact dans l'immunothérapie

Par Yoan VELUT

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par le Pr Diane DAMOTTE

Présentée et soutenue publiquement le 12 Décembre 2022

Devant un jury composé de :

Madame Stéphanie GRAFF-DUBOIS (Professeur)

Présidente du jury

Monsieur Franck PAGES (Professeur)

Examineur

Monsieur Paul HOFMAN (Professeur)

Rapporteur

Monsieur Emmanuel DONNADIEU (Chargé de Recherche)

Rapporteur

Madame Diane DAMOTTE (Professeur)

Directrice de Thèse

Remerciements

Cette thèse est le résultat de plusieurs années de travail, qui n'aurait jamais vu le jour ou aboutit sans l'implication et le soutien, parfois fortuits, de nombreuses personnes. A tous et à toutes, je tiens à vous exprimer mes remerciements les plus sincères.

Je remercie l'ensemble des membres de mon jury de thèse de me faire l'honneur de présenter les résultats de mes recherches doctorales : à Madame le Professeur *Stéphanie GRAFF-DUBOIS* de le présider, à Monsieur le Professeur *Franck PAGES* en qualité d'examineur, à Monsieur le Professeur *Paul HOFMAN* et à Monsieur *Emmanuel DONNADIEU* en qualité de rapporteur.

Je tiens à remercier très chaleureusement ma directrice de thèse, Madame le Professeur *Diane DAMOTTE* pour... tout. Merci de m'avoir accepté dans ton équipe dans laquelle j'ai passé de très bon moments, merci pour ta confiance, merci pour ta disponibilité, merci pour ton écoute, merci pour ta patience, merci pour ta bienveillance merci pour tous ces échanges enrichissants, merci pour tes encouragements, merci pour tout ce que tu m'as appris, merci pour toutes les opportunités que tu m'as accordé. J'ai passé des années très enrichissantes sur le plan professionnel et personnel, avec et grâce à toi, que quelques lignes ne permettent pas de décrire. Je te suis extrêmement reconnaissant pour tout ce que tu m'as apporté ; et tu m'as beaucoup apporté.

Je remercie Madame le Professeur *Isabelle CREMER* de m'avoir accueilli dans l'équipe et de ces précieux retours sur mon travail, à Madame le Professeur *Catherine SAUTES-FRIDMAN*, à Madame le Professeur *Lubka ROUMENINA* et à Monsieur le Professeur *Wolf-Hervé FRIDMAN* pour leur accueil.

Je remercie l'ensemble du personnel des services d'anatomopathologies et de chirurgie thoracique de l'Hôpital Cochin pour leur travail, d'abord de soin des patients, mais également dans la collecte des échantillons et des données cliniques. Ces travaux n'auraient pas pu se dérouler sans votre aide.

Je remercie Monsieur le Professeur *Marco ALIFANO* pour son aide et son implication dans mes travaux de thèse et pour sa présence indéfectible à mes Comités de Suivi de Thèse.

Je remercie très chaleureusement Madame le Professeur *Audrey MANSUET-LUPO* pour notre collaboration. J'ai su que nous allions bien nous entendre la première fois que nous avons

travaillé ensemble et, en effet, nous nous sommes très vite entendu. J'ai beaucoup apprécié tous nos moments ensemble, nos discussions, nos débats, nos repas, nos petits-déjeuners (même les 5 minutes de « dispute » pour savoir pourquoi je ramène toujours des viennoiseries) et surtout nos fous rires ! Tu m'as beaucoup aidé et appris et j'espère avoir pu en faire autant (au moins à organiser un fichier Excel).

Je remercie grandement *Aurélie BONI* pour avoir récupéré, contrôlé et coupé un nombre incroyable de tumeur pour l'ensemble des projets. Je ne peux pas dire précisément combien de lame tu as coupé, mais je sais que ce chiffre est démesuré. Ta maîtrise parfaite du microtome nous a permis d'analyser certains d'échantillons que nous pensions trop compliqués et ta précision dans la découpe a été déterminante pour le Digital Spatial Profiling. Merci encore !

Je remercie l'ensemble des équipes d'AstraZeneca pour leur confiance en mon travail, leurs bonnes humeurs et leurs financements. J'ai été heureux de collaborer avec vous sur plusieurs projets et ai beaucoup appris à vos côtés (en visio).

Je remercie grandement les membres du Centre d'Histologie, Imagerie cellulaire et Cytométrie des Cordeliers, en particulier *Floriane ARBARETRAZ* et *Christophe KLEIN* pour leurs disponibilités à toute heure, leurs aides et leurs bonnes humeurs. Un très grand merci pour la gestion du Leica BOND RX et du Digital Spatial Profiler, qui nous ont causé bien des problèmes ! Encore merci et bon courage!

Je remercie l'ensemble des masters de médecine que j'ai eu l'honneur et le plaisir d'encadrer. Ça a été un grand plaisir de travailler avec vous, de vous aider, de vous faire découvrir la recherche et de découvrir vos expertises médicales. Aucuns d'entre vous n'a souhaité poursuivre dans la recherche, mais vous excellez dans votre domaine et vos patients n'en seront que ravis. Merci aux Docteurs *Geoffroy BOULLE*, *Elise DECROIX*, *Pierre PETITJEAN* et *Basilie ARQUE*.

Je remercie *Julien LAVERGNE* pour son aide précieuse lors de ma dernière année de thèse. J'ai été heureux de travailler avec toi et de te partager mon expérience. J'espère avoir pu t'aider autant que tu m'as aidé.

Je remercie toutes les personnes de l'équipe 13 et 15 de leurs bonnes humeurs contagieuses, de leurs aides et de leurs soutiens. Merci à vous tous de créer collectivement une aussi bonne ambiance, d'aussi bons moments de partage et d'entraide. Je vous souhaite de conserver cette atmosphère de travail. Merci *Antoine*, *Anne C*, *Margot*, *Lucas*, *Marie-Sophie*,

Nathalie Ju, Nathalie Jo, Tania, Sophie, Pierre-Emmanuel J, Tcheng-Ming, Julie, Arlette, Fatou, Tessa, Lucie, Anne-Françoise et Amine. Merci et bon courage à *Anne, Barbara, Sarah, Guilhem et Pierre-Emmanuel F* pour la suite de vos thèses.

Je remercie *Camille BAEY, Aurélie PASCUAL, Ghislaine LIOUX, Ana ORTALLI, Thibaud METZGER et Jean-Baptiste PENIGAULT* pour leurs aides précieuses sur plusieurs de nos projets (et de belles remises).

Je remercie grandement *Romaric ROCHELEUX* pour son aide à l'analyse de données CosMx.

Je remercie mes colocos pour leurs soutiens indéfectibles et pour tous les bons moments que je passe à vos côtés !

Je remercie *Gioli & Assia*, dont j'ai envahi le laboratoire avec leurs musiques et qui m'ont permis de travailler dans ma bulle.

Enfin, je remercie très chaleureusement mes proches, ma famille et mes amis. Vous savez pourquoi, et ma vie sait pourquoi. Un grand merci pour vos encouragements et vos soutiens !

VELUT Yoan – Thèse de doctorat - 2022

A Germaine DEMARY,

A mes nièces Anna et Louise,

A Stéphane LECALVEZ,

Sommaire

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
TABLE DES TABLEAUX	13
ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION	19
LE CANCER DU POUMON	20
I- Epidémiologie	20
II- Les facteurs de risque	23
1- Le tabac	23
2- L'exposition professionnelle	24
3- La pollution de l'air	24
4- Le radon	25
5- Les antécédents familiaux et personnels	25
III- Classification	27
1- La classification TNM des cancers du poumon	27
2- Classification histologique WHO	31
3- La classification IASLC/ATS/ERS des adénocarcinomes pulmonaires	33
IV- Les traitements des cancers broncho-pulmonaires	36
1- La résection chirurgicale	36
2- La radiothérapie	36
3- La chimiothérapie	36
4- Les thérapies ciblées	38
5- L'immunothérapie	41
6- Prise en charge thérapeutiques des cancers broncho-pulmonaires	43

IMMUNITE ET CANCER	45
V- La tumorigenèse	45
1- La voie p53	46
2- La voie RTK/RAS/RAF/MEK	47
3- La voie PI3K/AKT/mTOR	48
4- Le cycle cellulaire	48
VI- L'acquisition des propriétés biologiques tumorales : les « Hallmarks » du cancer	50
VII- L'« immunoediting » des tumeurs : Règle des 3E	52
1- La phase d'élimination	53
2- La phase d'équilibre	54
3- La phase d'échappement	54
4- Les mécanismes favorisant la progression tumorale	54
a. L'inflammation	54
b. L'angiogenèse	56
c. La transition épithélio-mésenchymateuse	58
VIII- Les effecteurs de l'immunosurveillance anti-tumorale : une plasticité cellulaire	61
1- Le système immunitaire inné	61
a. Les cellules dendritiques	61
b. Les macrophages	62
c. Les granulocytes	63
d. Les NK	65
2- Système immunitaire adaptatif	66
e. Dynamique fonctionnelle de l'immunité adaptative : le cycle cancer-immunité	66
f. Dynamique fonctionnelle de l'immunité adaptative : l'immunomodulation	68
i. Les molécules inhibitrices : les « <i>immune checkpoints</i> »	68
ii. L'anergie	69
iii. L'exhaustion	70
g. Les lymphocytes T	71
i. Les lymphocytes T cytotoxiques CD8+	72
ii. Les lymphocytes T CD4+ helper	73
iii. Les lymphocytes T régulateur (Treg)	75
iv. Les lymphocytes T $\gamma\delta$	77
v. Les lymphocytes B	78
IX- L'organisation du microenvironnement tumoral.	80
1- Le microenvironnement tumoral : relation cellules immunitaires-cellules tumorales	80

2-	L'infiltrat immunitaire intra-tumoral prédit la survie des patients	81
3-	La caractérisation de l'infiltrat immunitaire prédit la réponse thérapeutique dans le CBNPC	84
4-	Caractérisation spatiale de l'environnement immunitaire, son influence sur la survie et la réponse aux ICI	85
5-	Intérêt clinique : le développement des immunothérapies bi- et tri-spécifiques	87
	HYPOTHÈSE/OBJECTIF	90
	RÉSULTATS	91
	Article 1 : Chemoradiotherapy efficacy is predicted by intra-tumour CD8+/FoxP3+ double positive T cell density in locally advanced N2 non-small-cell lung carcinoma	91
	Article 2: The Contactome involving CD8+ T cells, FOXP3+ T cells and neutrophils influence the survival and the response to therapy in lung cancer	101
	DISCUSSION	156
	PERSPECTIVES ET CONCLUSION	165
	BIBLIOGRAPHIE	166
	ANNEXES	183
	Article 3: SMARCA4-deficient lung carcinoma is an aggressive tumor highly infiltrated by FOXP3+ cells and neutrophils	183

Table des illustrations

Figure 1 : Incidence et mortalité estimée en France [1]	21
Figure 2 : Incidence et mortalité actuelle et prévisionnelle du cancer du poumon [1]	22
Figure 3 : Schéma représentatif des différents critères de la classification TNM du cancer du poumon d'après la 8ème édition [29]	28
Figure 4 : Survie globale des patients souffrant de cancer du poumon selon la classification TNM [30]	31
Figure 5 : Proportion des différents sous-types de cancer du poumon et des types histologiques de CBNPC.....	32
Figure 6 : Survie sans maladie selon le grade de tumeur [46].....	35
Figure 7 : Les cibles d'action principales des chimiothérapies [50]	37
Figure 8 : Incidence des drivers oncogéniques dans les adénocarcinomes pulmonaires[65]	39
Figure 9 : Les voies de signalisation inhibées par les thérapies ciblées approuvées par la FDA [66]	40
Figure 10 : Essais cliniques avec des anticorps monoclonaux anti-PD-1/PD-L1 entre 2017 et 2021[69]	42
Figure 11 : Survie globale des patients souffrant de CBNPC sans mutation ciblables selon le traitements en première ligne et le statut PD-L1 TPS [84].....	43
Figure 12 : Proportion des altérations par voie de signalisation et sous-type de tumeur [88]	46
Figure 13 : Les « Hallmarks » du cancer en 2022 [101]	51
Figure 14 : Le concept d' « immunoediting » des cancers [104]	53
Figure 15 : L'angiogenèse dans le processus d' « immunoédition » des cancers [120]	58
Figure 16 : Les étapes de la transition épithélio-mésenchymateuse [132].....	60
Figure 17 : Les rôles opposés des neutrophiles « N1 » et « N2 » dans le cancer [153]	64
Figure 18 : Le cycle cancer-immunité et ces médiateurs [180].....	67
Figure 19 : Les voies d'activation et d'inhibition des cellules immunitaires par les CPA ou les cellules tumorales [186].....	69
Figure 20 : L'exhaustion progressive des lymphocytes T dans les infections chroniques [189]	70

Figure 21 :Le mécanisme de cytotoxicité direct médié par les lymphocytes T cytotoxiques [196].....	73
Figure 22 :Le développement des lymphocytes T CD4+ et leurs sous-types dans l'immunité [206]	75
Figure 23 : Les mécanismes régulateurs des Treg [214].....	76
Figure 24 : Les actions immuno-régulatrices des Treg sur les cellules de l'immunité innée [209].....	77
Figure 25 : La « contexture immunitaire » [244]	81
Figure 26 : Impact de l'infiltrat immunitaire sur le pronostic des patients souffrant de cancer [281].....	83
Figure 27 : Impact respectif des cellules immunitaires infiltrants les tumeurs du poumon et du sein [221].....	84
Figure 28 : Les échelles d'études spatiales du microenvironnement tumoral [300]	86
Figure 29 : Les différents formats d'immunothérapie [314]	88

Table des Tableaux

Table 1 : Description des différents seuils des trois critères de la classification TNM du cancer du poumon d’après la 8ème édition [28]	29
Table 2 : Stage des cancers du poumon d’après la 8ème édition de la classification TNM [28]	30
Table 3 : Meilleurs taux de réponse global par mutation driver et par traitement dans le CBNPC [64]	39
Table 4 : Les anticorps bi-spécifiques en essais de phase III en oncologie en 2022 [315]	89

Abréviations

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIM	Adénocarcinome avec invasion minime
AIRE	Auto-immune regulator
AIS	Adénocarcinome in situ
AKT	Ak strain transforming
ALK	Anaplastic Lymphoma Receptor Tyrosine Kinase
ARN	Acide Ribonucléotidique
AHSMOG-2	Adventist Health and Smog Study-2
ATS	American Thoracic Society
Bcl6	B-cell lymphoma 6
BCR	B-Cell Receptor
BPCO	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
BRAF	B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma proto-oncogene
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate
CBNPC	Carcinome Broncho-Pulmonaire Non à Petites Cellules
CCL	C-C motif chemokine ligand
CD	Cluster de différenciation
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CIRC	Centre international de recherche sur le Cancer
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COX2	Cyclooxygénase 2
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CPC	carcinome bronchique à petites cellules
CSF1	Macrophage colony-stimulating factor
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein 4
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand
CXCR	C-X-C motif chemokine receptor
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
DC-LAMP	Dendritic Cell-Lysosomal Associated Membrane Protein
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELANE	Elastase des neutrophiles

EMA	European Medicine Agency
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ERBB	Erb-B Receptor Tyrosine Kinase
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERS	European Respiratory Society
ESCAPE	European Study of Cohorts for Air Pollution Effects
FDA	Food and Drug Administration
FGFR	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FoxP3	Forkhead box P3
GAZEL	cohorte GAZ et Electricité
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
Gr-1	Lymphocyte Antigen 6 Family Member G
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
G-MDSC	Granulocyte-like myeloid derived suppressor cells
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor-1
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
ICI	Immune Checkpoint Inhibitor
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFN-γ	Interféron- γ
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ILCCO	International Lung Cancer Consortium
IND	Index de densité normalisé
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IRSN	Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire
JAK-STAT	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription
KIT	KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LOX-1	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDM	Murine double-minute

MEK	Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase
MET	Mesenchymal-epithelial transition factor – proto-oncogene
MMP	Matrix metalloproteinase
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MUC-1	Mucin-1
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NK	Natural Killer
NKG2D	Natural Killer Group 2D
NLR	Neutrophil to Lymphocyte Ratio
NOS	Nitrogen oxide species
NOX	NADPH oxydase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PD-1	Programmed cell Death protein 1
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PD-L1	Programmed cell Death ligand protein 1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PM2.5	Particule de moins de 2.5 μ m
POLB	DNA Polymerase β
PRRs	Pattern Recognition Receptors
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma virus
RET	REarranged during Transfection - proto-oncogene
RORγt	Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma
ROS	Reactive Oxygen Species
ROS1	ROS Proto-Oncogene 1
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
SAT1	Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1
SMARCA4	SWI/SNF-Related Matrix-Associated Actin-Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily A Member 4

SMC1L2	Structural maintenance of chromosomes 1L2
SNAI1	Zinc finger protein SNAI1
SPLF	Société de Pneumologie de Langue Française
STK11	Serine/Threonine Kinase 11
SWI/SNF	SWItch-Sucrose Non Fermentable
TCR	T-Cell Receptor
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
Tfh	T follicular helper
TGF-β	Transforming Growth Factor β
Th	T helper
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitor
TLR	Toll-like receptor
TLS	Tertiary Lymphoid Structure
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TP53	Tumor protein p53
TPS	Tumor Proportion Score
Treg	T régulateur
TSC	Tuberous sclerosis complex
TTF1	Thyroid-Transcription Factor-1
TWIST	Twist-related protein 1
TYK2	Tyrosine Kinase 2
UBE2N	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 N
UICC	Union Internationale contre le Cancer
VCAM	Vascular cell adhesion protein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WELCA	Women Epidemiology Lung Cancer
WHO	World Health Organization
ZEB1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1

Introduction

Le cancer du poumon constitue la première cause de mortalité par cancer en France et dans le monde. Bien qu'ayant bénéficié des nombreuses avancées médicales dans la prévention, le diagnostic et le traitement des cancers, la survie des patients souffrant de cancer du poumon reste médiocre, avec une survie à 5 ans approximativement de 20% tous stades confondus. L'influence du système immunitaire sur le contrôle et la progression tumorale est maintenant clairement établie. Il a notamment été démontré que la composition en cellule immunitaire du microenvironnement tumoral a un fort impact pronostique et prédictif de la réponse aux traitements. L'introduction récente de l'immunothérapie ciblant le verrou immunitaire CTLA4 et PD-1/PD-L1 a constitué une avancée notable dans différents cancers et notamment le cancer du poumon, avec l'hypothèse d'une levée de l'immunosuppression induite par les cellules tumorales. Toutefois, environ 20% des patients répondent à cette immunothérapie sans que l'on puisse en identifier leurs éligibilités. Si l'analyse du microenvironnement tumoral est parfois incluse dans l'étude des tumeurs, elle se limite souvent à la quantification des cellules immunitaires sans prendre en compte les interactions spatiales de ces cellules.

L'analyse de l'interaction entre les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral représente le sujet de cette thèse et nous nous sommes intéressé aux interactions spatiales entre les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes T FoxP3+ et les neutrophiles CD66b+. Nous les avons identifiés, quantifiés et analysés leurs influences sur la survie et la réponse aux traitements chez des patients atteints de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (CBNPC).

La première partie de ce document sera consacrée à l'état des connaissances actuelles, sur la prise en charge des CBNPC et l'efficacité des traitements anticancéreux, puis sur les mécanismes de la tumorigenèse et les relations entre le système immunitaire et la progression tumorale. La deuxième partie sera dédiée au travail expérimental réalisé sur différentes cohortes de patients atteints de CBNPC, en discutant de son intérêt dans la prise en charge de ce cancer.

Le cancer du poumon

I- Epidémiologie

En 2020, près de 468 000 nouveaux cas de cancer ont été enregistrés en France. Sur la période 2015-2020, ce sont près de 1 501 881 personnes qui ont souffert d'un cancer [1]. L'incidence des cancers est différente chez l'homme et la femme et est dominée par les cancers sexe-spécifiques. En 2020, chez l'homme, les cancers les plus fréquents sont ceux de la prostate (66 070 cas (25,4% des nouveaux cas)), du poumon (31 941 cas (12,3%)) et du côlon (25 781 cas (9,9%)) pour une incidence totale de 260 169 personnes. Chez la femme, ce sont ceux du sein (58 083 cas (28%)), du côlon (22 280 cas (10,7%)) et du poumon (16 359 cas (7,9%)) pour une incidence totale de 207 796 personnes. Avec près des deux tiers des nouveaux cas répertoriés (66,1%), l'homme est le plus touché par le cancer du poumon. Standardisé par l'âge, le taux de mortalité y est 3 fois plus important que chez la femme (35 pour l'Homme, 12.5 pour la femme).

Au total, en France, tout sexe confondu, 48 061 nouveaux cas de cancer du poumon sont répertoriés, soit 10,3% de l'ensemble des cancers diagnostiqués. Toujours en 2020, 185 621 personnes sont décédées d'un cancer, avec une mortalité légèrement plus élevée chez les hommes (56,6%). Le cancer du poumon a la mortalité la plus élevée chez l'homme (25 214 (24%)), avant les cancers du côlon (11 178 cas (10,6%)) et de la prostate (9 060 cas (8.6%)). C'est le second cancer le plus meurtrier chez la femme (11 881 cas (14.7%)) juste après le cancer du sein (14 183 cas (17.6%)) mais avant celui du côlon (9 775 cas (12.1%)) (Figure 1). Le cancer du poumon a donc l'incidence et la mortalité la plus élevée de l'ensemble des types de cancers existants.

L'incidence des cancers a augmenté entre 1990 et 2010, au contraire de leurs mortalités. Les mêmes tendances ont été observées avec le cancer du poumon, mais avec un impact différent selon le sexe. En effet, depuis 1990, l'incidence du cancer du poumon stagne et tend à diminuer chez les hommes, alors qu'il augmente fortement chez les femmes (triplé entre 1990 et 2010). La mortalité suit également cette tendance (Figure 2) [1,2], cohérente avec l'augmentation de la consommation de tabac chez les femmes [3]. Les prévisions de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sont pessimistes et prédisent une augmentation de l'incidence et de la mortalité des cancers du poumon entre 2020 et 2040 (39 100 nouveaux cas en 2040 pour une mortalité de 32000 cas chez l'homme, 19 100 nouveaux cas chez la femme

pour une mortalité de 14 300 cas). Le cancer du poumon touche particulièrement des personnes âgées, avec un âge médian des patients de 68 ans chez l’homme et de 67 ans chez la femme en 2018 [4,5].

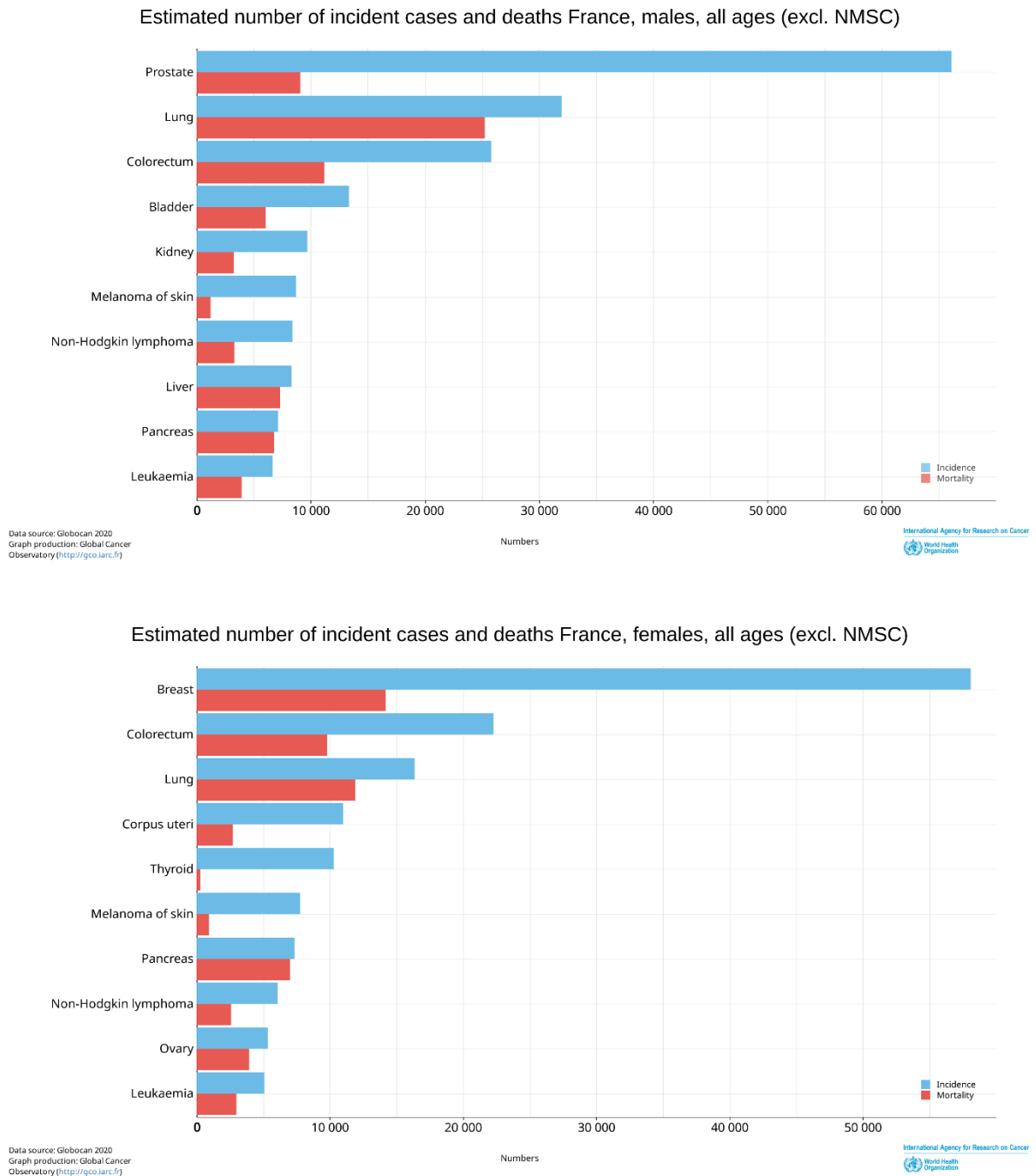


Figure 1 : Incidence et mortalité estimée en France [1]
Entre l’homme (Haut) et la femme (Bas), tout âge confondu, en 2020



Figure 2 : Incidence et mortalité actuelle et prévisionnelle du cancer du poumon [1]
 (Gauche) : Incidence et mortalité par sexe pour le cancer du poumon en France standardisés par l'âge pour 100000 cas. (Droite) : Nombre estimé de nouveaux cas et mortalité associée entre 2020 et 2040, hommes et femmes confondus, tout âge en France métropolitaine

Les avancées thérapeutiques des dernières décennies ont montré une nette amélioration de la survie des patients. La survie nette à 5 ans standardisée sur l'âge des personnes atteintes d'un cancer du poumon augmente depuis plusieurs décennies mais reste mauvaise (13 % en 1989-1993, 17 % en 2005-2010, 20 % en 2010-2015 (18 % pour les hommes, 24 % pour les femmes)) [4]. La majorité des cancers du poumon est diagnostiquée à des stades avancés de la maladie, réduisant les possibilités thérapeutiques, ainsi que leurs efficacités.

En effet, les symptômes spécifiques de la maladie n'apparaissent qu'à des stades tardifs, et les moyens de dépistage précoce font cruellement défaut. Une étude prometteuse de dépistage par tomodensitométrie à faible-dose chez des patients à fort risque de cancer (antécédent familiaux, BPCO (Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive)) a permis de diminuer significativement la mortalité des patients touchés en dépistant les tumeurs à des stades plus précoces de la maladie [5,6]. En France, une étude pilote de l'Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) et de la Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF) (Dépiscan) vise à reproduire ces résultats par scanner hélicoïdal à faible dose [7].

II- Les facteurs de risque

1- Le tabac

Le tabagisme actif est la 1^{ère} cause de développement de cancer du poumon dans le monde. En effet, plus de 80% des cancers du poumon lui sont directement attribuables [8]. Mais de multiples études, au niveau mondial, ont montré que le tabagisme est également un facteur de risque pour un nombre bien plus important de cancer : nasopharynx, nez et sinus, estomac, rein, uretère, cervix, leucémie myéloïde, colorectal et ovaire (mucineux) [9]. La cigarette classique contient plus de 7000 substances chimiques, dont 60 sont cancérigènes avérés ou suspectés [8] et connus pour induire, entre autres, des dommages de l'ADN des cellules et affecter les mécanismes de sa réparation.

Le risque de développement de cancer du poumon est accru selon la durée du tabagisme et de l'intensité de la consommation (calculé en paquet année, soit le nombre de paquet de cigarette fumé par jour rapporté à une année). Cependant, la durée de consommation semble avoir un effet plus important et proportionnel sur l'incidence, au contraire de son intensité [10]. Toutes les formes de consommation de tabac sont concernées. Une étude sur 14 123 fumeurs a montré une incidence plus importante de cancer du poumon pour les cigarettes « classique » (tabac avec ou sans filtre) mais une mortalité équivalente, quel que soit le type de cigarette consommé [10,11].

L'arrêt de la consommation de cigarette réduit le risque de développement de cancer du poumon, comparé aux personnes qui en poursuivent la consommation, mais cela n'en réinitialise pas l'incidence [10], qui restera plus élevée que chez les personnes n'ayant jamais fumé. Un risque 3 fois supérieur au non-fumeur chez les patients ayant fumé et qui ont arrêté après 25 ans d'abstinence a notamment été rapporté [12]. Les femmes s'en sortent légèrement mieux. Une étude (WELCA study (Women Epidemiology Lung Cancer)) a montré que les fumeuses atteignent un risque de développement de cancer du poumon équivalent aux non-fumeuses après 20 ans d'abstinence [13]. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études montrant que les femmes survivent globalement mieux que les hommes face au cancer du poumon [14].

Le tabagisme passif est aussi concerné et correspond à la respiration de la fumée de cigarette expiré par un fumeur. Cette fumée, dites « secondaire », est tout aussi nocive sur la santé que la fumée « primaire » de la cigarette. Sur une cohorte d'adultes norvégiens (Nord-

Trøndelag Health Survey 2 study) de 65 229 personnes suivies pendant 18 ans, les personnes ayant rapporté un tabagisme passif au cours de leurs vies ont montré un risque accru de 30% de développer un cancer du poumon [15].

2- L'exposition professionnelle

Les personnes travaillant dans les secteurs industriels et agricoles sont les plus touchées par la survenue de cancer du poumon, ou l'exposition à des matériaux irritants ou nocifs pour la santé sont fréquents.

L'amiante est le facteur de risque d'origine professionnel le plus fréquent pour les cancers du poumon. Plusieurs études ont montré le lien entre l'exposition professionnelle à l'amiante et le développement de cancer du poumon [16]. Le mécanisme d'action est cependant mal connu. L'amiante est un minéral fibreux principalement utilisé dans la construction pour ces capacités d'isolation thermique et phonique. De nombreux bâtiments construits au cours du XXème siècle contiennent de l'amiante et représentent un danger pour toutes les personnes y travaillant. Il est interdit depuis 1997 (décret n° 96-1133 du 24 décembre 1996) en France et progressivement remplacé par d'autres matériaux isolants moins dangereux.

D'autres substances cancérigènes sont connues pour favoriser la survenue d'un cancer du poumon et sont inscrites dans les tableaux des maladies professionnelles. En 2022, 19 affections conduisant à un cancer du poumon sont classées. Peuvent être cités, à titre d'exemple, l'inhalation de poussières ou de vapeurs arsenicales, de cadmium, une exposition aux rayonnements ionisants, l'exposition aux goudrons et huiles de houille... L'ensemble des affections est consultable sur le site de l'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) [17] et publié au Journal Officiel.

3- La pollution de l'air

Plusieurs études ont montré un lien entre la présence de particules fines dans l'air et la survenue d'un cancer du poumon : l'une aux Etats-Unis (Adventist Health and Smog Study-2 (AHSMOG-2)), débutée en 2010 a suivi 80 285 personnes pendant plus de 7 ans [18], l'autre en France par l'INSERM sur une cohorte de 20 625 personnes (cohorte GAZ et Electricité (GAZEL)) créée en 1989 [19] et suivie plus de 25 ans. L'étude de 17 cohortes européennes (European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE)) a montré que l'exposition

aux particules de moins de $2.5\mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$), originaires des résidus de combustion incomplètes du pétrole et de la biomasse, est le principal acteur de l'augmentation de cette incidence [20].

4- Le radon

Le radon est un gaz radioactif provenant de la désintégration du radium. Il est naturellement présent dans les sols et les roches granitiques et volcaniques. En France, on le retrouve dans des proportions plus importantes dans les zones montagneuses du Massif Central, les Vosges et la Bretagne. Il est classé cancérigène par le Centre international de recherche sur le Cancer (CIRC) depuis 1987. Un lien entre l'incidence du cancer du poumon et la présence de radon est clairement établi [21].

5- Les antécédents familiaux et personnels

Des antécédents familiaux de cancer du poumon sont généralement un facteur de risque de développement de cancer du poumon. Une étude dirigée par l'International Lung Cancer Consortium (ILCCO) a montré que les personnes dont l'un des parents souffre d'un cancer du poumon a un risque de développement de cancer du poumon augmenté de 50% en comparaison d'une personne sans antécédents familiaux, après ajustement du statut tabagique et d'autres paramètres cliniques [22,23]. Une autre étude portant sur des jumeaux scandinaves a montré des résultats similaires (Nordic Twin Study) [24]. Ceci traduit l'implication génétique dans l'étiologie du cancer du poumon.

Des antécédents personnels sont aussi facteurs de risques. En effet, les personnes ayant déjà eu un cancer du poumon ont également un risque plus important d'en développer un second. Une étude a montré que parmi les personnes ayant souffert d'un cancer, un douzième d'entre eux (1/12ème) va développer un autre cancer. Par ailleurs, le cancer du poumon est celui qui est le plus fréquent dans ce cas [25].

Ainsi, des facteurs génétiques assurant une meilleure protection face au cancer du poumon. Des prédispositions génétiques au cancer du poumon ont été observées, en particulier les mutations germinales T790M et V843I du gène codant pour le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) [26]. Notamment, la mutation T790M est connu pour entraîner une résistance aux thérapies ciblées anti-EGFR. D'autres prédispositions génétiques ont été observées sur des études de cas et doivent être validées sur de plus grands effectifs.

III- Classification

1- La classification TNM des cancers du poumon

La première classification TNM a été mise en place par le chirurgien français Pierre DENOIX à l'Institut Gustave Roussy. Elle est aujourd'hui devenue une référence internationale pour décrire l'extension anatomique d'un cancer. Cette classification est régulièrement mise à jour par l'Union Internationale contre le Cancer (UICC) en tenant compte des nouvelles données scientifiques et médicales. La 8ème édition, proposée par l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), et acceptée par l'UICC est sortie en 2016 [27]. La 9ème édition est prévue pour 2023.

Les critères de classification peuvent varier d'un cancer à un autre pour décrire au mieux l'extension tumorale chez le patient. Il est donc important de bien connaître la localisation de la tumeur avant de la classer. Seule la classification TNM relative aux cancers du poumon sera développée ici.

La classification TNM combine 3 critères pour évaluer le stade d'avancé de la tumeur [28], chacun désigné par une lettre (Figure 3 et Table 1) :

- La tumeur (T) : correspond à la taille de la tumeur, mesurée dans ses plus grandes dimensions, et sa localisation dans l'organe.
- L'extension ganglionnaire (N) : correspond à la localisation de l'aire ganglionnaire, envahie par des cellules tumorales, la plus distale de la tumeur initiale.
- La présence de métastases (M) : correspond à la propagation du cancer dans d'autres parties du corps, puis de leurs nombres.

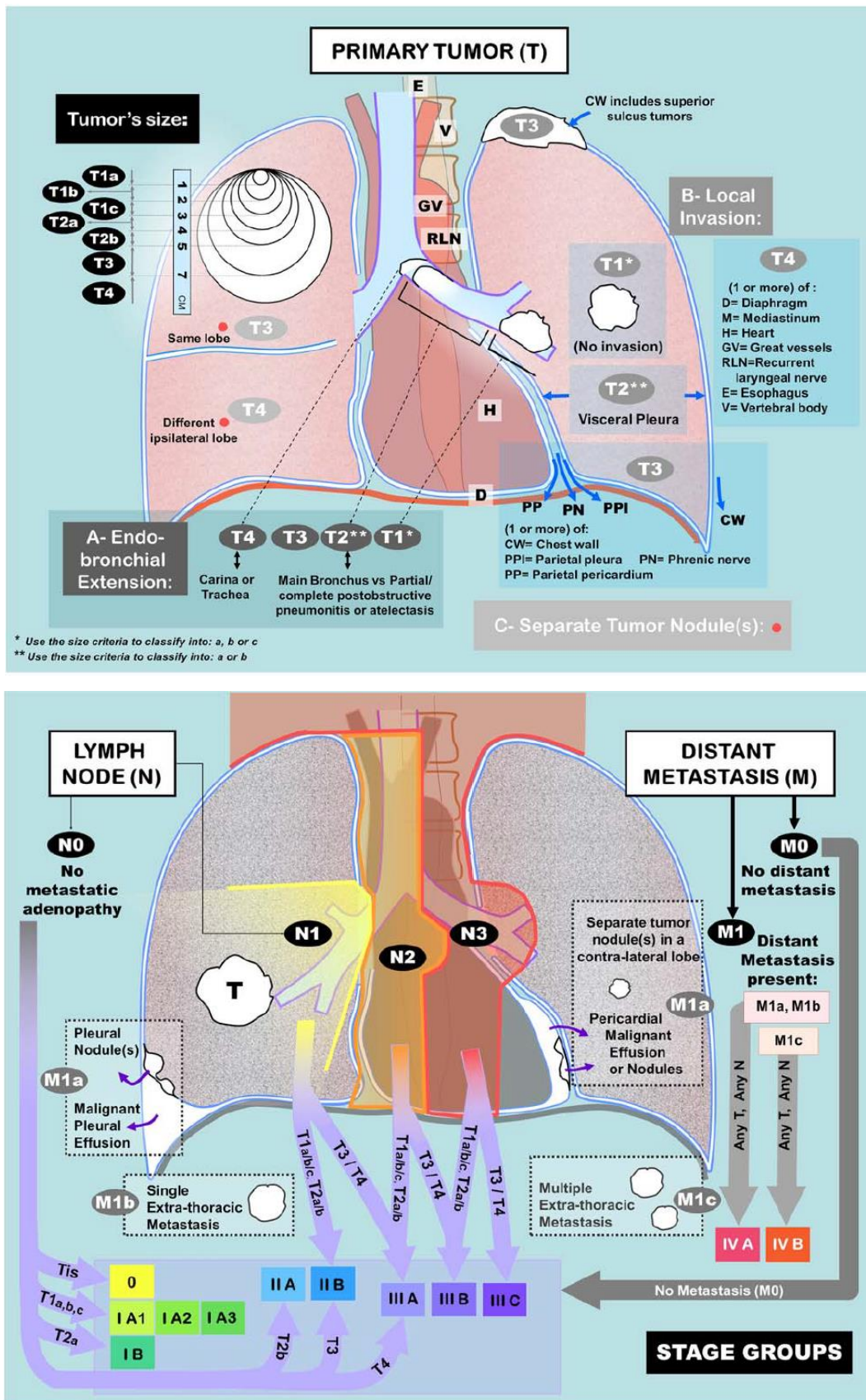


Figure 3 : Schéma représentatif des différents critères de la classification TNM du cancer du poumon d'après la 8ème édition [29]

T (primary tumor)	
T0	No primary tumor
Tis	Carcinoma in situ (squamous or adenocarcinoma)
T1	Tumor ≤3 cm
T1mi	Minimally invasive adenocarcinoma
T1a	Superficial spreading tumor in central airways*
T1a	Tumor ≤1 cm
T1b	Tumor >1 but ≤2 cm
T1c	Tumor >2 but ≤3 cm
T2	Tumor >3 but ≤5 cm or tumor involving: visceral pleura,† main bronchus (not carina), atelectasis to hilum‡
T2a	Tumor >3 but ≤4 cm
T2b	Tumor >4 but ≤5 cm
T3	Tumor >5 but ≤7 cm or invading chest wall, pericardium, phrenic nerve; or separate tumor nodule(s) in the same lobe
T4	Tumor >7 cm or tumor invading: mediastinum, diaphragm, heart, great vessels, recurrent laryngeal nerve, carina, trachea, esophagus, spine; or tumor nodule(s) in a different ipsilateral lobe
N (regional lymph nodes)	
N0	No regional node metastasis
N1	Metastasis in ipsilateral pulmonary or hilar nodes
N2	Metastasis in ipsilateral mediastinal or subcarinal nodes
N3	Metastasis in contralateral mediastinal, hilar, or supraclavicular nodes
M (distant metastasis)	
M0	No distant metastasis
M1a	Malignant pleural or pericardial effusion‡ or pleural or pericardial nodules or separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe
M1b	Single extrathoracic metastasis
M1c	Multiple extrathoracic metastases (1 or >1 organ)

*Superficial spreading tumor of any size but confined to the tracheal or bronchial wall. †Atelectasis or obstructive pneumonitis extending to hilum; such tumors are classified as T2a if >3 and ≤4 cm, T2b if >4 and ≤5 cm. ‡Pleural effusions are excluded that are cytologically negative, nonbloody, transudative, and clinically judged not to be due to cancer.

Table 1 : Description des différents seuils des trois critères de la classification TNM du cancer du poumon d'après la 8ème édition [28]

La combinaison des 3 facteurs T, N et M permet de classer les tumeurs par stade de la maladie (Table 2). Il est important de noter qu'un stade 0 peut être rendu. C'est le cas pour les adénocarcinomes *in situ* (AIS) ou invasion minime (AIM).

Cette classification peut être effectuée au cours du diagnostic clinique, avec les informations reçues des examens cliniques (radiologique/endoscopique), ou lors de l'examen anatomopathologique de la pièce tumorale réséquée. Des lettres sont alors indiquées au début de la stadification TNM pour en préciser la méthode de classification : « c » pour clinique, « p » pour histo-pathologique.

T/M	Subcategory	N0	N1	N2	N3
T1	T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c	IVB	IVB	IVB	IVB

Table 2 : Stage des cancers du poumon d'après la 8ème édition de la classification TNM [28]

Le TNM a permis de nombreuses avancées médicales et scientifiques. Tout d'abord, il fournit un langage commun entre les médecins nationaux et internationaux pour évaluer l'étendue d'un cancer. Elle permet ainsi de normaliser les critères de sélection des cohortes de patients pour la recherche, assurant la comparaison des études sur des cohortes internationales. Elle est également un critère important dans la codification des indications thérapeutiques. En effet, les stades précoces vont largement bénéficier de la résection chirurgicale et de la radiochimiothérapie, tandis que les stades avancés bénéficieront plus des traitements ciblés, de radiochimiothérapies et d'immunothérapies. Le TNM permet ainsi au clinicien d'ajuster l'arsenal thérapeutique aux caractéristiques de la tumeur. Enfin, le TNM est un marqueur très puissant de la survie globale [28]. La survie médiane à 5 ans diminue progressivement avec l'augmentation du stade : respectivement 77.5%, 56.5%, 25% et 5% pour les stades I, II, III et IV (Figure 4) [30].

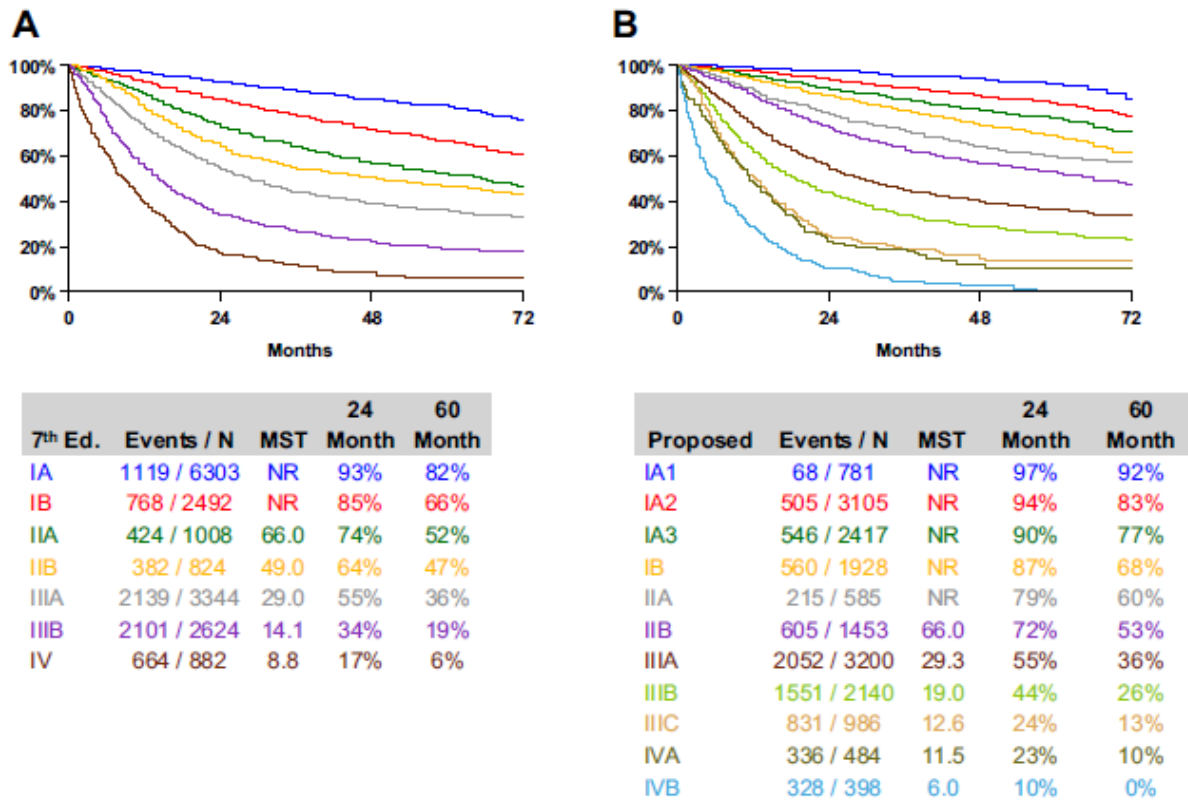


Figure 4 : Survie globale des patients souffrant de cancer du poumon selon la classification TNM [30]
Données d'après la 7^{ème} édition (A) et la 8^{ème} édition (B). MST : temps de survie médian

2- Classification histologique WHO

La grande diversité des morphologies de tumeurs a rendu nécessaire leurs classifications à des fins diagnostiques. La classification WHO se base en premier lieu sur des critères morphologiques, puis complété par des données d'immunohistochimie et de biologie moléculaire. Les mises à jour régulières de ces classifications prennent en compte l'évolution des connaissances sur ces tumeurs et ainsi la complexité de l'évaluation des tumeurs. La dernière mise à jour date de 2021 [31]. Le diagnostic est posé par l'anatomopathologiste sur un prélèvement de la tumeur.

2 grands sous-types de tumeurs du poumon sont communément décrits : les carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBPNPC) et les carcinomes bronchiques à petites cellules (CPC), représentant respectivement 85% et 15% des tumeurs du poumon [32].

Les CPC ont un pronostic très mauvais avec 6,5% de survie à 5 ans [33]. Les CBPNPC sont constitués de différents sous-types tumoraux selon la morphologie et leurs phénotypes qui dépendent du type cellulaire d'origine de la cellule tumorale [34] (Figure 5).

- **Les adénocarcinomes** représentent la majorité des CBNPC, avec 50% des cas observés. D'origine glandulaire, ils ont pour origine les cellules pulmonaires mucosécrétantes (cellules de Clara, cellules caliciformes...) ou les pneumocytes. Les architectures variées qu'ils peuvent prendre sont à l'origine de la classification IASLC/ATS/ERS des adénocarcinomes pulmonaires.
- **Les carcinomes épidermoïdes** représentent 30% des cas observés et ont pour d'origine les cellules squameuses du poumon qui tapissent les bronches. Ce sont des tumeurs le plus souvent périphériques, sous-divisées en plusieurs catégories selon la géométrie des cellules et la présence de kératine.
- **Les carcinomes à grandes cellules** représentent 15% des cas observés. Plutôt rare, c'est plus une catégorie d'exclusion regroupant les carcinomes pulmonaires qui n'entrent pas dans les précédentes catégories et qui présentent des cellules tumorales de grandes tailles sans architecture glandulaire.

Les 5% restants correspondent à des morphologies plus rares comme les carcinomes basaloïdes, les carcinomes neuroendocrines qui dérivent des cellules neuroendocrines, les carcinomes adénosquameux composé de 2 contingents (adénocarcinome et carcinome épidermoïde) et les carcinomes Not Otherwise Specified, ne pouvant être classés comme adénocarcinome ou carcinome épidermoïde sur les critères d'immunohistochimie.

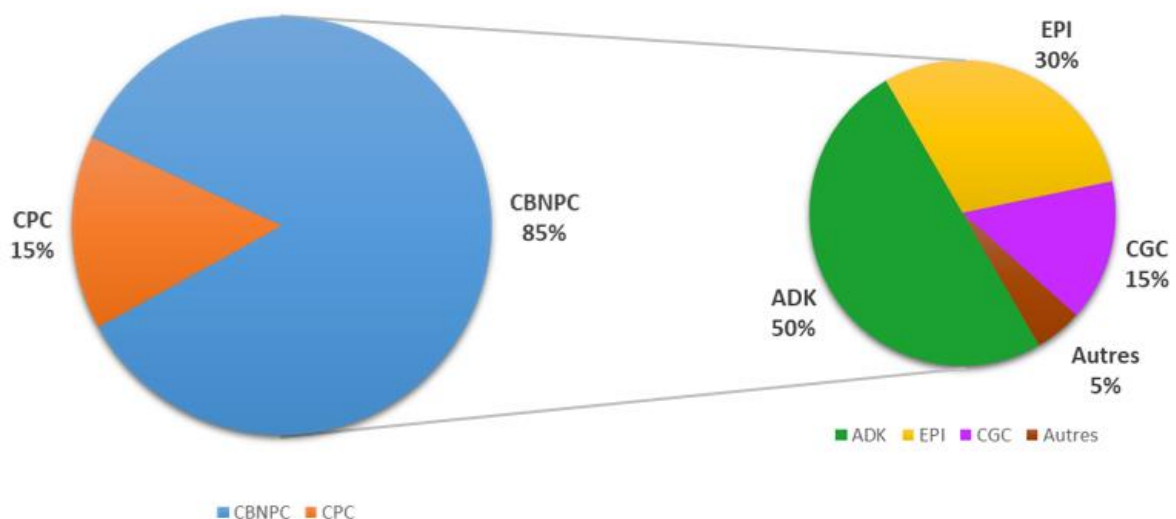


Figure 5 : Proportion des différents sous-types de cancer du poumon et des types histologiques de CBNPC

ADK : Adénocarcinome, CGC : Carcinome à grandes cellules, EPI : épidermoïde

3- La classification IASLC/ATS/ERS des adénocarcinomes pulmonaires

De par la grande diversité de morphologie des adénocarcinomes, une classification leur a été dédiée. Elle a été développée par un consortium international de professionnels dans l'étude et le traitement des cancers broncho-pulmonaires (oncologues, pneumologues, pathologistes, chirurgiens thoraciques...) et représentants de l'IASLC, de l'American Thoracic Society (ATS) et de l'European Respiratory Society (ERS) [35]. Comme pour la classification WHO, la classification IASLC/ATS/ERS se base d'abord sur des critères morphologiques, et affinés par des critères immunohistochimiques, puis de biologie moléculaire. Le sous-type prédominant est celui qui représente la plus grande surface tumorale.

- **Les adénocarcinomes in situ (AIS)** : ce sont des tumeurs d'aspect lépidique de moins de 3cm sans invasion ni modification de l'architecture pulmonaire.
- **Les adénocarcinomes à invasion minime (AIM)** : ce sont des tumeurs d'aspect lépidique de moins de 3 cm avec un foyer d'invasion de moins de 5mm.
- **Les adénocarcinomes lépidiques** : les cellules tumorales dérivent des cellules pneumocytaires non mucipares et prolifèrent le long des parois alvéolaires sans altérer l'architecture pulmonaire.
- **Les adénocarcinomes tubulaires** : les cellules tumorales s'organisent autour des lumières glandulaires, formant de grands tubes d'apparence glandulaire.
- **Les adénocarcinomes papillaires** : les cellules tumorales sont cylindriques et organisée autour d'un axe fibro-conjonctif vasculaire.
- **Les adénocarcinomes solides** : les cellules tumorales sont organisées en massifs (ou nids) ovalaires, sans architecture glandulaire.
- **Les adénocarcinomes micropapillaires** : Les cellules tumorales s'organisent de la même façon que les adénocarcinomes papillaires. Mais la prolifération le long des alvéoles est supplémentées par la formation d'amas de cellules tumorales sans axes fibro-conjonctifs dans les lumières alvéolaires
- **Les adénocarcinomes mucineux** : Les cellules tumorales sécrètent une importante quantité de mucus, qui est observé en flasque et distendent les alvéoles.

Cette classification ne s'applique que sur des pièces opératoires. En effet, des contingents multiples peuvent être présents et peuvent être manqués lors de la réalisation de la biopsie. De plus, le diagnostic des AIS et AIM ne peuvent pas être réalisés sur biopsie, compte rendu de leurs petites tailles et de la nécessité de les distinguer des adénocarcinomes lépidiques.

L'étude de marqueurs immunohistochimiques a pour but de compléter l'étude morphologique [36]. Deux marqueurs sont majoritairement recherchés :

- TTF1 (Thyroid-Transcription Factor-1) est un facteur de transcription nucléaire impliqué dans le développement de la glande thyroïde et du poumon. Dans le poumon, il est exprimé par les pneumocytes, d'où son utilisation comme marqueur de l'épithélium et intervient dans l'activation transcriptionnelle des surfactants. 80% des adénocarcinomes surexpriment le TTF1, alors qu'il est absent dans les carcinomes épidermoïdes [37,38].
- P40 correspond à un isoforme tronqué en N-terminale de la protéine p63 formée par le gène P63 ($\Delta Np63$). Dans sa forme non tronquée, c'est une protéine qui régule l'apoptose des cellules. A l'inverse de la protéine TTF-1, P40 est peu ou pas exprimée dans les adénocarcinomes, mais fortement exprimée dans les carcinomes épidermoïdes [39,40].

L'utilisation combinée du TTF1 et de P40 en immunohistochimie aide au diagnostic des adénocarcinomes et des carcinomes épidermoïdes [37,41]. D'autres marqueurs plus spécifiques des cellules neuroendocrines, comme la chromogranine A et la synaptophysine, vont orienter le diagnostic vers un carcinome neuroendocrine.

Plusieurs équipes, [42–44] dont la nôtre, ont montré l'impact pronostique de la classification des adénocarcinomes selon les 3 grades pronostiques décrits par Yoshizawa *et al* [45] :

- Les adénocarcinomes de bas grades comprennent les AIS et les AIM
- Les adénocarcinomes de grades intermédiaires comprennent les adénocarcinomes lépidiques, tubulaires et papillaires
- Les adénocarcinomes de haut grades comprennent les adénocarcinomes solides, micropapillaires et mucineux.

Plusieurs études ont validé cette différence pronostique [46,47] (Figure 6). Tsao *et al.* ont montré son impact pronostique sur la survie sans maladie et la réponse à la chimiothérapie adjuvante [47].

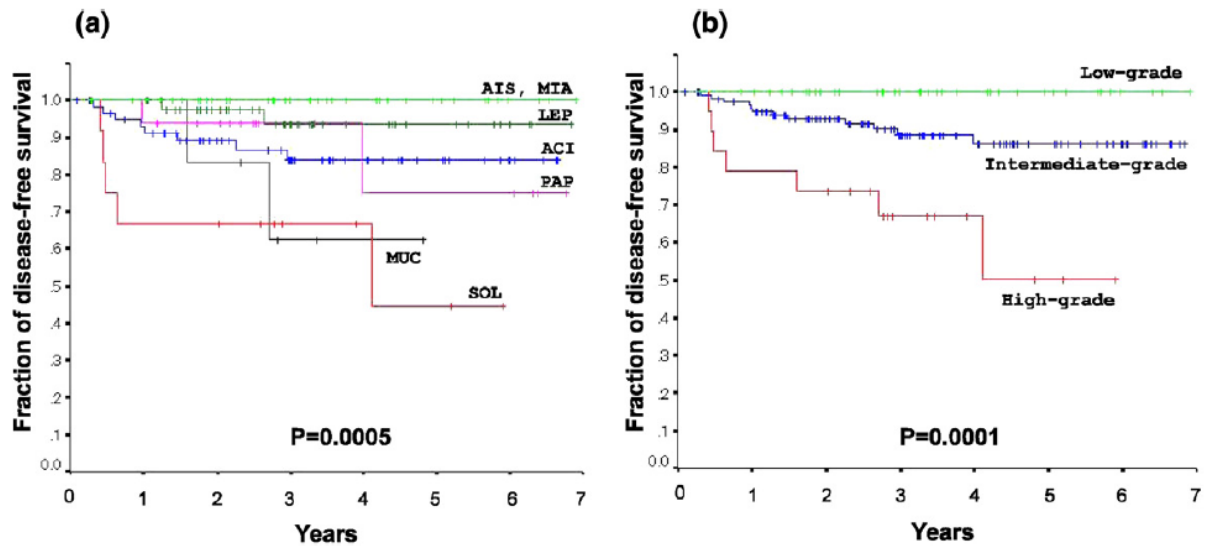


Figure 6 : Survie sans maladie selon le grade de tumeur [46]

(a) D'après la 7^{ème} édition (b) d'après la 8^{ème} édition. ACI : acinaire (tubulaire), AIS : Adénocarcinome in situ, LEP : lépidique, MIA : Minimally Invasive Adenocarcinoma, MUC : mucineux, PAP : papillaire, SOL : solide

IV- Les traitements des cancers broncho-pulmonaires

1- La résection chirurgicale

La résection chirurgicale consiste en l'exérèse de la tumeur par le chirurgien thoracique. Elle s'effectue par le retrait d'un segment (segmentectomie), d'un lobe (lobectomie) ou d'un poumon entier (pneumonectomie) selon la taille de la tumeur et sa localisation périphérique ou proximale. Un curage des ganglions locaux régionaux et médiastinaux sont nécessaires pour évaluer le stade de la maladie [48]. Les résultats de ces analyses auront un impact majeur sur le traitement anticancéreux post-opératoire.

2- La radiothérapie

La radiothérapie est un traitement locorégional qui utilise une source ionisante pour détruire les cellules à forte division. Les cellules tumorales se multiplient beaucoup plus rapidement que les cellules souches saines et sont donc plus sensibles aux effets des rayonnements ionisants. Le rayonnement entraîne des cassures de l'ADN, leurs accumulations provoquant inévitablement la mort de la cellule cible par apoptose ou nécrose. La grande majorité des traitements de radiothérapie utilisent une source de rayonnement à l'extérieur de l'organisme et focalise les rayonnements ionisant sur la zone tumorale. D'autres applications, comme la curiethérapie, consistent à injecter la source radioactive au plus près de la lésion tumorale pour en réduire les effets secondaires sur les cellules saines. La délivrance se fera en plusieurs cycles, à des doses personnalisées à la tumeur et au patient. La radiothérapie seule a montré des taux de réponse très modeste, avec une amélioration de la survie à 3 ans de l'ordre de 5% [49].

3- La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement systémique ciblant des facteurs clés de la croissance, de la réplication et de la division cellulaire. Les cellules tumorales, en forte division, sont plus sensibles aux chimiothérapies que les cellules saines. Comme pour la radiothérapie, la chimiothérapie est administrée par cycles (cures), à des doses dépendantes de multiples paramètres, notamment le type de tumeur et l'état de santé du patient. Certaines utilisent des sels de platines comme le cisplatine et le carboplatine, qui bloquent les mécanismes de

transcription et de traduction de l'ADN en ARN, puis en protéines. Le pémétréxed et la gemcitabine ciblent plus spécifiquement les enzymes impliquées dans la synthèse des acides nucléiques, constituant de l'ADN, tandis que la vinblastine, le vinorelbine ou encore le docétaxel bloque le déploiement du réseau de microtubules cellulaire qui se met en place lors de la mitose et en empêche le bon déroulement [50] (Figure 7). 2 types de chimiothérapies doivent être distingués :

- La chimiothérapie adjuvante est réalisée après résection chirurgicale et vise à éliminer les cellules tumorales résiduelles de la chirurgie. Plusieurs études ont montré son efficacité, avec une amélioration de 5% de la survie globale [51,52].
- La chimiothérapie néo-adjuvante a pour but de réduire la taille de la tumeur pour améliorer l'efficacité de la thérapie principale et la survie globale. Des études semblent montrer un gain significatif de la survie avec la chimiothérapie néo-adjuvante dans des stades avancés, mais seulement chez les patients N0 et N1, avec un gain de survie de l'ordre de 5% [53–55]. Ces données doivent encore être validées sur des cohortes plus importantes.

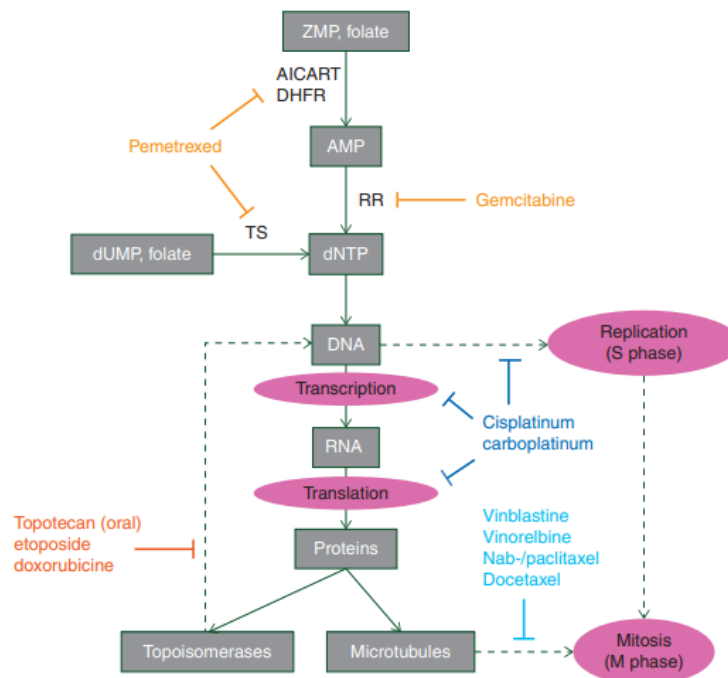


Figure 7 : Les cibles d'action principales des chimiothérapies [50]

AICART : aminoimidazolecarboxamide ribonucleotide formyltransferase, DHFR : dihydrofolate reductase, RR : ribonucleotide reductase, TS : Thymidylate synthase, ZMP : 1-β-D-ribofuranosyl-5-Aminoimidazole-4-carboxamide-5'-phosphate

La chimiothérapie est fréquemment utilisée en combinaison avec la radiothérapie. L'objectif de cette radio-chimiothérapie est de potentialiser les effets respectifs de chaque traitement en ciblant différents processus cellulaires. Plusieurs études ont montré que des patients souffrant de CBNPC localement avancés traités par radio-chimiothérapie avaient un taux de réponse et des survies globales et sans progression supérieures à la radiothérapie conventionnelle [56,57].

4- Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées sont des traitements médicamenteux qui ciblent des anomalies moléculaires détectées dans les cellules tumorales, qui potentialisent leurs croissances et leurs proliférations. Ces anomalies sont identifiées par séquençage de l'ADN ou l'ARN tumoral d'une biopsie ou de l'ADN tumoral circulant dans le sang. Les mutations activatrices du gène *EGFR* (Del19, L858R) et les recombinaisons du gène *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) ont été les premières identifiées dans les adénocarcinomes. Aujourd'hui, de plus en plus de drivers oncogéniques ciblables ont été découverts comme *ROS1* (ROS Proto-Oncogene 1), *BRAF* (B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma proto-oncogene), *HER2* (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2), *MET* (Mesenchymal-epithelial transition factor – proto-oncogene) et *RET* (REarranged during Transfection - proto-oncogene) [58] (Figure 8). Ces thérapies sont approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement des CBNPC de stade avancés non résecables [59,60], et ont montré de bons résultats, avec des taux de réponse supérieur à 50% [61–64] (Table 3).

Ces médicaments sont, pour la grande majorité, des inhibiteurs des tyrosines kinases (TKI) qui jouent un rôle prépondérant dans la signalisation cellulaire (Figure 9). Les TKI bloquent les mécanismes cellulaires impliqués dans la croissance et la prolifération tumorale. Les carcinomes épidermoïdes sont rarement mutés pour ces gènes et sont donc de mauvais candidats pour ces thérapies.

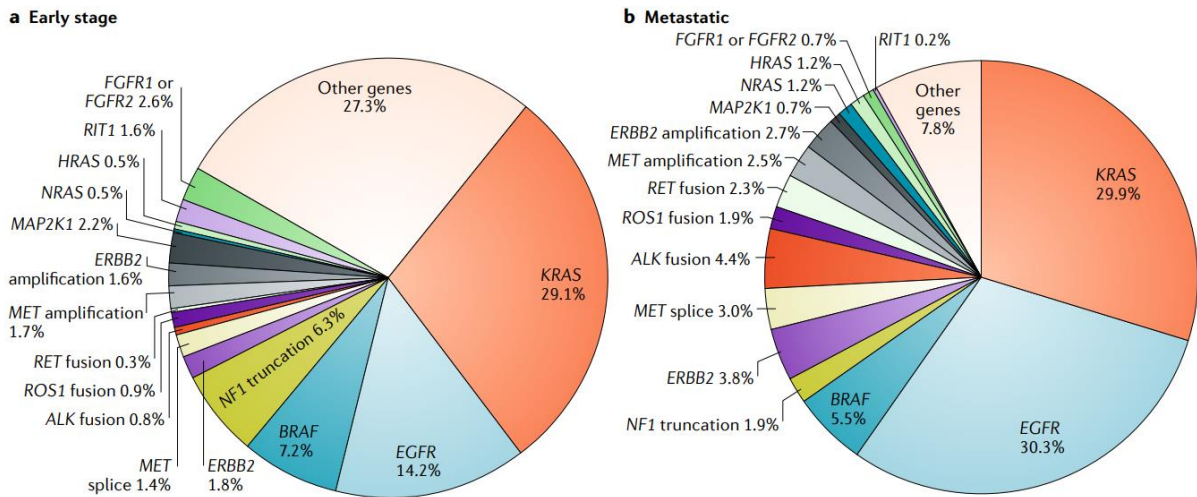


Figure 8 : Incidence des drivers oncogéniques dans les adénocarcinomes pulmonaires[65]
 (a) Dans les adénocarcinomes pulmonaires de stade précoce (données combinées de séquençage de l'exome entier du TCGA et de 5 publications (N=741)), (b) Dans les adénocarcinomes pulmonaires métastatiques (données combinées de séquençage nouvelle génération de panels ciblés sur les gènes liés au cancer des études MSK-IMPACT et FoundationOne (N=5262))

	<i>EGFR</i>	<i>ALK</i>	<i>ROS1</i>	<i>BRAF</i>	<i>KRAS</i>	<i>HER2</i>	<i>MET</i>	<i>RET</i>	<i>NTRK</i>
Targeted therapy	80% ^a	83%	77%	64%	54% ^b	55%	71%	68%	75%
ICI	11%	4%	14%	24%	57% ^c	15%	23%	11%	NA
					25%				
ICI + targeted therapy	75% ^d	81% ^d							
Chemotherapy + ICI	81% ^e	NA			41%				

NOTE. The following key refers to data source: bold, randomized phase III clinical trials; italic, phase I or II single-arm clinical trials; bold and italic, subgroup analysis of phase III clinical trials; bold and underline, pooled analysis of retrospective series. For EGFR and ALK, data from phase II noncomparative trials and subgroup analysis of phase III clinical trials are also available. For KRAS, data from subgroup analysis of phase II or III clinical trials are also available. Abbreviations: ICI, immune checkpoint inhibitor.

^aIn sensitizing mutations.

^bSpecific KRAS G12C inhibitor.

^cIn first line.

^dIncreased grade ≥ 3 toxicities.

Table 3 : Meilleurs taux de réponse global par mutation driver et par traitement dans le CBNPC [64]

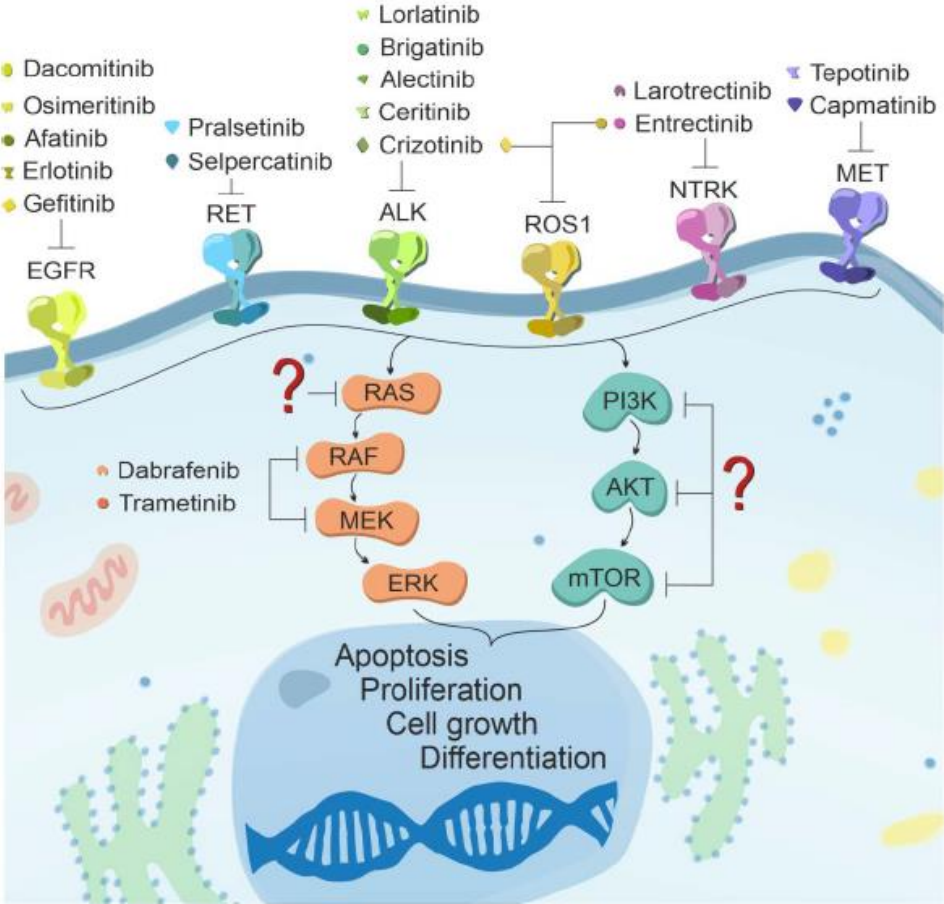


Figure 9 : Les voies de signalisation inhibées par les thérapies ciblées approuvées par la FDA [66]

5- L'immunothérapie

L'immunothérapie est une approche thérapeutique visant à stimuler le système immunitaire en modulant les mécanismes d'immunosuppression et d'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale. La distinction avec les thérapies ciblées se situe sur la cible thérapeutique. Alors que les thérapies ciblées agissent sur des mécanismes cellulaires de la cellule tumorale, l'immunothérapie agit sur les points de contrôle immunitaire (« *immune checkpoint* »), des protéines présentes à la surface de certaines cellules immunitaires et qui en régule l'activité. Les médicaments utilisés sont des anticorps monoclonaux dirigés contre un immune checkpoint particulier et qui bloque l'interaction avec son ligand ou son récepteur spécifique. Le mécanisme d'inhibition de la réponse immunitaire est alors bloqué. Dans les CBNPC, les immunothérapies les plus courantes sont celles dirigées contre la voie PD-1/PD-L1 (Programmed cell Death protein 1/ Programmed cell Death ligand protein 1), notamment du fait que la cellule tumorale pulmonaire peut exprimer PD-L1 comme mécanisme d'échappement tumoral, parfois en association avec des anti-CTLA-4 (Cytotoxique-T-Lymphocyte- Antigen 4). D'autres immunothérapies, en essais, ciblent des signaux de costimulation de la réponse immunitaire ou des voies métaboliques du système immunitaire et sont développés en détail dans la publication de Walsh *et al.* [67]. Cette grande diversité de cible thérapeutique est à l'origine de nombreuses molécules thérapeutique, dont certaines ont montré une bonne efficacité dans les mélanomes, les cancers du côlon, les cancers du poumon et les cancers du rein [68], mais également dans les maladies auto-immunes et infectieuses [69,70] (Figure 10).

Aujourd'hui, l'expression tumorale de la protéine PD-L1 est le seul marqueur décisionnel utilisé pour la prescription d'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 dans le cancer du poumon [71,72]. Elle est évaluée par le TPS (Tumor Proportion Score) qui représente le pourcentage de cellules tumorales PD-L1 positifs. 3 seuils de positivité sont couramment utilisés : strictement inférieur à 1% (<1%), supérieur à 1% inclus et strictement inférieur à 50% ($1\% \leq \text{PD-L1} < 50\%$) et supérieur ou égal à 50% ($\geq 50\%$).

De nombreuses immunothérapies ont reçu une autorisation de mise sur le marché par la FDA et l'European Medicine Agency (EMA) pour le cancer du poumon. Les principaux anti-PD-1 commercialisés sont le nivolumab (Opdivo, Bristol Myers Squibb) et le pembrolizumab (Keytruda, Merck). Les principaux anti-PD-L1 sont l'atezolizumab (Tecentriq®, ROCHE) et le durvalumab (Imfinzi®, AstraZeneca) [73].

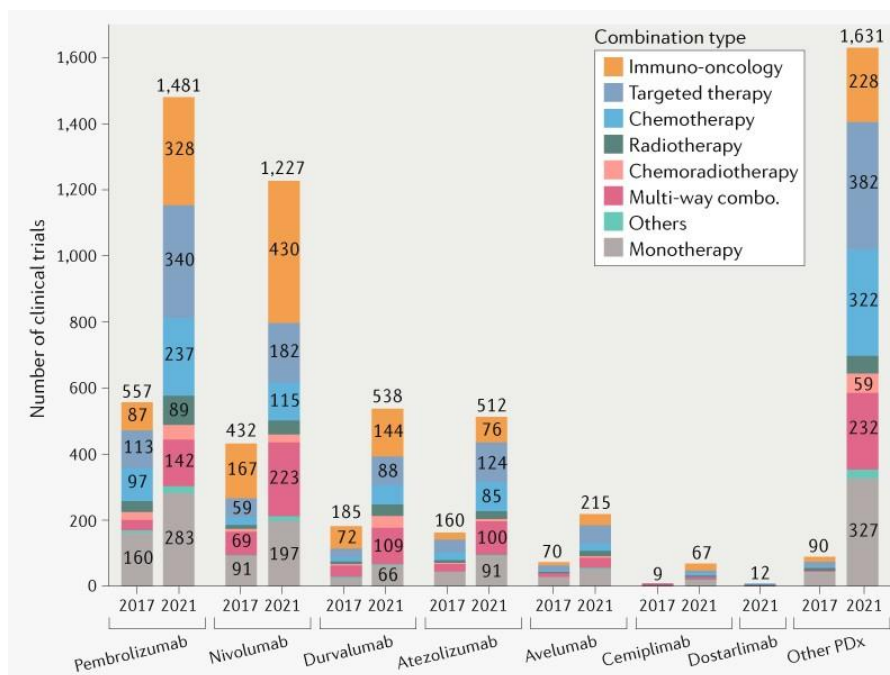


Figure 10 : Essais cliniques avec des anticorps monoclonaux anti-PD-1/PD-L1 entre 2017 et 2021[69]
 En décembre 2021, 5683 études cliniques sont en cours pour évaluer l’efficacité des anticorps monoclonaux anti-PD-1/PD-L1. « Others PDx » inclus les anti-PD-1/PD-L1 non approuvés par la FDA

La présence d’un PD-L1 TPS>50% est lié à une moins bonne survie globale et survie sans progression chez des patients souffrant de CBNPC non traité par anti-PD-1 [71]. Le pembrolizumab donne des résultats encourageants avec un taux de survie à 5 ans de 30%, en première ligne. Les résultats sont plus mitigés pour les TPS<50% [74,75]. Les anti-PD-1 donnent également de bon résultats, avec une réponse observée pour 25% des patients avec un TPS>1% [76]. L’immunothérapie est également étudiée dans le CBNPC de stade précoce, avec une augmentation de la survie globale et de la survie sans progression, quel que soit le statut TPS [77] (Figure 11). Globalement, l’immunothérapie est efficace chez 15 à 20% des patients dont les tumeurs ont un TPS élevé et, inversement, 7% des patients dont les tumeurs sont négatives pour le PD-L1 (TPS<1%) ont une meilleure survie globale sous immunothérapie, soulignant le caractère imparfait du biomarqueur PD-L1 et de l’importance de mieux sélectionner les patients pouvant bénéficier de cette thérapie [78,79]. L’expression tumorale de PD-L1 est variable sur le plan spatial et temporel, alors que la technique d’immunohistochimie est maîtrisée [80].

L’efficacité de l’immunothérapie est limitée dans le temps, la majorité des patients vont progresser ou rechuter [81,82], démontrant que l’immunothérapie seule ne permet pas d’obtenir

la guérison. Ces résultats soulignent la nécessité de combinaison d'immunothérapie avec des thérapies plus conventionnelles de chimiothérapie ou thérapie ciblée [67,73,83].

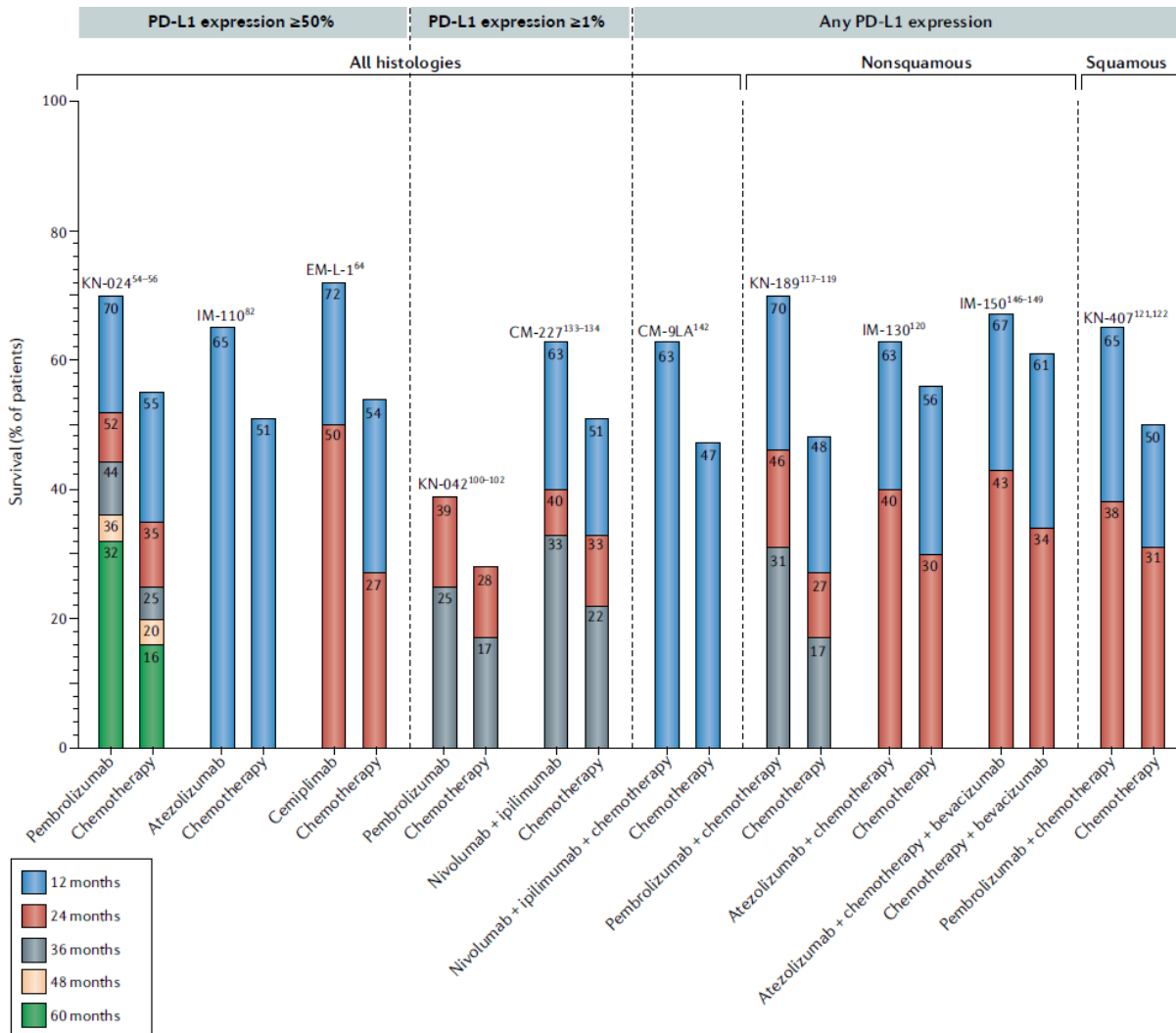


Figure 11 : Survie globale des patients souffrant de CBNPC sans mutation ciblables selon le traitements en première ligne et le statut PD-L1 TPS [84]

L'essai clinique correspondant est indiqué au-dessus des barres. CM : CheckMate, EM-L-1 : EMPOWER-Lung1, IM : IMpower, KN : KEYNOTE

6- Prise en charge thérapeutiques des cancers broncho-pulmonaires

La prise en charge thérapeutique des cancers broncho-pulmonaires dépend de plusieurs paramètres :

- du type histologique : les possibilités de traitement sont sensiblement différentes entre les CBNPC et les CPC, mais également entre les adénocarcinomes et les carcinomes épidermoïdes.

- du stade TNM lors du diagnostic. Les possibilités de traitements, ainsi que leurs efficacités, sont plus importants dans les stades précoces et meilleure est la survie des patients traités.
- de paramètres cliniques du patient. L'échelle de performance du patient est un indicateur important dans la prise de décision thérapeutique. Elle mesure l'état de santé général du patient et détermine si l'administration de traitement anticancéreux, notamment la chimiothérapie, est possible ou si des ajustements de posologie sont nécessaires. Le statut tabagique, la présence de comorbidité ou d'antécédents familiaux ou personnels de cancer sont d'autres facteurs qui peuvent impacter les possibilités de traitement.

Les pratiques cliniques de prise en charge des cancers broncho-pulmonaires sont publiées et régulièrement mis à jour par des consortiums internationaux de professionnel de l'oncologie médicale [85].

Immunité et Cancer

V- La tumorigenèse

La tumorigenèse consiste en l'ensemble des mécanismes cellulaires aboutissant à la transformation maligne d'une cellule normale et la formation de tumeur. Elle regroupe un ensemble de mécanismes complexes et séquentiels d'anomalies génétiques et épigénétiques conduisant des cellules saines à acquérir des propriétés malignes. Les événements génétiques conduisant à l'apparition de tumeur sont plutôt bien connus [86], avec plus de 3000 gènes liés à l'apparition de cancer [87].

Ils sont très souvent initiés par une exposition aiguë ou chronique à des agents mutagènes et touchent des gènes impliqués dans les voies de signalisations indispensables à la maintenance cellulaire. Les voies de signalisation cellulaire correspondent à la propagation d'un signal intracellulaire, résultant de stimuli extérieurs et aboutissant à une réponse cellulaire spécifique. L'initiation du signal est médiée par l'interaction d'un ligand extracellulaire avec un récepteur membranaire de la cellule. Le signal se propage en intracellulaire, par un ensemble de protéines activées successivement en cascade, jusqu'au noyau et moduler l'expression de groupes de gènes. Une dérégulation des voies de signalisation peut mener à une prolifération excessive, l'acquisition de résistance à l'apoptose, une activation incontrôlée ou encore favoriser la progression tumorale.

Lorsqu'ils sont mutés, 3 types de gènes peuvent entraîner la transformation maligne :

- Les gènes suppresseurs de tumeurs : ce sont des gènes impliqués dans l'inhibition des mécanismes de prolifération cellulaire et de l'apoptose. Leurs fonctions régulatrices sont perdues ou fortement réduites lorsque des mutations dans leurs séquences ont lieu.
- Les proto-oncogènes : regroupent des gènes variés impliqués dans les fonctions essentielles des cellules comme la prolifération, la survie, la division, l'apoptose ou la différenciation et dont l'apparition d'altération génétique entraîne une activation incontrôlée des mécanismes générateurs de tumeurs.
- Les gènes de réparation de l'ADN : qui codent pour les protéines impliquées dans la réparation des altérations de l'ADN cellulaire. L'incidence des mutations des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN est bien inférieure à ceux des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur [88]. Néanmoins, les mutations des gènes UBE2N (Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 N), SMC1L2 (structural

maintenance of chromosomes *IL2*) et POLB (DNA Polymerase β) sont spécifiquement associés au CBNPC [89].

De nombreux « hotspot » mutationnel ont été décrits dans les cancers. Leurs incidences et les voies de signalisations affectées sont très variables selon les types de tumeurs [88] (Figure 12).

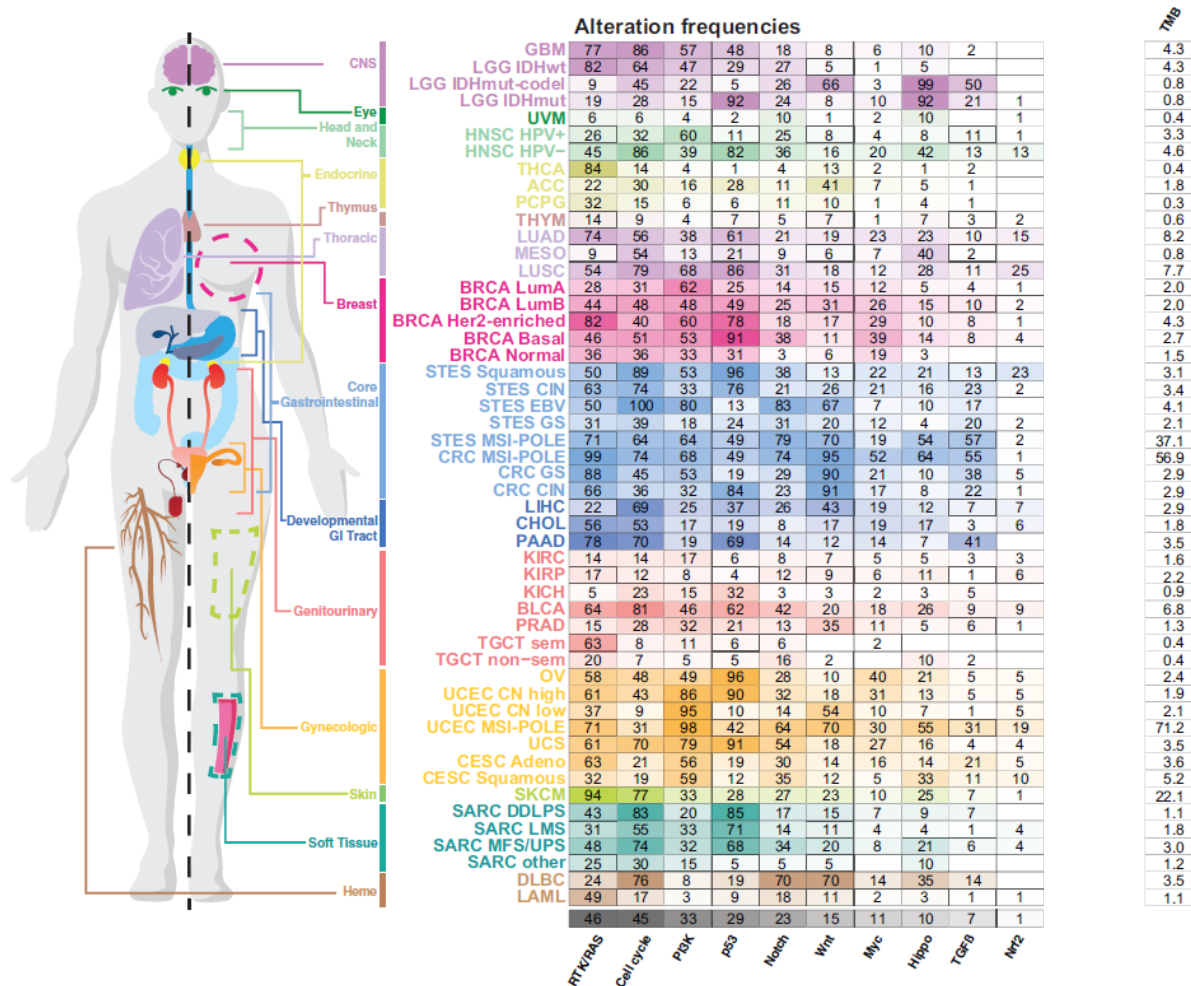


Figure 12 : Proportion des altérations par voie de signalisation et sous-type de tumeur [88]
 Les voies de signalisation sont triées par ordre décroissant de médiane de fréquence d'altération. Les couleurs sont de plus en plus intenses avec la fréquence d'altération. Les sous-types « instabilité microsatellitaire » (MSI) et « Polymerase epsilon » (POLE) ont été regroupés dans les cancers colorectaux, de l'estomac et de l'endomètre. TMB : Tumor Mutational Burden

Dans le CBNPC, 4 voies sont fréquemment mutées : la voie p53, le cycle cellulaire, la voie RTK/RAS/RAF/MEK et la voie PI3K/AKT/mTOR [88,90].

1- La voie p53

TP53 est un gène suppresseur de tumeur codant pour le facteur de transcription p53, une protéine pro-apoptotique connue comme la « Gardienne du génome ». Une fois transloquée au noyau, elle régule un large panel de fonction cellulaire comme la prolifération, le cycle cellulaire ou encore l'apoptose. Selon le stress cellulaire d'origine (comme les dommages de l'ADN, les oncogènes ou l'hypoxie), une cascade de phosphorylation de protéines médiatrices spécifiques aura lieu. Dans tous les cas, cela va aboutir à la phosphorylation de p53 qui va alors être transloqué et réaliser ses effets transcriptionnels. Les protéines MDM2 et MDM1 sont les principaux inhibiteurs de p53 et assurent la stabilité d'activation de la voie [91].

TP53 est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers de toute origine. Dans le CBNPC, environ 60 à 70% des tumeurs présentent une mutation de *TP53* [92].

2- La voie RTK/RAS/RAF/MEK

Cette voie de signalisation, la seconde plus mutée dans le CBNPC, est la plus mise à profit pour les thérapies ciblées. Elle est caractérisée par une cascade de phosphorylation protéique aboutissant à une réponse cellulaire.

Elle a un rôle central dans la régulation de la prolifération, la croissance et la différenciation. Elle est activée par la liaison d'un facteur de croissance, de cytokines ou d'hormones à un large panel de récepteur membranaire à activité tyrosine kinase (RTK) comme EGFR, ERBB2/3/4 (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase), MET, KIT (KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase), ALK, ROS1 et FGFR1/2/3/4 (Fibroblast Growth Factor Receptor), qui recrute à son tour les protéines RAS (Rat sarcoma virus), qui ont 3 isoformes (HRAS, KRAS, NRAS). Une cascade de phosphorylation va entraîner l'activation des protéines RAF (Rapidly accelerated fibrosarcoma), puis des protéines MEK (Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase) et enfin des protéines ERK (Extracellular signal-regulated kinase), qui agissent comme des facteurs de transcription en se transloquant dans les noyaux et activant la transcription des gènes [93,94].

De nombreux gènes codants pour les protéines de cette voie de signalisation sont fréquemment mutés. Dans le CBNPC, la famille des RAS est mutée dans 30% des cas, dont 96% sont des mutations de KRAS. EGFR est muté dans 10 à 15% des cas et le gène ALK réarrangé dans 5% des cas. Enfin, le gène BRAF, de la famille des RAF, est également retrouvé muté dans 7% des cas [95].

3- La voie PI3K/AKT/mTOR

La voie PI3K/AKT/mTOR joue un rôle prépondérant dans la croissance cellulaire, le métabolisme, la prolifération et la survie. Elle est fréquemment activée dans les processus cancéreux.

Comme pour la voie RTK/RAS/RAF/MEK, la voie PI3K/AKT/mTOR se compose d'une multitude de kinase qui s'active en cascade et débute avec l'activation d'un RTK. Cette activation entraîne, en aval, l'activation de PI3K (phosphoinositide 3-kinase) puis des protéines membranaires PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) ; ce qui assure le recrutement de la protéine AKT (Akt strain transforming). La protéine mTOR (mechanistic target of rapamycin), retrouvé sous forme de complexe protéique, est alors activée tandis que TSC1/2 (tuberous sclerosis complex) (qui inhibait mTOR dans le complexe mTORC1/2) est inhibé. Le complexe mTOR interagit ensuite directement avec les protéines du cycle cellulaire, de l'apoptose ou de l'organisation du cytosquelette et en module les fonctions [96].

De nombreuses anomalies peuvent provoquer l'activation de mTOR. Dans le CBNPC, la perte de fonction de la protéine suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) qui inhibe le recrutement de PI3K, est retrouvé dans environ 5% des cas. Des mutations de PI3K, l'amplification d'AKT ou encore l'inactivation de TSC1/2 sont également fréquents [97].

4- Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se déroule en 4 phases successives (G1, S, G2, M) finement régulés par des points de contrôles cruciaux pour la survie cellulaire. Dans un processus cellulaire normal, ces « checkpoints » contrôlent l'intégrité de la cellule et la mise en place des mécanismes cellulaires subséquents. Ils se composent de mécanismes intracellulaires inhibiteurs du cycle cellulaire et sont surexprimés si la cellule ne remplit pas les conditions nécessaires à une prolifération normale. 3 points de contrôles majeurs existent : en fin de phase G1 avant la phase S de duplication du génome, à la fin de la phase S après contrôle de l'intégrité du génome et entre les phases G2 et M lorsque la cellule se prépare à la mitose.

Les étapes du cycle cellulaire sont médiées par une dizaine de combinaison de cyclines et de kinases dépendantes de cycline. Chaque combinaison agit à une étape bien particulière du

cycle et est régulée par des protéines dont l'expression est modulée par d'autres voies de signalisation cellulaire. A titre d'exemple, les facteurs de transcription E2F, d'importance capitale dans l'initiation de la réplication et l'entrée en phase S, sont surexprimées lors de l'activation de la voie RAS/RAF/MEK/ERK [98].

Le gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) code pour 2 protéines inhibitrices du cycle cellulaire : p16INK4a qui inhibe les complexes CDK (cyclin-dependent kinase) 4/6 - cycline D, initiateurs du cycle cellulaire et contrôleur de la sénescence, et p14ARF qui inhibe le cycle cellulaire et induisant l'apoptose en inhibant la dégradation de la protéine p53 par la protéine MDM2 (murine double minute 2) [98]. 20 à 30% des CBNPC présentent des mutations de *CDKN2A* conduisant à la perte de fonction de ces protéines.

VI- L'acquisition des propriétés biologiques tumorales : les « Hallmarks » du cancer

Dès les années 2000, les avancées de la recherche en oncologie a montré à la fois la grande diversité, mais aussi la grande complexité des mécanismes de la tumorigenèse. Afin de rationaliser et conceptualiser la tumorigenèse, Douglas Hanahan et Robert Weinberg ont suggérés les propriétés majeures acquises par les cellules saines lors de leurs transformations et croissance néoplasique, et cruciales à la formation de tumeur ou « Hallmarks of Cancer ». Les auteurs ont proposés, en 2000, 6 altérations essentielles que partagent toutes les cellules tumorales au niveau cellulaire [99] :

1. L'autonomie vis-à-vis des signaux de croissance
2. L'insensibilité aux signaux antiprolifératifs
3. La capacité à éviter l'apoptose
4. Une capacité proliférative infinie
5. L'induction durable de l'angiogenèse
6. L'acquisition d'un pouvoir invasif et de formation de métastases

En 2011, les mêmes auteurs ont actualisé les « Hallmarks of cancer » en y intégrant 4 nouvelles caractéristiques [100] :

7. La reprogrammation du métabolisme énergétique
8. L'échappement au système immunitaire
9. L'instabilité génétique des tumeurs
10. L'inflammation chronique

Enfin en 2022, une dernière version publiée par Douglas Hanahan (Figure 13) intègre 4 nouvelles caractéristiques des « Hallmarks of cancer » [101] :

11. La sénescence
12. La plasticité phénotypique et la perturbation de la différenciation
13. La reprogrammation épigénétique
14. Le polymorphisme du microbiome

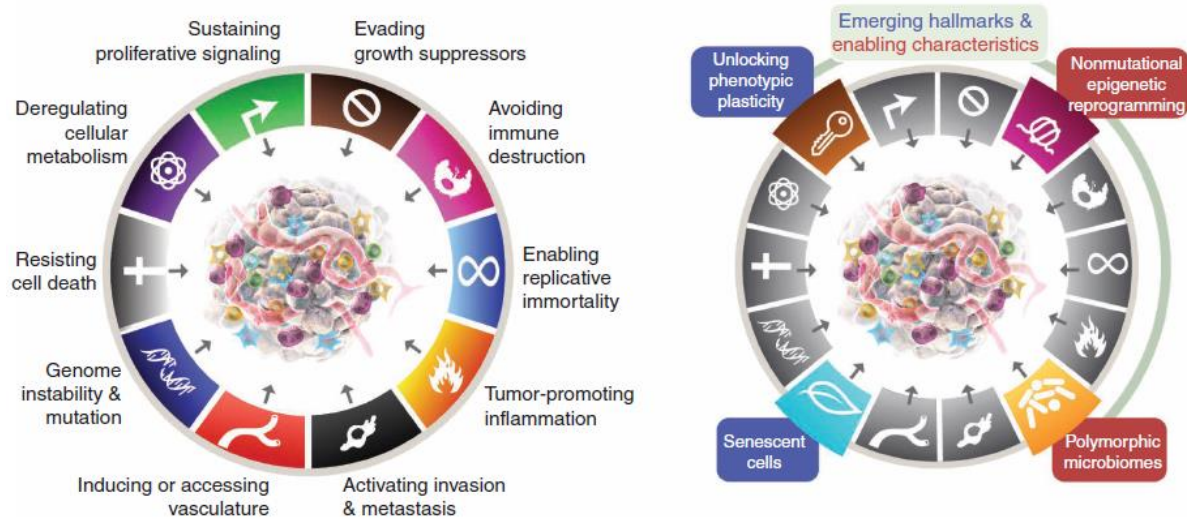


Figure 13 : Les « Hallmarks » du cancer en 2022 [101]

A gauche, les 10 « Hallmarks of cancer » décrits en 2011. A droite, les nouveaux « Hallmarks of cancer » avec les 4 derniers ajoutés en 2022

Ces 14 « Hallmarks » soulignent la complexité des cancers dans leurs émergences, progressions et contrôles. Il est maintenant admis que le cancer n'est pas une maladie de la cellule tumorale mais également du stroma et de l'individu, qui doivent être permissif.

VII- L'« immunoediting » des tumeurs : Règle des 3E

En 1970, Frank Macfarlane Burnet a défini l'immunosurveillance des tumeurs, et a émis l'hypothèse que l'instabilité génétique des tumeurs était à l'origine de néo-antigènes pouvant être reconnus par le système immunitaire et induisant une immunité anti-tumorale, protectrice dans les premiers stades de développement de la tumeur [102]. L'équipe de Robert Schreiber validera cette hypothèse en montrant un temps de développement de sarcome induit par méthylcholanthène plus important chez les souris immunocompétentes, comparée aux souris immunodéficientes [103].

De manière intéressante, l'équipe observe également, au cours du temps, une immunogénicité moindre des tumeurs des souris immunocompétentes, favorisant la progression tumorale par échappement au système immunitaire, suggérant une pression de sélection du système immunitaire pour les clones tumoraux les moins immunogéniques. Il y a une période d'équilibre entre le contrôle tumoral par le système immunitaire et la croissance tumorale puis les mécanismes d'échappement tumoral dominant et permettent la progression tumorale, l'ensemble de ces étapes étant intitulées « immunoediting » [104] ou « règle des 3E » (Figure 14). Cette dynamique du cancer et de l'influence respective des cellules tumorales et de l'environnement immunitaire a été soutenue par d'autres auteurs, notamment dans le CBNPC [105].

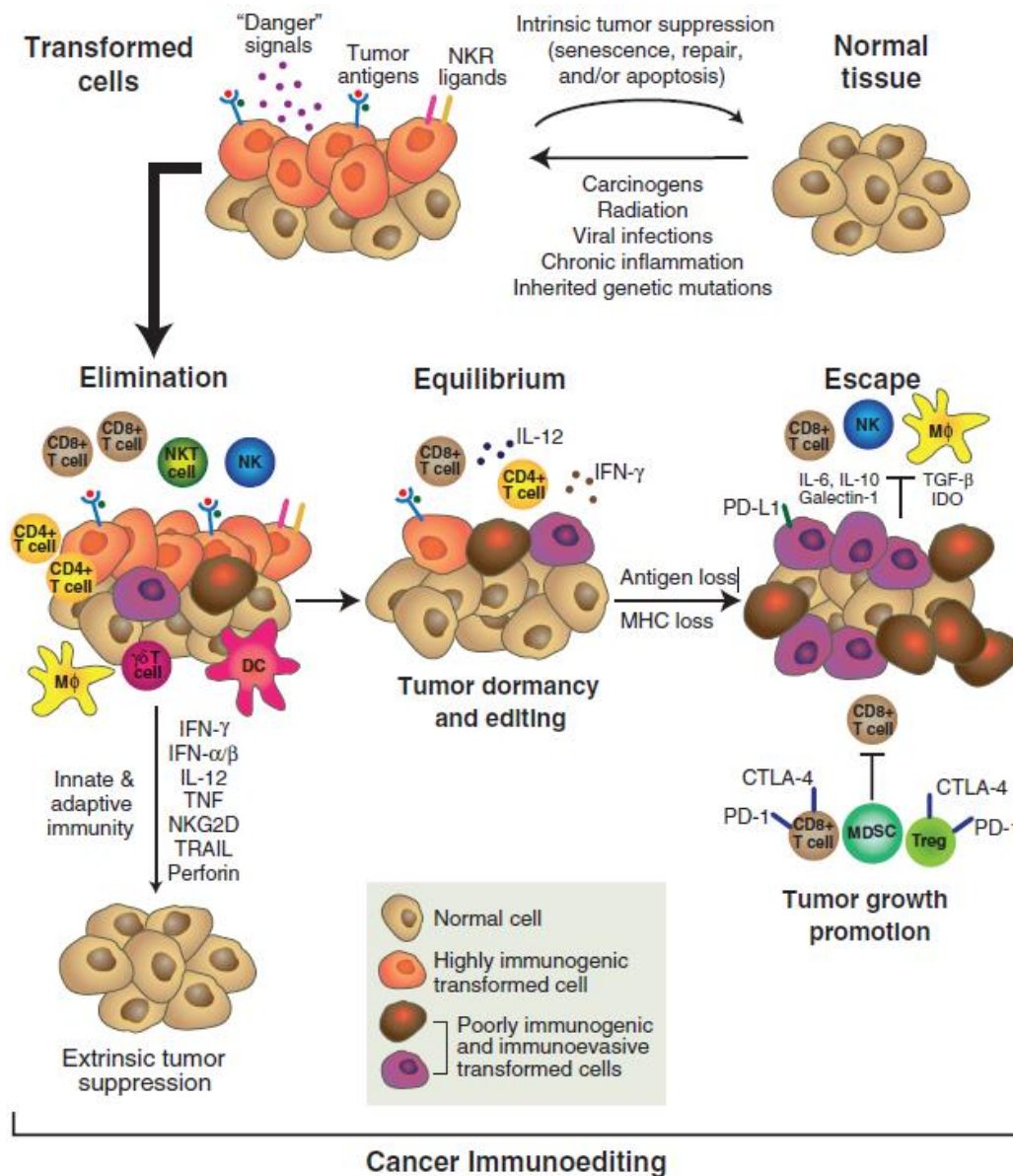


Figure 14 : Le concept d' « immunoeediting » des cancers [104]
 DC : Dendritic cell, Mφ : Macrophage, NKR: Natural Killer Receptor

1- La phase d'élimination

La phase d'élimination correspond à une mise à jour du concept d'immunosurveillance de Frank Macfarlane Burnet. Le système immunitaire inné et adaptatif coopèrent pour détecter et éliminer les cellules tumorales avant qu'elles ne deviennent cliniquement apparentes [104]. Les lymphocytes T CD8+ et les cellules Natural Killer (NK) sont les principaux acteurs de la lyse spécifique des cellules tumorales, via la reconnaissance des antigènes tumoraux et la production de granzyme et de perforine. Les cellules dendritiques ont également un rôle majeur dans la présentation antigénique et l'initiation de la réponse immunitaire anti-tumorale. Une

grande variété de cellules et de médiateurs protéiques et moléculaires va intervenir dans le stroma tumoral, avec des impacts très variés sur la progression tumorale. Les différents acteurs et le déroulement de la réaction immunitaire anti-tumorale seront décrits plus loin.

2- La phase d'équilibre

La phase d'équilibre est initiée lorsque la tumeur n'est plus éliminée par le système immunitaire, mais que le développement tumoral est contenu par les cellules immunitaires. Les cellules tumorales les plus immunogènes ont été éliminées initialement et la pression de sélection entraîne la persistance de clones tumoraux peu immunogènes et plus résistants à la réponse immunitaire anti-tumorale. Parfois, cet équilibre abouti à l'état de dormance sans cellules tumorales cliniquement détectables. C'est une phase de durée variable [106]. La présence de lymphocyte T, d'interleukine 12 (IL-12) et d'IFN γ (interféron- γ) sont nécessaires au maintien des cellules tumorales à l'état de dormance [107].

3- La phase d'échappement

L'acquisition par les cellules tumorales de capacités d'échappement à la réponse immunitaire va leur permettre de proliférer et parfois de se diffuser sous forme de métastases via différents mécanismes [108,109]:

- La perte d'antigénicité par défaut de présentation antigénique sur les molécules du CMH
- La perte d'immunogénicité par l'expression ou la surexpression de protéines du soi
- L'induction d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. Cela peut être par l'expression membranaire ou la sécrétion sous forme soluble de protéines impliquées dans la régulation du système immunitaire (« *immune checkpoint* »), le recrutement de cellules immunitaires pro-inflammatoires ou immunosuppressives, la production de cytokines immunosuppressives ou la diminution de protéines induisant l'apoptose induite par les cellules immunitaires [110].

4- Les mécanismes favorisant la progression tumorale

a. L'inflammation

La réaction inflammatoire correspond à la réponse immunitaire à une lésion tissulaire et assure le recrutement et l'activation des cellules du système immunitaire inné et adaptatif en vue de guérir la lésion et d'en éliminer les éléments pathogènes [111].

Elle se compose d'un large panel de cellules et de médiateurs protéiques. Les plus importants sont les chimiokines, qui vont recruter des populations spécifiques de leucocytes et médier l'évolution de l'inflammation. Les plus notables sont le TNF α , le TGF- β et l'IFN- γ .

- Le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) est l'une des premières cytokines pro-inflammatoire produite par les lymphocytes T. Il se lie aux récepteurs membranaires TNFR1 et TNFR2 (Tumor Necrosis Factor Receptor) des cellules épithéliales et entraîne leurs apoptoses par la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinase) et NF- κ B (nuclear factor-kappa B). Il a également des effets protumoraux, en augmentant l'infiltration et la prolifération des lymphocytes T régulateurs dans le microenvironnement tumoral [112,113].
- L'IFN- γ est une cytokine pléiotrope : elle stimule l'angiogenèse, augmente l'immunogénicité des tumeurs, en leur faisant surexprimer les CMH I et II, mais également leurs capacités d'immunomodulation en leur faisant surexprimer le PD-L1, peut entraîner l'apoptose directe des cellules tumorales ou encore recruter et moduler l'activation des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral [114,115].
- Le TGF- β (Transforming Growth Factor β) a un rôle majeur dans la résolution de l'inflammation et l'immunosuppression des cellules de l'immunité innée et adaptative [116,117].

De nombreuses autres protéines dont les interleukines contribuent à la réaction inflammatoire comme l'IL-1 β et l'IL-6 [118].

Dans un processus inflammatoire aigu standard, la présence de pathogènes ou d'une lésion tissulaire provoque respectivement la libération de PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) ou de DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns), qui sont reconnus par de nombreuses cellules via les PRRs (Pattern Recognition Receptors), une grande famille de récepteur comprenant notamment les TLRs (Toll-like receptors) [119]. La liaison entre le PRRs et son ligand entraîne l'activation de voies de signalisations intracellulaires majeures de l'inflammation, notamment les voies NF- κ B, MAPK et JAK-STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) [118,120]. Elles activent la transcription de nombreux gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6...), des chimiokines (CXCL1,

IL-8...) qui recrutent spécifiquement des cellules inflammatoires et des molécules d'adhésions (P-sélectine, ICAM1 (InterCellular Adhesion Molecule-1), ICAM2, VCAM (Vascular cell adhesion protein)) pour faciliter leurs recrutements, en augmentant la perméabilité vasculaire à proximité du site inflammatoire [121]. Après l'élimination des éléments pathogènes et la réparation des lésions, la résolution de l'inflammation est spontanée et médiée par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires jusqu'au retour de l'homéostasie.

Dans le processus tumoral, l'homéostasie reste perturbée par la persistance de stimuli oncogéniques et de mort cellulaire, qui vont collectivement maintenir l'activation des mécanismes cellulaires de l'inflammation et le recrutement de cellules inflammatoires [122]. L'inflammation chronique a montré son rôle potentialisateur dans l'acquisition d'instabilité génomique et favorise donc le développement tumoral dans l'ensemble des étapes d'immunoediting citées précédemment [104]. L'expression des PRRs sur les cellules tumorales, associée à des mutations dans les voies de l'inflammation, favorise leurs activations incontrôlées et en conséquence la chronicité de l'inflammation [119,123].

b. L'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus physiologique normal qui permet de former de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux déjà existants. Elle est indispensable lors du développement des organes et de la réparation des lésions tissulaires.

La cellule tumorale présente une forte activité métabolique, du fait de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale, et l'activation continue des mécanismes cellulaires de croissance et de prolifération, en générant dans le même temps autant de déchets métaboliques qui doivent être rejetés [120]. La croissance tumorale génère un environnement hypoxique qui va initier l'angiogenèse. Le principal médiateur de l'angiogenèse est le VEGF (Vascular endothelial growth factor), sécrété par de nombreuses cellules immunitaires (neutrophiles, lymphocytes, macrophages...), non immunitaires (fibroblastes) ou tumorales [124]. La liaison du VEGF à son récepteur RTK (VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)), exprimé à la surface des cellules endothéliales induit leurs proliférations et accroît la perméabilité vasculaire. Cette prolifération est stimulée par de nombreux autres médiateurs, notamment des facteurs de croissances pro-angiogénique comme le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et le FGF (Fibroblast Growth Factor), qui se lient respectivement aux récepteurs PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) et FGFR (Fibroblast Growth Factor

Receptor) et des cytokines comme l'IL-1, le TGF- β et le TNF- α des cellules saines comme des cellules tumorales. Les cellules endothéliales à proximité du site d'action vont alors proliférer, déformer la structure vasculaire et sécréter des protéases pour dégrader la membrane basale entourant le capillaire sanguin. La sécrétion de métalloprotéinases matricielles par les cellules immunitaires et les cellules tumorales, en particulier MMP9, amplifie la dégradation de la matrice extracellulaire et permet l'expansion des cellules endothéliales vasculaire dans le microenvironnement extracellulaire [125]. Elles vont alors se répartir le long de l'espace formé par la dégradation de la matrice extracellulaire et bourgeonner vers la source du stimulus, tout en formant une nouvelle membrane basale de soutien.

L'hypoxie joue un rôle amplificateur de l'angiogenèse. Le principal effecteur de l'angiogenèse médiée par l'hypoxie est la protéine HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1), fréquemment surexprimée dans les cancers [126]. En condition normoxique, HIF-1 est synthétisé et dégradé en continu. En condition hypoxique, sa dégradation n'est plus assurée [120]. Il s'accumule alors dans le cytoplasme et active la transcription de nombreux gènes de l'angiogenèse, de la prolifération et de la survie par les voies NF- κ B, RAS/RAF/MEK/ERK et MAPK [127]. Ce dernier point met clairement en évidence le lien intime entre inflammation et angiogenèse (Figure 15).

L'hypoxie modifie également le phénotype des fibroblastes du microenvironnement vers un profil pro-tumoral en favorisant l'angiogenèse par sécrétion de FGF, IL-6, PDGF, et TGF- β [128]. Enfin, par sécrétion de MMP9 et l'augmentation de la mobilité cellulaire, elle encourage la mise en place d'un phénotype invasif et la dissémination de la tumeur en induisant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) [129].

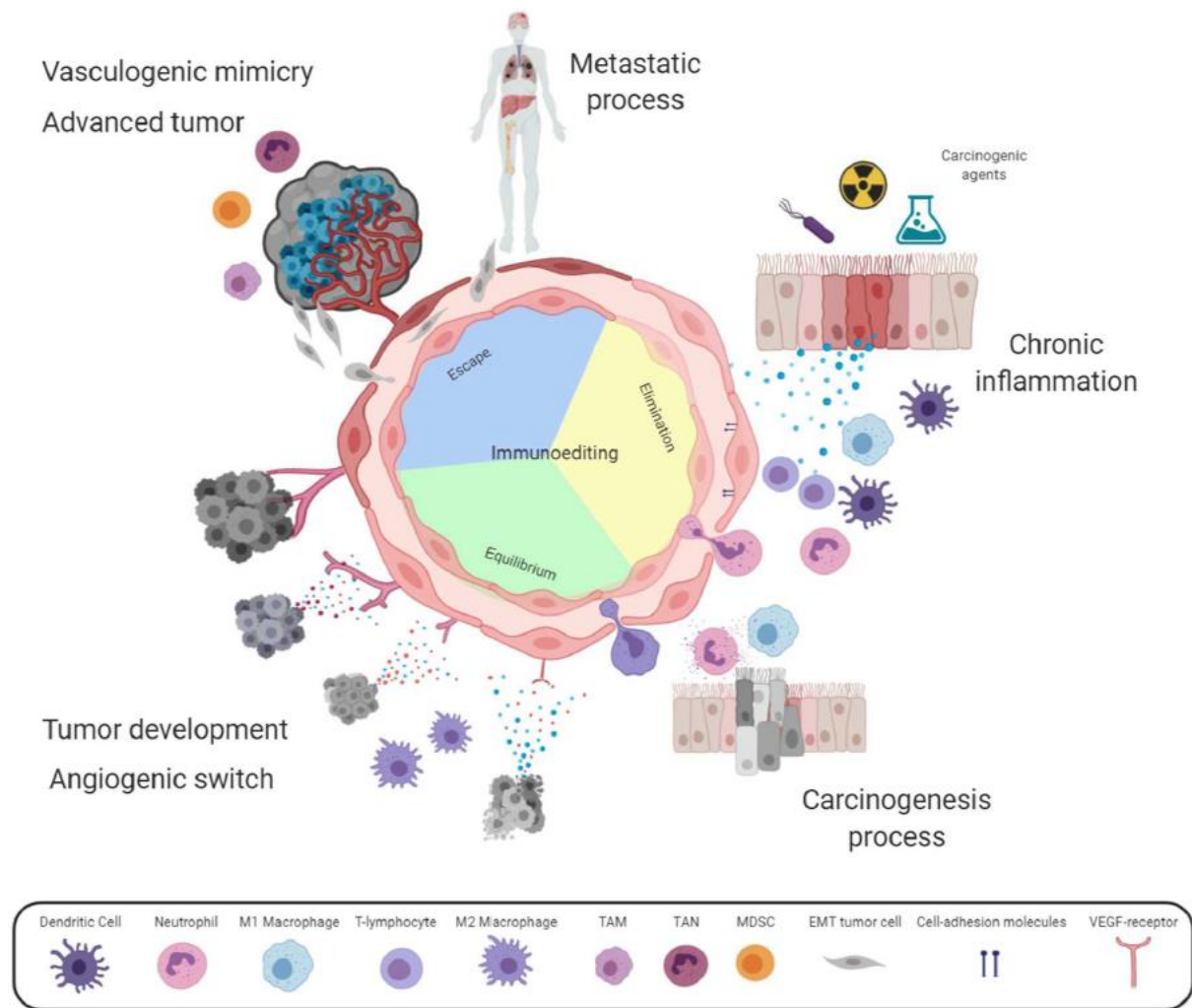


Figure 15 : L'angiogenèse dans le processus d' « immunoédition » des cancers [120]
 TAM : Tumor-Associated Macrophage, TAN : Tumor-Associated Neutrophil, EMT: Epithelial-Mesenchymal transition

c. La transition épithélio-mésenchymateuse

La TEM est un processus biologique réversible au cours duquel une cellule épithéliale polarisée va progressivement acquérir un phénotype mésenchymateux [130]. C'est un phénomène naturel de l'embryogénèse et de la réparation tissulaire, mais également un des principaux mécanismes cellulaires de la progression tumorale [131].

Les cellules épithéliales sont caractérisées par une polarisation apico-basale, jointes entre elles par des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes. Elles reposent sur une membrane basale à l'aide d'hémidesmosomes liés au réseau intracellulaire de cytokératine, assurant un ancrage solide à la membrane et la cohésion de l'épithélium. Elles

expriment fortement les gènes associés au phénotype épithélial comme l'E-cadhérine, les molécules d'adhésion des cellules épithéliales et des cytokératines (Figure 16).

La TEM est induite par l'activation d'un réseau complexe de nombreuses voies de signalisations cellulaires (MAPK, PI3K, ERK, NK-kB, β -caténine, TGF- β , NOTCH [132]) via des médiateurs moléculaires présent dans le microenvironnement. L'ensemble de ces voies aboutissent à l'expression des facteurs de transcription induisant les mécanismes de la TEM : ZEB1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1), SNAIL (Zinc finger protein SNAI1) et TWIST (Twist-related protein 1). De nombreuses molécules peuvent induire la TEM, en particulier ceux impliqués dans l'inflammation et l'angiogenèse (TGF-B, VEGF, hypoxie...).

Les facteurs de transcription de la TEM vont réprimer les gènes codant pour les marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, cytokératine, MUC-1 (Mucin-1), laminin-1...) et surexprimer les gènes codant les marqueurs mésenchymaux (N-cadhérine, Vimentine, fibronectine, β -caténine...) [133]. Cette modification des gènes exprimés va entraîner la perte des jonctions cellulaires, un réarrangement du cytosquelette d'actine et la dégradation de la membrane basale. La cellule va alors perdre son adhérence et acquérir la mobilité. Les cellules cancéreuses ayant accompli leurs TEM acquièrent une forte capacité d'invasion, une forte mobilité et une résistance accrue à l'apoptose. En adhérant aux intégrines de la matrice extracellulaire, celles-ci vont migrer vers les vaisseaux sanguins ou lymphatiques puis pénétrer dans leurs lumières et circuler dans l'organisme. Elles peuvent alors se localiser dans un autre tissu, proche ou distant de la tumeur primitive, en général dans un site où les conditions sont favorables à son développement [134], et infiltrer ce nouveau site après extravasation [135]. Dans la nouvelle localisation, les cellules tumorales vont acquérir un phénotype épithélial en initiant la transition mésenchymo-épithéliale, phénomène inverse de la TEM.

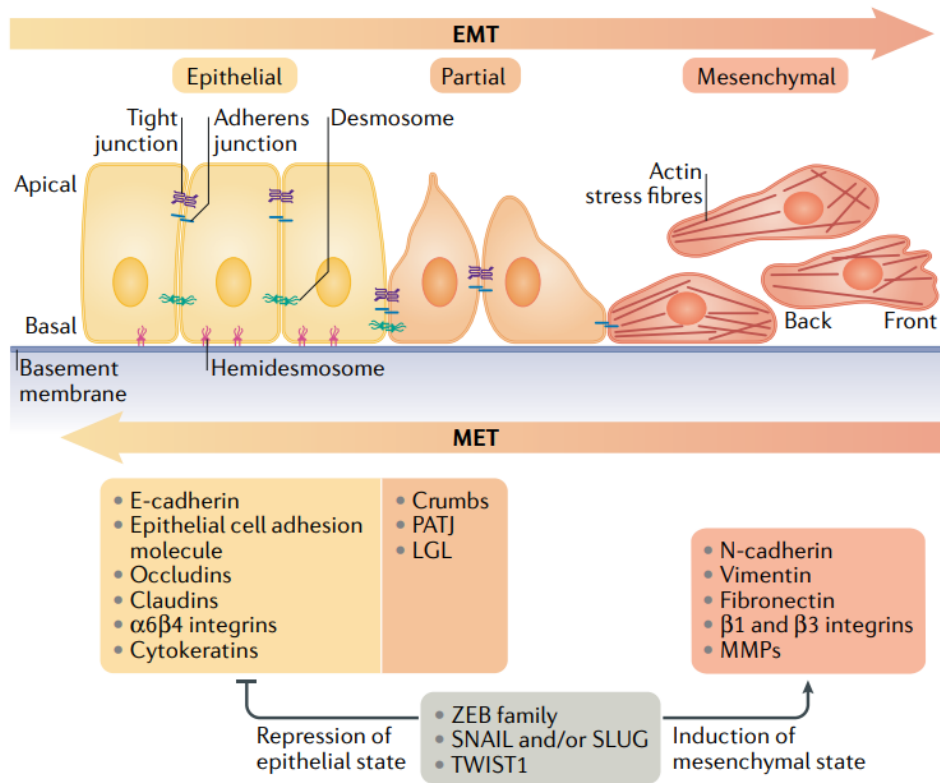


Figure 16 : Les étapes de la transition épithélio-mésenchymateuse [132]

PATJ : PALS1-associated tight junction protein, LGL : Lethal Giant Larvae, EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition, MET : Mesenchymal-Epithelial Transition, E-cadherin, epithelial cadherin; MMP, matrix metalloproteinase; N-cadherin, neural cadherin

VIII- Les effecteurs de l'immunosurveillance anti-tumorale : une plasticité cellulaire

Le système immunitaire peut générer une réponse immunitaire innée ou adaptative selon les acteurs mis en jeu :

- La réponse immunitaire innée : mise en place rapidement et non spécifique de l'antigène, elle comprend les macrophages, les granulocytes (ou polynucléaires), les cellules NK et les cellules dendritiques.
- La réponse immunitaire adaptative : plus longue à se mettre en place, elle est spécifique de l'antigène, elle a une capacité de mémoire et comporte une composante cellulaire et une composante humorale. La réponse immunitaire adaptative implique les lymphocytes T et B et se met en place lors de la présentation de l'antigène par une cellule présentatrice d'antigène (CPA).

1- Le système immunitaire inné

a. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques ont pour origine les précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse, au même titre que les autres cellules de l'immunité innée, à l'exception des cellules NK. Elles sont retrouvées sous forme immature en grande proportion dans les tissus, en particulier dans les muqueuses en contacts avec l'extérieur. Dans le microenvironnement tumoral, elles sont également présentes dans les structures lymphoïdes tertiaires (TLS).

Sous leurs formes immatures, les cellules dendritiques possèdent d'importantes capacités de reconnaissance et de capture d'antigène dans leurs environnements par surexpression des PRRs et potentialisé par leurs nombreuses dendrites [136,137]. La maturation des cellules dendritiques débute lors de la capture d'antigènes tumoraux, puis leurs présentations sous forme de peptide sur le CMH I au niveau de la membrane plasmique. S'ensuit une surexpression des molécules de costimulation (CD80/CD86), des molécules du CMH (I et II) et de la sécrétion de nombreuses cytokines stimulant la prolifération (IL-2, IL-12, IFN- γ) [138] et la différenciation des lymphocytes T CD4+ [139,140]. Les cellules dendritiques matures voient leurs capacités de phagocytose diminuées mais acquièrent une plus grande mobilité et vont migrer dans les ganglions lymphatiques. Cette migration est dépendante

de la sécrétion des chimioattractants CCL19 et CCL21 par les cellules stromales des ganglions lymphatiques [141], pour initier la réponse immunitaire adaptative en présentant l'antigène aux lymphocytes. Elles font ainsi le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les cellules dendritiques matures expriment le DC-LAMP (ou CD208).

b. Les macrophages

Les macrophages proviennent de la différenciation et de la maturation des monocytes sanguins dans les tissus. Ils sont rapidement recrutés sur le lieu de la lésion par de nombreuses cytokines, dont les plus importantes sont le CCL2, le VEGF, le CCL5 et le CSF1 (colony stimulating factor 1) [142].

Leurs actions anti-tumorales consistent principalement en la phagocytose des composants tumoraux et la lyse des cellules tumorales par les mécanismes de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Comme les cellules dendritiques, les macrophages sont des CPA qui peuvent activer les lymphocytes de l'immunité adaptative. Ces cellules montrent une grande plasticité dans les processus antitumoraux, comme en témoigne leur large spectre de phénotypes décrit dans la littérature [143]. 2 phénotypes, représentant les extrêmes du spectre phénotypique, ont été décrits [144,145] :

- Les macrophages « M1 » : caractérisés par la production de cytokines pro-inflammatoires comme le $TNF\alpha$, $IFN-\gamma$ et l'IL-6 [144]. C'est un phénotype associé à l'inflammation et au contrôle de la tumeur. Ils sont induits par l' $IFN-\gamma$, le $TNF\alpha$, les LPS (Lipopolysaccharide) et l'IL-12. Ils expriment le CD11b, le CD11c, le CD86 et le CD68. L'activation du CD11b stimule l'accumulation des lymphocytes T cytotoxiques et inhibe la croissance tumorale [146].
- Les macrophages « M2 » : caractérisés par la production de molécules régulatrices des fonctions immunitaires comme l'arginase-1, le $TGF-\beta$ et l'IL-10, et des molécules pro-angiogéniques. Il leur est attribué un profil pro-tumoral, associé à la régulation de la réponse immunitaire et la résolution de l'inflammation [147]. Ils expriment le CD163, le CD204 et le CD206 et sont induits par des médiateurs de l'immuno-régulation comme l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et le $TGF-\beta$.

c. Les granulocytes

Les granulocytes sont les cellules majoritaires parmi les globules blancs dans le sang. Elles possèdent un noyau plurilobé et de nombreuses granules intracytoplasmiques. 3 sous-types sont décrits :

- Les neutrophiles

Ce sont les plus fréquents, les premiers à être recruté sur le site de l'inflammation aigüe et ils participent activement au processus inflammatoire. Ce recrutement précoce est médié par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, en particulier CXCL1, CXCL2, CXCL5 et CXCL8, de puissants chémoattractants des neutrophiles qui en surexpriment les récepteurs spécifiques CXCR1 et CXCR2 [142,148]. Les neutrophiles activés expriment le CD66b, le CD15, le CD16 et le CD11b [149,150]. Ils peuvent éliminer les cellules tumorales par phagocytose, par cytotoxicité directe via la sécrétion locale d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (NOS) ou par lyse ADCC. Comme pour les macrophages, les neutrophiles présentent un large spectre phénotypique, dont les 2 phénotypes extrêmes sont régulièrement décrits (Figure 17) :

- Les neutrophiles « N1 » antitumoraux sont induits par les IFN de type I (α et β). Ils ont une forte activité anti-tumorale plurifactorielle : ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoire (IL-12, TNF α) et des chemoattractant des lymphocytes T CD8+ (CXCL9, CXCL10) [151]. Elles peuvent également, sous l'influence d'IFN- γ , surexprimer des molécules de costimulation (CD86, CD54...) et agir comme des CPA pour activer les lymphocytes de la réponse adaptative [152].
- Les neutrophiles « N2 » protumoraux sont des neutrophiles immatures avec des noyaux hypolobés, induits par le TGF- β . Ils présentent une forte activité pro-inflammatoire : ils sécrètent notamment des ROS et NOS qui favorisent l'inflammation, des molécules pro-angiogéniques (VEGF, MMP9) et des protéases (ELANE (élastase des neutrophiles), MMP9) qui dégradent la matrice extracellulaire et promeut la prolifération et la dissémination métastatique [153]. Ils ont également des actions immunosuppressives par la sécrétion de ROS, de NOS, de TNF α et de myéloperoxydase qui peuvent supprimer l'action cytotoxiques des lymphocytes T CD8+ par contact direct [154,155] et des NK. Enfin, la sécrétion d'arginase-1 entraîne la dégradation de l'arginase du milieu extracellulaire et supprime l'activation et la prolifération des lymphocytes T par rétention métabolique [156]. Ils correspondraient aux cellules

suppressives dérivées des cellules myéloïdes granulocytiques (G-MDSC), un sous-type de cellules immunomodulatrices. Leur présence est corrélée avec la proportion des molécules immunomodulatrices et de lymphocytes T régulateurs [157]. Des publications récentes ont montrés que les neutrophiles peuvent libérer leurs ADN sous forme d'un réseau de chromatine, de protéase et de protéines intracellulaires, afin de piéger des éléments pathogènes et permettre leurs éliminations [158]. Ces NET (Neutrophil Extracellular Traps) favorisent la dissémination tumorale en augmentant la mobilité des cellules sanguines dans le sang [158,159]. Ce mécanisme de NETose est donc souvent associé aux neutrophiles N2.

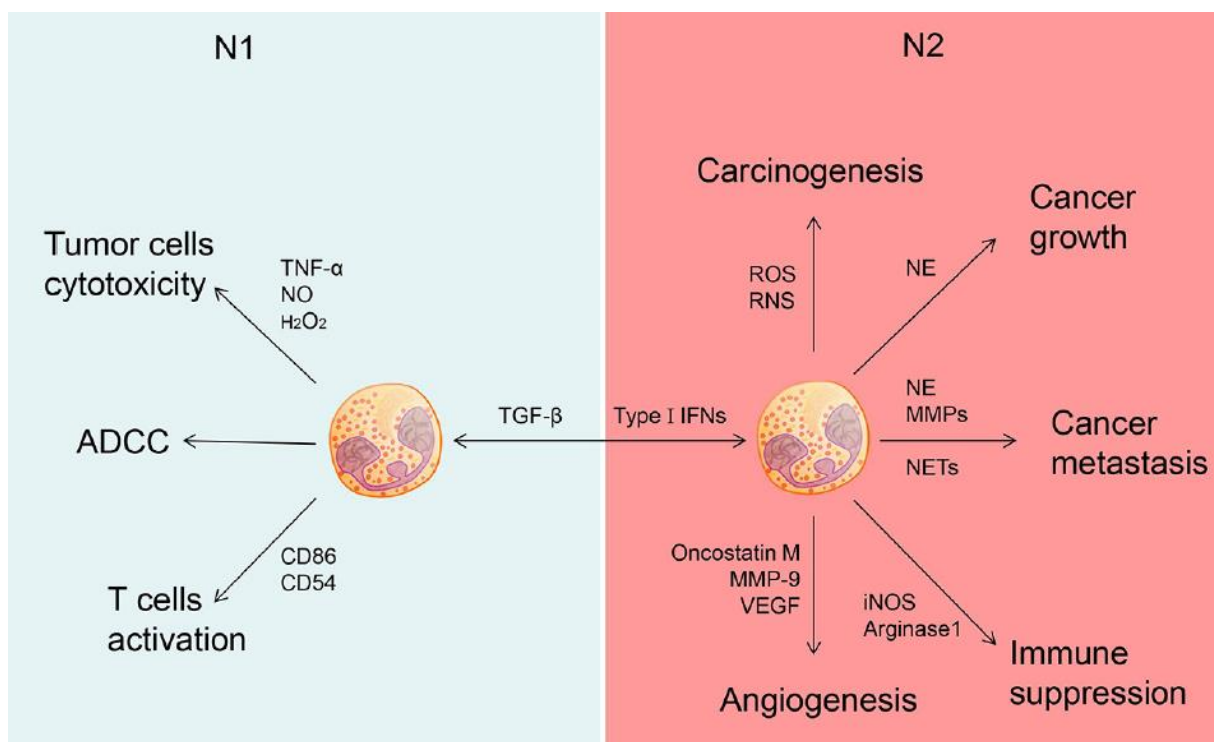


Figure 17 : Les rôles opposés des neutrophiles « N1 » et « N2 » dans le cancer [153]
 NE : Neutrophil Elastase, iNOS :inducible Nitric Oxide Synthase, N, H2O2 : hydrogen peroxide

Ces 2 phénotypes ont aussi été définis respectivement en neutrophiles de haute densité et de faible densité, d'après leurs séparations sur gradient de Ficoll [160]. Les médiateurs et les mécanismes modulant la plasticité de ces phénotypes font encore l'objet de débats [160]. L'absence de marqueur spécifique des phénotypes N1 et N2 rend leurs études fonctionnelles difficiles. Des études ont montré que l'expression de LOX-1 (Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1) serait un marqueur spécifique des G-MDSC, [161,162], mais cela doit encore être validé [163,164].

- Les éosinophiles

Beaucoup moins fréquent que les neutrophiles, les éosinophiles représentent moins de 1% des granulocytes. Ils ont un rôle prépondérant dans la réponse aux infections, notamment parasitaires, et ont été retrouvés dans le microenvironnement tumoral de nombreuses tumeurs solides [165] et hématologiques [166]. Des rôles pro et antitumoraux leur ont été attribués et semblent dépendre de la localisation du cancer [167].

- Les basophiles

Ce sont les granulocytes les moins abondants et sont principalement impliqués dans les phénomènes allergiques médiés par les IgE, via leurs récepteurs membranaires aux fragments Fc des IgE (FcεRI). Plusieurs études ont montré leurs présences dans les cancers [168], dont les CBNPC [169]. Néanmoins, leurs influences sur le développement tumoral est mal décrite et fait l'objet de débats [170,171].

d. Les NK

Les cellules NK sont des grands lymphocytes granuleux, originaires de la moelle osseuse, qui possèdent de fortes activités cytolytiques des cellules anormales infectées par des virus ou tumorales. Elles sont caractérisées par l'expression de CD56, de CD16 et de NKp46 [172]. Contrairement aux lymphocytes T conventionnels qui seront décrits plus loin, les NK n'expriment ni le récepteur spécifique de la reconnaissance de l'antigène (TCR), ni son corécepteur (CD3). Les cellules NK présentent un grand nombre de récepteurs et de ligands membranaires activateurs ou inhibiteurs de la cytotoxicité ou de la sécrétion de cytokines [173,174]. De par l'absence de molécules spécifiques de l'antigène, la lyse des cellules anormales est réalisée par cytotoxicité naturelle sans immunisation préalable, ou par des mécanismes d'ADCC.

La cellule NK en interaction avec la cellule cible déclenche la cytotoxicité naturelle lorsque l'intensité des signaux activateurs engagés (notamment NKp46, NKG2D (Natural Killer Group 2D) et CD16) dépassent celui des signaux inhibiteurs [175]. Les récepteurs KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor) sont les principaux récepteurs inhibiteurs des cellules NK et reconnaissent spécifiquement le CMH I [176]. Les cellules NK sont ainsi capables de

discriminer les cellules du « soi » et du « non soi » par la reconnaissance du CMH I. La perte ou la diminution d'expression du CMH I des cellules tumorales est un mécanisme classique d'échappement au système immunitaire [177,178]. La lyse par cytotoxicité directe a lieu par dégranulation des granules lytiques cytoplasmiques, contenant du granzyme et des perforines, au contact de la cellule tumorale.

Les cellules NK ont également des fonctions de sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires qui stimulent l'activation des autres cellules de l'immunité ($TNF\alpha$, IL-2), augmente leurs capacités cytolytiques ($IFN-\gamma$) et favorisent leurs recrutements (GM-CSF). Dans les CBNPC, il a été montré que les NK étaient peu nombreuses et qu'elles avaient un phénotype et des fonctions altérées (plus faible expression des signaux de costimulation, cytotoxicité déficiente) participant à la croissance tumorale [179].

2- Système immunitaire adaptatif

e. Dynamique fonctionnelle de l'immunité adaptative : le cycle cancer-immunité

Les lymphocytes T sont capables d'induire une réponse immunitaire suite à la reconnaissance par leurs TCR d'un peptide antigénique présenté par une CPA ou une cellule tumorale via le CMH I (T CD8) ou II (T CD4). Chen *et al* ont décrits la succession des événements permettant d'activer et d'entretenir la réponse immunitaire anti-tumorale, en l'intitulant le cycle Cancer-Immunité [180] (Figure 18)

Les antigènes tumoraux libérés par les cellules tumorales sont internalisés par les CPA (majoritairement les cellules dendritiques), puis présentés à leurs surfaces sur les CMH. Les cellules dendritiques matures vont rejoindre les ganglions lymphatiques pour activer les lymphocytes naïfs. Cette activation se déroule en 3 étapes successives [180]:

- Présentation antigénique par l'interaction TCR/CD3-CMH
- Signal de costimulation nécessaire à la transduction du signal jusqu'au noyau, par l'interaction de CD80 ou de CD86 des cellules dendritiques avec CD28 du lymphocyte T
- La prolifération et la différenciation fonctionnelle des lymphocytes T

Les lymphocytes activés prolifèrent et forment un clone de cellule de même spécificité pour l'antigène (sélection clonale) et vont migrer vers la zone tumorale par la circulation générale. Les lymphocytes T effecteurs vont reconnaître l'antigène tumoral et déclencher des mécanismes cellulaires aboutissant à la lyse des cellules tumorales. Cela conduit à la libération toujours plus importante d'antigène tumoral, et ainsi entretient le cycle cancer-immunité. Une partie des lymphocytes T activés vont rester quiescent et se différencier en lymphocytes T mémoires. Ces lymphocytes T mémoires seront réactivés lors d'une nouvelle exposition au même antigène et assureront une réponse immunitaire plus rapide. Dans la situation tumorale, il existe une évolution clonale tumorale pour échapper à cette réponse immunitaire spécifique d'antigène.

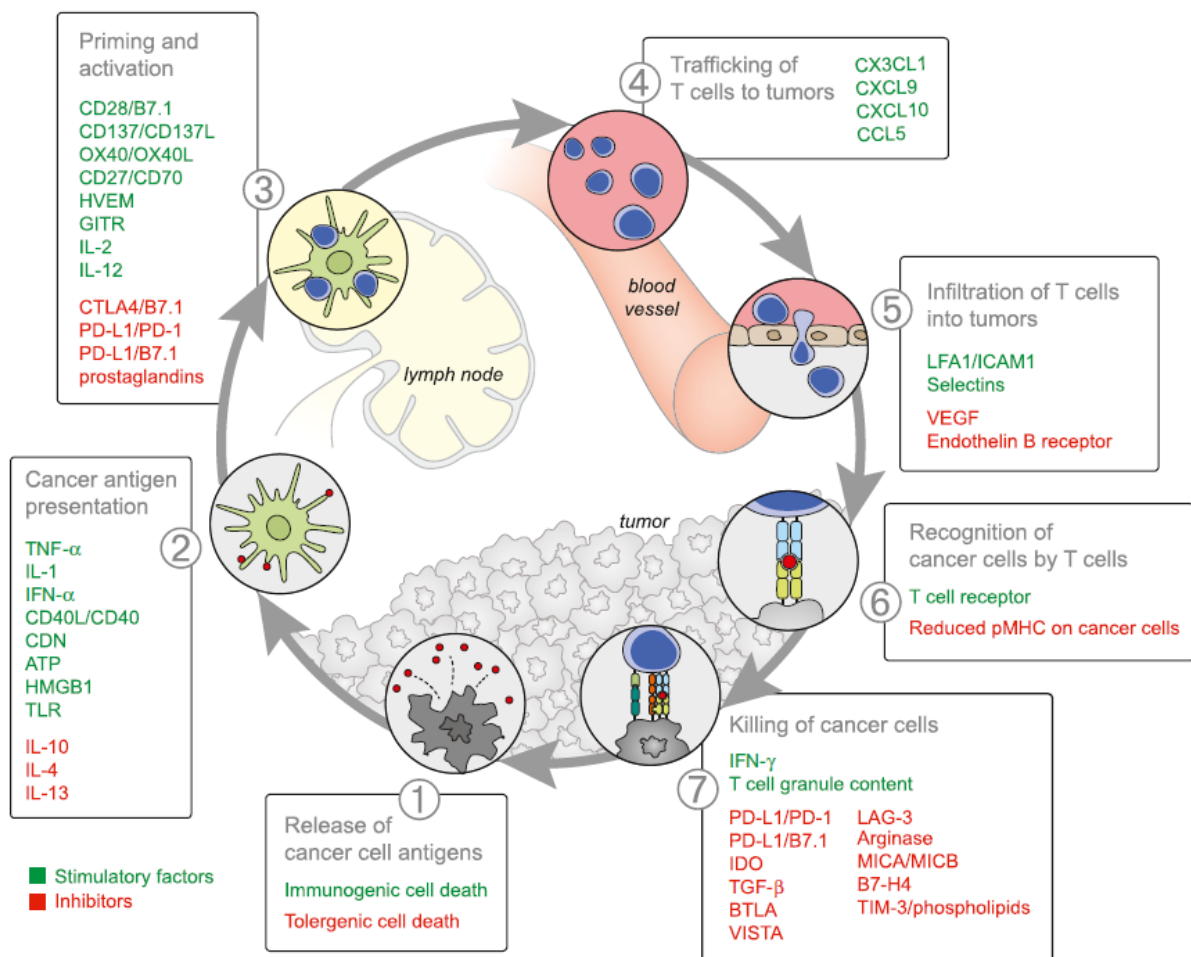


Figure 18 : Le cycle cancer-immunité et ces médiateurs [180]

f. Dynamique fonctionnelle de l'immunité adaptative :
l'immunomodulation

i. Les molécules inhibitrices : les « *immune checkpoints* »

La réponse immunitaire nécessite un rétrocontrôle négatif subséquent pour empêcher la prolifération incontrôlée des cellules immunitaires, éviter une auto-immunité et résoudre l'inflammation. Dans ce but, des protéines inhibitrices sont exprimées à la membrane des cellules immunitaires, après reconnaissance de l'antigène, pour en réguler l'activation et la prolifération. De nombreux « *immune checkpoints* » ont été décrits [181] (Figure 19) :

- CTLA-4 : exprimé en intracellulaire par les lymphocytes T naïfs, la protéine est transloquée à la membrane après reconnaissance de l'antigène [182]. CTLA-4 entre en compétition avec CD28 pour la liaison avec ses ligands spécifiques CD80/CD86 avec une plus forte affinité et intervient au moment de la présentation antigénique.
- PD-1 : exprimé par les lymphocytes T, il possède 2 ligands : PD-L1 qui est exprimé par de nombreuses cellules immunitaires (lymphocytes T et B, macrophages, plasmocytes, granulocytes) et tumorales, et PD-L2 dont l'expression est plus restreinte au CPA et à certaines cellules épithéliales, notamment pulmonaires [183]. La liaison de PD-1 avec son ligand entraîne l'apoptose du lymphocyte T. L'expression de PD-L1 par les cellules cancéreuses est un mécanisme majeur de l'échappement tumoral, et constitue la cible des immunothérapies actuelles.
- LAG-3 (Lymphocyte-activation gene 3) : exprimé par les lymphocytes T et les cellules NK, il est fréquemment coexprimé avec PD-1 dans les lymphocytes infiltrant la tumeur, conduisant à l'exhaustion des lymphocytes et permettant la croissance tumorale. Son ligand principal est le CMH II, mais son mécanisme d'action n'est pas encore clairement établi [184].
- TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3) : exprimé sur les lymphocytes T, les cellules NK, les macrophages et les cellules dendritiques. Il a plusieurs ligands dont le principal est la Galectin-9. Il a un rôle prépondérant dans l'inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoire TNF α et IFN- γ [185].
- TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) : exprimé par les lymphocytes T et les cellules NK, il a pour ligand les protéines CD112 et CD155. Il inhibe l'immunité innée et adaptative à travers divers mécanismes, bien décrits dans une revue de Joe-Marc Chauvin [186].

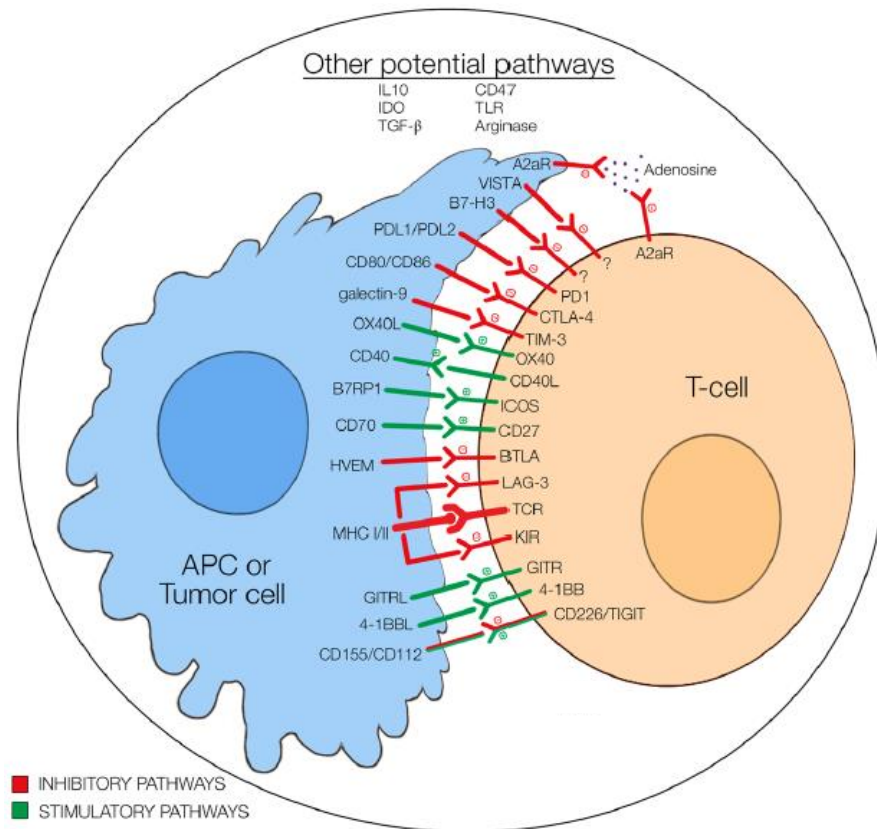


Figure 19 : Les voies d'activation et d'inhibition des cellules immunitaires par les CPA ou les cellules tumorales [186]

L'expression de molécules inhibitrices est un mécanisme d'immunomodulation qui peut être synergique de l'action des lymphocytes T régulateurs qui seront décrits plus loin dans ce document.

ii. L'anergie

L'anergie est un mécanisme tolérogène au cours duquel les lymphocytes sont fonctionnellement inactifs après rencontre de l'antigène. Elle a lieu lors d'une stimulation sous-optimale du lymphocyte, due à l'absence des signaux de costimulation lors de l'interaction TCR/CD3-CMH/peptide, ou à une exposition altérée au CMH ou à l'IL-2 qui sont nécessaires à son activation [187]. Les lymphocytes T anergiques ne prolifèrent pas et produisent moins de cytokine, notamment l'IL-2 [187]. L'anergie a été mis en évidence dans le microenvironnement tumoral et constitue également un mécanisme d'échappement tumoral [188].

iii. L'exhaustion

L'exhaustion est un état de dysfonction du lymphocyte T après stimulation antigénique, initié par une persistance de la stimulation antigénique par le TCR et des niveaux excessifs de cytokines pro-inflammatoires. Elle est favorisée par la présence de TGF- β et d'IL-10. Cette activation chronique entraîne une diminution progressive des fonctions effectrices des lymphocytes T, via une expression d'immune checkpoint, notamment PD-1, TIM-3 et LAG-3, avec une diminution de la sécrétion de cytokine et une diminution de la cytotoxicité [189,190] (Figure 20). L'exhaustion est un mécanisme de protection dans les inflammations chroniques et notamment dans le cancer. En effet, il a été montré que les cellules lymphocytaires infiltrant les tumeurs avaient un phénotype dit « exhausté », en partie responsable de l'échappement tumoral [191]. Les mécanismes de l'exhaustion des lymphocytes, notamment T, ont été décrit très récemment [192].

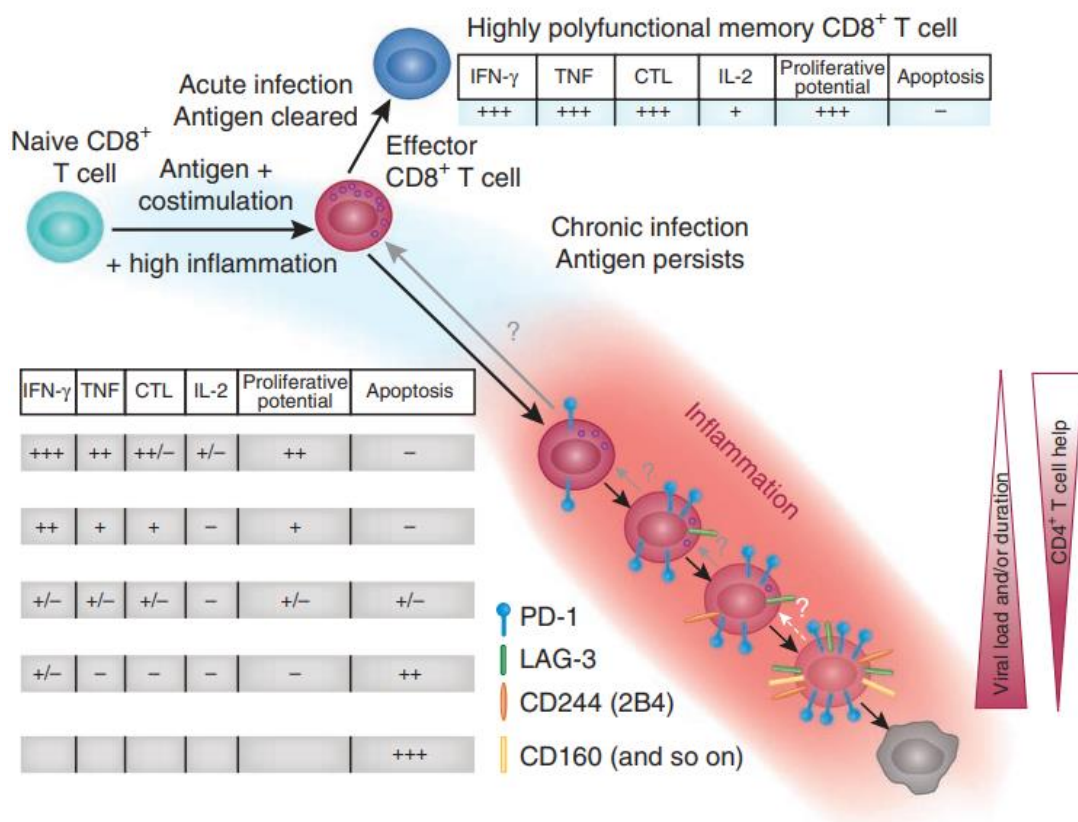


Figure 20 : L'exhaustion progressive des lymphocytes T dans les infections chroniques [189]
CTL : Potentiel cytotoxique du lymphocyte T

g. Les lymphocytes T

Composante majeure de l'immunité adaptative cellulaire, les lymphocytes T ont pour origine les progéniteurs lymphoïdes de la moelle osseuse. A ce stade, les progéniteurs lymphocytaires n'expriment pas de marqueurs lymphocytaires (CD3-, CD4-, CD8-, TCR-) et migrent vers le thymus pour y réaliser leurs maturations. En arrivant dans la région corticale thymique, elles vont exprimer l'ensemble des marqueurs lymphocytaires cités précédemment. La maturation de ces thymocytes « double positifs » va consister en 2 étapes successives, réalisées lors de la migration dans le thymus, de la région corticale à la région médullaire [193,194].

La première étape consiste en la **sélection positive** des thymocytes capable de reconnaître les molécules du CMH des cellules épithéliales thymique. L'interaction TCR-CMH doit être d'une affinité suffisante pour permettre aux thymocytes « double positif » de recevoir les signaux cellulaires de survie. Si l'interaction est de trop forte affinité, cela signifie que le TCR reconnaît fortement le CMH du soi, et est donc délétère pour l'organisme. Le thymocyte ne recevra alors pas les signaux de survie, entrera en apoptose et sera éliminé par les macrophages résidents. La sélection positive s'achève par l'engagement du thymocyte dans un lignage lymphocytaire « simple positif » CD4+ ou CD8+. La sélection du cluster de différenciation dépendra du type de CMH reconnu par le TCR du thymocyte : CD8 s'il a reconnu le CMH I, CD4 s'il a reconnu le CMH II. A cette étape, le TCR est capable de reconnaître n'importe quel peptide présenté par un CMH, qu'il soit du soi ou du non soi.

La seconde étape consiste à l'acquisition de la tolérance vis-à-vis du soi, par **sélection négative** des thymocytes qui reconnaissent les peptides du soi sur le CMH. Le peptide du soi est présenté aux thymocytes, par des cellules dendritiques de la médullaire thymique sous contrôle du facteur de transcription AIRE (Auto-immune regulator). Les gènes sous le contrôle d'AIRE codent pour des antigènes restreints à des organes spécifiques à l'exception du thymus. Les thymocytes « simple positif » qui interagissent avec une trop forte affinité vont recevoir des signaux de mort cellulaire et entreront en apoptose.

A la sortie du thymus, les lymphocytes T ont acquis i) un TCR fonctionnel, ii) un lignage spécifique (CD4 ou CD8), iii) la tolérance au soi. Ils sont dits naïfs tant qu'ils n'ont pas rencontré un antigène. L'expression du TCR permet la reconnaissance spécifique de l'antigène par les lymphocytes matures. Pour répondre efficacement à la grande diversité des antigènes étrangers, des réarrangements somatiques aléatoires des segments V(D)J des gènes du TCR ont

lieu tout au long de la maturation thymique [195]. L'ensemble des TCR formé dans ce processus et retrouvé dans l'organisme constitue le répertoire lymphocytaire T.

Il existe plusieurs sous-types de lymphocytes T :

- Lymphocytes T cytotoxiques (CD8+)
- Lymphocytes T « helper » ou auxiliaire (CD4+)
- Lymphocytes T régulateurs (Treg)
- Lymphocytes T $\gamma\delta$

i. Les lymphocytes T cytotoxiques CD8+

Ce sont les acteurs majeurs de l'immunité anti-tumorale. Les lymphocytes T CD8+, activés par la présentation d'un antigène par une CPA, se lient à la surface des cellules tumorales via l'interaction TCR-CD3/CMH-peptide. La synapse immunologique formée permet la délivrance locale du contenu des granules lymphocytaires, contenant des granzymes, des perforines et du FasL [196]. Le granzyme et les perforines font former des pores dans la membrane et conduisent à la lyse osmotique de la cellule et l'induction de l'apoptose ; FasL va se lier au Fas membranaire de la cellule tumorale, qui active les caspases et les endonucléases, conduisant à la fragmentation de l'ADN de la cellule tumorale et l'induction de l'apoptose [197] (Figure 21).

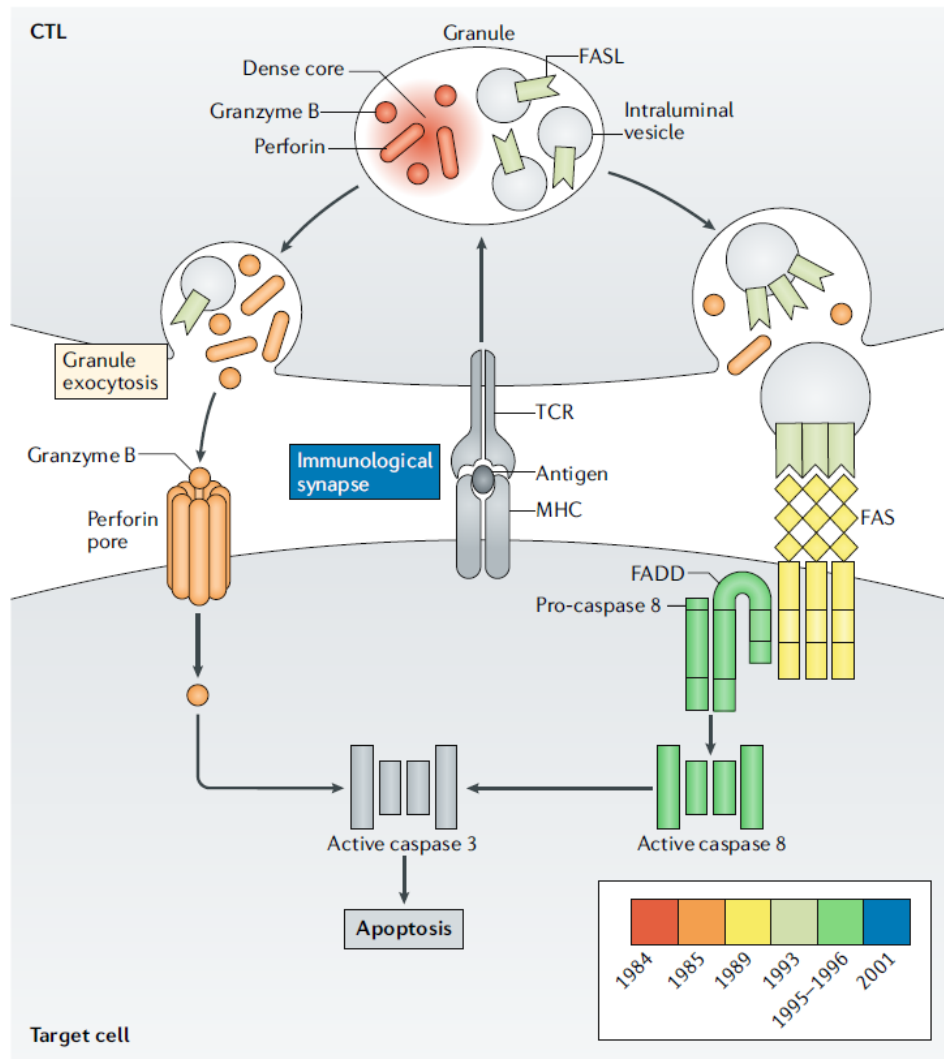


Figure 21 :Le mécanisme de cytotoxicité direct médié par les lymphocytes T cytotoxiques [196]
 Les protéines sont colorées selon l'année de leur découverte

ii. Les lymphocytes T CD4+ helper

Les lymphocytes T CD4+ « helper » (Th) ont pour fonction de promouvoir la réponse immunitaire par le recrutement, l'activation et la stimulation des cellules immunitaires effectrices. Les lymphocytes T CD4+ activés, vont être différenciés par la sécrétion de nombreuses cytokines, qui orientent la réponse immunitaire et régulent l'inflammation. La différenciation en un sous-type de lymphocyte Th dépend du stimulus d'origine. De nombreux sous-types de lymphocyte Th sont décrits [198,199] (Figure 22):

- Les lymphocytes Th1 sont induits par l'IL-12 et l'IFN- γ principalement sécrétés par les cellules dendritiques. Ils sécrètent principalement de l'IFN- γ qui stimule la prolifération et l'activation des macrophages, des granulocytes, des cellules NK et des lymphocytes ;

mais également de l'IL-2 et du TNF α pro-inflammatoire. Ils expriment spécifiquement le facteur de transcription T-bet et sont plus impliqués dans la potentialisation de la réponse immunitaire adaptative cellulaire.

- Les lymphocytes Th2 ont un rôle pro-tumoral et anti-inflammatoire, qui contrebalance la réponse Th1 [200]. Ils produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 qui favorisent la sécrétion d'IgE par les lymphocytes B et polarisent les macrophages vers un phénotype M2, et de l'IL-10 immuno-régulateur. Ils sont induits par l'IL-4 et expriment le facteur de transcription GATA-3.
- Les lymphocytes Th17 sont induits par l'IL-6, l'IL-21 et le TGF- β . Ils sont pro-inflammatoires et ils produisent de l'IL-17, de l'IL-21, de l'IL-22 et du GM-CSF et expriment spécifiquement le ROR γ t. Leurs rôles dans le cancer est encore débattu [201].
- Les lymphocytes Th9 sont induits par l'IL-4 et le TGF- β et produisent majoritairement de l'IL-9 qui stimule la production de cytokine et améliore la survie et la prolifération des lymphocytes T [202].
- Les lymphocytes Th22 sont induits par le TNF- α et l'IL-6. Assez mal décrits, des études leur ont attribué un rôle important dans la tumorigenèse [203].
- Les lymphocytes T follicular helper (Tfh) sont présents dans les centres germinatifs de la rate, des ganglions et des TLS ainsi que dans la marge d'invasion des tumeurs [204]. Ils potentialisent la prolifération des lymphocytes B des centres germinatifs via la sécrétion d'l'IL-21 et d'IL-4 [205] et expriment spécifiquement Bcl6 (B-cell lymphoma 6), CXCR5 et CD40L.

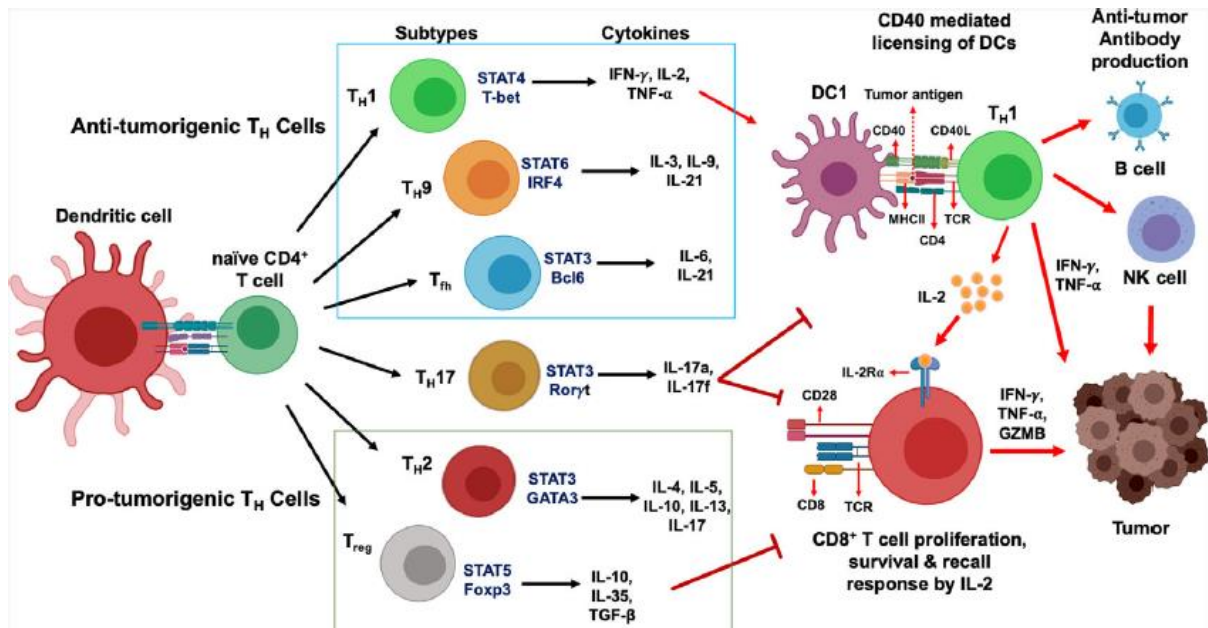


Figure 22 :Le développement des lymphocytes T CD4+ et leurs sous-types dans l'immunité [206]
GZMB : Granzyme B

iii. Les lymphocytes T régulateur (Treg)

Les lymphocytes Treg sont les principales cellules effectrices de l'immunomodulation. Dans des conditions physiologiques, ils assurent la tolérance du soi et la résolution de la réponse immunitaire. De nombreuses études ont souligné la contribution des Treg dans la progression tumorale et l'altération de la réponse immunitaire anti-tumoral [207–209]. Comme pour les autres lymphocytes, ils nécessitent la présentation de l'antigène pour être activés et remplir leurs fonctions biologiques. La littérature scientifique fait état de plusieurs sous-types de lymphocytes Treg [210]. Seuls les lymphocytes Treg naturels, les plus nombreux et les plus étudiés dans le cancer seront décrits.

Les lymphocytes Treg naturel expriment le facteur de transcription FoxP3 et CD25 qui est une sous unité du récepteur à l'IL-2 [211] et représentent 5 à 10% des lymphocytes T CD4+ [212]. Ils sont induits par le TGF-β et l'IL-10. Ils modulent la réponse immunitaire anti-tumorale par plusieurs mécanismes directs ou indirects (Figure 23 et Figure 24) :

- L'expression « d'immune checkpoint » : les lymphocytes Tregs expriment un large panel de protéines immunomodulatrices comme CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3 et TIGIT [213].

- La privation métabolique : les lymphocytes Treg surexpriment CD25, la sous-unité alpha du récepteur de l'IL-2. Ce récepteur de haute affinité entre en compétition avec les autres cellules immunitaires pour la capture de l'IL-2. La diminution de l'IL-2 diminue alors la survie et la prolifération des autres cellules immunitaires [214,215]. Ils peuvent également transférer directement du cAMP (adénosine monophosphate cyclique) aux lymphocytes T effecteurs par les jonctions communicantes [216]. L'accumulation intracellulaire de cAMP entraîne l'apoptose des cellules cibles.
- La sécrétion de cytokine immunomodulatrices (TGF- β , IL-10, IL-35) et d'adénosine qui inhibent la prolifération des lymphocytes (notamment les Th1), des granulocytes et des macrophages [214,217]. Les cellules tumorales sécrètent elles-aussi de l'IL-10 et du TGF- β , pour échapper au système immunitaire [218].
- Cytotoxicité directe : Les lymphocytes Treg peuvent lyser les lymphocytes T effecteurs en contact direct par sécrétion de granzyme et perforine.

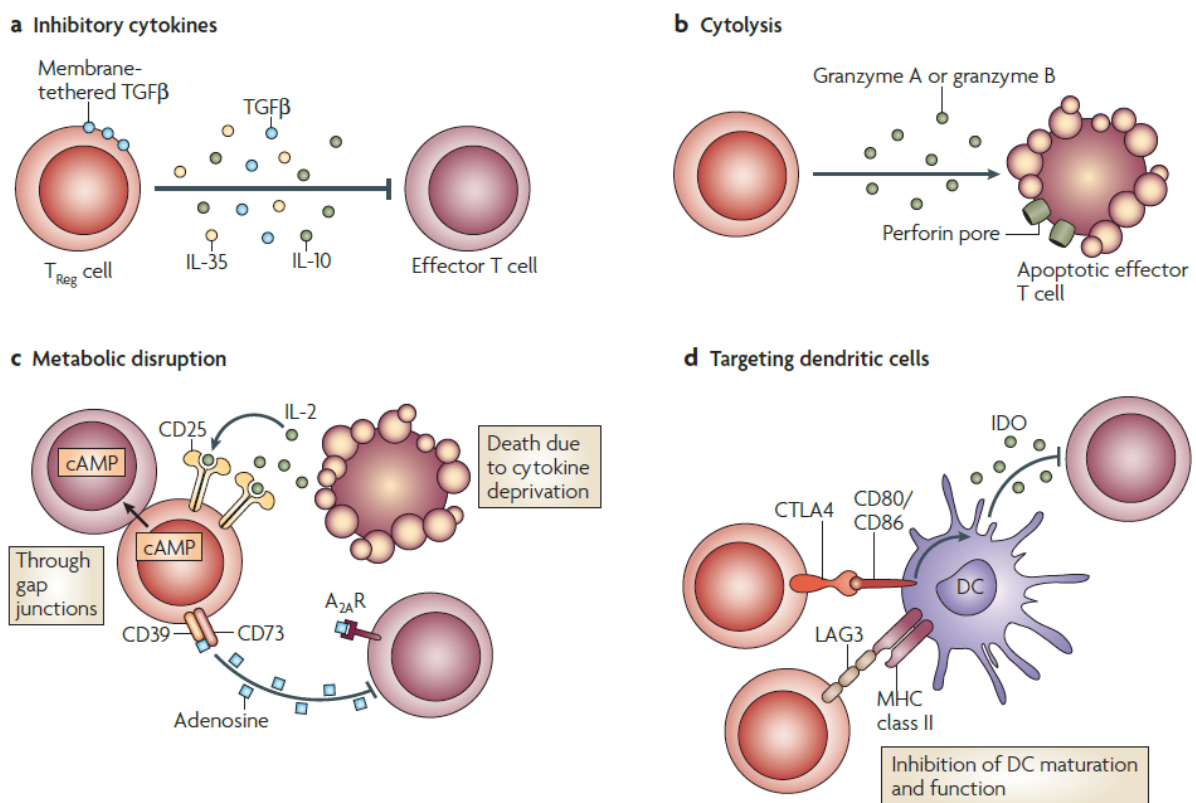


Figure 23 : Les mécanismes régulateurs des Treg [214]
 DC : cellule dendritique, IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase

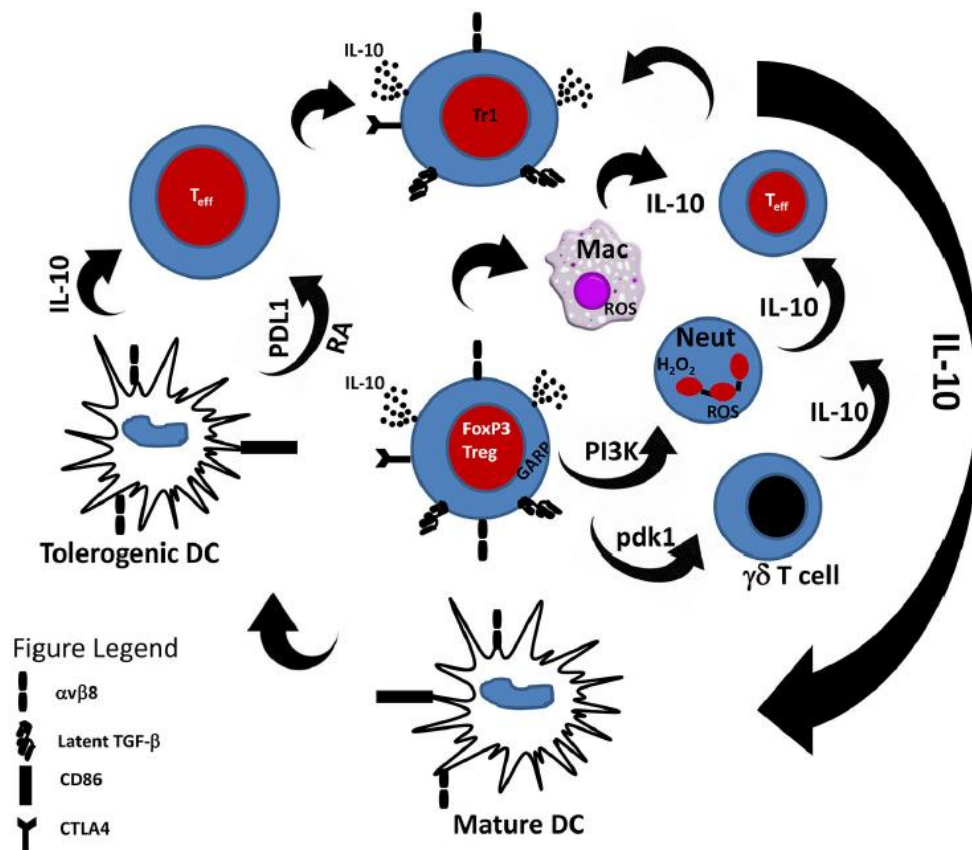


Figure 24 : Les actions immuno-régulatrices des Treg sur les cellules de l'immunité innée [209]

Mac : Macrophage, pdk1 : 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, RA : Retinoic acid, GARP : Glycoprotein A repetitions predominant, Tr1 : IL-10-producing T regulatory type 1, T_{eff} : Effector T cell

Dans le microenvironnement tumoral du CBNPC, il a été observé la présence d'IL-10 et de TGF secrétés par les cellules tumorales pour recruter des lymphocytes Treg et inhiber la réponse immunitaire ; et constitue un mécanisme d'échappement tumoral [218,219].

iv. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Ils composent un groupe hétérogène assez rare de lymphocyte T présentant un TCR composé des chaînes γ et δ , contrairement aux autres lymphocytes T dont le TCR est composé des chaînes α et β . Ils représentent 1 à 5% des lymphocytes T totaux, expriment CD3 mais pas CD4 ni CD8 [220]. Ils pourraient avoir un intérêt dans la réaction immunitaire anti-tumorale [221,222] par leurs fortes cytotoxicités et sécrétion de cytokines. Néanmoins, leurs faibles fréquences et des études préliminaires ne permettent pas d'en préciser les différents sous-type

et leurs actions précises dans la réponse anti-tumorale. Ils pourraient être des cibles intéressantes des thérapies anticancéreuses [223,224].

v. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les effecteurs de l'immunité adaptative humorale, notamment par la production d'anticorps après différenciation en plasmocytes [225]. Ils ont aussi pour origine des progéniteurs lymphoïdes de la moelle osseuse. Ils complètent leurs développements dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate et les ganglions lymphatiques [226]. Ils sont caractérisés par l'expression membranaires d'immunoglobulines, du BCR, de CD19 et de CD20.

Durant la maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse, de nombreux réarrangements somatiques aléatoires des segments V(D)J des gènes des chaînes lourdes (stade pro-B) puis des chaînes légères (stade pré-B) du BCR vont se succéder [227]. Ce phénomène de diversité combinatoire permet d'obtenir un important polymorphisme du BCR, permettant de répondre à la grande disparité des antigènes étrangers, et constitue le répertoire des lymphocytes B [228]. Les lymphocytes B vont exprimer des IgM à leurs surfaces dans les premiers stades de maturation, puis coexprimer des IgM et des IgD en fin de stade pré-B dans la moelle osseuse. Les lymphocytes B naïfs générés vont migrer ensuite dans les organes lymphoïdes secondaires.

L'activation du lymphocyte B mature a lieu lorsque son BCR reconnaît spécifiquement un antigène étranger soluble ou présenté par une CPA sur le CMH I, associé à des signaux de costimulation via CD40L/CD40 [226]. Cette reconnaissance antigénique va entraîner la commutation isotypique des chaînes lourdes des immunoglobulines et la permutation somatique des régions variables des chaînes lourdes et légères. Ces mécanismes complémentaires vont permettre d'accroître la spécificité de l'anticorps pour l'antigène. Les lymphocytes B activés vont ensuite proliférer par sélection clonale puis se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps spécifiques de l'antigène [229]. De la même manière que pour les lymphocytes T, une partie des lymphocytes B activés vont se différencier en lymphocytes B mémoires.

Les lymphocytes B sont moins bien étudiés dans la réponse anti-tumorale que les lymphocytes T, notamment les T CD8+ dit effecteurs. Néanmoins les lymphocytes B sont

retrouvés dans les tumeurs solides, notamment dans 35% des CBNPC [230], principalement regroupés en structures lymphoïdes tertiaires ou TLS [231] quel que soit le stade de la maladie [232].

L'action anti-tumorale des lymphocytes B repose sur plusieurs mécanismes : la sécrétion d'anticorps qui vont neutraliser les antigènes tumoraux et faciliter leurs éliminations par phagocytose et l'initiation de la lyse cellulaire par ADCC [233]. En se liant aux antigènes tumoraux membranaires, ils constituent un point d'ancrage pour les cellules immunitaires cytotoxiques exprimant le récepteur des fragments Fc des immunoglobulines (FcγR, en particulier le FcγRIII (CD16)) ; principalement les cellules NK mais aussi les macrophages M1, les neutrophiles N1 et les lymphocytes. La synapse immunologique formée va assurer la délivrance locale de granzyme et de perforine et la lyse de la cellule tumorale (Figure 21). Les lymphocytes B peuvent aussi agir comme cellules présentatrices d'antigènes capturés sur leurs BCR, et stimuler la prolifération et l'activation des cellules effectrices par sécrétion d'IFN-γ et d'IL-12 [234]. Plusieurs études semblent indiquer l'existence de sous-type de lymphocyte B dits régulateurs, exprimant des ligands et des cytokines comme TGF-β, l'IL-10 et PD-L1 [235]. Ils favorisent la progression tumorale en inhibant les NK, les lymphocytes Th et les lymphocytes T CD8⁺ et favorisent la prolifération des lymphocytes Treg [234,236]. Ces cellules sont difficilement identifiables en absence de marqueurs spécifiques faisant consensus.

IX- L'organisation du microenvironnement tumoral.

1- Le microenvironnement tumoral : relation cellules immunitaires-cellules tumorales

Le microenvironnement tumoral (MET) est un ensemble complexe, structuré, hétérogène et dynamique de cellules immunitaires, de fibroblastes, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, et de molécules sécrétées dans l'environnement proche de la tumeur [237]. Le phénotype de ces cellules, leurs densités et leurs localisations sont hétérogènes entre des tumeurs d'histotypes différents mais également entre tumeurs de même histotype [238]. Cette organisation, à la fois qualitative (nature des cellules et leurs phénotypes), quantitative (densité de cellules par mm²) et spatiale (localisation dans le MET) constitue l'« *immune contexture* » ou contexte immunitaire [237,239] (Figure 25).

Plusieurs composantes constituent le MET du CBNPC [237,240–242] :

- Des cellules immunitaires aux fonctions anti-tumorales : (lymphocytes T CD8+, Th1, Th9, Tfh, macrophages M1, neutrophiles N1, lymphocytes B) qui sécrètent des molécules anti-tumorales (IFN- γ , IL-2, TNF α ...) comme des cytokines et chimiokines qui induisent le recrutement, l'activation, la prolifération et la survie des cellules anti-tumorales.
- Des cellules immunitaires aux fonctions pro-tumorales (lymphocytes Treg, macrophages M2, neutrophiles N2, MDSC, lymphocyte B régulateur) qui sécrètent des molécules pro-inflammatoire (TNF α , IL-1...) ou immunomodulatrices (TGF- β , IL-10...), qui inhibent la réponse immunitaire anti-tumorale et favorisent la prolifération des cellules cancéreuses.
- Des molécules de l'angiogenèse et de l'inflammation qui modulent la réponse immunitaire et la progression tumorale.
- Des TLS, qui peuvent être au milieu des massifs tumoraux ou localisés en périphérie des tumeurs. Ce sont des agrégats de lymphocytes B, de lymphocyte T et de cellules dendritiques matures DC-LAMP+, avec une structure histologique proche d'un follicule lymphoïde ganglionnaire [243].

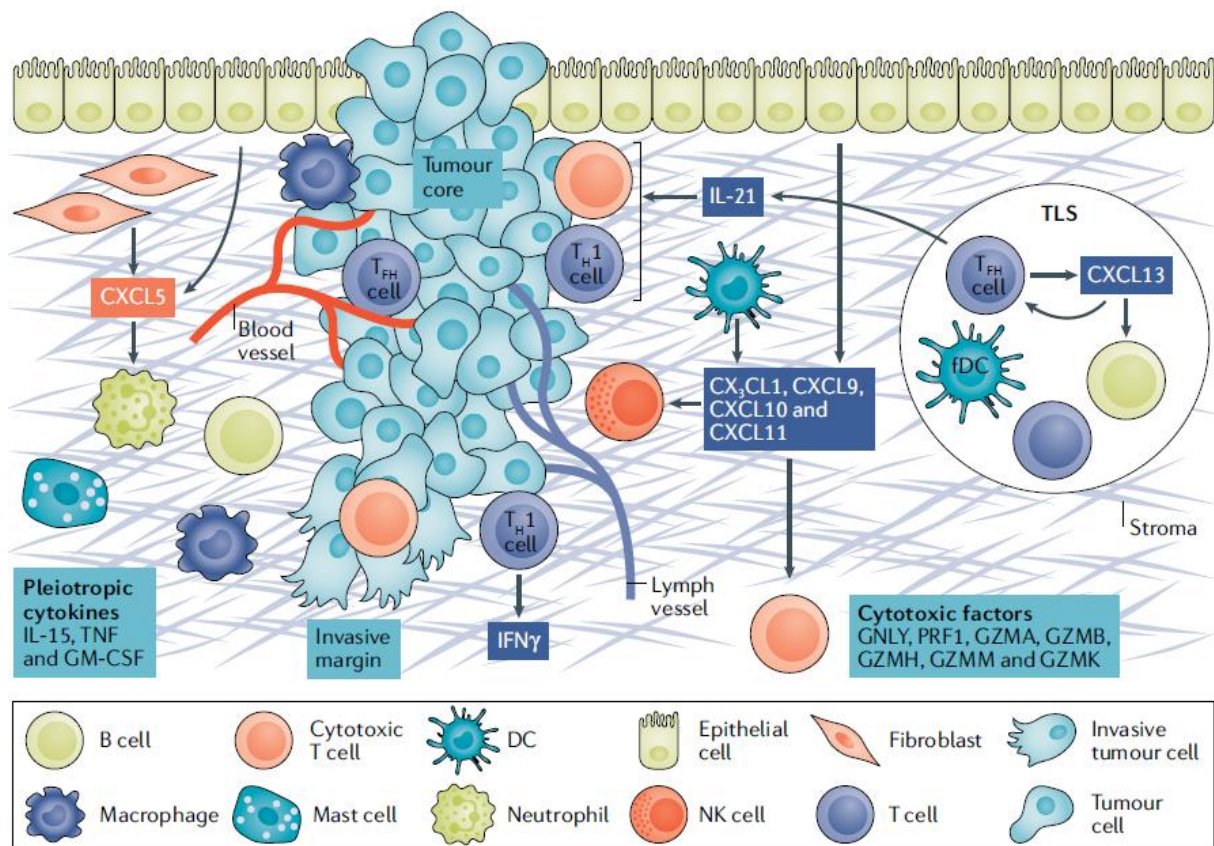


Figure 25 : La « contexture immunitaire » [244]
 fDC : follicular Dendritic cell, GNLY : granulysin, GZM : Granzyme

2- L'infiltrat immunitaire intra-tumoral prédit la survie des patients

Plusieurs études ont démontré l'impact pronostique de l'environnement immunitaire sur la survie et la réponse aux traitements [238,245] (Figure 26 et Figure 27).

Les lymphocytes T CD8⁺ ont été les premiers étudiés, de par leurs fonctions cytotoxiques anti-tumorales. Ils ont un impact positif sur le pronostic dans de nombreux cancers solides comme les cancers du sein [246], du côlon [245,247], le cancer gastrique [248,249], le carcinome hépatocellulaire [250], le mélanome [251] ou encore le CBNPC [252–254]. Ce rôle anti-tumoral n'est pas observé dans le cancer du rein où leurs densités a un impact négatif, contrastant avec les autres tumeurs [255].

La présence de TLS est également associée à une meilleure survie dans de nombreux cancers, dont le CBNPC [243,254,256], de même que la présence de nombreux lymphocytes B

(CD20) [243,257], de cellules dendritiques matures (DC-LAMP) [254,258] ou de lymphocytes Th1 [237].

A l'inverse, les granulocytes neutrophiles sont associés à une mauvaise survie dans les CBNPC [163,259,260] et dans l'ensemble des cancers [261–263]. Ainsi, le ratio sanguin neutrophile/lymphocyte (NLR), qui consiste à diviser la proportion de neutrophile par celle de lymphocyte, est un marqueur de mauvais pronostic. Il serait un indicateur de la balance entre l'inflammation et l'immunité adaptative.

L'étude du rôle des macrophages dans le contrôle tumoral est difficile du fait de leurs diversités phénotypiques et de leurs impacts pronostiques contrastés. De nombreuses études se sont basées sur les marqueurs CD68 et CD163 pour discriminer respectivement les macrophages M1 et M2 [264,265] et ont montrés des résultats parfois contradictoires [266,267]. Plusieurs études, utilisant des combinaisons de marqueurs pour distinguer ces 2 phénotypes, ont montré que les macrophages M1 sont liés à une bonne survie, à l'inverse des macrophages M2 [268,269].

Le rôle pro- ou anti-tumoral des lymphocytes Treg FoxP3+ dans les tumeurs et notamment le CBNPC est toujours très débattu : des études leur confèrent un impact positif [252,270], négatif [271–274] ou encore une absence de valeur pronostique [275].

En dehors de la composition du microenvironnement tumoral et de son influence sur la survie des patients, les paramètres liés à l'individu sont également importants à prendre en compte. En effet nous avons montré que chez des patients avec un CBNPC associé à la BPCO, la densité de lymphocytes T CD8+ intra-tumoraux n'avait pas d'impact pronostique, probablement lié à un phénotype particulièrement « épuisé fonctionnellement » de ces lymphocytes [276]. Les paramètres liés à la cellule tumorale sont également très importants, nous avons montré que selon le type de mutation observé dans la cellule tumorale, le microenvironnement était enrichi en cellules pro- ou anti- tumorales, avec un impact pronostique variable [277].

L'hétérogénéité à la fois en terme de densité, de fonction et d'impact pronostique des cellules immunitaires du microenvironnement tumoral souligne l'importance d'évaluer plus globalement le stroma immunitaire tumoral, en y intégrant son caractère dynamique et la distribution spatiale des cellules, plutôt que d'évaluer un marqueur individuel [244]. Dans les prémices de cette approche, Jérôme Galon a développé l'« *Immunoscore* » pour évaluer la survie des patients atteints de cancer colorectaux et ainsi adapter leur prise en charge.

L'« *Immunescore* » consiste en la quantification des lymphocytes T CD8+ (CD3+/CD8+) et des lymphocytes T mémoires (CD45RO+) dans le lit tumoral et dans la marge d'invasion [278]. Un système de cotation prend en compte ses paramètres et délivre un score. Ce dernier a montré un fort impact pronostique, indépendamment du stade TNM [278]. Les patients présentant des scores élevés avaient une meilleure survie avec un taux plus faible de récurrence [247]. Des études récentes semblent montrer son intérêt dans d'autres cancers, notamment le CBNPC [279,280].

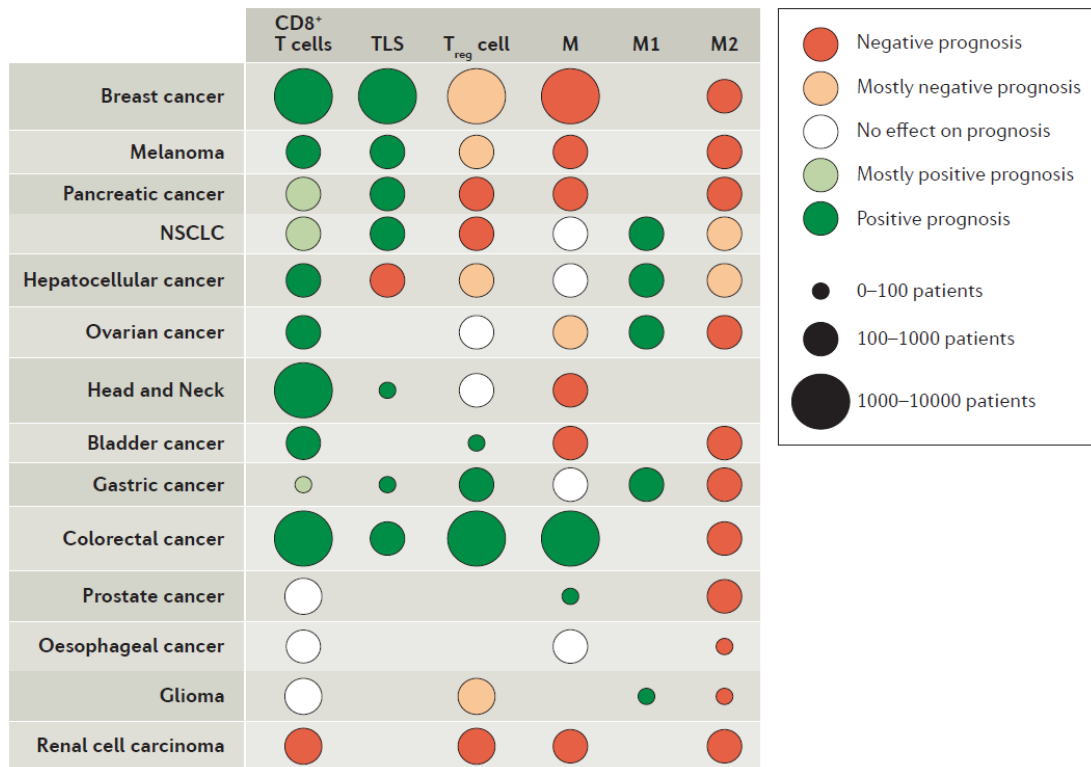


Figure 26 : Impact de l'infiltrat immunitaire sur le pronostic des patients souffrant de cancer [281]

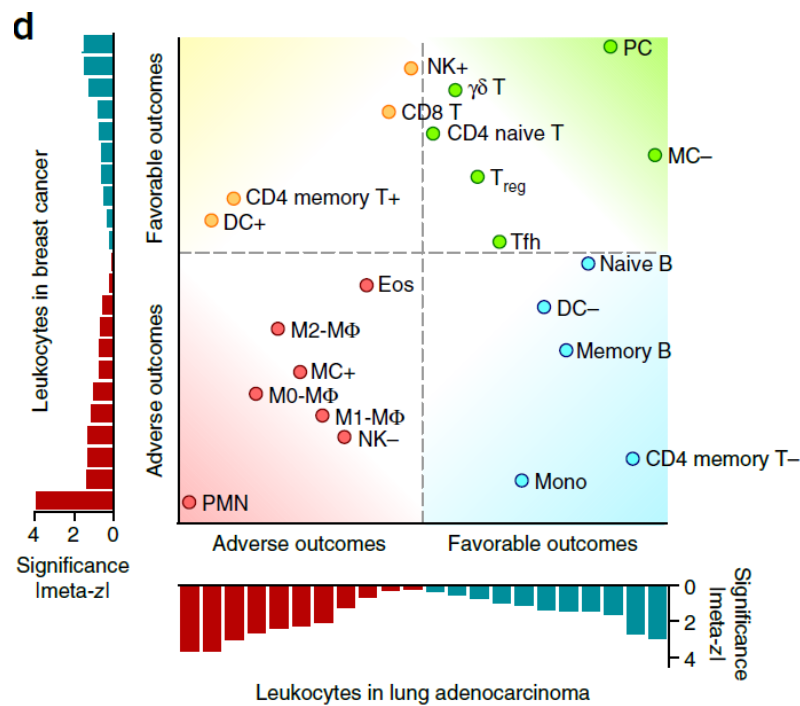


Figure 27 : Impact respectif des cellules immunitaires infiltrants les tumeurs du poumon et du sein [221]

3- La caractérisation de l'infiltrat immunitaire prédit la réponse thérapeutique dans le CBNPC

La composition du microenvironnement tumoral influence la réponse aux traitements dans le CBNPC [238,282]. Une forte infiltration en lymphocytes T CD8⁺ et un score faible de PD-L1 exprimé par les cellules tumorales est associé à une meilleure réponse à la chimiothérapie et à la radiothérapie, quel que soit le stade de la tumeur [283]. La présence de cellules dendritiques matures DC-LAMP⁺ est également prédictif de l'efficacité de la chimiothérapie néo-adjuvante dans des stades avancés [284]. A l'inverse, un ratio FoxP3/CD8 ou un NLR élevé est corrélé avec une moins bonne efficacité de la chimiothérapie [285,286].

L'introduction de l'immunothérapie a mis en lumière le rôle de l'environnement immunitaire intra-tumoral pour le contrôle ou l'échappement tumoral. Cette immunothérapie ciblant l'axe PD-1/PD-L1 vise à lever l'échappement tumoral médié par l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales induisant une dysfonction des lymphocytes T effecteurs PD-1⁺. Cette stratégie a montré des résultats suffisamment positifs pour être admis dans le traitement de première ou deuxième ligne du CBNPC en adjuvant, puis en néo-adjuvant, avec un allongement significatif de la survie globale et de la survie sans progression [84]. Néanmoins, de nombreux

patients ne vont pas bénéficier de cette thérapie, malgré la présence de lymphocytes T CD8+ intra-tumoraux et d'une expression supérieure à 1% de PD-L1 par les cellules tumorales [82], signifiant la nécessité de poursuivre les analyses biologiques de l'environnement immunitaire des tumeurs.

De nombreuses études ont démontré l'impact prédictif majeur de l'infiltrat de lymphocytes T CD8+ [163,287,288], des lymphocytes T CD4+ [289,290] et de PD-L1 sur la réponse aux ICI (Immune Checkpoint Inhibitor) [79,291]. Si les tumeurs non infiltrées en cellules immunitaires ne répondent pas aux ICI, en revanche, l'absence d'expression de PD-L1 peut être associée à une réponse aux ICI dans une proportion significative de patients atteints de CBNPC [292,293].

Parmi les cellules plutôt associées à une mauvaise réponse aux ICI, il faut citer les polynucléaires neutrophiles [291] et les MDSC [294,295]. Les résultats sont plus contrastés pour les lymphocytes Treg [294,296] et les lymphocytes T épuisés [297,298].

4- Caractérisation spatiale de l'environnement immunitaire, son influence sur la survie et la réponse aux ICI

La caractérisation de l'environnement par l'évaluation de la densité d'une sous-population cellulaire ne prend en compte ni la complexité de l'ensemble de l'infiltrat immunitaire intra-tumoral, ni de sa topographie au sein de la tumeur, ni des proximités entre les cellules immunitaires et leurs influences respectives [299]. Pourtant, ces paramètres pourraient être à l'origine des discordances de la littérature scientifique.

Ainsi, le microenvironnement tumoral peut être étudié selon différentes approches :

- La quantification d'un ou plusieurs sous-types cellulaires.
- La localisation cellulaire dans un compartiment déterminé (tumoral, stroma, marge d'invasion...).
- L'analyse de proximité entre types cellulaires, permettant d'identifier des contacts cellulaires par le calcul d'une distance moyenne entre les cellules [300,301] (Figure 28).

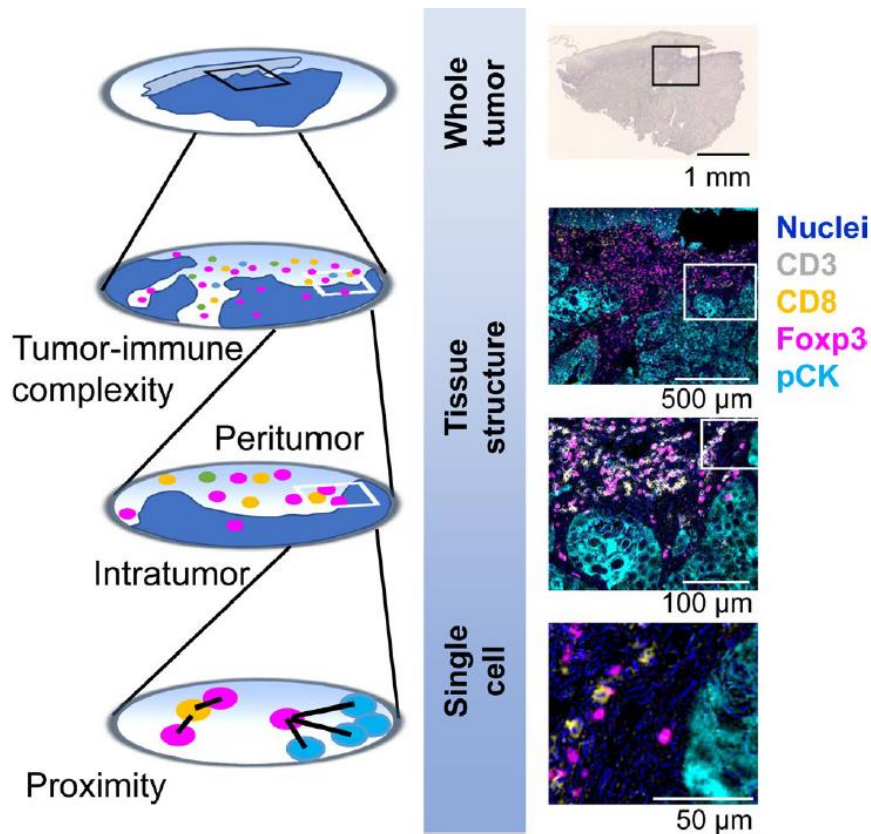


Figure 28 : Les échelles d'études spatiales du microenvironnement tumoral [300]

Un nombre très restreint d'étude ont été publiés sur l'analyse spatiale des cellules immunitaires et leurs influences sur le pronostic dans les CBNPC. La majorité de ces études a évalué la distance moyenne entre les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules tumorales. Il a été montré qu'une faible distance moyenne était liée à une meilleure survie clinique [302–304] et une meilleure réponse aux ICI [305,306]. De même, une faible distance moyenne entre les macrophages M1 et les cellules tumorales prédirait la survie [307]. Parra *et al.* ont observé un risque de récurrence plus important chez les patients dont les lymphocytes T exprimant PD-L1 et PD-1, et d'autres immune checkpoints (LAG-3, TIM-3), étaient proches des cellules tumorales [241].

Ces études se sont donc intéressées à l'interaction entre cellules immunitaires et cellules tumorales, mais peu d'études ont analysé les proximités spatiales entre deux types de cellules immunitaires. Barua *et al.* ont montré un impact pronostique favorable en cas de proximité entre les lymphocytes T CD8⁺ et Treg FoxP3⁺ (20μm) [308]. La proximité des cellules NK (CD56⁺) et de cellules CD45⁺ semble également associé à une meilleure survie [309]. Ces études n'ont pas analysé l'impact sur la réponse thérapeutique dans le CBNPC. En revanche dans le mélanome il a été montré qu'une proximité entre les cellules PD-1⁺ et PD-L1⁺ [310,311], ainsi

qu'entre les lymphocytes T CD8⁺ ou PD-L1⁺ et les cellules tumorales [312] avait un impact sur la réponse aux ICI

5- Intérêt clinique : le développement des immunothérapies bi- et tri-spécifiques

L'immunothérapie conventionnelle met à profit un anticorps monoclonal pour cibler et bloquer une cible protéique sur une cellule. Les progrès en ingénierie génétique ont permis la construction d'anticorps pouvant se lier simultanément à plusieurs épitopes différents, d'un même antigène ou de plusieurs, d'une même cellule ou portés par des cellules distinctes [313]. Dans le domaine de l'oncologie, ils offrent une plus grande flexibilité d'actions thérapeutiques. Ils permettent notamment de [314] (Figure 29):

- Bloquer plusieurs voies cellulaires impliquées dans la prolifération tumorale ou la résolution de la réponse immunitaire (immune checkpoint), et ainsi améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale.
- Recruter et d'activer des cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T CD3⁺ et les cellules NK, pour améliorer leurs efficacités cytotoxiques anti-tumorales en les rapprochant des cellules tumorales.
- Améliorer la spécificité de l'anticorps pour un antigène unique, en ciblant plusieurs de ces épitopes

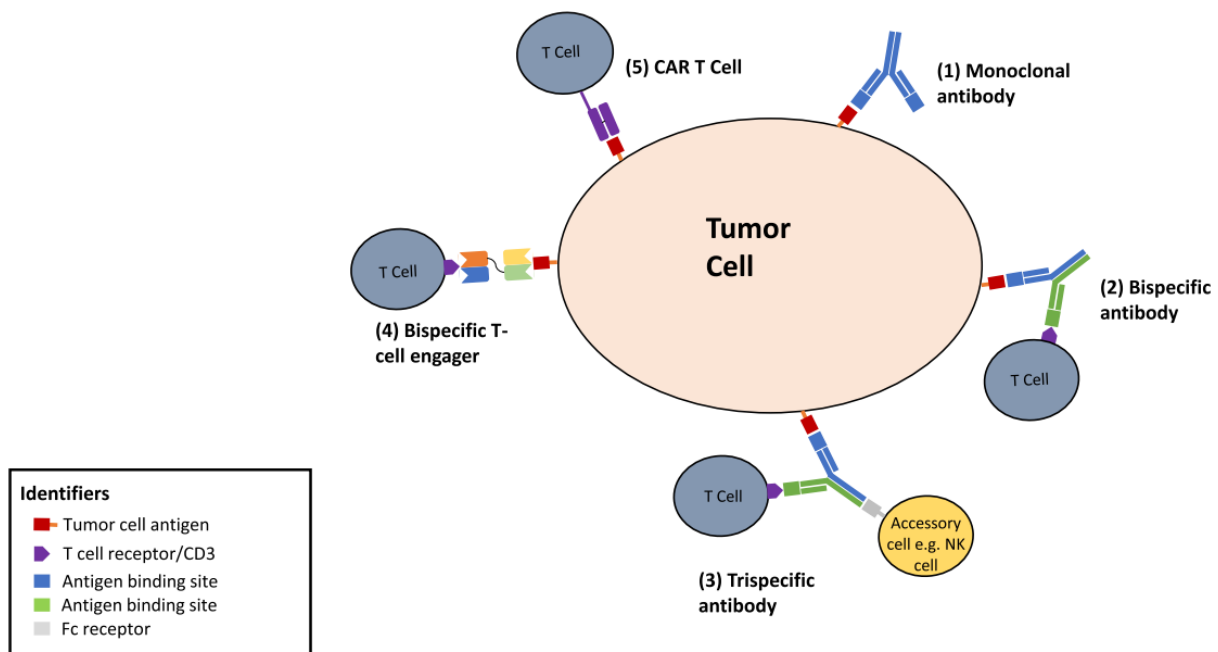


Figure 29 : Les différents formats d'immunothérapie [314]

(1) : anticorps monoclonal, (2) : anticorps bi-spécifique, (3) : anticorps tri-spécifique, (4) : anticorps bi-spécifique engageur de lymphocyte T construit par la réunion de 2 chaînes légères d'immunoglobuline, (5) thérapie CAR T cell (Chimeric antigen receptor T cells)

La grande majorité des anticorps bi-spécifiques en oncologie ont pour but de rapprocher spatialement les lymphocytes T CD3 des cellules tumorales pour améliorer leurs efficacités anti-tumorales, en forçant leurs interactions [315]. D'autres anticorps poly-spécifiques permettent de rapprocher les cellules NK des cellules tumorales et induire leur lyse par les mécanismes d'ADCC [316].

Des anticorps tri-spécifiques ont également été développés, avec des résultats intéressants *in vitro*. Un anticorps tri-spécifique anti-CD3/anti-CD28/anti-CD38 a montré un recrutement efficace des lymphocytes T CD3 à proximité immédiate de cellules tumorales de myélome et leurs lyses [317]. Un anticorps tri-spécifique anti-EGFR/anti-EpCAM/anti-CD3 a montré des résultats encourageant dans le cancer colorectal [318]. Ces anticorps poly-spécifiques font l'objet d'essais cliniques croissants [314,315] (Table 4).

Drug	Company	Targets	Key indications
Glofitamab	Roche/Genentech/Chugai	CD20 xCD3	DLBCL
Mosunetuzumab	Roche/Genentech/ Chugai/Biogen	CD20 xCD3	Indolent and aggressive NHL
Epcoritamab	Genmab/AbbVie	CD20 xCD3	DLBCL
Elranatamab	Pfizer	BCMA xCD3	Multiple myeloma
Teclistamab	Janssen	BCMA xCD3	Multiple myeloma
Erfonilimab	Alphamab Oncology	PDL1 xCTLA4	NSCLC, PDAC
Cadonilimab	Akeso Biopharma	PD1 xCTLA4	GOJ adenocarcinoma, cervical cancer
Tebotelimab*	MacroGenics	PD1 xLAG3	Gastric/GOJ cancer
Ivonescimab	Akeso Biopharma	PD1 xVEGF	NSCLC
Navicixizumab	OncXerna Therapeutics/ Mereo Biopharma	DLL4 xVEGF	Ovarian cancer
SI-B001*	SystImmune/Sichuan Baili Pharmaceutical	EGFR xHER3	NSCLC
Zanidatamab	Zymeworks	HER2 xHER2	Gastro-oesophageal adenocarcinoma
Catumaxomab	LintonPharma	EpCAM xCD3	Gastric adenocarcinoma
Bintrafusp alfa	Merck KGaA	PDL1 xTGF β	NSCLC, biliary tract cancer
SHR-1701	Jiangsu Hengrui Medicine/ Suzhou Suncadia Biopharmaceuticals	PDL1 xTGF β	NSCLC, cervical cancer, gastric/GOJ cancer

Table 4 : Les anticorps bi-spécifiques en essais de phase III en oncologie en 2022 [315]

BCMA : B-cell maturation antigen, DLBC : Diffuse Large B-Cell Lymphoma, DLL4 : Delta-Like Ligand 4, GOJ : Gastro-oesophageal junction, PDAC : pancreatic ductal adenocarcinoma, NHL : Non-Hodgkin's Lymphoma, NSCLC : Non-small cell lung cancer, * : en phase II-III

Hypothèse/Objectif

Le microenvironnement tumoral est un milieu complexe associant de nombreuses cellules aux fonctions parfois opposées et se limiter à quantifier un sous type cellulaire parait désormais insuffisant. Ainsi, l'analyse spatiale du microenvironnement immunitaire, en évaluant les interactions cellulaires, est probablement plus approprié pour prédire la qualité de la réponse immunitaire et son influence sur la survie et la réponse aux thérapies.

L'objectif de cette thèse a été d'analyser l'impact des interactions spatiales entre les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes Treg FoxP3+ et les neutrophiles CD66b+ sur les cellules, la composition de l'environnement immunitaire, l'influence sur la survie et la réponse thérapeutique dans le CBNPC.

Nous avons étudié les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes Treg FoxP3+ et les neutrophiles CD66b+, individuellement, lorsqu'ils étaient en contact en utilisant des techniques d'immunohistochimie multiplex, d'analyse protéique spatiale, d'expression de gènes et de protéines dans plusieurs cohortes de patients souffrants de CBNPC de stade I-III, de stade IIIA-N2 opérés et traités par radiothérapie/chimiothérapie et de stade III-IV traités par ICI. Nous avons étudié une base de données publique de transcriptomique spatiale multiplexe à l'échelle subcellulaire permettant d'identifier des mécanismes cellulaires impliqués dans ces interactions cellulaires.

Résultats

Article 1 : Chemoradiotherapy efficacy is predicted by intra-tumour CD8+/FoxP3+ double positive T cell density in locally advanced N2 non-small-cell lung carcinoma

G. Boulle, Y. Velut, A. Mansuet-Lupo, L. Gibault, H. Blons, L. Fournel, A. Boni, I. Cremer, M. Wislez, V. Duchatelle, Trédaniel, S.A. Hammond, R. Herbst, M. Alifano, P. Giraud, D. Damotte

Publié dans European Journal of Cancer

Résumé des résultats de l'Article 1 :

L'objectif de l'étude a été d'étudier l'impact des lymphocytes T CD8+, des lymphocytes T régulateurs FoxP3+ et du PD-L1 TPS sur l'efficacité de la radio-chimiothérapie chez des patients souffrant de CBNPC de stade III (N2). Des échantillons de pièces opératoires et de biopsies ont été collectés.

Les résultats ont montré que la densité des lymphocytes T CD8+ dans le stroma était associée à la réponse à la radiothérapie, de même que la densité de lymphocyte T CD8+/FoxP3+ double positif. Cette sous-population a été peu étudiée et son rôle reste controversé, mais elle pourrait avoir un rôle à la fois cytotoxique et régulateur de l'immunité anti-tumoral. En revanche, la densité de FoxP3 n'a pas montré d'influence sur la réponse à la radiothérapie.

Les patients présentant un PD-L1 intermédiaire ($1 < x < 50$) présentait une meilleure survie globale, mais pas une meilleure survie sans progression, suggérant que le gain de survie de ces patients n'est pas lié au contrôle de la maladie.

Nos résultats soulignent l'intérêt de la quantification des populations de lymphocytes T CD8+, et plus particulièrement la population de lymphocyte T CD8+/FoxP3+ dans la prédiction de la réponse au traitement par radio-chimiothérapie, même dans les biopsies.

Nos résultats suggèrent que le traitement ne modifie pas l'infiltrat immunitaire, et ainsi ne permet pas de transformer une tumeur « froide » en tumeur « chaude », mais plutôt que le traitement potentialise une réponse immunitaire anti-tumorale préexistante.



Original Research

Chemoradiotherapy efficacy is predicted by intra-tumour CD8⁺/FoxP3⁺ double positive T cell density in locally advanced N2 non–small-cell lung carcinoma



G. Boulle ^{a,b,c,1}, Y. Velut ^{a,b,c,1}, A. Mansuet-Lupo ^{a,b,c,d}, L. Gibault ^e,
 H. Blons ^{b,f,g}, L. Fournel ^{b,h,i}, A. Boni ^{a,b,c}, I. Cremer ^{a,b,c}, M. Wislez ^{a,b,j},
 V. Duchatelle ^k, J. Trédaniel ^{b,i,l}, S.A. Hammond ^m, R. Herbst ^m,
 M. Alifano ^{a,b,c,h}, P. Giraud ^{b,n}, D. Damotte ^{a,b,c,d,*}

^a Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale (INSERM), UMRS 1138, Cordeliers Research Center, Team Cancer, inflammation and complement, Paris, France

^b University Paris Descartes, Paris, France

^c University Pierre et Marie Curie-Paris, Paris, France

^d Department of Pathology, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Cochin, Paris, France

^e Department of Pathology, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

^f INSERM UMRS 1147, Paris, France

^g Department of Biochemistry, APHP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

^h Department of Thoracic Surgery, APHP, Hôpital Cochin, Paris, France

ⁱ INSERM U1124, Paris, France

^j Department of Respiratory Medicine, APHP, Hôpital Cochin, Paris, France

^k Department of Pathology, St Joseph Hospital, Paris, France

^l Department of Oncology, St Joseph Hospital, Paris, France

^m Research and Early Discovery, Oncology Research and Development, AstraZeneca, Gaithersburg, MD, USA

ⁿ APHP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Radiotherapy, Paris, France

Received 31 March 2020; received in revised form 18 April 2020; accepted 27 April 2020

Available online 28 June 2020

KEYWORDS

Radiotherapy;
 CD8⁺/FoxP3⁺ cells;
 Lung cancer;

Abstract Background: Radiotherapy is a standard of care for locally advanced stage III N2 non–small-cell lung carcinoma (NSCLC) combined with surgery/chemotherapy. Radiotherapy is hypothesised to induce tumour immunogenic cell death, to release neoantigen resulting in intra-tumoural immune infiltration and abscopal effect. Conversely, it has not

* Corresponding author: Team “Inflammation, Complement and Cancer”, Cordeliers Research Center, INSERM UMRS 1138, 15 rue de l’école de Médecine, F-75006, Paris, France. Fax: +33 1 44 27 81 17.

E-mail address: diane.damotte@aphp.fr (D. Damotte).

¹ Both authors contributed equally to this work.

Immune environment

been demonstrated if immune cells are necessary to drive radiotherapy efficacy and predict patient's survival.

Patients and methods: We retrospectively analysed tumour samples and clinical data from 113 patients, 89 resected (PORT) and 24 non-resected (DRC) N2-NSCLC treated with chemotherapy and radiotherapy (same radiotherapy department from 2002 to 2015). The immune environment was characterised with *in situ* multiplex staining (CD8, FoxP3, PD-L1 and cytokeratin) and correlated with clinical data and survival.

Results: High density of CD8+ T cells was associated with OS ($p = 0.04$, HR = 1.93 [0.99–3.78]) and DFS ($p = 0.003$, HR = 2.42 [1.31–4.47]) in the PORT. High density of CD8+/FoxP3+ double positive cells was associated with OS ($p = 0.01$, HR = 1.97 [1.11–3.48]) in the whole population, with OS ($p = 0.05$, HR = 1.92 [0.98–3.74]) and PFS ($p = 0.03$, HR = 1.83 [1.03–3.23]) in the PORT without reaching significance for the DRC. Intermediate PD-L1 expression in tumour cells (TPS = 1–49%) was associated with a higher survival in the PORT.

Conclusions: Intra-tumoural CD8+ T cell and particularly CD8+/FoxP3+ double positive T cell densities predict survival in stage III N2-NSCLC suggesting the need for a pre-existing intra-tumour immunity to mediate the action of radiotherapy. Density of CD8+/FoxP3+ cells was the best predictor of patient's survival in multivariate analysis and could represent a biomarker of radiotherapy efficacy.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) is the leading cause of cancer death worldwide because of its high frequency, the late stage at diagnosis in 70% of patients and the poor responsiveness to standard chemotherapy [1,2]. In the initial stages (I–II), surgery is the mainstay of treatment, possibly associated with adjuvant chemotherapy; the treatment of locally advanced disease (stage III) is based on a multimodality approach including surgery, chemotherapy and radiotherapy, with a wide range of associations and sequences [3,4]. This population is currently treated with several modalities, including surgery, chemotherapy and radiotherapy. Adjuvant immunotherapy for locally advanced stages is a recent major breakthrough with a clear survival benefit and acceptable toxicity [5,6]. Radiotherapy is supposed to act as an immunogenic treatment with a possible abscopal effect on distant metastases and thus could increase efficacy of the immunotherapy. Tumour immune environment characteristics and particularly CD4+Th1 cells and CD8+ cytotoxic T cells densities are known to be a strong predictive marker of survival and were also associated with immunotherapy efficacy. The strong link between intra-tumour CD8+ T cells density and survival even in advanced stages [7] or after neo-adjuvant chemotherapy [8] has been extensively demonstrated. The significance of intra-tumour FoxP3 Tregs density is contradictory according to authors and could mediate either pro- or anti-tumour response; the PD-L1 expression in tumour cells was reported as associated with immunotherapy efficacy, but its

significance is contrasted for non-immunotherapy treated patients [7–15].

In the present study, we address the respective link of CD8+ T cells and FoxP3+ T cells densities with efficacy of radiotherapy in stage III N2-NSCLC. We also determined if the percentage of PD-L1-expressing tumoural cells had a survival impact in such population. We had the opportunity to analyse two groups of patients: first had tumour surgical resection followed by treatment with chemotherapy and radiotherapy (PORT), and the second was exclusively treated with chemotherapy and radiotherapy (DRC). Both groups received radiotherapy within the same radiotherapy department of Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP). We found that intra-tumoural CD8+ T cell and particularly CD8+/FoxP3+ double positive T cell densities were strongly linked to survival after radiotherapy.

2. Materials and methods

2.1. Patient population

We conducted a retrospective study including all consecutive patients suffering from an NSCLC stage III pN2 that was histologically documented treated by surgery combined with chemotherapy and radiotherapy (PORT group) or with exclusive chemotherapy and radiotherapy (DRC group) within the radiotherapy department of HEGP between 2002 and 2015; and whose tumour specimens were available for immunostaining experiments. Patients treated in three hospitals

(HEGP, Cochin Hospital and St Joseph Hospital—Paris, France) were referred to a single centre for radiotherapy after weekly multidisciplinary team meetings sharing common practices outlined in institutional guidelines. All patients included in the present study had an N2 disease, therefore stage of disease was fixed by T stage (T1–T2 = IIIA; T3–T4 = IIIB). We excluded 30% of DRC patients because of the lack of available histological material, and all NSCLC stages I–II and IV or SCLC.

This study was approved by the local ethics committee (CPP Ile de France II, No. 2008-133, No. 201206-12 and No. 2018 MS1).

2.2. Treatments

Treatment regimen was decided according to our institutional guidelines in the setting of a multidisciplinary team discussion. All the patients had the same pre-treatment work-up including contrast-enhanced thoracic and upper abdominal computed tomography (CT) and contrast-enhanced brain CT scans or magnetic resonance imaging. Positron-emission tomography (PET) scan was systematically used beginning January 2004. Invasive mediastinal staging (mediastinoscopy, video-assisted thoracic surgery, EBUS and oesophageal ultrasonography) was indicated in case of clinically suspected N2 disease at CT or PET scan. As a general rule, infiltrative (“bulky”) N2 disease at presentation was considered as a contraindication for surgery and patients were treated by chemoradiotherapy (DRC). For resectable N2 disease (known before surgery or pathological examination), curative surgery included anatomical lung resection and a full mediastinal lymphadenectomy with perioperative platinum-based chemotherapy (4 cycles). Pertinence of surgery, possibly within the LUNG ART study was decided at multidisciplinary team discussion. Treatment was supplemented with 3D-radiotherapy in all operated patients, to deliver a dose of 54 Gy on the mediastinum; and for non-resectable diseases, radiotherapy and chemotherapy combination was performed with 66 Gy and at least two cycles of platinum-based chemotherapy. According to the French Radiation Oncology Society recommendations, dosimetry constraints for organ at risk were as follows: a volume of lung parenchyma that received 20 Gy < 37%, a mean dose to the lung less than 15–20 Gy, a volume of heart that received 40 Gy < 30% and a volume of oesophagus that received 50 Gy < 35% [16].

2.3. Pathological material

Formalin-fixed paraffin-embedded tumour samples were collected from the pathology department of Cochin, HEGP and Saint-Joseph Hospitals. All samples were blindly reviewed by thoracic expert pathologists (ALM

and DD) and tumours classified according to the latest World Health Organisation (2015) [17], and staging according to the latest tumour-node-metastasis (TNM; 8th edition 2017).

2.4. Immunostaining

Multiplex fluorescence immunohistochemistry was performed on 5- μ m thick serial sections using Opal™ 4-Color Automation IHC Kit (PerkinElmer®) for CD8 (Anti-CD8 antibody SP16, Spring Bio), Cytokeratin (Anti-cytokeratin antibody AE1/AE3, DAKO), FoxP3 (Anti-FoxP3 antibody 236A/E7, Abcam) and PD-L1 (Anti-PD-L1 E1L3N; CST), respectively, with Opal 570, Opal 520 and Opal 690 fluorophores and then counterstained with Spectral DAPI. Slides were scanned on Axio Scan Z1 (Zeiss) and the analysis performed using Halo® (Indica Labs) counting software. Multiplex staining accuracy was checked by chromogenic staining (DAB) on NSCLC tissues. For the multiplex staining, the development of the analysis algorithm consisted of a selection of the cells labelled by the fluorophore according to nuclear (FoxP3) or membrane (CD8, PD-L1 and cytokeratin) geometrical parameters. All counting results were converted to cell density (cell number per mm²), except for PD-L1 where the TPS (tumour proportion score) was used, corresponding to the percentage of PD-L1 positive tumour cells. Different areas were analysed on the tumour section: the tumour cell nests only (IT), the tumoural stroma (S) and both (ST) (Fig. 1).

2.5. Statistical methods

Survival analysis was performed with the ‘survminer’ RStudio (version 3.5.1) package, using both log-rank test and Cox proportional hazards regressions (<http://cran.r-project.org>) to determine *p*-value, hazard ratio (HR) and confidence interval (CI). A *p*-value < 0.05 was considered to be significant, and Prism 8 (GraphPad) was used to represent multivariate analysis. Multivariate analysis was performed on overall survival (OS) selecting variables with the lowest *p*-value (< 0.1) obtained from univariate analysis: ST CD8 and ST CD8+/FoxP3+ double positive T cells for the PORT group and ST CD8 and IT CD8+/FoxP3+ double positive T cells for the DRC group. TNM status was not introduced in the multivariate analysis as all patients were N2M0, and therefore TNM was restricted to the T stage of the tumour. A strong correlation was found between CD8+ and CD8+/FoxP3+ double positive T cells (Supplementary Fig. 3); therefore, we conducted the multivariate study separately for the CD8+ T cells and the CD8+/FoxP3+ T cells.

Several cutoffs were tested and the first quartile was used as a separation value between patients with low

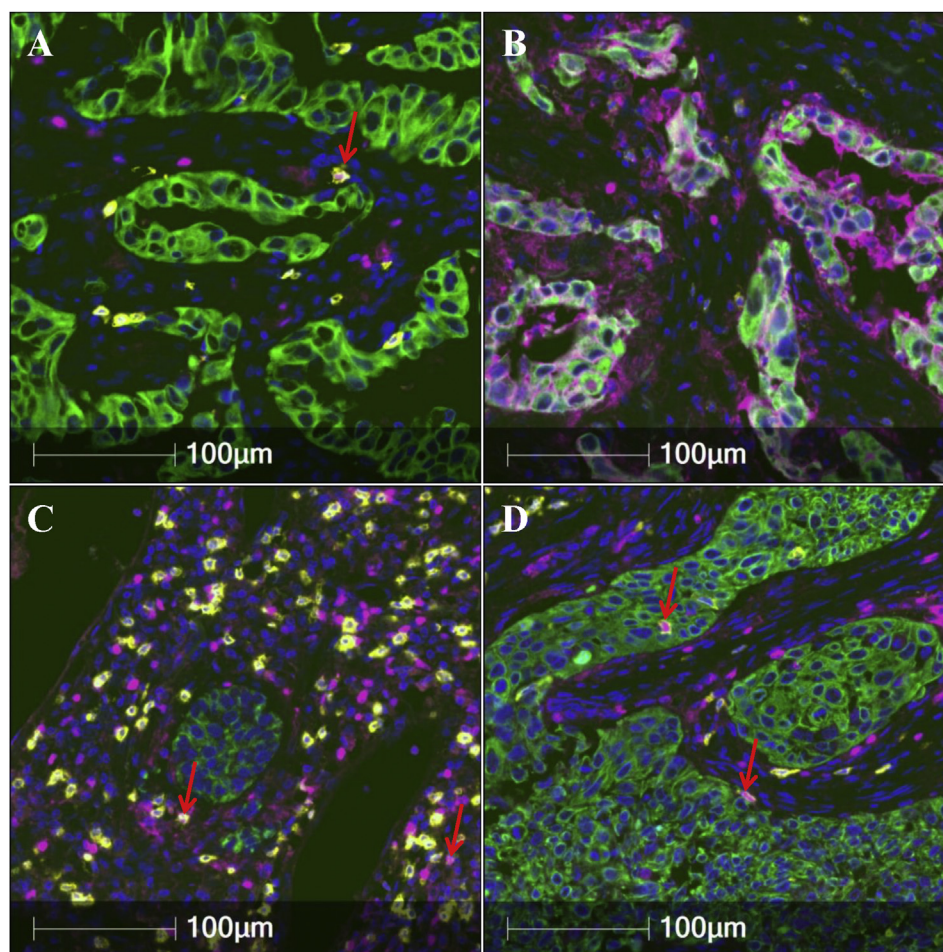


Fig. 1. Multiplex staining of two non-small-cell lung cancers from PORT cohort, showing heterogeneity of tumours microenvironment. Tissue section was stained by fluorescent multiplex immunohistochemistry for CD8 (yellow), PDL-L1 (violet in membranes), FoxP3 (violet in nuclei) and cytokeratin (green). (A) and (B), respectively, show non-expressing and high-expressing PD-L1 tumour nest, with few infiltration of immune cells. (C) and (D), respectively, show high level of CD8+/FoxP3+ double positive cells in the stroma (ST) and in the tumour nest (IT). Both pictures point the closeness of CD8+, FoxP3+ and CD8+/FoxP3+ cells together, especially in the stroma. Bold red arrows indicate CD8+/FoxP3+ cells.

and high densities (25% low/75% high) of a considered parameter as it gave the lowest p -value. Data collection was completed on February 2019 and data analysis started afterward.

3. Results

3.1. Population

We studied 113 patients treated with radiotherapy regimen between 2002 and 2015 and having available tumour samples for immunostaining. A total of 89 patients (PORT) were treated by surgical resection, and 24 patients were not operated from their lung tumour (DRC). The median follow-up was 29.8 (0.8–149.6) and 20.8 (0.1–76.4) months for PORT and DRC, respectively. Median age at the start of radiotherapy was 61.5

(39–82) and 60.7 (48–77) years for PORT and DRC, respectively. Characteristics of the patient populations are summarised in [Table 1](#).

3.2. Survival and local control

At 5 years, OS rate was 50.9% (95% CI: 0.40–0.64) and 25.4% (95% CI: 0.10–0.59) for PORT and DRC, respectively. In global population, median survival was 27 months; in the PORT group, the median survival was 29.8 months and the DFS rate was 33.7% (95% CI: 0.23–0.47); in the DRC group, the median survival was 18.4 months and the DFS rate was 21.8% (95% CI: 0.0904–0.524). There was a significant difference between the two groups in terms of OS ($p = 0.03$, HR = 0.52 [0.28–0.97]) ([Supplementary Fig. 1](#)).

Table 1
Patients characteristics and univariate analysis.

	PORT	DRC	p-Value
Patients (%)	89 (79%)	24 (21%)	
Age (median year)	61.5	60.7	0.16
Men	54 (60.7%)	16 (66.7%)	0.76
Women	35 (39.3%)	8 (33.3%)	
OMS (pre-treatment)			0.66
0–1	85 (95.5%)	24 (100.0)	
2–3	4 (4.5%)	0	
Tobacco			0.25
Yes	75 (84.3%)	23 (95.8%)	
No	14 (15.7%)	1 (4.2%)	
Pack-year (mean)	36	41	0.43
Chronic bronchitis			0.14
Yes	18 (20.2%)	9 (37.5%)	
No	71 (79.8%)	15 (62.5%)	
T stage (disease stage)			1.00
T1–T2 (IIIA)	54 (60.7%)	15 (62.5%)	
T3–T4 (IIIB)	35 (39.3%)	9 (37.5%)	
Side of tumour			1.00
Right	46 (51.7%)	13 (54.2%)	
Left	43 (48.3%)	11 (45.8%)	
Type of surgery			NA
Segmentectomy	2 (2.2%)	NA	
Lobectomy	54 (60.7%)	NA	
Pneumonectomy	23 (25.8%)	NA	
Bilobectomy	6 (6.7%)	NA	
Others	4 (4.5%)	NA	
Resection			NA
R0	87 (97.8%)	NA	
R1–2	2 (2.2%)	NA	
Ganglionic area			0.64
One	43 (46.1%)	14 (58.3%)	
More than one	45 (50.6%)	10 (41.7%)	
NA	1 (1.1%)	0 (0.0%)	
Histology			0.18
Adenocarcinoma	59 (66.3%)	11 (45.8%)	
Squamous cell carcinoma	20 (22.5%)	8 (33.3%)	
Others	10 (11.2%)	5 (20.9%)	
Chemotherapy			NA
Neo-adjuvant	27 (30.3%)	NA	
Adjuvant	86 (96.6%)	24 (100%)	
Adjuvant immunotherapy			0.94
Yes	9 (10.2%)	3 (12.5%)	
No	39 (44.3%)	10 (41.7%)	
NA	40 (45.5%)	11 (45.8%)	

3.3. Prognostic value of immune subpopulations

At univariate analysis, in global population, the OS was associated with double positive CD8+/FoxP3+ T cells density ($p = 0.01$, HR = 1.97 [1.11–3.48]). Operated population analysis gave the most significant association between survival and CD8+ T cells densities, as high density CD8+ T cells in the whole tumour area (ST CD8) was associated with a significantly higher OS ($p = 0.04$, HR = 1.93 [0.99–3.78]) and DFS ($p = 0.003$, HR = 2.42 [1.31–4.47]); in the tumour nest, high density of CD8+ T cells (IT CD8) was associated with higher DFS only ($p = 0.009$, HR = 2.20 [1.19–4.06]). High density of ST CD8+/FoxP3+ double positive T cells was associated with better OS ($p = 0.05$,

HR = 1.92 [0.98–3.74]) and significantly greater PFS ($p = 0.03$, HR = 1.83 [1.03–3.23]) (Fig. 2). In the non-operated group, high density of IT CD8+/FoxP3+ T cells density was associated with a trend to improved OS and DFS ($p = 0.06$, HR = 2.84 [0.88–9] and $p = 0.05$, HR = 3.03 [0.91–10.10], respectively) (Supplementary Fig. 2).

As densities of CD8+ and CD8+/Foxp3+ double positive T cells were correlated, we conduct the multivariate analysis separately for each cells subtype (Supplementary Fig. 3). Interestingly, we were able to show that both immune populations were strong predictor of survival (OS and DFS; Fig. 3, Supplementary Figs. 4 and 5). Particularly, intra-tumour CD8+/FoxP3+ double positive cells were the best survival predictor, meanwhile whole tumour CD8+ T cell density was at the limit of significance in multivariate analysis ($p = 0.05$, HR = 0.54 [0.29–1.01]) and this suggests that this population encompasses cells of more heterogeneous specificity rather than population imbalance ($n = 28$ low and $n = 85$ high).

FoxP3+ single positive T cells had no significant impact on survival (OS, DFS) in the PORT and DRC groups (data not shown).

3.4. Tumoural PD-L1 expression

In the PORT population, the OS was higher in patients with a PD-L1 tumour expression level $\geq 1\%$ (82 versus 9 months), but still did not reach significance ($p = 0.40$, HR = 0.84 [0.25–2.86]) (Supplementary Fig. 6). The beneficial effect on survival was mainly observed in patients with a tumour expression level of PD-L1 between 1% and 49% compared to those $\geq 50\%$ (149 versus 44 months). The OS was dramatically increased in the PD-L1 intermediate group compared to the $\geq 50\%$, but we did not find any differences for DFS in both groups (33 versus 24). No association was found in the DRC group. Twelve patients received immunotherapy in the course of their disease, but no significant association with survival, PDL1 expression nor immune infiltration characteristics could be found.

4. Discussion

The aim of our study was to determine if the immune environment characteristics could impact stage III (N2) NSCLC patient's survival after a radio/chemotherapy regimen. Particularly, we wanted to determine if patients with immunologically cold tumour may have a long survival after radiotherapy suggesting an immunogenic impact of irradiation. We addressed this question by studying the survival of patients treated with radiotherapy combined to chemotherapy and curative surgery for a majority of them, according to the density of intra-tumour CD8 T cells, FoxP3 cells and PDL1 positive

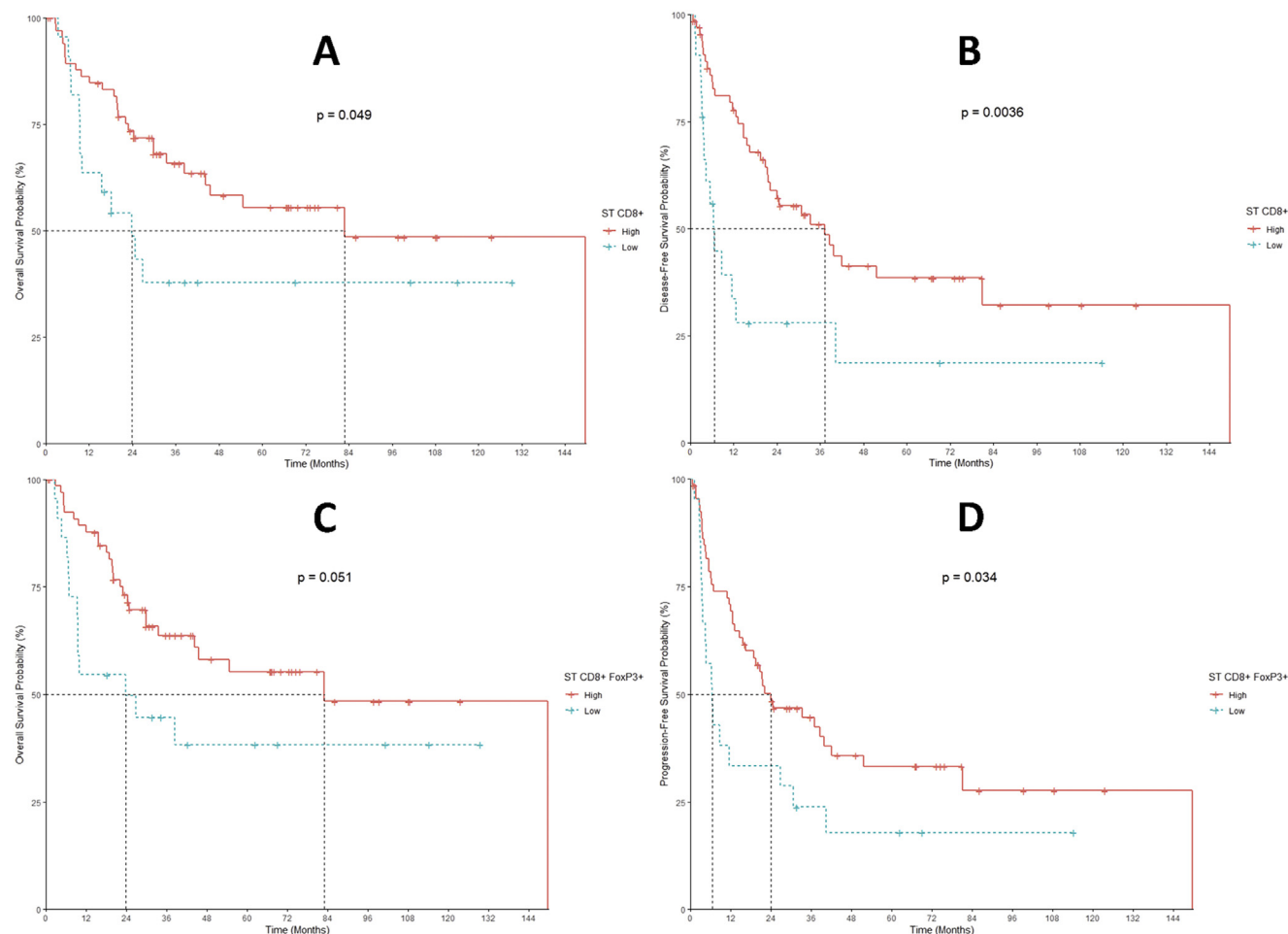


Fig. 2. Kaplan–Meier curves for PORT group. OS (A) and DFS (B) with high ($n = 67$, red) or low ($n = 22$, blue) density of ST CD8+ cells. OS (C) and PFS (D) survival curves for patient with high ($n = 67$, red) or low ($n = 22$, blue) density of ST CD8+ FoxP3+ double positive cells.

tumour cells. We used an *in situ* multiplex labelling technique, which gave us the opportunity to identify and quantify CD8+/FoxP3+ double positive cells within the tumour nest and stroma. As expected, we found that the OS after chemo/radiotherapy was significantly increased when patients had tumour surgical resection with an HR of 0.47, as smaller stages and better performance status were prone to surgery. We also demonstrate that OS and DFS were significantly associated with CD8+ T cells, and interestingly to CD8+/FoxP3+ double positive T cells densities, which was never reported before. Finally, we also showed that the percentage of tumoural cells expressing PD-L1 (TPS), particularly the intermediate group (TPS = 1–49%) was associated with OS.

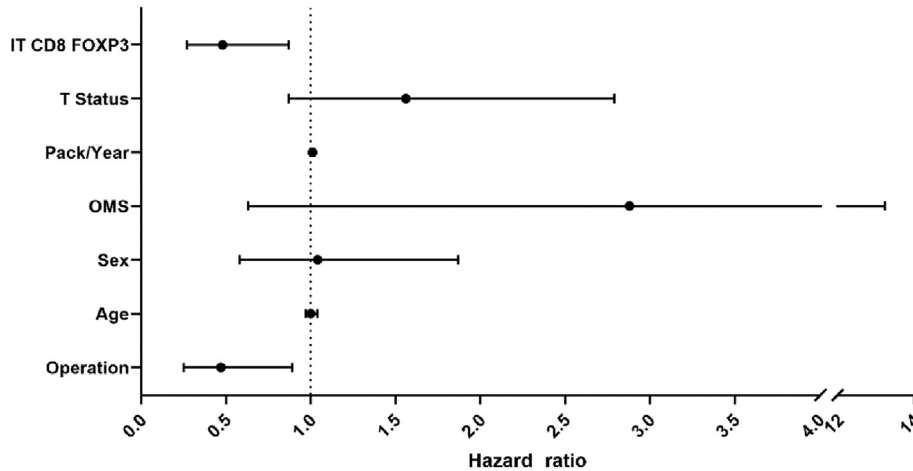
The prognostic value of a high density of CD8+ TILs in NSCLC was reported by our team, independent of the stage of disease nor neo-adjuvant treatment [7,8]. The link between CD8+ TILs and radiotherapy efficacy was suggested before [9], particularly by Tokito *et al.* who showed the impact of high density of CD8+ TILs in terms of OS ($p < 0.01$) and PFS ($p = 0.01$) in a chemo/radiotherapy cohort [10]. A recent meta-analysis

(24 studies and $n = 7006$ patients) confirms the high prognostic value of CD8+ TILs in NSCLC with an impact on survival (HR = 0.91, $p = 0.001$) and recurrence (HR = 0.74, $p = 0.001$), but no clear link with radiotherapy [18]. It has never been clearly demonstrated the need for an established immunity to induce an effective radiotherapy; rather radiotherapy is supposed to induce immunogenic cell death and thus promotes immune response, abscopal effect and to increase the effectiveness of immunotherapy. Thus, our results suggest that radiotherapy does not turn a cold tumour into a hot tumour, but rather enhance or awake a pre-existing anti-tumour immune response.

Interestingly, the multiplex staining identified CD8+/FoxP3+ double positive cells that were the best predictor of survival in multivariate analysis of OS and DFS in both resected (PORT) and non-resected (DRC) NSCLC. This subset of CD8+ TILs is controversial in terms of biological significance as they represent a small proportion of immune cells within tumours and that they may act either as regulatory or cytotoxic cells [19–21]. The FoxP3 expression in CD8+ T cells could

Covariates	Levels	p-value		Hazard ratio	95% CI
IT CD8 FOXP3	Low – High	0.01	**	0.48	0.27 - 0.87
T Status	T1-T2 – T3-T4	0.13		1.56	0.87 - 2.79
Pack/Year	-	0.06	*	1.01	1.00 - 1.02
OMS	0-1 – 2-3	0.17		2.88	0.63 - 13.22
Sex	M – F	0.89		1.04	0.58 - 1.87
Age	-	0.77		1.00	0.97 - 1.04
Operation	No – Yes	0.02	**	0.47	0.25 - 0.89

Overall survival - Forest plot



Covariates	Levels	p-value		Hazard ratio	95% CI
ST CD8	Low – High	0.05	*	0.54	0.29 - 1.01
T Status	T1-T2 – T3-T4	0.18		1.50	0.83 - 2.70
Pack/Year	-	0.07	*	1.01	1.00 - 1.02
OMS	0-1 – 2-3	0.17		2.85	0.62 - 13.02
Sex	M – F	0.88		1.05	0.58 - 1.89
Age	-	0.56		1.01	0.98 - 1.04
Operation	No – Yes	0.01	**	0.44	0.23 - 0.84

Overall survival - Forest plot

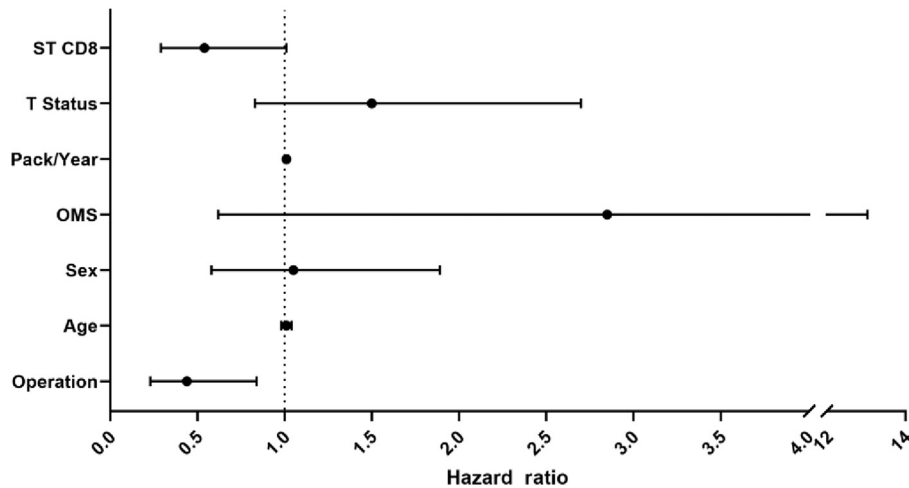


Fig. 3. Multivariate Cox regression analysis on the OS of the whole cohort. IT CD8 FOXP3 (up) and ST CD8 (down) have been separately analysed against clinical covariates with *p*-value, hazard ratio and 95% CIs indicated in the respective tables, and forest-plots are represented for clarification. TNM stage was not included in the multivariate analysis, because all patients had the same N2M0 stage, and TNM status was therefore restricted to the T stage of the tumour. For factor covariates, reference level is indicated on the left side of the levels columns. **p* < 0.1, ***p* < 0.05. OMS: Performance score from Organisation Mondiale de la Santé; CI, confidence interval.

be a hallmark of a transient T cell activation or a biomarker of an immune regulatory response to the tumour, or to radiotherapy-induced inflammation. It has been reported in a mouse model that CD8+/FoxP3+ T cells were associated with a tumour regression phenotype and interferon- γ secretion [19]. It was not reported in human tumours, and our finding has to be confirmed in other cohorts of NSCLC, treatment-naïve ones and in other solid tumours. The fact that densities of CD8+/FoxP3+ T cells are predictors of survival, even in small specimen (DRC) means that it could be interesting biomarkers of responsiveness to combined chemo/radiotherapy, at any stage of disease or size of tumour samples. To quantify this population, either multiplex fluorescent staining or chromogenic double staining could be performed routinely, with artificial intelligence help for an accurate assessment of cell densities [22].

We analysed PD-L1 expression in tumoural cells (TPS), which is a companion test for immune checkpoint inhibitors. We found that longest survivors had TPS comprised between 1% and 49%, which was not yet reported by others [9,23]. Our PD-L1 staining technique was validated with a French national harmonisation study [24]. Interestingly, if the OS was dramatically increased in the intermediate group, DFS was similar for all patients with TPS above 1% and thus suggest that disease control is not the principle mechanism of long-term survival in these patients.

Our study had a few limitations; the need for tumour tissue led to the main bias of the studied population, with a very high proportion of operated patients, which is not conventional management of N2 patients. Indeed, we had low number of evaluable biopsies from DRC patients and thus the proportion of PORT was artificially increased. Both populations were similar in terms of clinical variable, and yet there seems to be an advantage conferred to the patients operated on, can be by the effect of reducing the tumour volume with surgery, which may explain the impact of operation status in the multivariate analysis. Therefore, our results have to be confirmed in a more clinically relevant population of DRC patients particularly included in clinical trials. Postoperative radiotherapy was administrated after R0 resection; thus in operated patients, survival after radiotherapy is not related to the volume of residual disease, but rather to the density of cCD8+ T lymphocytes, as suggested by our study.

Our results suggest that radiotherapy efficacy is not due to immune cell recruitment, but rather linked to an increasing antigen specificity of T cells or an enhancing of pre-existing anti-tumour immune response and should bring some benefit to patients with N2 status [1,25,26]. It would have been interesting to analyse tumour specimen before and after neo-adjuvant radiotherapy to determine the effect of radiotherapy on immune cells densities, but this is not recommended in current patient's therapeutic management.

We reported that survival outcome in NSCLC patients treated with a combined radiotherapy/chemotherapy regimen alone or with surgery can be predicted by the density of CD8+ TILs and more specifically by the density of CD8+/FoxP3+ double positive TILs. In contrast to the hypothesised role of radiotherapy, pre-existing intra-tumoural immune cells are necessary to mediate a clinical response after radiotherapy.

Funding

This work was supported by the French Society of Radiation Oncology (SFRO), the National Union of Radiation Therapists Oncologists (SNRO), the French Society of Young Radiation Therapists Oncologists (SFjRO) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Paris Descartes-Paris 5 University, Pierre et Marie Curie-Paris 6 University, the Cancer Research for Personalized Medicine (CARPEM), the LabEx Immuno-oncology, the Institut National du Cancer (2011-PLBIO-06-INSERM 6-1) and MedImmune.

Conflict of interest statement

GB: Received support from the SFRO.

ALM: Lectures and educational activities: AstraZeneca, Roche, Pfizer. Travel, accommodations, expenses: Roche.

HB: Lectures and educational activities: AstraZeneca, Bristol-Myers Squibb, MSD.

MW: Lectures and educational activities: AstraZeneca, Amgen, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, MSD, Roche. Travel, accommodations, expenses: Astra-Zeneca, MSD, Roche, Pfizer.

JT: Travel, accommodations, expenses: BMS, Roche.

SAH and RH: Full-time employees of AstraZeneca.

MA: Consulting advisory role: AstraZeneca.

PG: Lectures and educational activities: AstraZeneca, Bristol-Myers Squibb, Ipsen, Merck.

DD: Lectures and educational activities: AstraZeneca, Bristol-Myers Squibb, MSD, Agilent. Consulting advisory role: AstraZeneca, BMS, MSD. Travel, accommodations, expenses: Abbvie, Roche, AstraZeneca. Sponsored research: AstraZeneca, Medimmune, Roche.

The remaining authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.04.040>.

References

- [1] Péchoux CL, Mercier O, Belemsagha D, Bouaita R, Besse B, Fadel E, et al. Role of adjuvant radiotherapy in completely resected non-small-cell lung cancer. *EJC Suppl EJC Off J EORTC*

- Eur Organ Res Treat Cancer Al 2013;11:123–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.022>.
- [2] Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2002; 346:92–8. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011954>.
- [3] Andre F, Grunewald D, Pignon JP, Dujon A, Pujol JL, Brichon PY, et al. Survival of patients with resected N2 non-small-cell lung cancer: evidence for a subclassification and implications. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2017;18:2981–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.16.2981>.
- [4] Ball DL, Fisher RJ, Burmeister BH, Poulsen MG, Graham PH, Penniment MG, et al. The complex relationship between lung tumor volume and survival in patients with non-small cell lung cancer treated by definitive radiotherapy: a prospective, observational prognostic factor study of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group (TROG 99.05). *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 2013;106:305–11. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2012.12.003>.
- [5] Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017;377:1919–29. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709937>.
- [6] Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med* 2018;379:2342–50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809697>.
- [7] Goc J, Germain C, Vo-Bourgais TKD, Lupo A, Klein C, Knockaert S, et al. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res* 2014;74:705–15. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1342>.
- [8] Remark R, Lupo A, Alifano M, Biton J, Ouakrim H, Stefani A, et al. Immune contexture and histological response after neo-adjuvant chemotherapy predict clinical outcome of lung cancer patients. *Oncoimmunology* 2016;5:e1255394. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1255394>.
- [9] Ameratunga M, Asadi K, Lin X, Walkiewicz M, Murone C, Knight S, et al. PD-L1 and Tumor Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Markers in Resected NSCLC. *PLoS One* 2016;11:e0153954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153954>.
- [10] Tokito T, Azuma K, Kawahara A, Ishii H, Yamada K, Matsuo N, et al. Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8+ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990;2016(55):7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.11.020>.
- [11] Yang H, Shi J, Lin D, Li X, Zhao C, Wang Q, et al. Prognostic value of PD-L1 expression in combination with CD8+ TILs density in patients with surgically resected non-small cell lung cancer. *Cancer Med* 2018;7:32–45. <https://doi.org/10.1002/cam4.1243>.
- [12] Cooper WA, Tran T, Vilain RE, Madore J, Selinger CI, Kohonen-Corish M, et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer Amst Neth* 2015;89:181–8. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.05.007>.
- [13] Al-Shibli KI, Donnem T, Al-Saad S, Persson M, Bremnes RM, Busund LT, et al. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2008;14:5220–7. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0133>.
- [14] Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, Conlon D, Joshi MB, Harpole DH, et al. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 2006;107:2866–72. <https://doi.org/10.1002/cncr.22282>.
- [15] Zhao S, Jiang T, Zhang L, Yang H, Liu X, Jia Y, et al. Clinicopathological and prognostic significance of regulatory T cells in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Oncotarget* 2016;7:36065–73. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9130>.
- [16] Giraud P, Lacornerie T, Mornex F. Radiotherapy for primary lung carcinoma. *Cancer Radiother J Soc Francaise Radiother Oncol* 2016;20(Suppl). <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2016.07.009>. S147-156.
- [17] Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol* 2015;10:1243–60. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>.
- [18] Zeng D-Q, Yu Y-F, Ou Q-Y, Li X-Y, Zhong R-Z, Xie C-M, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2016;7:13765–81. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7282>.
- [19] Le DT, Ladle BH, Lee T, Weiss V, Yao X, Leubner A, et al. CD8+Foxp3+ tumor infiltrating lymphocytes accumulate in the context of an effective anti-tumor response. *Int J Cancer J Int Cancer* 2011;129:636–47. <https://doi.org/10.1002/ijc.25693>.
- [20] Chaput N, Louafi S, Bardier A, Charlotte F, Vaillant J-C, Ménégau F, et al. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* 2009;58:520–9. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.158824>.
- [21] Churlaud G, Pitoiset F, Jebbawi F, Lorenzon R, Bellier B, Rosenzweig M, et al. Human and Mouse CD8+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Front Immunol* 2015;6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00171>.
- [22] Boulle G, Velut Y, Boni A, Lupo A, Alifano M, Trédaniel J, et al. Analysis of immune microenvironment by multiplex immunohistochemistry in locally advanced non-small cell lung cancer: Principles and perspectives. *Cancer Radiother J Soc Francaise Radiother Oncol* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2018.07.031>.
- [23] Uruga H, Bozkurtlar E, Huynh TG, Muzikansky A, Goto Y, Gomez-Caraballo M, et al. Programmed Cell Death Ligand (PD-L1) Expression in Stage II and III Lung Adenocarcinomas and Nodal Metastases. *J Thorac Oncol* 2017;12:458–66. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.10.015>.
- [24] Adam J, Le Stang N, Rouquette I, Cazes A, Badoual C, Pinot-Roussel H, et al. Multicenter harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2018;29:953–8. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy014>.
- [25] Albain KS, Swann RS, Rusch VW, Turrisi AT, Shepherd FA, Smith C, et al. Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2009;374:379–86. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60737-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60737-6).
- [26] Radiation therapy in treating patients with non small cell lung cancer that has been completely removed by surgery - Full text view - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00410683). n.d. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00410683> (accessed February 11, 2018).

Article 2: The Contactome involving CD8+ T cells, FOXP3+ T cells and neutrophils influence the survival and the response to therapy in lung cancer

Y. Velut, A. Mansuet-Lupo, J. Biton, K. Leroy, B. Burrioni, G. Boulle, P. Giraud, F Goldwasser, J. Arrondeau, P. Boudou-Rouquette, L. Gibault, H. Blons, L. Fournel, A. Boni, I. Cremer, M. Wislez, S.A. Hammond, M. Alifano, D. Damotte

En soumission dans Journal for Immunotherapy of Cancer

Résumé des résultats de l'Article 2 :

L'objectif de cette étude a été de montrer l'impact des proximités spatiales entre les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes T régulateurs FoxP3+ et les neutrophiles CD66b+ sur le pronostic clinique et la réponse aux traitements anti-cancéreux, en développant un pipeline d'analyse pour quantifier la proportion des interactions entre 2 types cellulaires, rapportée à leurs densités respectives (I_{ND}) sur 3 cohortes de patients souffrant de CBNPC.

Nous avons montré que l' I_{ND} CD66b-FoxP3 est prédictif de la survie et de la réponse à la radiothérapie et chimiothérapie, ainsi que dans une moindre mesure l' I_{ND} CD8-CD66b, mais pas l' I_{ND} CD8-FoxP3.

Nous avons montré que l' I_{ND} est lié à un environnement immunitaire tumoral immunomodulateur et une signature anti-TEM. Cependant, les lymphocytes T CD8+ des tumeurs avec un I_{ND} élevé ont montrés une activation plus importante. Ce dernier résultat a été retrouvé en étudiant l'expression des protéines de l'onco-immunité à l'échelle paucicellulaire, au niveau de ces interactions. L'utilisation d'une base de données en ligne de transcriptomique à l'échelle cellulaire a montré que les interactions CD8-CD66b, CD66b-FoxP3 et CD8-FoxP3 entraînent l'inhibition des mécanismes cellulaires impliqués dans la présentation antigénique, l'activation cellulaire et la production de cytokine.

L' I_{ND} n'a pas montré de lien ni avec les caractéristiques cliniques du patient, ni avec ceux de la tumeur à l'exception d'une diminution du PD-L1 TPS dans les tumeurs I_{ND} Low, pouvant suggérer une meilleure réponse à l'immunothérapie. L'étude d'une cohorte de patient traités par immunothérapie anti-PD-1 n'a pas montré d'influence sur la survie et la réponse au traitement.

Ces résultats soulignent la complexité de l'immunité anti-tumorale, qui dépend de la présence de certains types de cellules immunitaires, mais également de leurs interactions, qui modulent leurs phénotypes et leurs activités anti-tumorales ; et soulignent l'intérêt de l'IND CD66b-FoxP3 dans la prédiction de la réponse aux traitements anti-cancéreux.

TITLE PAGE

THE CONTACTOME INVOLVING CD8+ T CELLS, FOXP3+ T CELLS AND NEUTROPHILS INFLUENCE THE SURVIVAL AND THE RESPONSE TO THERAPY IN LUNG CANCER.

Running title

IMMUNE CELLS CONTACT PREDICT OUTCOME AND THERAPY RESPONSE IN LUNG CANCER

Y. Velut^{1,2,3} A. Mansuet-Lupo^{1,2,3,4} J. Biton⁵, K. Leroy^{1,2,3,6} B. Burroni^{1,2,3,4}, G. Boule^{1,2,3}, P. Giraud^{2,7}, F Goldwasser^{2,8,9} J. Arrondeau^{8,9} P. Boudou-Rouquette^{8,9} L. Gibault¹⁰, H. Blons^{2,6,11}, L. Fournel^{2,12,13}, A. Boni^{1,2,3}, I. Cremer^{1,2,3}, M. Wislez^{1,2,3,14}, S.A. Hammond¹⁵, M. Alifano^{1,2,3,13} and D. Damotte^{1,2,3,4}

AFFILIATIONS

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMRS 1138, Cordeliers Research Center, Team Cancer, inflammation and complement, Paris, France

²University of Paris, Paris, France

³Sorbonne Universités, Paris, France

⁴Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (APHP), Hôpital Cochin, Department of Pathology, Paris, France

⁵Physiopathologie, cibles et thérapies de la polyarthrite rhumatoïde ; Laboratoire Immunologie et Immunopathologie-Li2P, INSERM UMR1125, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France

⁶Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (APHP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of molecular oncology, Paris, France

⁷Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (APHP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Radiotherapy, Paris, France

⁸CERTIM, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (APHP), Hôpital Cochin, APHP, Paris, France

⁹Department of Medical Oncology, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France

¹⁰Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (APHP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Pathology, Paris, France

¹¹INSERM UMRS 1147, Personalized Medicine, Pharmacogenomic, Therapeutic Optimization, Paris, France

¹²INSERM U1124, Environmental Toxicity, Therapeutic Targets, cellular signaling and biomarkers (T3S), Paris, France

¹³APHP, Hôpital Cochin, Department of Thoracic Surgery, Paris, France

¹⁴APHP, Hôpital Cochin Department of Respiratory medicine, Paris, France

¹⁵Research and Early Discovery, Oncology Research and Development, AstraZeneca, Gaithersburg, Maryland, USA

Corresponding author: Pr Diane Damotte, Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Inserm, Université de Paris, Team Inflammation, complement and cancer, 15 Rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France. E-mail: diane.damotte@aphp.fr

Phone: +33-1-48-51-40-83. Fax: +33-1-44-27-81-17

Keywords: NSCLC, CD8+ T cells, FoxP3+ cells, neutrophils, immunotherapy, proximity, interaction, prognosis

Abstract

Background: Tumor immune environment (TME) influence the outcome of patients suffering from solid cancer and predict response to immune-checkpoint inhibitors (ICI). High densities of CD8⁺ cells and neutrophils were respectively associated with longer and shorter survival; meanwhile FoxP3 cells were not clearly linked to outcome. Nevertheless, beyond the density of each cell type, the balance and the interaction between these cells may contribute to the TME complexity and functions explaining some unexpected patient's outcome. We observed that CD8⁺ lymphocytes, FoxP3⁺ lymphocytes and neutrophils could be physically in contact and we aimed at determining their role on TME characteristics and their impact on survival and response to therapy in human non-small cell lung carcinoma (NSCLC).

Methods: We quantified CD8⁺ cells, FoxP3⁺ cells and CD66b⁺ neutrophils respective densities and the CD8-CD66b, CD8-FoxP3 and CD66b-FoxP3 doublets using multiplex immunostaining in operated NSCLC stage IIIA-N2 (n=72) receiving chemotherapy and radiotherapy, in stage I to III (n=54) treated by surgery and in patients treated by ICI (n=54). Immune cells were considered in contact when the distance between nuclei was under 10 μ m and we used a normalized density index of doublet cells "I_{ND}" to avoid any bias linked to individual cell densities. Clinical data and survival were collected for each cohort and compared to the doublets densities and I_{ND}. To characterise biological pathway involved in these doublets we compare the I_{ND} CD8-CD66b, CD8-FoxP3 and CD66b-FoxP3 to flow cytometry data, Nanostring gene expression and Digital Spatial Profiling (DSP) analysis in the N=52 stage I-III cohort. Nanostring and DSP experiments results were compared to the Nanostring CosMx database.

Results: High density of CD8⁺ cells and neutrophils are associated with longer and shorter survival respectively, meanwhile FoxP3⁺ cells density had no influence. Patients with high I_{ND} of CD8⁺, FoxP3⁺ and neutrophils had the best overall survival, a lower frequency of PD1⁺/TIM3⁺ T cells, a lower expression of IFN- γ related genes and a decreased Epithelial to Mesenchymal Transition signature, altogether suggesting a favourable TME prone to control tumor expansion. Patients with high I_{ND} appear to be sensitive to chemotherapy-radiotherapy but it did not predict ICI efficacy.

Conclusion: High cellular contact between CD8⁺ T cells, FoxP3⁺ cells and CD66b neutrophils in the TME significantly impact patient's outcome and may predict response to therapy in lung cancer. It suggests that beyond cells densities, the proportion and the spatial distribution of immune subpopulations significantly influence tumour escape mechanisms.

Background

The non-small cell lung carcinoma (NSCLC) remains the main cause of death from cancer despite the combination of therapies namely surgery, radiotherapy, chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy. Patient's management is based on clinical and tumour characteristics but a deeper understanding of tumor biology is still required to achieve the healing goal of curative therapy [1], [2]. The immune infiltration of NSCLC is a strong predictor of survival and response to immune-checkpoint inhibitors (ICI). [3]–[5] CD8+ T cells intra-tumoral infiltration, Th1 and IFN- γ gene signature were associated with the best outcome, neutrophils with the worst one, although FoxP3+ T cell were reported to have no impact on survival. [3], [6]–[8] If high CD8+ T cells infiltration in tumors is one of the best prognosticators, it is also often associated with tumor escape mechanisms through the PD1-PD-L1 pathway [9]–[12]. In line with that, a high frequency of PD-L1-expressing tumor cells (TPS) was reported as indicative of immune checkpoint inhibitors (ICI) sensitivity and were introduced in the routine clinical care for ICI administration [13]. The best response were obtained when TPS was above 50% [14], [15], but when looking at the whole population of lung cancer, ICI efficacy did not reach the expected results, as overall survival (OS) dropped around 15% [11], [16]. The complexity of the tumor microenvironment (TME) composition [5], including a wide range of immune cells, soluble factors and extracellular matrix may collectively influence the patient's OS and responsiveness to therapy [17]. It was previously shown that TME is a dynamic milieu [18], [19] whose composition is profoundly influenced by clinical and pathological factors like cancer gene mutation, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) or immune checkpoint expression [20], [21]. Quantification of immune cells densities were previously reported as influencing patient's prognosis [22]–[25], but recently it was published that immune cells may show cellular contact in the TME and that it may impact the immune cells pleiotropic functions [26]–[28]. Particularly, this may explain the discrepancies between cell density assessment and survival, as each cell subtype may interfere with the surrounding immune cells, modifying their function. [29]–[31] In line with this hypothesis, we developed a new approach for the TME analysis by evaluating immune cells proximity in NSCLC using multiplex fluorescence immunohistochemistry (IHC) focusing on the CD66b+ neutrophil, CD8+ T lymphocyte and FoxP3+ T cells densities and mutual contact, and we evaluated its influence upon survival and response to therapy.

MATERIAL & METHODS

Patients and samples

We analyzed three retrospective cohorts of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) whole NSCLC tumor specimens. The first one (#Cohort 1) is a retrospective and monocentric cohort (n=52) of stage I-IIIa resected NSCLC in Cochin hospital between 2014 and 2015 [21]. The second cohort (#Cohort 2) is a retrospective and multicentric cohort (N=72) of resected stage IIIA-N2-NSCLC patients receiving chemotherapy and radiotherapy within the same centre between 2002 and 2015 [16]. The third cohort (#Cohort 3) is a monocentric cohort of metastatic NSCLC (n=54) treated with immune checkpoint inhibitors either pembrolizumab in first line (n=14) or nivolumab in second or third line (n=40) within the CERTIM (Centre d'Etude et de Recherche des Thérapies ImmunoModulatrices) network. Each cohort adds additional

informations for immune cells contact influence on survival (#Cohorts 1 and 2), on combined chemotherapy/radiotherapy efficacy (#Cohort 2) and on ICI efficacy (#Cohort 3). Flow cytometry analysis of intra-tumor immune cells was performed for tumors from the #Cohort 1 supplemented by gene expression analysis on FFPE samples with the Nanostring nCounter® PanCancer Immune Profiling and PanCancer Progression Panel. In addition, Digital spatial Profiling (DSP, Nanostring) was performed on N=24 tumors from #Cohort 1. The protocol was approved by the local ethic committee (CPP Ile de France II, n°2008-133; n°2012 06-12 and MS1) in agreement with article L.1121-1 of French law. All analysis performed across samples are indicated in Supplementary Figure 1.

Immunohistochemistry

5-µm thick FFPE-tumor sample were selected and evaluated by pathologist (ALM, BB and DD) on Hematoxylin-Eosin-Safran-stained section. Sections with the highest immune cell infiltration were used for IHC. Simple 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) IHC staining of PD-L1 (QR1, 1:100, Diagnostics/BIOCYC) was performed on Autostainer Link 48 (Agilent). Proportion of PD-L1 positive tumoral cells (TPS) was evaluated by pathologist (ALM, BB and DD) with three cutoffs as follow: <1%, 1%≤PD-L1<50% or ≥50%. Fluorescent multiplex IHC staining were performed on Leica Bond RX (Leica Biosystem®) using the Opal™ 4- Color Automation IHC Kit and the Opal Polaris 780 Reagent Pack (AKOYA Biosciences) with CD66b (G10F5, BD), FoxP3 (236A/E7, Abcam), pan-cytokeratin (AE1/AE3, DAKO) and CD8 (SP16, Abcam). After counterstaining with DAPI, slides were mounted with ProLong™ Glass Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific), and digitized using Axio Scan.Z1 (Zeiss) multispectral imaging system. Representative images of multiplex IHC staining is shown in Figure 1A.

Cell counting and Spatial Analysis

Whole images were analyzed using Halo software (indica labs) under pathologist supervision (D.D). Automatic quantification of CD66b+ (neutrophils), CD8+ and FoxP3+ cells was performed, with pan-CK to discriminate stromal and intra-cytokeratin compartment. Following cell counting, spatial arrangement of each cell in all samples was extracted and the close proximity of immune cell was quantified using Proximity Analysis tool. We defined a doublet of cell (called “doublet” thereafter) when the distance of two distinct cell type nucleus centroid is less or equal to 10µm, in accordance with the literature [32]. To account for individual cell density variation between samples, we adapted a formula from Burel et al [33]. Briefly, they studied doublet of lymphocyte and monocyte in the blood and estimate the relative proportion of those cluster normalized by the respective proportion of each cell type composing the cluster. We adapted the formula for IHC purpose as follow:

$$I_{ND\ C1-C2} = \frac{Density\ doublet_{C1-C2}}{Density_{C1} * Density_{C2}}$$

Where I_{ND} is the normalized density index of doublet cells between the two considered cell type (C1 and C2).

Flow cytometry

Multiparameter flow cytometry staining were performed on isolated mononuclear cells extracted from N=44 fresh NSCLC sample of patient from #Cohort 1 and analysed on a BD LSRFortessa® Cell Analyzer, as previously described [21].

Gene expression in bulk sample

Gene expression analysis was performed on total RNA extracted from N=51 FFPE tumor samples of #Cohort 1 using Nanostring nCounter® PanCancer Immune Profiling and PanCancer Progression Panel as previously described [20].

Digital Spatial Profiling of cell interaction

DSP was performed on N= 24 FFPE samples of #Cohort 1. Briefly, slides were deparaffined and antigen retrieval procedure were performed according to manufacturer instructions. Samples were incubated overnight at 4°C with a mix of 49 photocleavable oligonucleotide-labeled primary antibodies, including six controls (three negative and three positive) and 3 fluorescent-labeled primary antibodies to identify interacting and non-interacting cells area : CD8-AF555 (EPR21769, Abcam), FoxP3-AF594 (SP97, Abcam) and Neutrophil Elastase-AF647 (ELANE) (950334, Biotechne). After counterstaining with SYTO13 (Nanostring Technologies), slides were loaded and scanned in the DSP device (Nanostring Technologies). Region of interest (ROI) were defined as circular region of 70µm diameter (3 848µm²) containing at least 20 cells in the stromal compartment. Necrotic and fibrotic area were specifically excluded. Eight ROIs were selected per sample: two ROIs individually enriched for each cell type (CD8, FoxP3, ELANE) and two ROIs enriched in these three immune cells contacts. Oligonucleotides from the selected ROI were release after UV light exposure, collected, dispensed in a 96-wells plate, hybridized with specific fluorescent barcodes and digitally counted with nCounter® FLEX Analysis System (Nanostring Technologies).

CosMx database

Briefly, CosMx allows multiplex RNA quantification and mapping at single-cell subcellular resolution. Tissue RNA are detected, after slide deparaffination and RNA exposure, by in-situ hybridization probe and subsequent addition of a set of four reporters, coupled with four different fluorochromes. A fluorescence microscope acquires high resolution Z-stacked image, then reporters are cleaved by UV light exposure and washed away. Multiple cycle of staining, microscope acquisition and destaining can be achieved to increase the desire number of target. CosMx data of eight NSCLC tissue sections from previous report [34] and available online (CosMx™ SMI FFPE Dataset) were collected. 980 RNA, including 20 negative controls to evaluate background noise, were studied at subcellular cell level. Cell types were determined using k-nearest neighbours (dimension 1 to 10 and 10 for the max size of the kd-tree leafs) and Leiden clustering (resolution 0.05 and Reichardt and Bornholdt's Potts model). We specifically selected CD8 T cells, Treg cells and neutrophils for subsequent analysis. Euclidean distance was computed between each cell centroids with a threshold of 10µm, and RNA expression was differentially analysed for one considered cell type if it interact with another considered cell

type or not. Normalized counts were obtained by dividing individual raw count for each gene by the total count of the considered cell.

Statistical analysis

Differences in clinical, pathological, immune cell or flow cytometry variables were evaluated using χ^2 and Wilcoxon-Mann-Whitney test. When studying the effect of immune cells on survival, median or third quartile was used as threshold value between “Low” (below median or third quartile value) and “High” (above median or third quartile value) group. Wilcoxon-Mann-Whitney test or Student’s t-test whether variable follow normal distribution were used for comparison of cell densities or proportion between two groups. OS was calculated from the date of surgical resection (or first cycle of the immunotherapy treatment for #Cohort 3), to the date of death or last follow-up. Kaplan-Meier estimate was used for survival analysis with log-rank test for comparison. Cox proportional hazards regression model was used for univariate and multivariate analysis. Variables associated with survival showing p-value under 0.1 were further selected for multivariate analysis. All statistical analysis was conducted using R 3.3.2 ([https:// www.R-project.org/](https://www.R-project.org/)) with “survminer”, “ggplot” and “corrplot” packages. Gene Expression Panel data were analyzed by ROSALIND® (<https://rosalind.onramp.bio/>), with a HyperScale architecture developed by ROSALIND, Inc. (San Diego, CA). Digital spatial Profiling data were analyzed with GeoMx Digital Spatial Profiler v2.0 Instrument Software. Raw counts were normalized with housekeeping controls protein expression. Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to compare protein expression between two kinds of ROIs, with Benjamini–Hochberg false discovery adjustment method to account for multiple testing. GraphPad Prism 8.0.2 was used for data representation of multivariate Cox-regression analysis and Biorender for scheme.

Results

CD8+, FoxP3+ cells and CD66b neutrophils, interact in the tumor microenvironment and influence the NSCLC survival

Clinical and pathological characteristics of the 3 cohorts are summarized in Table 1. For the #Cohort 1 (stage I-III NSCLC), the median follow-up was 39.9 months (range 0.23-83.36) with a 5-year OS survival rate of 44.3%. The density of CD8+ T cells was not found significantly associated with survival in the #Cohort 1 ($p=0.88$) which is enriched with COPD patients (39%) [21], meanwhile high density of neutrophils negatively influences survival ($p=0.056$). FoxP3+ cells density and outcome were not statistically associated ($p=0.49$) (Figure 1B).

Multiplex immunostaining allowed us to observe close contact between CD8, FoxP3 and neutrophils and we quantified these doublets of CD8-FoxP3, CD8-CD66b, and CD66b-FoxP3 cells using a proximity analysis approach, described in Figure 1C. We found that immune cells close contact were mainly present in the stromal compartment, and they were heterogeneously distributed within and among tumors, as shown in Figure 1A. Furthermore, the density of each doublet differs according to the immune cell involved in this interaction (Figure 1D). Indeed, CD8-FoxP3 doublets were the most frequent, meanwhile CD8-CD66b and CD66b-FoxP3 doublets were less frequent (median: 18,3 ; 4,94 and 1,29 per mm² respectively). To analyse the role of such doublets, and considering the correlation between the density of each cell subtype composing the doublet and the density of the doublet itself (Supplementary Figure 2), we normalized the quantification of the immune cell doublets using a normalized density index (I_{ND}), adapting the formula from Burel et al [33] (Figure 1C). The heterogeneity of doublets I_{ND} was not correlated with subgroups of NSCLC, as we found no differences of patients' clinical features according to I_{ND} (Supplementary Table 1), except few differences for sex and tumor histology with I_{ND} CD8-CD66b. We found that high density of I_{ND} of each doublets was often associated with same higher density, or I_{ND} , of the others doublets (Supplementary Figure 3). Interestingly, a significant positive association was observed for CD66b-FoxP3 and survival ($p=0.03$) and we found the same tendency even not significant for CD8-CD66b I_{ND} ($p=0.073$) and CD8-FoxP3 I_{ND} ($p=0.099$) (Figure 1E).

At univariate analysis, CD66b-FoxP3 I_{ND} ($p=0.0343$) and COPD ($p=0.0138$) were factors affecting clinical outcome, and this value was also found at multivariate analysis (respectively HR=0.3316 [0.1518-0.7244], $p=0.00563$ and HR=0.2603 [0.1071-0.6330], $p=0.00299$) (Supplementary Table 2).

CD8+, FoxP3+ cells and CD66b neutrophils cell interaction are associated with immune cell activation and an immunoregulatory environment in the tumor

As doublets I_{ND} significantly influence patient outcome, we hypothesized that such cell contact induce biological modification of the cells involved in this interaction or contactome. In a first set of analysis, we collected flow cytometry data of whole tumor samples from #Cohort 1 ($n=43$) [21] (detailed panels in Supplementary Table 3). Interestingly, patients with high CD8-CD66b I_{ND} , meaning above median value, showed decreased expression of ICOS, CTLA-4 and CD27 (respectively $p=0.016$, $p=0.042$ and $p=0.016$), and an increased expression of PD-1 on CD8+ T cells ($p=0.022$) (Figure 2A). Similar observation were found for high CD8-FoxP3 I_{ND} , except PD-1 did not reach significance ($p=0.325$). Patients with high CD66b-FoxP3 I_{ND} had a

decreased expression of TIM-3, ICOS and CTLA-4 (respectively $p=0.020$, $p=0.028$ and $p=0.057$) and an increased expression of PD-1 ($p=0.004$) on CD8+ T cells. Interestingly, these findings were restricted to CD8 T only cells as we found no association between I_{ND} and immune checkpoint or activation molecules for CD4+ T cells, Treg and NK cells from the same tumor. Moreover, I_{ND} was not associated with the global proportion of CD8+, CD4+, Treg, TEMRA, T effector, Effector Memory or NK cells (Supplementary Table 4).

In addition to flow cytometry, we had the opportunity to analyze the gene expression profile of #Cohort 1 samples ($n=51$) obtained with Nanostring nCounter® PanCancer Immune Profiling and PanCancer Progression Panel (Figure 2B). Using Gene Set Expression Analysis (Supplementary Figure 4 & 5), we observed a down-regulation of gene involved in T cell activation and differentiation in the high CD66b-FoxP3 I_{ND} group (CD8A, PTGS2, GZMB, IL6, IL2RA, CD6, TNFSF10, PRF1, MICB). Signature of T cell and cytokine production were also found down-regulated in high I_{ND} doublets of cells, notably interleukines and their receptors (IL2, IL2-RA, IL-6, IL-15...), proinflammatory components (PTGS2, CCL20, CXCR1...) and cytolytic proteins (GZMB, PRF1...), suggesting a negative regulation of immune cells. Interestingly, in the PanCancer Progression Panel, we observed an overexpression of genes from the epithelial side of the Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) (SLC44A4, TMPRSS2, TJP3, WNT5A, ERBB3, PRSS8, NDNF, PRR15L, SORD, MYO5C, MUC-1), suggesting absence or a decreased of EMT in this group. Signature of decreased immune cell activation and differentiation were again observed. Differentially expressed gene sets are also linked to angiogenesis mechanisms and wound healing. Altogether, these results indicates that doublets of cells are linked to less exhausted CD8+ T cells phenotype, a more immune-regulated microenvironment, and decrease of EMT resulting in tumor control and best outcome.

Flow cytometry and Nanostring nCounter® PanCancer Immune Profiling and PanCancer Progression Panel were conducted in bulk samples of NSCLC, therefore as we focused on interacting cells, we next analysed molecular modification at the cellular level using spatial approach. For such purpose we performed Digital Spatial Profiling (DSP) analysis looking at the variation of 49 proteins of immuno-oncology in samples of the #Cohort 1 ($N=24$) (Figure 3A). For this experiment, we compare proteins levels between each area of interest (ROIs) with free immune cell and ROIs with interacting cells (Figure 3B). Among the protein panel, 6 proteins (CD163, LAG-3, FOXP3, GITR, PD-L2, CD80) were excluded because they raw counts were below the detection limit. In the DSP experiments, we first studied the proteins variation between tumors with high I_{ND} compare to low I_{ND} . We found only differences for I_{ND} “High” and “Low” tumors with an overexpression of CD34 in the area enriched with free CD8 ($padj=0.028$), meanwhile not differences were found when comparing the others ROIs (data not shown). Secondly, we compare proteins expression in each free cells area compare to interacting cells area and found several differences. When comparing free neutrophils to interacting area, we found that neutrophil markers (CD66b, ARG1) were overexpressed in free neutrophils ROIs while immune checkpoint and immune cell activation marker were overexpressed in interacting cells ROIs. When comparing free FoxP3 cells to interacting area, we found that 4-1BB was overexpressed in free FoxP3 area. Interestingly, main protein expression modification was seen when comparing interacting cell area to free CD8 cells. Indeed, we found an increased expression of neutrophils markers, immune checkpoint (CTLA-4, B7-H3) as well as activation (STING, Ki-67) and costimulation proteins in the interacting cells ROIs compare to free CD8+ area.

Altogether, these results showed that CD8 T cells are biologically different when they interact with neutrophils or FoxP3 cells, particularly they seem less exhausted and more activated, suggesting more efficient functions for tumor control.

CD8+, FoxP3+ cells and CD66b neutrophils cell interaction is accompanied by a modification of gene expression at the unicellular scale

DSP experiments shows modification of protein expression at the cellular scale when CD8, FoxP3 and neutrophils are in contact. To verify and validate this observation and understand the cellular mechanisms affected by this immune cell interaction, we used a freely available, published database of single-cell spatial transcriptomic of NSCLC TME. We compared the expression of 960 RNA at single-cell scale between interacting and non-interacting cells. GSEA was used to analyse which cell pathways and mechanisms were differentially expressed (Figure 4 & Supplementary Figure 6 & 7 & Supplementary Table 5).

When FoxP3 and CD8 T cell interact, we did not find any differences of RNA expression in the FoxP3 cells suggesting that CD8 T cells does not affect FoxP3 transcriptome. Conversely, in such FoxP3 and CD8 interaction we found a modification of CD8 cells RNA with modulation of genes involved in the extra-cellular matrix (ECM), a reduce expression of genes of the cytokine response and cell adhesion pathways. When looking at the FoxP3 and neutrophil interaction setting, we found that neutrophil present a global decrease of cell activation and cytokine production; and that FoxP3 T cells show a decrease RNA expression of genes from IFN-gamma response, cell activation and cytokine production. Therefore, both immunosuppressive cells seems less functional. The third interacting situation involving neutrophils and CD8 shows that interacting neutrophils have a decreased gene expression for cell activation and cytokine production; and that CD8 cells have a decrease expression of genes from T cell activation, immune regulation and cytokine production.

Altogether, this database analysis confirms our results and shows that interacting CD8, FoxP3 and neutrophils have a mutual functional and phenotypic influence.

CD8+, FoxP3+ cells and CD66b neutrophils cell interaction impact CD8 exhaustion and response to immune checkpoint inhibitors

The #Cohort 1 analysis at the whole tumor and cellular scales has allowed us to show that in tumors with high frequency of interacting immune cells, the immune checkpoint proteins were less expressed, suggesting the absence of tumor escape mechanism through PD1/PD-L1 pathway. In accordance with that, we found a lower frequency of PD-L1 expressing tumoral cells when I_{ND} were high, particularly for I_{ND} CD8-FoxP3 ($p=0.0009$) (Figure 5A). Thus, we hypothesized that ICI would not give any survival advantage to patients harbouring a high I_{ND} , compare to those with low I_{ND} . To verify this assumption, we analyzed a cohort of patients receiving ICI (#Cohort 2), either pembroluzimab in first line (N=14) or nivolumab in second and third line (N=40) (Table 1).

The median follow-up of #Cohort 2 was 11.8 months (range 0.36-66.52) with a 5-year OS survival rate of 17.9%. Among parameters influencing patient's survival, the density of CD8+

T cells has a strong favourable impact ($p=0.00041$) (Figure 5B), but CD66b⁺ and FoxP3⁺ cells do not show any prognosis value ($p=0.97$ and $p=0.26$). Contrasting with patients from #Cohort 1, we did find a tendency to worse survival when I_{ND} was high for CD66b-FoxP3 doublets ($p=0.23$) (Figure 5C). Therefore, patients with low I_{ND} had at least similar or slightly improved survival compare to those with high I_{ND}, contrasting with results from #Cohort 1 where clearly high I_{ND} was a strong predictor of good outcome. At univariate and multivariate analysis, age at immunotherapy ($p=0.00124$), sex ($p=0.0608$), and CD8⁺ cells density ($p=0.000727$) were the best predicator of survival (Supplementary Table 6).

We had the opportunity to analyse the Nanostring IO360 panel for some tumors from #Cohort 2 (N=17) and we found that genes was differently expressed when I_{ND} was high with a higher expression of genes involved in cell activation and differentiation, IFN gamma production, response to cytokine and immune response. We also found underexpression of genes for cell differentiation, EMT, cell communication and MAPK pathway activity (EGFR, KRAS, HRAS, FGFR) (Supplementary Figure 8 & 9).

CD8⁺, FoxP3⁺ cells and CD66b neutrophils cell interaction impact response to conventional radiotherapy combined to chemotherapy

We showed that high index of interacting immune cells does not confer survival advantage for immune checkpoints inhibitors, it will even predict an absence of efficacy. We looked at the same index in patients treated with conventional radiotherapy combined to chemotherapy. Thus, we analysed a third cohort of patients stage IIIA-N2 (#Cohort 3, n=72). Clinical and pathological characteristics of #Cohort 3 are summarized in Table 1. The median follow-up was 31.72 months (range 0.82-149.64) with a 5-year OS survival rate of 37.2% (stage III-N2-NSCLC). Analysis of the median density of CD8 and FoxP3 cells did not showed any influence on the prognosis (respectively $p=0.31$ and $p=0.56$) even if there is a clear trend to an increased survival in CD8^{high} group, becoming significant when considering the strongest CD8⁺ T cell infiltration (above third quartile as previously shown by Boulle et al. [16]). The high density of neutrophils in the TME negatively influence patient survival ($p=0.073$) (Figure 6A).

For the patients from this cohort, the interacting immune cells influence the outcome as we found a significant positive association between CD66b-FoxP3 I_{ND} and CD8-CD66b I_{ND} to the survival ($p=0.0026$ and $p=0.032$ respectively), meanwhile CD8-FoxP3 I_{ND} does not predict outcome ($p=0.65$) (Figure 6B). At univariate analysis CD66b-FoxP3 I_{ND} ($p=0.00345$), CD8-CD66b I_{ND} ($p=0.0352$), neo-adjuvant chemotherapy ($p=0.0309$) and “Others” tumor histology ($p=0.0267$) were factors affecting clinical outcome. At multivariate analysis, CD66b-FoxP3 I_{ND} alone (HR=0.4468 [0.2373-0.8415], $p=0.0126$) and CD8-CD66b I_{ND} with “Others” histology retained a significant prognostic value (respectively HR=0.5282 [0.2877-0.9697], $p=0.0395$; HR=2.7249 [1.1495-6.4594] $p=0.0228$) (Supplementary Table 7).

Discussion

The tumor microenvironment is a complex milieu with a heterogeneity of cellular composition and cells spatial localization within the stroma. This immune heterogeneity was reported to predict survival and response to different systemic therapies particularly to immunotherapy [4], [5]. Beyond the heterogeneity of each immune cells density, we observed that these cells were sometimes in close contact when considering multiplex staining of lung carcinoma. We performed a spatial analysis of CD66b⁺ neutrophils, FoxP3⁺ cells and CD8⁺ T cells in the NSCLC TME because these cells are respectively considered as protective or pro-tumorogenic cells, meanwhile FoxP3 cells had discrepancies role in the literature. We quantified individual cells densities and cellular contact using an adapted formula from Burel et al [33] to account for individual cell density variation between samples. We developed an easy-to-use setup and analysis pipeline of immune cell interaction based on the spatial proximity of immune cell on FFPE whole tumor sample and their relation with patient survival and treatment efficacy. I_{ND} reflects the association between the two considered cell type and represents the rate of considered cell proximity in a defined area, small enough to suggest an interaction, normalized by their respective densities.

In accordance with previous publication, we confirm that each immune cell subtypes impact diversely the tumor progression [3], [6]–[8]. Unexpectedly, we found that CD66b⁺ and FoxP3⁺ cells in contact impact positively the patient outcome while they are both associated with poor prognosis or neutral when considered as free cells. Similarly, we found that CD66b⁺ and CD8⁺ cellular close contact has the same positive influence on the patient's survival. Interestingly, frequency of FoxP3⁺ and CD8⁺ cellular close contact had no link to outcome, meaning that when we consider doublet of immune cells, the cells involved in the interaction are important. In our three cohorts, we found that CD66b-FoxP3 I_{ND} was the strongest predictor of survival and we hypothesize that CD66b⁺ cells is pivotal. Indeed, CD66b interacting cells was already reported [29]. Lewkowicz et al. showed in two separate reports a direct cell-cell interaction between LPS-activated regulatory T cells and polymorphonuclear cells (PMN) dependant of ICAM-1 and CD11b, inducing IL-10 and TGF- β production by non-activated PMN resulting in PMN apoptosis [35], [36]. Others showed that this interaction causes PMN to inhibit T cell mainly through release of NO. The contact between ICAM-1 and Mac-1 (CD11b/CD18) is required as similar experiment in Transwell setup do not show any inhibition [37], [38], and requires high concentration of ROS to suppress T cell activation in distance [39]. Thus, CD66b⁺/FoxP3⁺ direct interaction may induce inhibition of these cells, leading to a modification of the TME and prone to anti-tumoral phenotype. In our cohort of patients studied with ex vivo immune cells flow cytometry experiments and Nanostring gene expression on whole tumor tissue, we observed decreased expression of immune checkpoint (CTLA-4, TIM-3, LAG-3) on CD8⁺ T cell in flow cytometry and an anti-EMT signature in gene expression that support this assumption. It is unclear in which extend one cell impacts the other. Neutrophils are considered as promoting tumor growth [5], tumoral cells resistance to radiotherapy and chemotherapy in vitro [40]–[42] and we postulate that interacting CD66b⁺ neutrophils inhibit immunoregulatory functions of FoxP3⁺ Treg through direct interaction of ICAM-1 and Mac-1, which is not possible with free neutrophils as regulatory T cell are shown to be resistant to oxidative stress [43]. The interaction between neutrophils and Treg may induces release of NO and/or ROS that would affect neutrophils functions, without resulting in Treg cell death. The third actor, the CD8⁺ T cell could then be redirected against tumoral cells without being affected by the regulatory action of regulatory T cell or neutrophils. This

mechanism could also have explained the decreased T cell activation in CD66b-FoxP3^{IND} High group. Indeed, Mitchell et al. showed in NSCLC that high intra-tumoral neutrophil burden inhibits T-cell response and showed diminished expression of IFN- γ related genes [44]. It therefore may suggest that high CD66b-FoxP3^{IND} should reflect a less exhausted immune response against tumor, and therefore we hypothesized a decreased or an absence of sensitivity to ICI. In line with that, we analysed ICI efficacy for patients according to CD66b-FoxP3^{IND} and found that patients with low CD66b-FoxP3^{IND} receiving anti-PD-1 therapy displayed longer OS compare to patients with high CD66b-FoxP3^{IND}. Indeed, low CD66b-FoxP3^{IND} is associated with a higher expression of immune checkpoint, including a PD1/PD-L1 regulatory pathway (Figure 6C).

The main limitation of our study is the precise phenotype of interacting cells. Indeed, as showed by Minns et al., depending on the activation state of each cells, sometimes opposite effect can be observed [45]. It appeared to us that, in the immune cell-cell proximity, the composition of each specific subset of FoxP3⁺, CD66b⁺ or CD8⁺ T cells may vary. We plan to investigate the phenotype of these cells by targeting others lineage or activation protein. Notably, we hypothesized that CD66b⁺ interacting cells could be myeloid-derived suppressor cells (MDSC) PMN and express differential level of LOX-1 (Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1), a known marker of MDSC [46], [47]. An interesting way forward would be to confirm these results in culture. Nevertheless, the difficulties to handle immune cell in vitro without altering their phenotypes, especially neutrophils, and cocultures condition setup with more than two cell types are highly challenging.

Another limitation of our study is the absence of demonstration of the precise mechanisms related to the CD66b-FoxP3^{IND}. New therapeutic option such as bi- and tri-specific therapeutic antibodies, designed to binds to multiple targets in different cells needs to be implemented by these contactome analysis. Indeed, multi-specific Ab are mainly used to drive one or more subset of immune cell in close proximity to tumoral cell to enhance their anti-tumoral actions, but could be extent to bring together several subset of immune cell and activate specifically-needed molecular pathways [48].

To conclude, by combining multiplex IHC and spatial cell analysis, we showed that CD66b⁺ neutrophils, FoxP3⁺ regulatory T cells and CD8⁺ T cells immune cell proximity or CD66b-FoxP3^{IND} predict survival, response to therapy and is associated with a non-exhausted TME. To our knowledge, this is the first paper to report a relationship between the spatial proximity of immune cell type and patient's outcome but it deserves additional studies to understand the underlying mechanism.

References

- [1] S. J. Antonia et al., « Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no 20, p. 1919-1929, nov. 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1709937.
- [2] M. Reck et al., « Five-Year Outcomes With Pembrolizumab Versus Chemotherapy for Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score $\geq 50\%$ », *J. Clin. Oncol.*, vol. 39, no 21, p. 2339-2349, juill. 2021, doi: 10.1200/JCO.21.00174.
- [3] J. Kargl et al., « Neutrophil content predicts lymphocyte depletion and anti-PD1 treatment failure in NSCLC », *JCI Insight*, vol. 4, no 24, p. e130850, déc. 2019, doi: 10.1172/jci.insight.130850.
- [4] A. J. Gentles et al., « The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers », *Nat. Med.*, vol. 21, no 8, p. 938-945, août 2015, doi: 10.1038/nm.3909.
- [5] W. H. Fridman, L. Zitvogel, C. Sautès–Fridman, et G. Kroemer, « The immune contexture in cancer prognosis and treatment », *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 14, no 12, p. 717-734, déc. 2017, doi: 10.1038/nrclinonc.2017.101.
- [6] M. Tamminga, T. J. N. Hiltermann, E. Schuuring, W. Timens, R. S. Fehrmann, et H. J. Groen, « Immune microenvironment composition in non-small cell lung cancer and its association with survival », *Clin. Transl. Immunol.*, vol. 9, no 6, janv. 2020, doi: 10.1002/cti2.1142.
- [7] A. B. Schulze et al., « Tumor infiltrating T cells influence prognosis in stage I–III non-small cell lung cancer », *J. Thorac. Dis.*, vol. 12, no 5, p. 1824-1842, mai 2020, doi: 10.21037/jtd-19-3414a.
- [8] M.-C. Dieu-Nosjean et al., « Long-Term Survival for Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer With Intratumoral Lymphoid Structures », *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no 27, p. 4410-4417, sept. 2008, doi: 10.1200/JCO.2007.15.0284.
- [9] T. Donnem et al., « Stromal CD8 + T-cell Density—A Promising Supplement to TNM Staging in Non–Small Cell Lung Cancer », *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, no 11, p. 2635-2643, juin 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1905.
- [10] J.-D. Fumet et al., « Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy », *Br. J. Cancer*, vol. 119, no 8, p. 950-960, oct. 2018, doi: 10.1038/s41416-018-0220-9.
- [11] S.-H. Kim et al., « Prognostic impact of CD8 and programmed death-ligand 1 expression in patients with resectable non-small cell lung cancer », *Br. J. Cancer*, vol. 120, no 5, p. 547-554, mars 2019, doi: 10.1038/s41416-019-0398-5.
- [12] D. P. Carbone, D. R. Gandara, S. J. Antonia, C. Zielinski, et L. Paz-Ares, « Non–Small-Cell Lung Cancer: Role of the Immune System and Potential for Immunotherapy », *J. Thorac. Oncol.*, vol. 10, no 7, p. 974-984, juill. 2015, doi: 10.1097/JTO.0000000000000551.
- [13] J.-D. Fumet et al., « Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy », *Br. J. Cancer*, vol. 119, no 8, p. 950-960, oct. 2018, doi: 10.1038/s41416-018-0220-9.
- [14] S. Gettinger et al., « Five-Year Follow-Up of Nivolumab in Previously Treated Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer: Results From the CA209-003 Study », *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, no 17, p. 1675-1684, juin 2018, doi: 10.1200/JCO.2017.77.0412.
- [15] E. B. Garon et al., « Five-Year Overall Survival for Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer Treated With Pembrolizumab: Results From the Phase I KEYNOTE-001 Study », *J. Clin. Oncol.*, vol. 37, no 28, p. 2518-2527, oct. 2019, doi: 10.1200/JCO.19.00934.

- [16] G. Boulle et al., « Chemoradiotherapy efficacy is predicted by intra-tumour CD8+/FoxP3+ double positive T cell density in locally advanced N2 non-small-cell lung carcinoma », *Eur. J. Cancer*, vol. 135, p. 221-229, août 2020, doi: 10.1016/j.ejca.2020.04.040.
- [17] N. K. Altorki et al., « The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 19, no 1, p. 9-31, janv. 2019, doi: 10.1038/s41568-018-0081-9.
- [18] A. Lin, T. Wei, H. Meng, P. Luo, et J. Zhang, « Role of the dynamic tumor microenvironment in controversies regarding immune checkpoint inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) with EGFR mutations », *Mol. Cancer*, vol. 18, no 1, p. 139, déc. 2019, doi: 10.1186/s12943-019-1062-7.
- [19] M. A. Giese, L. E. Hind, et A. Huttenlocher, « Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment », *Blood*, vol. 133, no 20, p. 2159-2167, mai 2019, doi: 10.1182/blood-2018-11-844548.
- [20] J. Biton et al., « TP53, STK11, and EGFR Mutations Predict Tumor Immune Profile and the Response to Anti-PD-1 in Lung Adenocarcinoma », *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, no 22, p. 5710-5723, nov. 2018, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0163.
- [21] J. Biton et al., « Impaired Tumor-Infiltrating T Cells in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Impact Lung Cancer Response to PD-1 Blockade », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 198, no 7, p. 928-940, oct. 2018, doi: 10.1164/rccm.201706-1110OC.
- [22] T. N. Gide et al., « Close proximity of immune and tumor cells underlies response to anti-PD-1 based therapies in metastatic melanoma patients », *OncoImmunology*, vol. 9, no 1, p. 1659093, janv. 2020, doi: 10.1080/2162402X.2019.1659093.
- [23] J. L. Carstens et al., « Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer », *Nat. Commun.*, vol. 8, no 1, p. 15095, avr. 2017, doi: 10.1038/ncomms15095.
- [24] A. M. Tsakiroglou et al., « Spatial proximity between T and PD-L1 expressing cells as a prognostic biomarker for oropharyngeal squamous cell carcinoma », *Br. J. Cancer*, vol. 122, no 4, p. 539-544, févr. 2020, doi: 10.1038/s41416-019-0634-z.
- [25] S. Barua et al., « Spatial interaction of tumor cells and regulatory T cells correlates with survival in non-small cell lung cancer », *Lung Cancer*, vol. 117, p. 73-79, mars 2018, doi: 10.1016/j.lungcan.2018.01.022.
- [26] A. Feichtenbeiner, M. Haas, M. Büttner, G. G. Grabenbauer, R. Fietkau, et L. V. Distel, « Critical role of spatial interaction between CD8+ and Foxp3+ cells in human gastric cancer: the distance matters », *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 63, no 2, p. 111-119, févr. 2014, doi: 10.1007/s00262-013-1491-x.
- [27] S. Lundgren et al., « Quantitative, qualitative and spatial analysis of lymphocyte infiltration in periampullary and pancreatic adenocarcinoma », *Int. J. Cancer*, vol. 146, no 12, p. 3461-3473, juin 2020, doi: 10.1002/ijc.32945.
- [28] J. Domagala-Kulawik, « The role of the immune system in non-small cell lung carcinoma and potential for therapeutic intervention », *Transl. Lung Cancer Res.*, vol. 4, no 2, p. 14, 2015.
- [29] E. B. Okeke et J. E. Uzonna, « The Pivotal Role of Regulatory T Cells in the Regulation of Innate Immune Cells », *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 680, avr. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.00680.

- [30] H. Garner et K. E. de Visser, « Immune crosstalk in cancer progression and metastatic spread: a complex conversation », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 20, no 8, p. 483-497, août 2020, doi: 10.1038/s41577-019-0271-z.
- [31] S. Costa, D. Bevilacqua, M. A. Cassatella, et P. Scapini, « Recent advances on the crosstalk between neutrophils and B or T lymphocytes », *Immunology*, vol. 156, no 1, p. 23-32, janv. 2019, doi: 10.1111/imm.13005.
- [32] V. M. Liarski et al., « Quantifying in situ adaptive immune cell cognate interactions in humans », *Nat. Immunol.*, vol. 20, no 4, p. 503-513, avr. 2019, doi: 10.1038/s41590-019-0315-3.
- [33] J. G. Burel et al., « Circulating T cell-monocyte complexes are markers of immune perturbations », *eLife*, vol. 8, p. e46045, juin 2019, doi: 10.7554/eLife.46045.
- [34] S. He et al., « High-plex Multiomic Analysis in FFPE at Subcellular Level by Spatial Molecular Imaging », *Genomics*, preprint, nov. 2021. doi: 10.1101/2021.11.03.467020.
- [35] N. Lewkowicz, M. Klink, M. P. Mycko, et P. Lewkowicz, « Neutrophil – CD4+CD25+ T regulatory cell interactions: A possible new mechanism of infectious tolerance », *Immunobiology*, vol. 218, no 4, p. 455-464, avr. 2013, doi: 10.1016/j.imbio.2012.05.029.
- [36] N. Lewkowicz et al., « Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10 », *Mucosal Immunol.*, vol. 9, no 2, p. 364-378, mars 2016, doi: 10.1038/mi.2015.66.
- [37] J. Pillay et al., « A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1 », *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no 1, p. 327-336, janv. 2012, doi: 10.1172/JCI57990.
- [38] J. Michaeli et al., « Tumor-associated neutrophils induce apoptosis of non-activated CD8 T-cells in a TNF α and NO-dependent mechanism, promoting a tumor-supportive environment », *OncoImmunology*, vol. 6, no 11, p. e1356965, nov. 2017, doi: 10.1080/2162402X.2017.1356965.
- [39] M. Klemke, G. H. Wabnitz, F. Funke, B. Funk, H. Kirchgessner, et Y. Samstag, « Oxidation of Cofilin Mediates T Cell Hyporesponsiveness under Oxidative Stress Conditions », *Immunity*, vol. 29, no 3, p. 404-413, sept. 2008, doi: 10.1016/j.immuni.2008.06.016.
- [40] I. R. Ramachandran et al., « Bone marrow PMN-MDSCs and neutrophils are functionally similar in protection of multiple myeloma from chemotherapy », *Cancer Lett.*, vol. 371, no 1, p. 117-124, févr. 2016, doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.040.
- [41] A. J. Wisdom et al., « Neutrophils promote tumor resistance to radiation therapy », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 116, no 37, p. 18584-18589, sept. 2019, doi: 10.1073/pnas.1901562116.
- [42] T. Hirz et al., « Neutrophils protect lymphoma cells against cytotoxic and targeted therapies through CD11b/ICAM-1 binding », *Oncotarget*, vol. 8, no 42, p. 72818-72834, sept. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.20350.
- [43] D. Mougiakakos, C. C. Johansson, et R. Kiessling, « Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death », *Blood*, vol. 113, no 15, p. 3542-3545, avr. 2009, doi: 10.1182/blood-2008-09-181040.
- [44] K. G. Mitchell et al., « Neutrophil expansion defines an immunoinhibitory peripheral and intratumoral inflammatory milieu in resected non-small cell lung cancer: a descriptive analysis of a prospectively immunoprofiled cohort », *J. Immunother. Cancer*, vol. 8, no 1, p. e000405, avr. 2020, doi: 10.1136/jitc-2019-000405.
- [45] D. Minns, K. J. Smith, G. Hardisty, A. G. Rossi, et E. Gwyer Findlay, « The Outcome of Neutrophil-T Cell Contact Differs Depending on Activation Status of Both Cell Types », *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 633486, mars 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.633486.

- [46] T. Condamine et al., « Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients », *Sci. Immunol.*, vol. 1, no 2, août 2016, doi: 10.1126/sciimmunol.aaf8943.
- [47] H. R. Kim et al., « The Ratio of Peripheral Regulatory T Cells to Lox-1 + Polymorphonuclear Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts the Early Response to Anti-PD-1 Therapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 199, no 2, p. 243-246, janv. 2019, doi: 10.1164/rccm.201808-1502LE.
- [48] K. Runcie, D. R. Budman, V. John, et N. Seetharamu, « Bi-specific and tri-specific antibodies- the next big thing in solid tumor therapeutics », *Mol. Med.*, vol. 24, no 1, p. 50, déc. 2018, doi: 10.1186/s10020-018-0051-4.

Declarations'

- Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the institutional review board (CPP Ile de France II, No. 2008-133, No. 201206- 12 and No. 2018 MS1).

- Consent for publication

All authors have checked and give their permission for publication

- Availability of data and material

Data and material are available upon reasonable request

- Competing interests

Dr. Mansuet-Lupo has served as compensated consultant or received honoraria from AstraZeneca, Pfizer, MSD, Roche

Pr. D.Damotte received honoraria from AstraZeneca, MSD, Roche and received research support from Medimmune.

The remaining authors declare no conflict of interest.

Funding

This work was funded by

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)

Sorbonne Université

Université de Paris

Site de Recherche Intégrée sur le Cancer SIRIC

CAnCER Research for PErsonnalized Medicine (CARPEM)

LabEx Immuno-oncology

Authors' contributions

Y.Velut : Data collection, Experimentation, Statistical Analysis, Writing

A.Mansuet-Lupo : Data collection, Reviewing

J.Biton : Data collection, Reviewing, Experimentation

K.Leroy: Data collection

B.Burroni : Reviewing

G.Boulle: Data collection

P.Giraud: Data collection

F.Goldwasser : Data collection

J.Arrondeau : Data collection

P.Boudou-Rouquette : Data collection

L. Gibault: Data collection

H. Blons: Data collection

L. Fournel: Data collection

A.Boni : Data collection, Experimentation

I.Cremer: Reviewing

M.Wislez: Data collection, Reviewing

S.A. Hammond: Reviewing

M.Alifano: Data collection, Reviewing

D.Damotte: Data collection, Directed the project, Reviewing, Writing

All authors approved the final manuscript

Acknowledgements

We thank the CRC core facilities for the technical and methodological help, assistance and support.

We thank Romaric Rocheleux for analysis help of CosMx data

List of Abbreviations

FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

NSCLC : Non-Small Cell Lung Carcinoma

TME : Tumor MicroEnvironment

AUC : Area Under the Curve

PD-L1: Programmed Death-Ligand 1

PD-1 : Programmed Death 1

IND : Index of normalized density

IFN- γ : Interferon- γ

EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition

IHC : ImmunoHistoChemistry

CI : Confidence Interval

CK: Cytokeratin

FoxP3: Forkhead box P3

CD: Cluster of Differentiation

LOX-1: Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1

PMN: Polymorphonuclear cell

MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cell

NO: Nitric oxide

ROS: Reactive Oxygen Species

OS: Overall Survival

CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte protein 4

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

LAG-3: Lymphocyte Activating 3

ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule 1

ICOS: Inducible T-cell costimulator

TEMRA: T cell effector memory expressing CD45RA

IL: Interleukin

Mac-1: Macrophage-1 antigen

COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Parameters	Cohort 1 (N=54)	Cohort 2 (N=54)	Cohort 3 (N=72)
Age			
Median [Min, Max]	68.5 [44.0, 85.0]	66.1 [30.6, 83.8]	62 [39, 82]
Sex			
F	18 (33.3%)	21 (38.9%)	31 (43.1%)
M	36 (66.7%)	33 (61.1%)	41 (56.9%)
Tobacco			
No	7 (13.0%)	3 (5.6%)	13 (18.1%)
Yes	44 (81.5%)	50 (92.6%)	59 (81.9%)
Missing	0 (0.0%)	1 (1.9%)	0 (0.0%)
Pack year			
<15	5 (9.6%)	7 (13.0%)	17 (23.6%)
>=15	47 (90.4%)	46 (85.2%)	55 (76.4%)
Missing	3 (5.6%)	1 (1.9%)	0 (0.0%)
COPD			
No	33 (61.1%)	NA	57 (79.2%)
Yes	21 (38.9%)	NA	15 (20.8%)
Tumor stage			
I-II	37 (68.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
III-IV	17 (29.6%)	54 (100%)	72 (100%)
Histology			
ADK	28 (51.9%)	37 (68.5%)	50 (69.4%)
Squamous	23 (42.6%)	11 (20.4%)	14 (19.4%)
Others	3 (5.6%)	6 (11.2%)	8 (11.1%)
PD-L1 TPS			
<1	12 (22.2%)	17 (31.5%)	4 (5.6%)
1<x<50	28 (51.9%)	14 (25.9%)	39 (54.2%)
>=50	14 (25.9%)	20 (37.0%)	29 (40.3%)
Missing	0 (0.0%)	3 (5.6%)	0 (0.0%)
Neoadjuvant Chemotherapy			
No	NA	NA	57 (79.2%)
Yes	NA	NA	15 (20.8%)
Anti-PD1			
Pembrolizumab	NA	14 (25.9%)	NA
Nivolumab	NA	40 (74.1%)	NA

Table 1

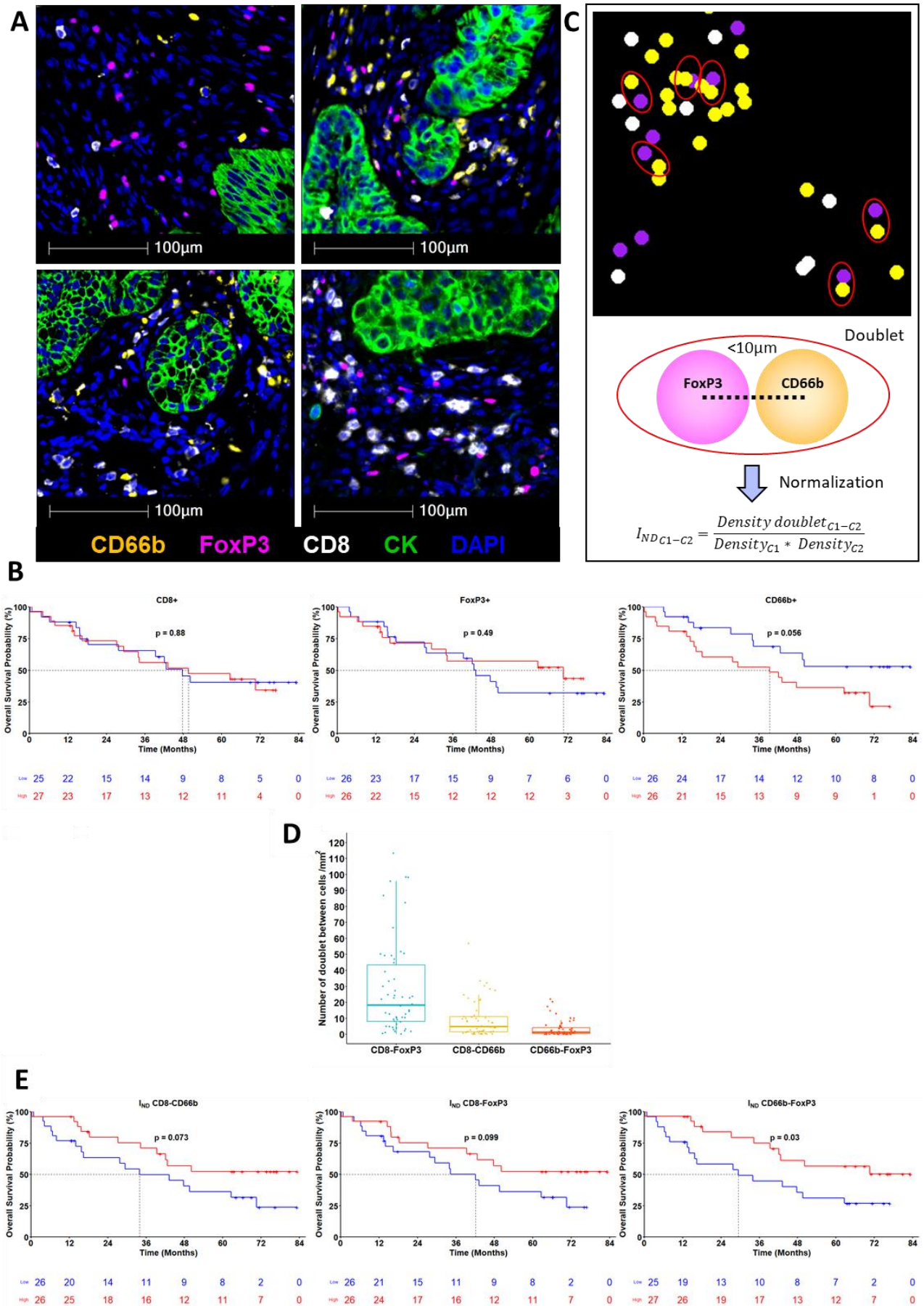


Figure 1

A	Cell	Cell Type	Marker	I _{ND} CD8 FoxP3 High	I _{ND} CD8-CD66b High	I _{ND} CD66b FoxP3 High
CD8	CCR7-	ICOS		0,084	0,016	0,028
		TIM3		0,238	0,158	0,020
		PD1+TIM3-		0,325	0,022	0,006
		CD27		0,032	0,016	0,104
		ICOS		0,008	0,132	0,256
		CTLA4		0,030	0,162	0,235
	CCR7-/CD45RA-	TIM3		0,378	0,240	0,040
		CD28+ PD1+ TIM3-		0,212	0,405	0,026
		CD28- PD1+ TIM3-		0,336	0,173	0,046
		CD28- PD1- TIM3+		0,838	0,492	0,040
		PD1+ TIM3-		0,129	0,077	0,004
		CD27		0,027	0,051	0,316
		CTLA4		0,017	0,042	0,057
		ICOS		0,014	0,162	0,279
CD4	FoxP3+	CTLA4+ ICOS+ TIM3-		0,019	0,486	0,762
		CTLA4+ ICOS- TIM3+		0,028	0,733	0,590
	FoxP3-	PD1+ TIM3+		0,861	0,830	0,178
		PD1+ TIM3-		0,581	0,688	0,376
		PD1- TIM3+		0,488	0,481	0,409
		PD1- TIM3-		0,559	0,533	0,498

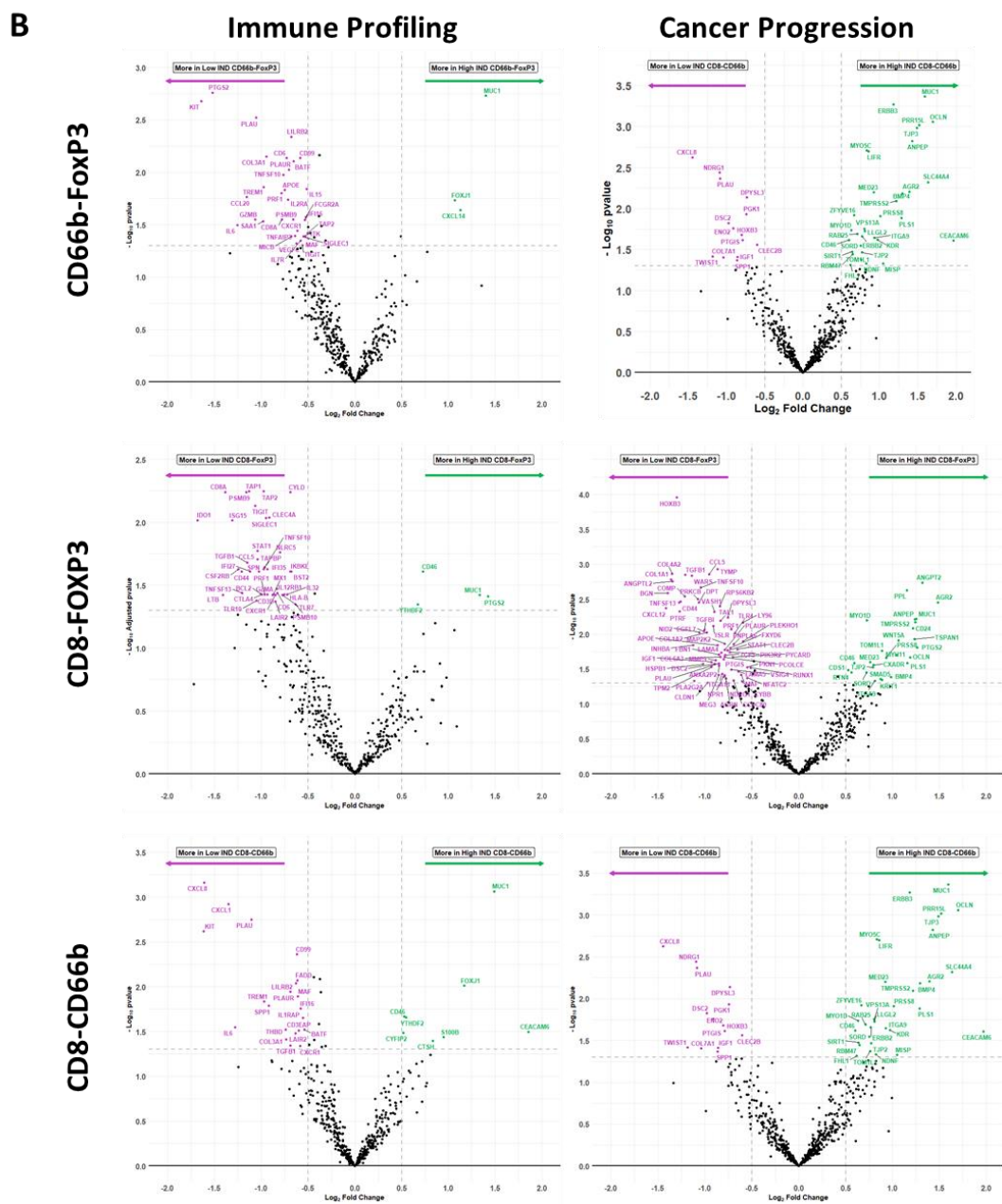


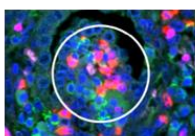
Figure 2

A

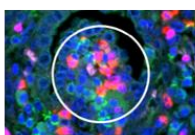
Immune Cell Profiling	IO Drug Target	Immune Activation Status	Immune Cell Typing
GZMB	Tim-3	CD127	FOXP3
Beta-2-microglobulin	4-1BB	CD25	CD14
CD11c	ARG1	CD27	CD163
CD20	B7-H3	CD40	CD34
CD3	GITR	CD44	CD45RO
CD4	IDO1	CD80	CD66b
CD45	LAG3	ICOS	FAP-alpha
CD56	OX40L	PD-L2	
CD68	STING		
CD8	VISTA		
CTLA4			
Fibronectin			
HLA-DR			
Ki-67			
PanCk			
PD-1			
PD-L1			
SMA			

B

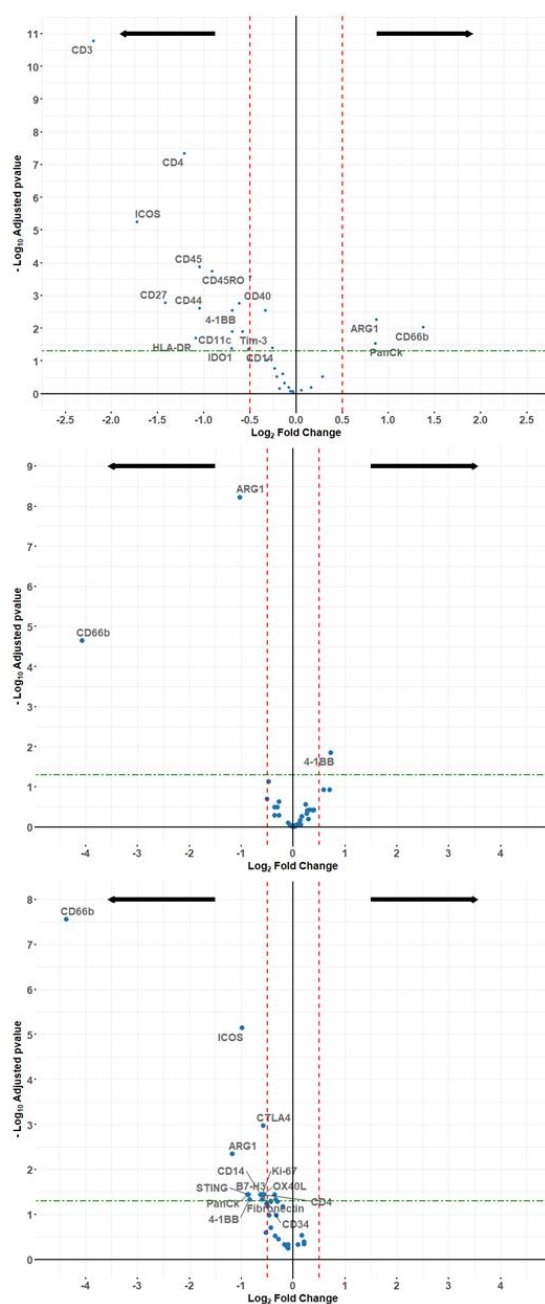
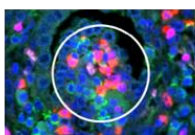
Interaction ROIs



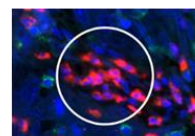
Interaction ROIs



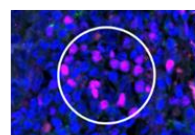
Interaction ROIs



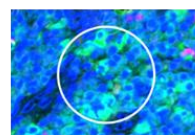
Free ELANE-enriched ROIs



Free FoxP3-enriched ROIs



Free CD8-enriched ROIs



■ ELANE ■ FoxP3
■ CD8 ■ SYTO13

Figure 3

Not enough genes
for GSEA analysis

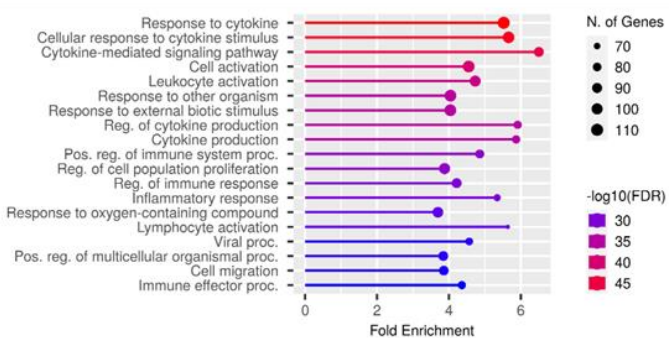
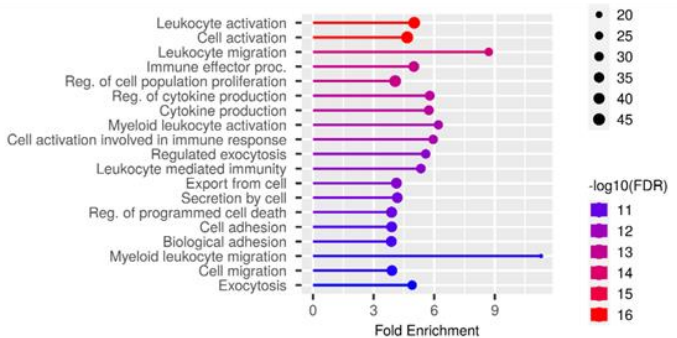
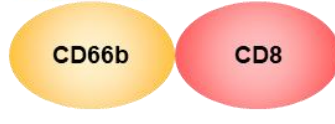
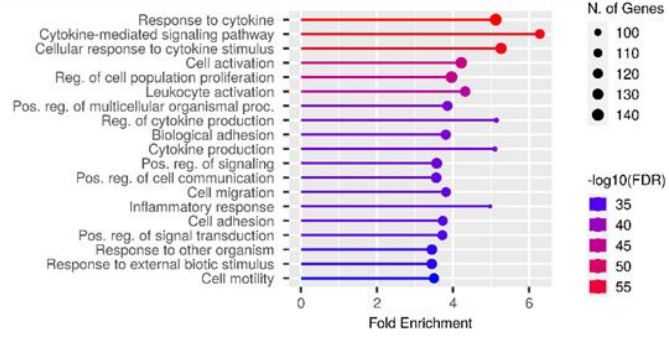
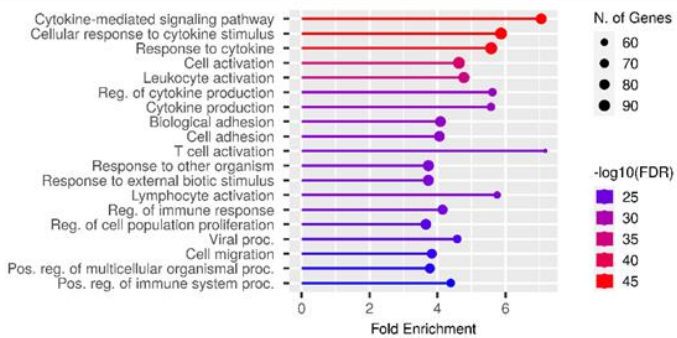
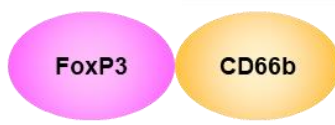
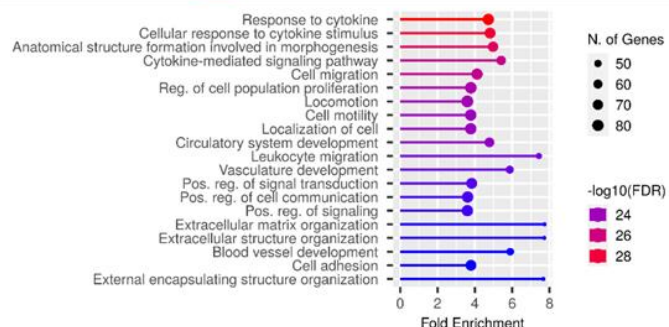
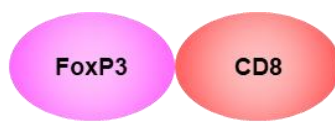


Figure 4

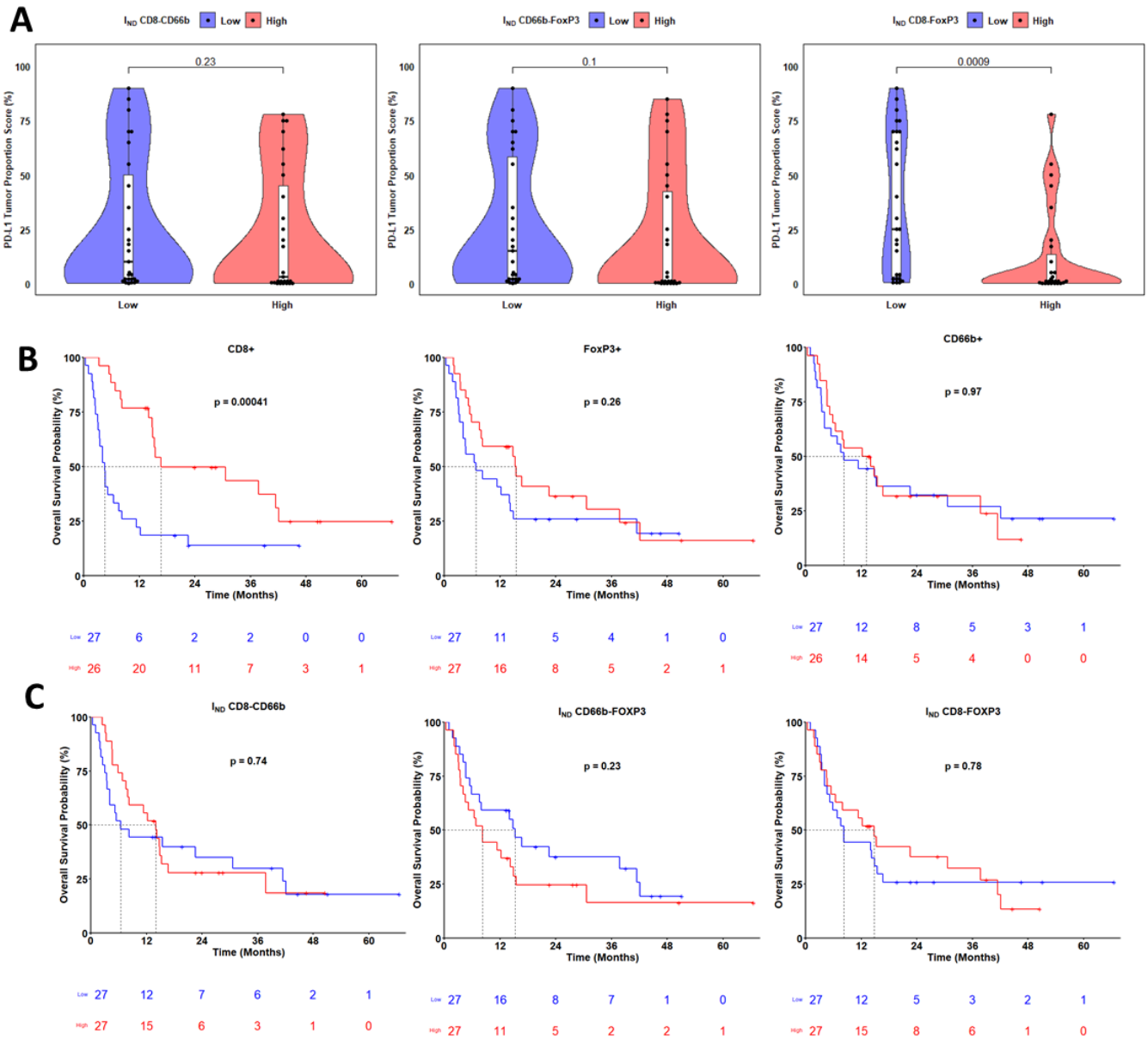


Figure 5

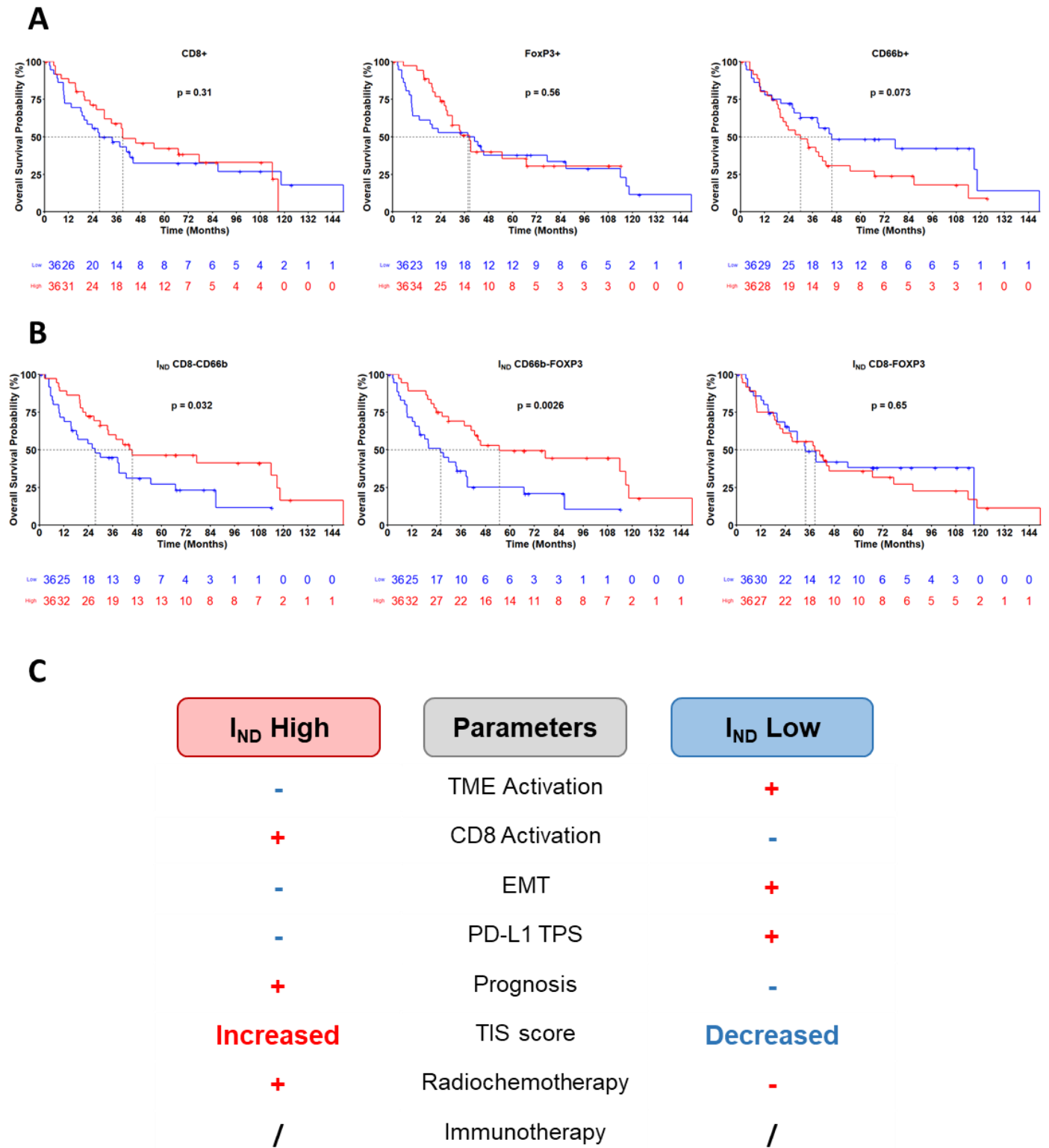
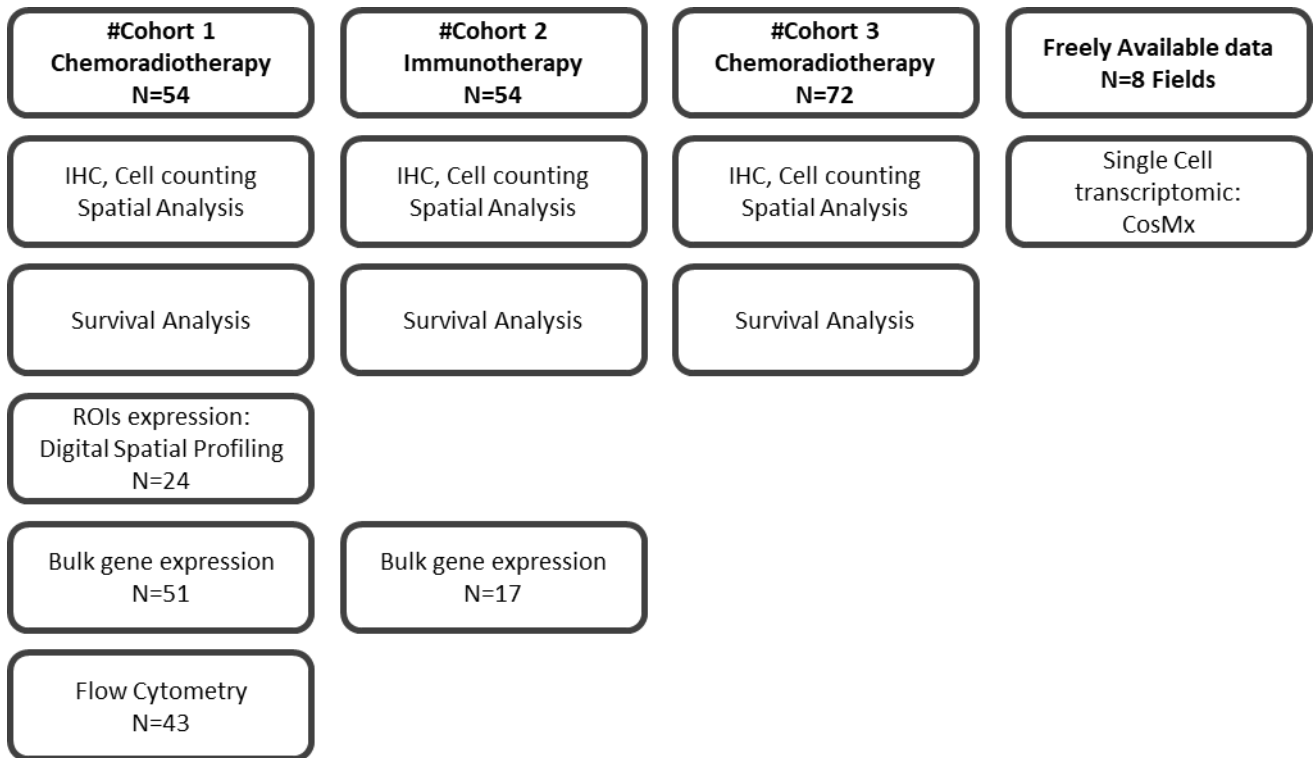
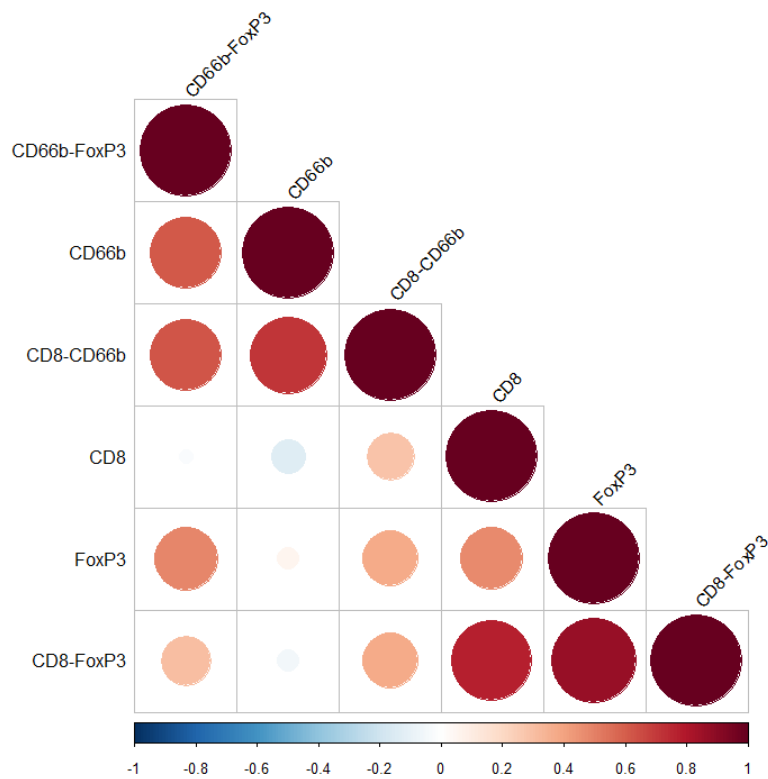


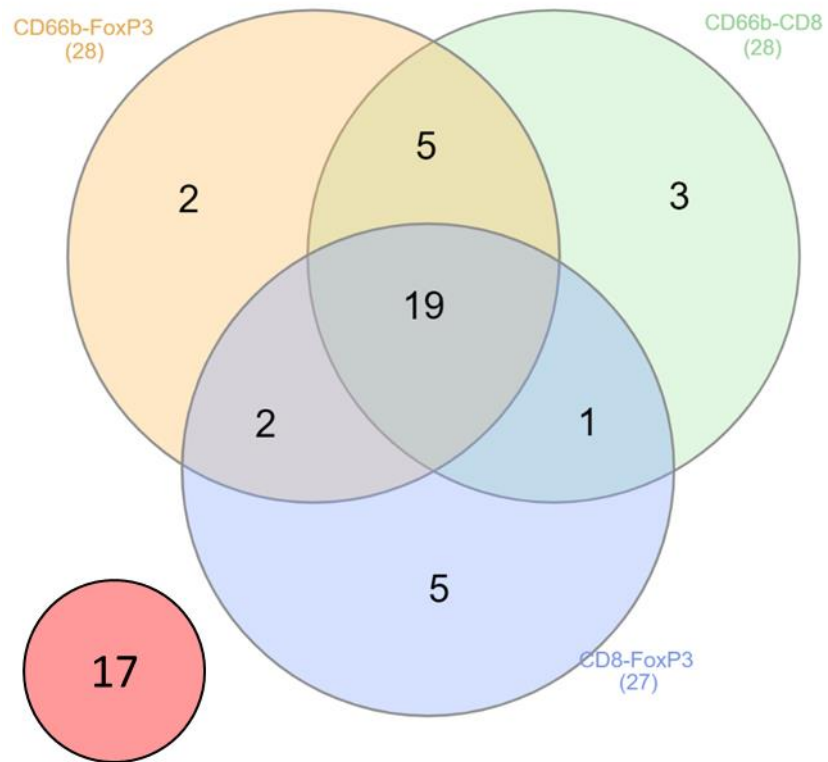
Figure 6



Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3

IND CD66b-FoxP3				
	level	Low	High	p-value
N		27	27	
Sex (%)	F	8 (29.6)	10 (37.0)	0.773
	M	19 (70.4)	17 (63.0)	
Age (mean (SD))		67.89 (10.74)	65.52 (9.19)	0.387
Tumor stage (%)	I	6 (22.2)	7 (25.9)	0.934
	II	12 (44.4)	12 (44.4)	
	III-IV	9 (33.3)	8 (29.6)	
Histological Subtype (%)	ADC	12 (44.4)	16 (59.3)	0.523
	Others	2 (7.4)	1 (3.7)	
	SSC	13 (48.1)	10 (37.0)	
Tobacco status (%)	Tobacco -	2 (7.7)	5 (20.0)	0.384
	Tobacco +	24 (92.3)	20 (80.0)	
COPD (%)	0	15 (55.6)	18 (66.7)	0.577
	1	12 (44.4)	9 (33.3)	

IND CD8-FoxP3				
	level	Low	High	p-value
N		27	27	
Sex (%)	F	9 (33.3)	9 (33.3)	1.000
	M	18 (66.7)	18 (66.7)	
Age (mean (SD))		68.37 (9.60)	65.04 (10.24)	0.223
Tumor stage (%)	I	7 (25.9)	6 (22.2)	0.934
	II	12 (44.4)	12 (44.4)	
	III-IV	8 (29.6)	9 (33.3)	
Histological Subtype (%)	ADC	14 (51.9)	14 (51.9)	0.828
	Others	2 (7.4)	1 (3.7)	
	SSC	11 (40.7)	12 (44.4)	
Tobacco status (%)	Tobacco -	3 (11.5)	4 (16.0)	0.955
	Tobacco +	23 (88.5)	21 (84.0)	
COPD (%)	0	18 (66.7)	15 (55.6)	0.577
	1	9 (33.3)	12 (44.4)	

IND CD8-CD66b				
	level	Low	High	p-value
N		27	27	
Sex (%)	F	5 (18.5)	13 (48.1)	0.043
	M	22 (81.5)	14 (51.9)	
Age (mean (SD))		69.07 (10.51)	64.33 (8.97)	0.081
Tumor stage (%)	I	7 (25.9)	6 (22.2)	0.860
	II	11 (40.7)	13 (48.1)	
	III-IV	9 (33.3)	8 (29.6)	
Histological Subtype (%)	ADC	9 (33.3)	19 (70.4)	0.024
	Others	2 (7.4)	1 (3.7)	
	SSC	16 (59.3)	7 (25.9)	
Tobacco status (%)	Tobacco -	1 (3.8)	6 (24.0)	0.092
	Tobacco +	25 (96.2)	19 (76.0)	
COPD (%)	0	15 (55.6)	18 (66.7)	0.577
	1	12 (44.4)	9 (33.3)	

Supplementary Table 1

Parameters	Cohort 1 (N=54)	Univariate			Multivariate		
		HR	95%CI	Pval	HR	95%CI	Pval
Age							
Median [Min, Max]	68.5 [44.0, 85.0]	1.019	[0.979-1.061]	0.353			
Sex							
F	18 (33.3%)	REF	REF	REF			
M	36 (66.7%)	1.671	[0.7325-3.812]	0.222			
Tobacco							
No	7 (13.0%)	REF	REF	REF			
Yes	44 (81.5%)	0.808	[0.2766-2.36]	0.697			
Pack year							
<15	5 (9.6%)	REF	REF	REF			
>=15	47 (90.4%)	0.6595	[0.1947-2.234]	0.504			
Missing	3 (5.6%)						
COPD							
No	33 (61.1%)	REF	REF	REF	REF	REF	REF
Yes	21 (38.9%)	0.337	[0.1418-0.8013]	0.0138	0.2603	[0.1071-0.6330]	0.00299
Tumor stage							
I-II	37 (68.5%)	REF	REF	REF			
III-IV	17 (31.5%)	1.7161	[0.8025-3.67]	0.164			
Histology							
ADK	28 (51.9%)	REF	REF	REF			
Squamous	23 (42.6%)	1.288	[0.5943-2.790]	0.522			
Others	3 (5.6%)	1.837	[0.4138-8.153]	0.424			
PD-L1 TPS							
<1	12 (22.2%)	REF	REF	REF			
1<x<50	28 (51.9%)	0.8303	[0.3500-1.970]	0.673			
>=50	14 (25.9%)	0.4810	[0.1569-1.475]	0.201			
CD66b-FoxP3 I_{ND}							
Low	27 (50,0%)	REF	REF	REF	REF	REF	REF
High	27 (50,0%)	0.4391	[0.2049-0.9410]	0.0343	0.3316	[0.1518-0.7244]	0.00563
CD8-CD66b I_{ND}							
Low	27 (50,0%)	REF	REF	REF			
High	27 (50,0%)	0.5058	[0.2364-1.082]	0.079			
CD8-FoxP3 I_{ND}							
Low	27 (50,0%)	REF	REF	REF			
High	27 (50,0%)	0.5327	[0.2489-1.1400]	0.105			

Supplementary Table 2

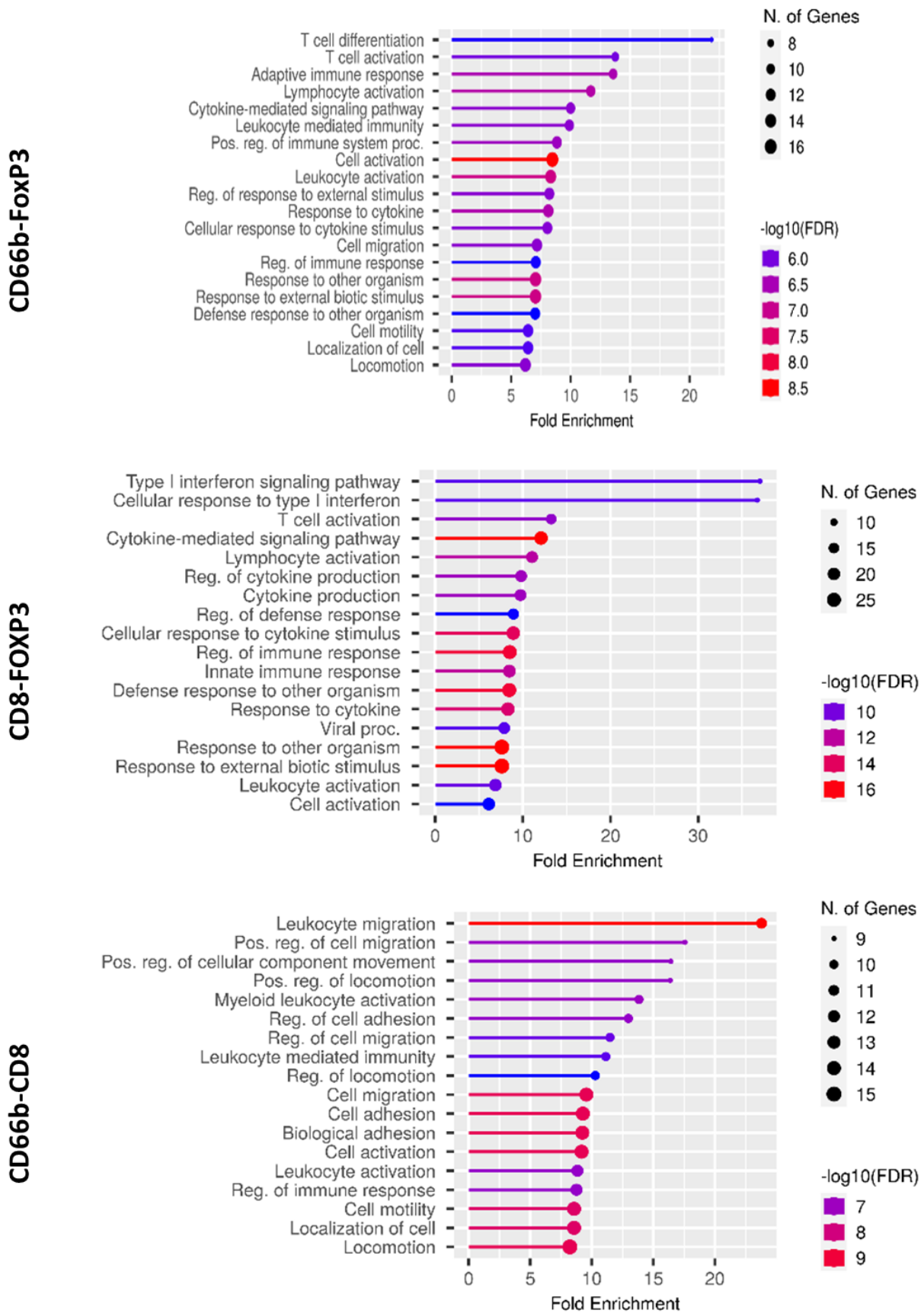
		CD8 Panel	CD4 Panel	Cytokine Panel
1	Live dead cells	TIM-3	TIM-3	
2	BV605	CD4	CD4	CD4
3	BV650	CD8	CD8	CD8
4	BV786	CD27	CD27	IL-10
4	FITC	CD28	CD28	Granzyme B
5	PercP	CD45	CD45	CD45
6	PE	LAG-3	CTLA4	IFN γ
7	ECD	CD45	CD45	
9	PE-Cy7	CCR7	CCR7	CD56
10	APC	ICOS	ICOS	TNF
11	AF700	CD3	Foxp3	CD3
12	APC-H7	PD1	CD3	IL-17

Supplementary Table 3

Cell type	I _{ND} _CD8_FoxP3	I _{ND} _CD66b_CD8	I _{ND} _CD66b_FoxP3
CD4+	0,325	0,548	0,518
CD8+	0,377	0,505	0,691
Treg (CD4+/FoxP3+)	0,814	0,338	0,198
TEMRA (CD45RA+/CCR7-)	0,159	0,745	0,261
T Effector (CCR7-)	0,239	0,793	0,948
Effector memory (CD45RA-/CCR7-)	0,539	0,608	1,000
NK Granzyme+ (CD56+ GRB+)	0,868	0,677	0,169

Supplementary Table 4

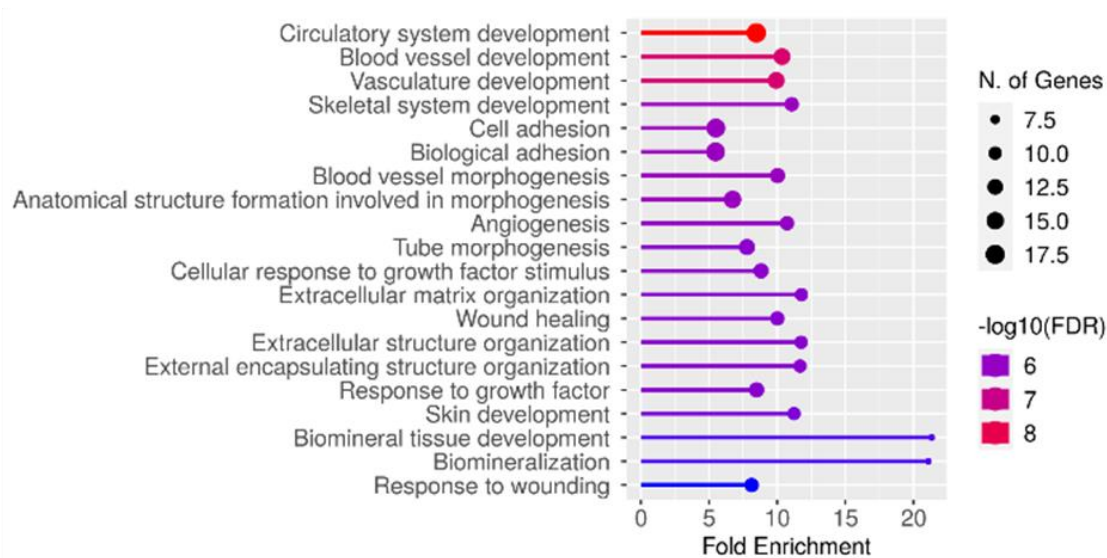
Immune Profiling



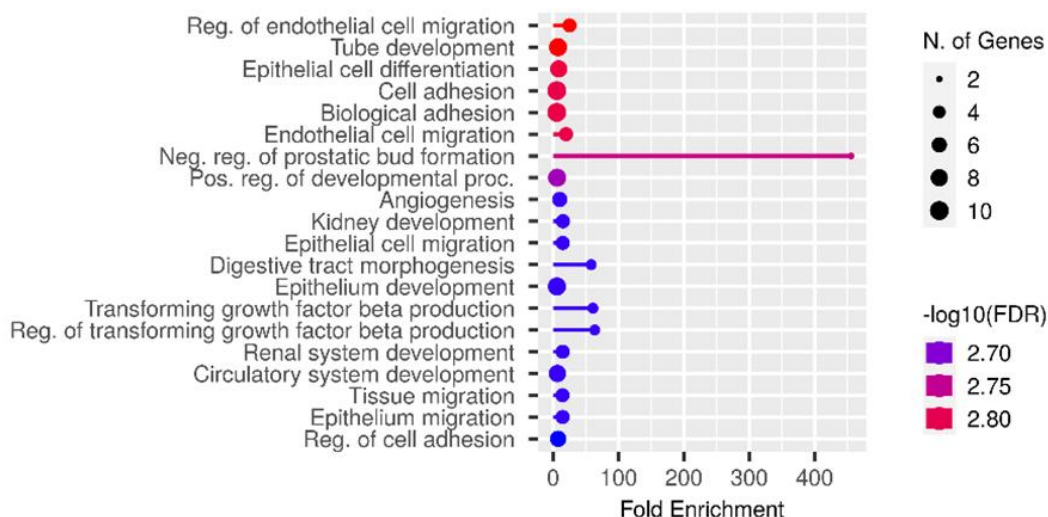
Supplementary Figure 4

Cancer Progression

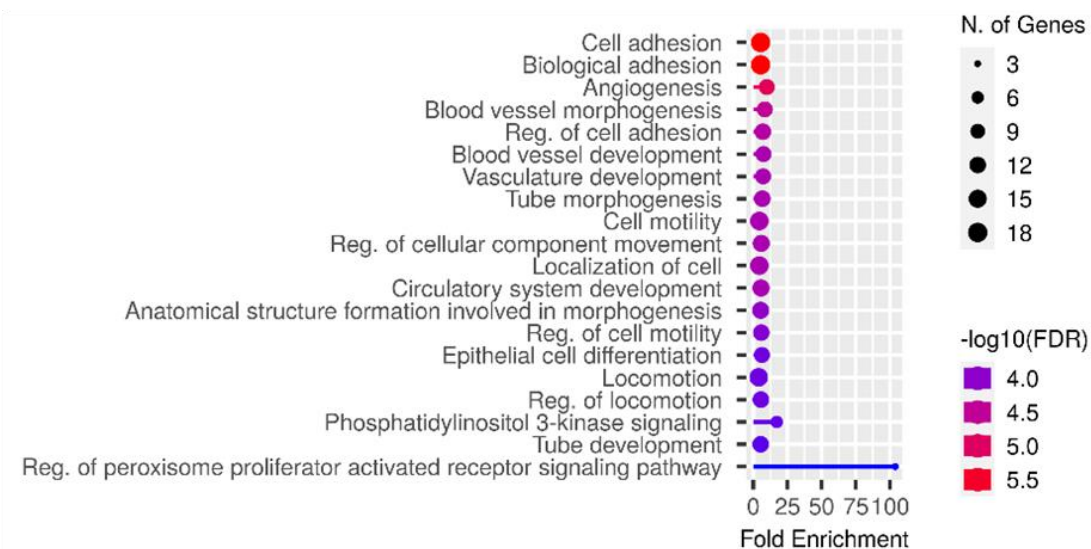
CD66b-FoxP3



CD8-FOXP3

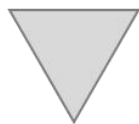


CD66b-CD8



Supplementary Figure 5

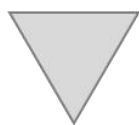
CosMx
FFPE Database



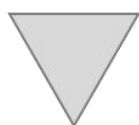
k-nearest neighbours
Leiden clustering



Cell Identification

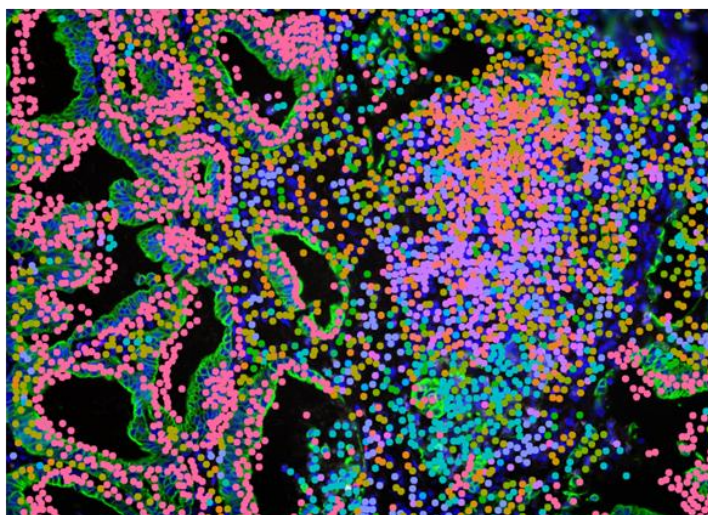
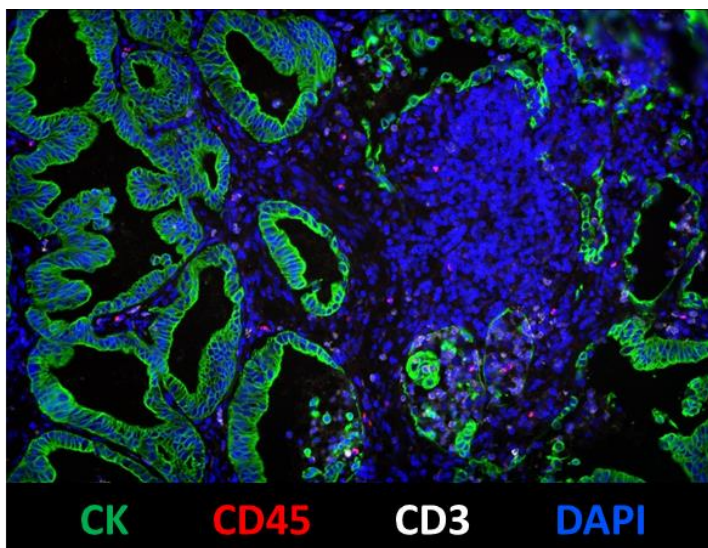


Compute
Euclidian distance

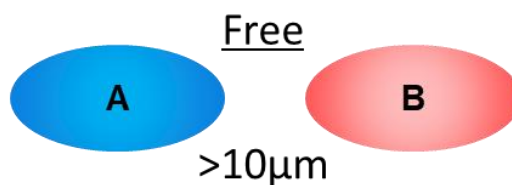
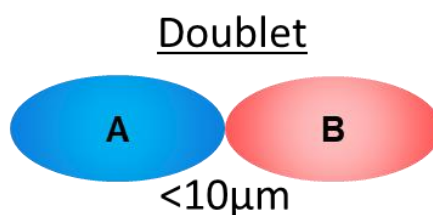


Spatial analysis

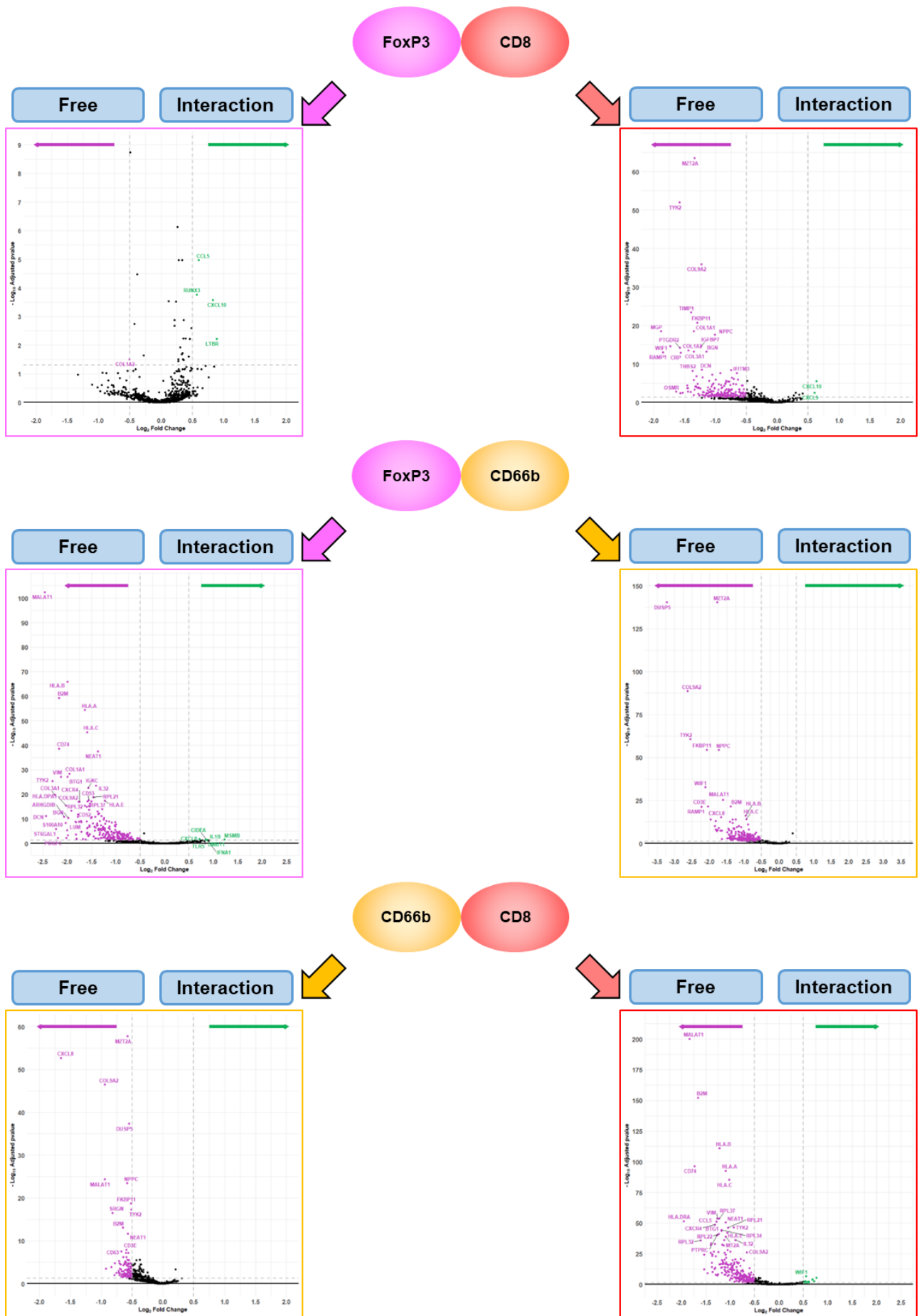
For each cell type:
Compare interacting
versus non interacting
setting



- CellType
- B-cell
 - endothelial
 - epithelial
 - fibroblast
 - macrophage
 - mast
 - mDC
 - monocyte
 - neutrophil
 - NK
 - pDC
 - plasmablast
 - T CD4
 - T CD8
 - Treg
 - tumor



Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 7

In_CD8_interacting_with_CD66b			In_CD8_interacting_with_Treg			In_CD66b_interacting_with_CD8		
Gene.name	Log2FD	Adj_pval	Gene.name	Log2FD	Adj_pval	Gene.name	Log2FD	Adj_pval
ACVR1	-0,751	1,40E-02	ACTA2	-1,033	1,20E-03	ADGRE2	-0,534	1,46E-02
ADGRE5	-0,653	1,13E-05	ACVR2A	-0,848	3,39E-02	AHR	-0,504	4,84E-02
ADGRF1	0,618	2,17E-02	ADGRG3	-1,091	1,74E-02	ANXA2	-0,613	5,29E-04
ADORA2A	0,591	7,71E-03	ALCAM	-0,779	1,33E-02	APP	-0,551	1,28E-02
AKT1	-0,757	4,77E-05	ANGPT1	-1,022	2,40E-02	ARF1	-0,562	2,02E-03
ANXA1	-1,380	8,41E-15	APP	-0,621	2,75E-02	AZU1	-0,537	9,85E-03
ANXA2	-0,951	1,83E-12	ATF3	-0,993	1,97E-02	B2M	-0,647	8,21E-14
ANXA4	-0,670	5,93E-03	ATG12	-1,019	1,40E-04	CALM2	-0,503	1,32E-03
APOB	0,575	3,83E-02	AZU1	-1,121	3,42E-03	CASP3	-0,532	2,54E-02
APP	-0,654	9,89E-04	BAG3	-0,939	1,75E-02	CCL3	-0,561	6,81E-04
AQP3	-0,534	3,19E-02	BGN	-1,148	6,41E-14	CCL7	-0,677	1,70E-02
AREG	-0,570	2,30E-02	BID	-0,798	2,88E-03	CD300A	-0,503	6,51E-03
ARF1	-0,885	4,88E-10	BMP5	-1,127	2,40E-02	CD3E	-0,594	1,18E-08
ARHGDI3	-1,401	1,35E-26	BRCA1	-0,853	4,36E-02	CD40LG	-0,513	3,57E-02
B2M	-1,664	6,42E-153	C11orf96	-0,773	1,08E-03	CD53	-0,573	2,48E-06
BAX	-0,764	2,38E-07	CALB1	-0,764	4,70E-02	CD55	-0,520	2,25E-04
BCL2	-0,663	5,90E-07	CALD1	-0,905	2,04E-04	CD63	-0,676	2,73E-08
BCL2L1	-0,747	9,51E-07	CCL15	-1,458	4,14E-05	CD84	-0,613	6,51E-03
BECN1	-0,798	5,59E-04	CCL19	-1,124	1,07E-04	CD8B	-0,552	4,76E-02
BST2	-0,578	2,14E-04	CCL21	-0,853	5,47E-03	CDKN1A	-0,541	4,01E-04
BTG1	-1,180	2,74E-44	CCL3	-0,546	1,62E-02	CEACAM1	-0,706	9,22E-03
C1QA	-0,993	2,09E-13	CCL3L3	-0,706	4,86E-03	CEACAM6	-0,753	2,83E-03
C1QB	-1,325	2,12E-13	CCL4L2	-0,556	2,39E-03	CIDEA	-0,571	2,31E-02
C1QC	-0,979	1,82E-12	CCR2	-1,060	4,25E-03	CLEC4A	-0,706	1,79E-05
CALM1	-0,795	1,66E-05	CCRL2	-1,152	8,09E-03	CLEC4E	-0,777	1,79E-05
CALM2	-1,161	2,56E-17	CD300A	-0,811	1,23E-02	CLEC7A	-0,588	5,45E-04
CALM3	-1,115	7,58E-13	CD3D	-0,523	4,81E-03	COL17A1	-0,505	4,70E-02
CASP8	-0,796	4,43E-09	CD55	-0,629	2,08E-02	COL9A2	-0,944	3,40E-47
CCL19	-0,553	2,76E-02	CD59	-1,075	1,20E-03	CRP	-0,617	2,81E-05
CCL2	-0,961	1,85E-05	CD5L	-0,870	3,49E-02	CRYAB	-0,560	1,73E-02
CCL4	-0,587	1,69E-04	CD69	-0,713	1,42E-05	CSF3R	-0,601	1,20E-05
CCL5	-1,285	6,03E-52	CD79A	-0,811	1,46E-02	CX3CL1	-0,702	3,30E-04
CD164	-0,574	2,80E-03	CD80	-0,829	2,11E-02	CXCL8	-1,651	1,91E-53
CD2	-0,899	3,47E-21	CD83	-0,597	4,18E-02	CXCR4	-0,580	3,20E-05
CD37	-1,370	2,51E-25	CD9	-0,685	2,16E-02	CYP1B1	-0,612	1,92E-02
CD3E	-0,725	2,39E-20	CDH11	-1,461	2,07E-04	DUSP5	-0,548	4,42E-38
CD3G	-0,543	1,82E-06	CELSR1	-0,855	4,32E-02	EPCAM	-0,552	9,85E-03
CD4	-0,732	3,63E-04	CLDN4	-0,655	1,22E-02	EZR	-0,622	9,54E-03
CD40	-0,676	8,17E-03	CLEC1A	-1,354	1,14E-02	FCGR3A	-0,563	6,25E-08
CD44	-0,608	3,98E-14	CLEC2D	-0,563	2,39E-03	FKBP11	-0,516	1,97E-19
CD47	-0,971	1,09E-07	CLU	-0,755	1,28E-02	FLT1	-0,573	1,40E-03
CD48	-0,971	1,18E-15	CNTFR	-1,127	8,22E-04	FPR1	-0,548	2,41E-05
CD52	-1,339	2,54E-27	COL12A1	-1,081	1,62E-02	FZD7	-0,571	3,88E-03
CD53	-1,004	1,34E-27	COL14A1	-1,107	1,89E-03	G6PD	-0,543	1,26E-02
CD55	-0,809	1,02E-06	COL15A1	-1,207	1,89E-03	GLUL	-0,598	6,93E-08
CD59	-0,887	2,04E-05	COL16A1	-0,974	4,48E-03	GNLY	-0,548	3,37E-06
CD63	-1,114	7,34E-21	COL17A1	-1,019	4,74E-02	GZMB	-0,640	6,54E-03
CD68	-1,224	3,60E-17	COL1A1	-1,352	3,03E-19	HCAR2	-0,514	7,52E-05
CD69	-0,709	6,62E-09	COL1A2	-1,439	2,68E-14	HLA.DRA	-0,586	6,16E-05
CD74	-1,731	3,75E-97	COL3A1	-1,351	5,39E-14	HSD17B2	-0,648	2,89E-02
CD81	-0,740	2,61E-11	COL4A1	-1,327	7,01E-05	HSPA1A	-0,525	1,79E-05
CD84	-0,660	2,59E-06	COL4A2	-1,353	1,45E-06	HSPA1B	-0,595	6,33E-07
CD9	-0,721	7,71E-04	COL5A1	-1,273	1,17E-04	HTT	-0,500	3,77E-02
CDH1	-0,631	2,01E-02	COL5A2	-1,304	1,06E-04	IAPP	-0,555	4,86E-02
CDKN1A	-0,721	1,10E-04	COL6A1	-1,054	2,44E-05	ICAM1	-0,584	4,46E-03
CENPF	-0,700	3,74E-02	COL6A2	-0,835	6,77E-06	IDO1	-0,717	1,07E-03
CFD	-0,526	7,81E-03	COL6A3	-0,890	1,19E-04	IFNGR1	-0,685	3,05E-05
CFLAR	-1,102	1,67E-14	COL8A1	-0,964	4,00E-03	IFNGR2	-0,544	2,43E-03
CIITA	-0,838	9,24E-06	COL9A2	-1,230	1,10E-36	IL13RA1	-0,642	4,53E-05
CLDN4	-0,791	8,59E-05	CRP	-1,565	1,06E-13	IL17A	-0,553	2,11E-02
CLEC2B	-0,513	6,27E-03	CRYAB	-0,697	4,36E-02	IL17B	-0,530	4,68E-03
CLEC2D	-0,562	1,67E-05	CSHL1	-1,051	1,12E-02	IL1R2	-0,623	1,79E-05
CLEC7A	-0,621	9,12E-03	CTNNA1	-0,512	2,92E-03	IL1RAP	-0,563	1,78E-05
CLU	-0,539	1,24E-02	CX3CL1	-1,342	4,52E-04	INHBA	-0,512	1,26E-02
CMKLR1	-0,874	1,43E-03	CXCL10	0,636	3,10E-06	INS	-0,568	1,34E-02

COL3A1	-0,666	2,71E-06	CXCL12	-0,686	2,18E-02	ITGA1	-0,559	2,77E-04
COL6A1	-0,609	2,11E-04	CXCL17	-1,406	1,67E-03	ITM2A	-0,627	1,28E-02
COL6A2	-0,832	4,88E-10	CXCL9	0,605	2,87E-03	KRT19	-0,709	4,42E-06
COL6A3	-0,765	6,18E-06	CXCR5	-0,661	4,87E-02	KRT20	-0,552	3,77E-02
COL9A1	0,548	3,20E-02	CYP1B1	-1,092	3,76E-04	KRT23	-0,648	5,47E-03
COL9A2	-0,658	6,74E-27	DCN	-1,224	3,17E-09	KRT4	-0,511	2,75E-02
COTL1	-1,243	4,74E-27	DDR1	-1,092	2,39E-03	KRT6C	-0,527	9,85E-03
CRIP1	-0,684	3,76E-08	DHRS2	-0,849	3,81E-02	KRT7	-0,559	4,01E-04
CRP	-0,663	1,80E-07	DLL1	-0,915	2,06E-02	LGALS3	-0,529	1,03E-03
CSK	-0,615	2,53E-05	DST	-0,964	1,84E-02	LMNA	-0,526	4,88E-02
CST7	-0,517	9,81E-05	DUSP1	-1,055	5,52E-08	LYN	-0,669	1,34E-03
CTLA4	-0,691	3,36E-04	DUSP2	-0,669	1,73E-05	MALAT1	-0,944	4,40E-25
CTNNB1	-1,153	6,42E-18	DUSP5	-2,234	2,48E-71	MAP1LC3B	-0,521	1,26E-02
CTSW	-0,823	1,38E-06	EFNB1	-1,020	1,23E-02	MECOM	-0,540	2,99E-02
CXCL10	-1,265	4,74E-08	ELANE	-0,904	1,41E-02	MET	-0,590	4,31E-02
CXCL14	-0,558	2,44E-02	EOMES	-0,797	1,40E-02	MMP1	-0,787	9,20E-03
CXCL16	-0,514	1,35E-02	EPHA2	-0,928	3,10E-02	MMP7	-0,683	5,00E-04
CXCL6	0,603	8,95E-03	EPHB3	-0,985	1,30E-02	MTRNR2L1	-0,922	3,02E-04
CXCL9	-1,463	8,04E-10	ERBB3	-0,982	2,69E-02	MXRA8	-0,513	1,99E-02
CXCR4	-1,315	2,06E-49	ESAM	-0,843	3,66E-02	MZB1	-0,619	1,34E-02
CYP1B1	-0,649	1,25E-03	ESR1	-0,762	4,03E-02	MZT2A	-0,575	1,74E-58
CYSTM1	-0,583	3,08E-03	FABP4	-1,175	4,72E-02	NDRG1	-0,613	5,79E-06
DCN	-0,775	2,94E-08	FASN	-0,709	3,44E-02	NEAT1	-0,569	1,97E-12
DDX58	-0,768	1,49E-04	FFAR3	-0,859	2,20E-02	NLRC4	-0,636	1,45E-02
DNMT1	-0,536	9,98E-04	FFAR4	-0,861	3,79E-02	NLRP3	-0,584	7,84E-03
DNTT	0,576	4,95E-02	FGF12	-1,199	1,45E-02	NPPC	-0,579	3,40E-24
DUSP1	-0,921	2,68E-12	FGF18	-1,004	2,16E-02	OXGR1	-0,720	2,71E-03
DUSP2	-0,727	3,70E-08	FGFR1	-0,880	9,46E-03	PECAM1	-0,528	3,82E-03
EIF5A	-0,824	2,30E-18	FGFR2	-1,110	3,41E-02	PIGR	-0,574	1,75E-02
ENTPD1	-0,587	4,10E-03	FKBP11	-1,299	1,85E-21	PROK2	-0,579	1,58E-02
ESR1	-0,562	4,61E-02	FLT1	-0,981	6,47E-03	PRSS2	-0,509	6,24E-03
ETS1	-1,092	4,23E-25	FN1	-0,830	2,60E-06	PTHLH	-0,509	4,01E-02
EZR	-1,092	2,22E-17	FOS	-0,766	5,37E-04	RAC2	-0,518	6,51E-03
FCER1G	-1,118	1,37E-08	FPR1	-0,531	4,70E-02	RNF43	-0,530	3,13E-02
FCGR3A	-1,189	2,48E-14	FYN	-0,634	1,31E-06	RSPO1	-0,512	2,39E-02
FFAR2	0,539	3,25E-03	GADD45B	-0,706	4,36E-03	S100A8	-0,582	8,50E-04
FGFR1	-0,566	1,96E-02	GC	-1,263	1,55E-02	SAT1	-0,646	5,67E-07
FN1	-0,506	2,33E-06	GCG	-1,072	3,85E-02	SCG5	-0,605	7,57E-03
FOS	-0,576	1,74E-03	GDF15	-0,959	9,43E-03	SELENOP	-0,589	7,52E-03
FYB1	-0,876	4,51E-15	GLUD1	-1,323	5,51E-05	SLC40A1	-0,634	1,18E-03
FYN	-0,923	8,13E-19	GPER1	-0,752	4,18E-02	SMAD2	-0,625	3,65E-03
GLUL	-1,194	2,37E-17	GPR183	-0,681	7,02E-03	SNAI2	-0,609	4,46E-03
GNLY	-1,060	3,47E-17	GZMK	-0,515	1,39E-02	SOX9	-0,532	6,51E-03
GPER1	0,681	1,51E-04	HBA1	-0,905	1,37E-02	SPRY2	-0,507	1,60E-02
GPNMB	-1,099	1,37E-08	HLA.DRB5	-0,738	3,66E-07	SRGN	-0,818	3,06E-17
GPR183	-0,670	2,04E-04	HSP90B1	-0,759	2,85E-05	THBS2	-0,563	8,40E-05
GPX1	-1,116	2,18E-26	HSPA1A	-0,845	7,15E-04	TLR2	-0,529	1,02E-04
GPX3	-0,818	1,80E-05	HSPA1B	-0,951	1,86E-05	TM4SF1	-0,837	1,26E-04
GSN	-0,943	2,11E-09	HTT	-0,854	9,63E-03	TNFRSF11B	-0,534	1,03E-02
GSTP1	-1,170	1,59E-20	IFIT1	-0,887	3,31E-02	TNFRSF19	-0,565	2,69E-02
GZMA	-0,833	1,70E-10	IFITM3	-0,657	2,20E-08	TNFRSF1B	-0,539	2,46E-03
GZMB	-1,175	2,40E-10	IFNA1	-0,932	3,41E-02	TYK2	-0,514	5,03E-18
GZMH	-0,514	2,88E-04	IFNAR1	-0,878	1,26E-02	VEGFD	-0,700	3,86E-03
GZMK	-0,608	6,03E-06	IFNAR2	-0,722	5,40E-03	VWF	-0,671	6,82E-03
H2AZ1	-0,536	1,67E-05	IFNGR1	-0,581	3,40E-02			
H4C3	-1,105	1,24E-11	IFNL3	-0,947	1,59E-02			
HDAC1	-0,575	3,02E-04	IGF1	-1,289	1,62E-05			
HDAC3	-0,638	3,35E-04	IGFBP7	-1,235	2,21E-15			
HDAC5	-0,578	1,89E-02	IGHA1	-0,788	4,08E-04			
HIF1A	-0,868	1,69E-05	IGHM	-0,747	3,49E-03			
HLA.A	-1,097	2,20E-93	IL11	-0,790	7,90E-04			
HLA.B	-1,223	1,22E-111	IL16	-0,572	3,95E-05			
HLA.C	-1,020	5,60E-86	IL17B	-1,145	4,00E-03			
HLA.DPA1	-1,165	4,85E-33	IL1R1	-0,826	4,04E-04			
HLA.DPB1	-1,405	7,20E-33	IL6	-0,688	2,66E-02			
HLA.DQA1	-0,999	4,27E-17	INHA	-0,900	2,82E-02			
HLA.DQB1	-0,967	7,90E-16	ITGA1	-0,570	3,88E-03			
HLA.DRA	-1,957	2,24E-52	ITGAE	-0,751	6,14E-04			
HLA.DRB1	-1,127	8,67E-37	ITGAL	-0,610	5,03E-04			

HLA.DRB5	-0,576	1,58E-10	JAG1	-0,856	3,34E-02
HLA.E	-1,060	9,04E-43	JUN	-0,577	3,32E-03
HMGB2	-1,057	1,77E-14	JUNB	-0,783	3,88E-06
HSP90AA1	-1,391	2,46E-34	KIT	-0,816	3,81E-02
HSP90AB1	-1,316	1,36E-33	KLF2	-0,601	3,06E-03
HSP90B1	-0,982	3,98E-14	KLRK1	-0,706	7,53E-07
HSPA1A	-0,968	7,05E-11	KRAS	-0,591	2,08E-02
HSPB1	-1,148	2,05E-19	KRT1	-0,744	3,49E-03
IER3	-0,508	1,66E-02	KRT10	-0,820	4,99E-02
IFI27	-1,031	9,97E-11	KRT14	-0,802	3,86E-06
IFITM1	-0,863	7,11E-19	KRT16	-1,015	2,31E-04
IFITM3	-0,789	2,00E-21	KRT17	-0,771	1,36E-02
IFNAR2	-0,501	1,30E-03	KRT18	-0,588	4,00E-03
IFNGR2	-1,302	1,32E-08	KRT19	-0,561	5,27E-03
IFNL3	0,769	4,27E-06	KRT23	-0,976	2,52E-02
IGF1	-0,587	2,38E-03	KRT6A	-0,791	8,52E-03
IGF2R	-0,726	2,14E-04	KRT7	-0,604	1,73E-02
IGHA1	-0,522	1,84E-02	LIF	-0,816	2,37E-02
IGHG1	-0,658	2,56E-04	LINC02446	-0,862	9,20E-03
IGHG2	-0,553	1,61E-03	LMNA	-0,547	4,62E-02
IGHM	-0,526	3,83E-02	LUM	-1,107	2,21E-06
IGKC	-1,131	1,13E-17	MAML2	-0,919	8,28E-03
IL10RB	-0,514	9,65E-03	MGP	-1,884	3,03E-19
IL13RA1	-0,626	4,12E-03	MMP16	-1,082	3,01E-02
IL16	-0,617	1,35E-09	MMP2	-0,914	2,85E-05
IL18	-0,587	2,48E-02	MRC2	-0,961	2,12E-03
IL1R1	-0,547	1,41E-03	MTRNR2L1	-1,065	7,05E-05
IL2RB	-0,637	1,34E-04	MXRA8	-0,849	1,39E-02
IL2RG	-0,599	6,44E-07	MZT2A	-1,341	3,30E-64
IL32	-0,894	6,08E-37	NANOG	-1,143	4,54E-03
IL6ST	-1,055	1,18E-11	NDRG1	-0,734	3,32E-04
IL7R	-0,978	1,01E-17	NFKB1	-0,710	1,89E-02
IRF3	-0,779	1,09E-11	NOTCH3	-1,445	2,07E-04
ITGA1	-0,613	3,23E-07	NPPC	-1,009	2,26E-18
ITGA2	0,518	5,30E-03	OLFM4	-0,966	4,13E-02
ITGAL	-0,720	1,09E-08	OSMR	-1,639	1,49E-03
ITGAV	-0,698	4,12E-04	PDGFA	-0,850	1,39E-02
ITGB1	-0,886	3,59E-09	PGF	-1,069	3,79E-02
ITGB2	-1,088	9,91E-19	PHLDA2	-0,876	1,62E-02
ITGB5	-0,619	3,08E-03	PPARG	-0,855	4,38E-02
ITK	-0,702	8,49E-08	PSAP	-0,615	3,61E-04
ITM2A	-0,504	1,64E-03	PTGDR2	-1,580	5,47E-15
JAK1	-0,945	1,27E-12	PTGDS	-0,958	4,27E-04
JAK2	-0,618	7,71E-03	PTGIS	-1,011	1,03E-02
JUNB	-0,792	7,51E-10	PTGS2	-1,574	3,86E-03
KLK3	0,518	4,61E-03	PTTG1	-0,805	8,52E-03
KLRB1	-0,574	1,80E-03	QRFPR	-0,975	1,63E-02
KLRK1	-0,748	2,68E-12	RAMP1	-1,852	8,59E-14
KRT10	0,559	1,86E-02	RARA	-0,843	1,32E-05
KRT15	-0,866	6,47E-11	RARRES1	-1,279	2,07E-04
KRT19	-1,055	1,06E-07	RARRES2	-0,860	4,86E-05
KRT7	-0,574	3,96E-03	RGCC	-0,760	6,39E-04
LAMP2	-0,629	1,90E-03	RGS2	-1,035	1,12E-05
LGALS1	-0,794	5,01E-16	S100B	-0,912	1,71E-03
LGALS3	-1,304	1,85E-14	SAA1	-0,809	2,79E-03
LGALS3BP	-0,635	6,92E-04	SAT1	-0,558	3,05E-03
LGALS9	-0,687	4,04E-04	SEC23A	-0,591	1,45E-02
LMNA	-0,641	2,54E-03	SEC61G	-0,593	5,02E-03
LUM	-1,080	3,70E-10	SERPINA3	-1,159	1,28E-02
LYN	-0,829	4,75E-03	SERPINB5	-1,119	2,22E-02
LYZ	-1,381	2,59E-18	SERPINH1	-0,860	2,37E-03
MALAT1	-1,836	7,23E-201	SLPI	-0,898	2,33E-02
MAP1LC3B	-0,825	3,37E-06	SMO	-1,058	1,59E-02
MAPK13	-0,817	7,63E-04	SNAI2	-0,701	4,18E-02
MAPK14	-0,549	4,75E-04	SOD1	-0,617	2,01E-03
MGP	-1,015	4,62E-13	SOX2	-0,845	2,91E-02
MIF	-1,089	1,71E-22	SOX9	-0,808	4,94E-02
MMP2	-0,794	2,65E-07	SPARCL1	-0,898	4,54E-03
MMP7	-0,534	5,24E-03	SPRY2	-0,871	1,80E-02

MT1X	-0,586	1,70E-04	SRGN	-0,563	3,75E-05
MT2A	-1,097	9,50E-40	ST6GALNAC3	-1,105	1,44E-02
MTRNR2L1	-0,844	9,95E-06	STAT3	-0,615	1,83E-03
MX1	-0,800	2,32E-08	STAT5B	-0,797	2,57E-03
NCR1	-0,916	5,48E-03	SYK	-0,838	4,03E-02
NEAT1	-1,097	2,29E-51	TAGLN	-0,923	2,56E-08
NFKBIA	-0,741	4,07E-08	TCL1A	-1,180	2,06E-02
NKG7	-0,695	8,73E-07	TFEB	-1,532	3,24E-03
NLRC5	-0,951	1,87E-14	TGFBR1	-0,838	3,49E-03
NLRP1	-0,525	1,09E-02	THBS1	-1,211	2,81E-07
NRXN3	0,612	7,20E-03	THBS2	-1,375	5,28E-09
OAS2	-0,730	2,30E-06	TIMP1	-1,396	3,76E-24
OAS3	-0,660	1,80E-05	TLR1	-0,907	2,75E-02
P2RX5	-0,533	6,79E-03	TLR3	-1,215	9,20E-03
PF4	0,723	2,70E-03	TM4SF1	-0,768	4,13E-02
PRF1	-0,643	7,86E-05	TNFRSF11B	-1,445	1,52E-03
PSAP	-0,867	8,13E-19	TNFRSF12A	-0,752	3,63E-09
PTGDS	-0,556	1,06E-03	TNFRSF18	-0,856	2,29E-03
PTGES2	-0,516	3,66E-03	TNFRSF9	-0,609	3,83E-02
PTGES3	-0,621	8,67E-07	TNFSF14	-1,062	1,08E-03
PTPRC	-1,267	6,69E-41	TNFSF9	-0,562	2,91E-02
PTPRCAP	-0,920	2,64E-17	TOP2A	-0,793	2,91E-02
RAC1	-0,857	1,09E-11	TPM1	-0,557	3,41E-02
RAC2	-1,039	1,39E-16	TPM2	-0,677	1,95E-03
RBPJ	-1,176	1,05E-14	TSC22D1	-0,750	4,32E-02
RELA	-0,833	1,29E-05	TUBB	-0,540	3,64E-04
RGS1	-0,952	1,49E-20	TXK	-0,731	2,16E-02
RORA	-0,526	1,22E-02	TYK2	-1,582	1,02E-52
RPL21	-1,046	6,33E-47	UBE2C	-0,998	1,09E-06
RPL22	-1,240	8,30E-42	VCAN	-1,311	1,59E-07
RPL32	-1,603	1,81E-36	VEGFA	-0,818	1,06E-02
RPL34	-1,178	4,34E-45	VPREB3	-1,278	5,47E-03
RPL37	-1,229	2,04E-54	VTN	-1,248	2,23E-04
RPS4Y1	-1,276	2,00E-08	WIF1	-1,731	2,21E-15
RUNX3	-0,529	8,17E-09	WNT10B	-0,943	7,54E-03
RXRB	-0,631	3,14E-04	WNT5B	-1,191	2,29E-03
RYK	-0,594	1,58E-02	XCL1	-0,671	1,08E-02
S100A10	-1,538	7,88E-25	YES1	-0,771	2,06E-02
S100A4	-0,943	3,43E-16			
S100A6	-1,132	1,77E-32			
SAT1	-0,903	1,26E-09			
SEC23A	-0,529	4,34E-03			
SEC61G	-0,846	4,71E-06			
SELENOP	-1,252	7,22E-09			
SERPINA1	-1,534	4,92E-13			
SLC2A4	0,517	2,89E-02			
SLC40A1	-0,995	5,49E-06			
SMAD2	-1,030	2,70E-08			
SMAD4	-0,807	2,88E-04			
SMARCB1	-0,555	1,29E-02			
SOD1	-0,868	5,24E-09			
SOD2	-1,299	1,07E-23			
SPINK1	0,690	7,41E-05			
SPOCK2	-0,532	7,54E-05			
SPP1	-1,362	7,32E-11			
SQSTM1	-1,371	3,60E-24			
SRGN	-1,055	1,01E-28			
ST6GAL1	-0,717	1,20E-03			
STAT1	-1,117	8,87E-15			
STAT3	-0,726	4,35E-06			
STAT4	-0,867	2,01E-12			
STAT5A	-0,623	2,24E-03			
STAT5B	-0,894	1,41E-06			
STAT6	-0,778	2,79E-05			
TAP1	-0,522	8,35E-04			
TAP2	-0,522	6,27E-04			
TGFBR2	-0,509	2,01E-05			
TIMP1	-0,839	1,01E-17			
TLR4	-0,685	2,80E-02			

TM4SF1	-1,004	2,94E-04
TNFRSF1B	-0,865	2,33E-06
TNFRSF21	-0,668	2,80E-02
TNFSF12	-0,514	3,01E-02
TPM1	-0,551	2,70E-03
TPSB2	-0,747	2,73E-02
TTR	0,577	1,31E-02
TUBB	-0,578	1,26E-08
TUBB4B	-0,625	3,35E-04
TYK2	-0,930	3,26E-47
TYROBP	-0,923	1,10E-06
VIM	-1,265	2,38E-54
WIF1	0,552	2,34E-07
XBP1	-0,705	1,86E-06
YBX3	-0,868	2,12E-08
ZFP36	-0,602	2,07E-08

In_CD66b_interacting_with_Treg			In_Treg_interacting_with_CD8			In_Treg_interacting_with_CD66b		
Gene.name	Log2FD	Adj_pval	Gene.name	Log2FD	Adj_pval	Gene.name	Log2FD	Adj_pval
ABL1	-0,817	3,59E-02	CCL5	0,600	1,07E-05	ADGRE5	-0,822	2,00E-02
ABL2	-0,780	4,70E-02	COL1A2	-0,508	3,12E-02	ADIRF	-1,131	2,58E-02
ACTA2	-0,731	3,19E-02	CXCL10	0,824	2,61E-04	AKT1	-0,941	2,55E-02
ACTG2	-1,132	1,96E-02	LTBR	0,888	5,99E-03	ANXA1	-1,537	1,44E-04
ADGRL2	-1,071	2,29E-02	RUNX3	0,568	1,69E-04	ANXA2	-1,327	1,12E-06
ADIRF	-1,067	1,52E-03				APOD	-1,151	3,76E-02
ALCAM	-1,050	6,73E-04				ARF1	-0,729	6,76E-03
ANGPT1	-0,842	3,82E-02				ARHGDIB	-2,068	1,19E-11
ANXA2	-1,492	2,12E-07				AXL	-1,160	3,73E-02
ANXA4	-1,330	2,58E-03				B2M	-2,168	4,54E-60
APOA1	-0,858	3,52E-02				BAX	-0,784	4,72E-03
APOB	-1,387	8,80E-03				BCL2	-0,744	2,43E-04
APOD	-0,872	3,14E-02				BCL2L1	-1,088	2,42E-04
AQP3	-0,917	3,00E-02				BGN	-1,979	4,04E-11
AREG	-1,098	9,44E-03				BST2	-0,957	6,11E-04
ARF1	-0,954	9,81E-04				BTG1	-1,997	7,04E-28
ARHGDIB	-1,197	1,52E-03				C1QA	-1,383	5,86E-09
ATF3	-0,964	2,68E-02				C1QB	-1,831	1,70E-09
ATG12	-1,380	1,38E-06				C1QC	-1,229	1,01E-06
AZGP1	-1,154	9,92E-03				C9orf16	-0,969	8,35E-04
B2M	-1,386	2,19E-22				CALD1	-0,962	6,73E-03
BCL2	-1,037	1,41E-03				CALM1	-1,195	7,78E-03
BCL2L1	-0,891	4,75E-04				CALM2	-1,299	4,82E-06
BEST1	-0,686	2,71E-02				CALM3	-1,314	1,36E-06
BGN	-1,839	8,95E-11				CASP8	-0,696	1,13E-02
BID	-0,602	1,05E-02				CCL5	-1,384	5,06E-08
BMPR2	-1,106	1,45E-02				CCND1	-1,146	1,84E-03
BRCA1	-0,882	2,50E-02				CCR5	-0,755	3,79E-02
BTG1	-0,604	7,97E-03				CD163	-1,084	5,11E-03
C11orf96	-0,668	3,66E-02				CD164	-1,049	1,26E-02
C1QA	-1,072	5,58E-07				CD2	-1,194	6,91E-10
C1QB	-0,832	5,22E-03				CD27	-1,043	8,77E-05
C1QC	-1,245	1,88E-07				CD37	-1,229	6,26E-07
C9orf16	-1,002	5,60E-05				CD3D	-1,195	9,83E-05
CALD1	-0,833	1,49E-02				CD3E	-1,379	7,84E-14
CALM2	-0,848	4,51E-04				CD3G	-1,049	8,03E-05
CALM3	-0,737	2,64E-02				CD4	-0,931	4,36E-03
CASP3	-1,254	2,23E-03				CD44	-1,303	6,09E-12
CASP8	-0,809	4,35E-02				CD47	-0,817	3,20E-02
CAV1	-0,641	2,96E-02				CD48	-0,833	9,53E-05
CCL11	-0,768	2,16E-02				CD52	-1,780	1,67E-12
CCL13	-1,096	9,92E-03				CD53	-1,558	2,30E-18
CCL15	-1,363	7,13E-08				CD55	-1,172	2,68E-02
CCL18	-0,753	1,72E-02				CD58	-0,728	1,93E-02
CCL19	-0,871	3,62E-02				CD59	-1,039	4,03E-02
CCL20	-0,697	3,62E-02				CD63	-0,979	3,77E-05
CCL21	-0,831	4,93E-03				CD68	-0,564	1,81E-02
CCL5	-0,647	4,62E-02				CD69	-1,416	3,81E-07
CCL7	-0,937	3,90E-02				CD74	-2,166	2,26E-39
CCND1	-0,935	3,22E-03				CD81	-0,893	3,38E-04
CCR2	-0,922	1,68E-02				CD84	-0,789	9,60E-04
CCRL2	-0,745	3,31E-03				CD9	-1,087	1,40E-02
CD14	-0,613	9,26E-03				CFLAR	-1,473	6,68E-09
CD164	-0,804	3,84E-02				CIDEA	0,842	2,09E-02
CD209	-0,615	4,00E-02				CLEC2D	-0,806	1,24E-02
CD27	-0,783	1,31E-02				COL18A1	-1,129	2,08E-02
CD33	-0,997	2,09E-02				COL1A1	-1,953	3,44E-29
CD36	-1,063	9,91E-03				COL1A2	-1,720	8,14E-10
CD3E	-2,037	2,19E-22				COL3A1	-2,254	1,84E-20
CD3G	-0,814	3,19E-02				COL5A1	-1,081	1,20E-02
CD4	-0,854	2,39E-02				COL5A2	-1,360	1,25E-02
CD44	-0,604	8,86E-03				COL6A1	-1,272	4,45E-04
CD48	-0,636	7,18E-03				COL6A2	-1,545	1,51E-07
CD52	-0,675	3,24E-02				COL6A3	-1,329	2,66E-05
CD53	-0,893	7,03E-06				COL8A1	-1,005	3,28E-02
CD55	-0,930	5,02E-05				COL9A2	-1,765	1,06E-17
CD58	-0,664	6,62E-03				COTL1	-1,256	3,98E-07

CD5L	-0,669	4,95E-02
CD63	-0,833	1,31E-04
CD68	-0,880	3,01E-06
CD74	-1,157	6,77E-11
CD81	-0,903	1,59E-03
CD86	-0,808	4,35E-02
CD8A	-0,720	3,50E-02
CD9	-0,886	6,43E-03
CDKN3	-1,160	8,47E-04
CEACAM1	-1,187	1,02E-02
CFD	-0,578	3,88E-02
CFLAR	-0,840	6,56E-03
CHI3L1	-0,639	4,41E-02
CIITA	-0,855	9,70E-03
CLEC12A	-0,757	4,49E-03
CLEC2B	-0,949	4,82E-03
CLEC4A	-0,719	2,01E-03
CLEC4E	-0,921	1,01E-03
CLEC7A	-0,786	2,50E-03
CLOCK	-1,121	7,18E-03
CMKLR1	-1,033	7,18E-03
CNTRF	-0,919	3,36E-03
COL11A1	-1,404	1,01E-03
COL15A1	-1,406	2,85E-04
COL16A1	-0,892	1,13E-02
COL1A1	-1,369	4,32E-07
COL1A2	-0,982	2,86E-03
COL3A1	-1,135	2,06E-05
COL4A1	-0,961	6,62E-03
COL5A1	-1,070	2,60E-03
COL5A2	-0,951	1,68E-02
COL5A3	-0,855	1,01E-02
COL6A3	-0,646	4,64E-02
COL9A2	-2,631	2,09E-89
CRIP1	-0,849	8,40E-04
CRP	-1,763	1,15E-08
CSF2RA	-1,057	5,66E-06
CSF2RB	-0,660	2,21E-02
CTNNB1	-1,415	2,54E-05
CTSG	-1,027	9,61E-06
CX3CL1	-1,006	3,31E-03
CXCL14	-0,795	4,09E-02
CXCL16	-0,687	3,05E-03
CXCL2	-0,541	4,82E-02
CXCL5	-1,098	1,10E-03
CXCL8	-1,666	4,61E-16
CXCR4	-1,452	2,32E-09
DCN	-0,965	4,41E-03
DDR2	-0,948	1,13E-02
DNMT1	-0,739	3,80E-02
DNTT	-1,643	3,22E-03
DUSP5	-3,226	4,31E-141
DUSP6	-0,717	7,39E-03
EGF	-0,852	4,81E-02
EIF5A	-0,608	1,37E-04
EMP3	-0,914	1,40E-04
ENTPD1	-0,931	1,01E-02
EOMES	-0,965	4,69E-02
EPCAM	-0,802	3,42E-02
EPHA4	-0,954	2,71E-02
EPHB2	-0,916	6,77E-03
ERBB2	-0,923	2,80E-03
ERBB3	-0,798	2,92E-02
ESR1	-0,831	2,46E-02
EZH2	-0,711	4,81E-02
FABP5	-0,810	5,60E-04
FAS	-0,820	1,79E-02
FCER1G	-0,891	7,03E-04
FCGR3A	-0,733	2,90E-05

CRP	-1,127	3,44E-02
CTLA4	-0,874	1,08E-04
CTNNB1	-1,354	8,44E-07
CTSG	-0,915	1,78E-02
CXCL8	0,715	1,76E-02
CXCR4	-1,748	1,06E-17
CXCR5	-1,130	3,28E-02
CYTOR	-1,248	1,90E-10
DCN	-2,433	7,36E-12
DMBT1	0,881	3,03E-02
DUSP5	-1,248	4,08E-11
EIF5A	-1,311	3,77E-08
ENTPD1	-1,586	3,13E-07
ETS1	-1,221	8,97E-09
EZR	-0,935	2,68E-05
FAS	-0,713	1,32E-02
FCER1G	-0,699	4,38E-02
FCGR3A	-1,157	4,44E-05
FKBP11	-0,561	6,57E-03
FN1	-1,818	2,07E-09
FOXP3	-0,654	4,04E-02
FYB1	-1,015	3,33E-06
FYN	-1,332	7,66E-10
GLUL	-0,990	1,74E-05
GNLY	-0,700	1,58E-02
GPNMB	-1,455	1,34E-03
GPX1	-0,769	1,66E-04
GSN	-1,431	5,11E-06
GSTP1	-1,092	1,41E-05
GZMA	-1,582	3,87E-05
H2AZ1	-1,598	4,96E-05
H4C3	-0,864	6,79E-03
HLA.A	-1,636	3,91E-55
HLA.B	-1,995	1,34E-66
HLA.C	-1,592	4,46E-46
HLA.DPA1	-2,022	4,51E-16
HLA.DPB1	-1,603	9,79E-10
HLA.DQA1	-1,498	2,01E-11
HLA.DQB1	-0,842	1,06E-04
HLA.DRA	-1,783	1,28E-11
HLA.DRB1	-1,600	1,16E-15
HLA.DRB5	-0,944	7,69E-05
HLA.E	-1,231	4,03E-18
HMGB2	-1,194	2,91E-05
HSP90AA1	-1,511	3,78E-11
HSP90AB1	-1,426	1,44E-11
HSP90B1	-1,755	1,46E-09
HSPA1A	-0,875	1,32E-02
HSPA1B	-0,835	5,53E-03
HSPB1	-1,225	7,17E-06
ICAM3	-0,757	2,24E-03
IFI27	-1,711	1,79E-09
IFITM1	-1,139	1,09E-09
IFITM3	-0,714	5,89E-05
IFNA1	0,869	3,03E-02
IFNGR1	-0,929	3,20E-02
IGF1R	-1,806	1,92E-02
IGF2R	-0,728	2,94E-02
IGFBP5	-0,933	1,65E-03
IGFBP7	-1,271	1,50E-07
IGHG1	-1,012	2,01E-09
IGHG2	-1,083	3,04E-09
IGKC	-1,571	2,28E-23
IL10RA	-0,754	1,18E-03
IL10RB	-0,891	1,67E-02
IL11RA	-0,878	7,25E-04
IL16	-0,808	4,69E-04
IL1B	0,855	2,98E-02
IL1R1	-1,167	1,89E-05

FCRLA	-1,068	5,72E-04
FGF7	-1,279	5,72E-04
FGG	-0,701	4,13E-02
FGR	-0,917	2,45E-04
FKBP11	-2,079	2,82E-55
FLT1	-0,882	3,12E-03
FN1	-1,145	2,05E-04
FOS	-0,583	1,17E-02
FOXF1	-0,839	6,62E-03
FOXP3	-0,710	4,36E-02
FPR1	-0,728	8,21E-04
FYN	-1,243	1,92E-03
FZD4	-0,636	3,90E-02
FZD5	-0,833	9,92E-03
GDF10	-0,762	4,26E-02
GDF9	-0,726	3,73E-02
GLUD1	-0,810	2,25E-02
GLUL	-0,548	1,36E-03
GNLY	-1,078	4,07E-07
GPBAR1	-0,526	4,00E-02
GPNMB	-0,945	1,36E-03
GPR183	-0,893	1,39E-02
GSN	-0,761	1,47E-02
GSTP1	-0,774	6,34E-04
GZMH	-0,961	5,92E-03
H2AZ1	-1,306	6,43E-05
H4C3	-0,520	4,26E-02
HBA1	-0,748	2,48E-02
HCAR3	-0,716	5,36E-03
HDAC1	-1,130	4,43E-03
HIF1A	-0,760	1,74E-02
HILPDA	-0,739	1,27E-02
HLA.A	-0,656	5,70E-07
HLA.B	-0,955	6,92E-17
HLA.C	-0,932	5,66E-15
HLA.DPA1	-1,307	1,45E-09
HLA.DPB1	-0,873	2,06E-03
HLA.DQA1	-0,722	1,53E-03
HLA.DQB1	-0,831	5,77E-05
HLA.DRA	-1,432	1,75E-08
HLA.DRB1	-1,286	1,41E-09
HLA.DRB5	-1,096	4,06E-10
HLA.E	-0,761	1,92E-05
HMGB2	-0,846	1,07E-03
HSP90AA1	-0,760	7,42E-04
HSP90AB1	-0,591	4,33E-04
HSP90B1	-1,037	6,34E-04
HSPA1A	-1,073	3,04E-06
HSPA1B	-1,150	2,65E-07
HSPB1	-0,856	2,95E-05
ICAM1	-0,651	2,34E-02
IFITM3	-0,571	1,55E-04
IFNA1	-1,426	5,00E-04
IFNAR1	-0,985	5,17E-03
IFNAR2	-0,690	1,83E-02
IFNGR1	-0,758	5,68E-03
IGF1	-0,771	2,57E-02
IGF2	-1,066	4,43E-03
IGFBP3	-0,882	7,73E-03
IGFBP5	-0,795	3,31E-03
IGFBP6	-0,523	2,64E-02
IGFBP7	-0,974	1,73E-05
IL10	-1,170	2,41E-03
IL10RB	-1,049	3,98E-04
IL11	-0,754	1,37E-03
IL12A	-0,733	2,47E-02
IL13RA1	-0,793	4,46E-03
IL15	-0,624	2,92E-02
IL16	-0,615	4,35E-02

IL2RB	-0,973	1,77E-03
IL2RG	-0,888	2,60E-04
IL32	-1,408	2,49E-24
IL6ST	-1,544	4,15E-08
IL7R	-1,345	5,34E-13
IRF3	-1,131	1,27E-07
ITGA1	-1,102	3,95E-03
ITGA5	-0,871	1,36E-02
ITGAL	-0,862	2,89E-03
ITGAV	-1,038	1,68E-02
ITGB1	-1,133	2,69E-04
ITGB2	-0,767	7,10E-04
ITK	-1,382	4,32E-08
ITM2A	-1,113	5,19E-03
JAK1	-1,443	1,36E-07
JAK2	-1,196	2,33E-02
JCHAIN	-1,336	2,68E-04
KLRK1	-1,263	4,58E-03
KRAS	-1,303	5,11E-03
KRT14	-0,827	6,05E-04
KRT15	-1,094	1,90E-05
LGALS1	-1,366	1,22E-12
LGALS3	-1,131	3,40E-04
LMNA	-1,316	5,04E-03
LTB	-1,144	4,42E-07
LUM	-1,999	4,33E-06
LYZ	-0,701	1,24E-02
MAF	-0,999	2,11E-08
MALAT1	-2,461	3,64E-103
MAP1LC3B	-1,173	4,49E-03
MAPK14	-0,731	1,73E-02
MGP	-1,551	3,10E-04
MIF	-1,016	9,72E-08
MMP2	-1,594	7,72E-07
MMP7	-0,881	4,47E-02
MRC1	-1,675	1,98E-02
MSMB	1,223	2,28E-02
MT2A	-1,542	7,97E-16
MTRNR2L1	-2,020	6,31E-03
MX1	-0,686	2,25E-03
NANOG	-1,622	2,68E-02
NDRG1	-0,707	1,75E-02
NEAT1	-1,373	3,01E-38
NFKBIA	-0,509	1,83E-02
NLRC5	-1,149	5,19E-07
NR3C1	-0,894	1,58E-02
OAS2	-0,680	1,11E-02
OAS3	-0,702	4,69E-03
PDGFC	-2,189	6,31E-03
PSAP	-1,127	1,43E-06
PTGES2	-0,651	1,76E-02
PTGES3	-0,968	8,54E-04
PTPRC	-1,640	3,34E-16
PTPRCAP	-1,254	1,58E-06
RAC1	-1,364	2,83E-06
RAC2	-1,392	2,68E-08
RAMP1	-1,812	1,01E-02
RARRES2	-0,877	1,50E-03
RBPJ	-1,055	3,82E-05
RGCC	-1,065	3,12E-03
RGS1	-1,551	6,45E-16
RORA	-1,115	2,12E-03
RPL21	-1,467	1,39E-19
RPL22	-1,285	8,62E-15
RPL32	-1,917	3,80E-14
RPL34	-1,584	8,45E-18
RPL37	-1,503	8,74E-18
RPS4Y1	-1,226	1,26E-03
RUNX3	-0,871	5,25E-04

IL17A	-0,740	1,82E-02
IL17B	-0,901	5,84E-03
IL18R1	-0,743	2,50E-02
IL1A	-0,636	2,94E-02
IL1R2	-1,001	6,16E-07
IL1RAP	-1,167	8,84E-08
IL20RA	-0,884	3,60E-02
IL2RG	-0,861	1,52E-03
IL32	-0,645	1,10E-03
IL3RA	-0,686	3,90E-02
IL4R	-0,528	4,31E-02
IL6	-0,504	4,58E-02
IL6ST	-0,751	4,35E-02
INHBA	-1,115	2,07E-03
INHBB	-0,853	1,67E-02
INS	-0,987	1,37E-02
INSR	-1,288	1,73E-03
IRF3	-0,650	2,92E-02
ITGA1	-1,814	9,27E-09
ITGA2	-0,712	4,69E-02
ITGA9	-0,653	4,65E-02
ITGAE	-0,674	4,00E-02
ITGB1	-0,717	1,89E-02
ITGB4	-0,954	7,90E-03
ITGB6	-0,653	4,54E-02
ITM2A	-0,878	2,22E-02
JAG1	-0,719	2,34E-02
JAK1	-1,105	3,30E-04
JUN	-0,511	3,59E-02
KITLG	-0,971	1,05E-02
KRAS	-0,821	4,41E-03
KRT1	-1,265	3,31E-05
KRT14	-1,339	1,16E-12
KRT15	-0,839	1,14E-03
KRT16	-0,747	4,83E-04
KRT17	-0,917	2,52E-05
KRT18	-1,025	7,45E-08
KRT19	-1,243	2,03E-06
KRT20	-0,894	3,62E-02
KRT23	-1,089	4,08E-03
KRT5	-1,087	8,18E-03
KRT7	-0,523	2,71E-02
KRT8	-0,698	3,01E-06
KRT86	-0,673	4,33E-02
LGALS1	-0,774	3,29E-05
LGALS3	-0,819	3,16E-03
LTB	-1,164	7,68E-06
LTBR	-0,708	4,09E-02
LTF	-1,196	5,38E-03
LYZ	-0,770	7,42E-04
MAF	-1,089	2,44E-04
MALAT1	-1,614	5,37E-26
MAP1LC3B	-0,849	1,68E-02
MAPK13	-0,816	1,01E-02
MARCO	-0,875	3,84E-02
MEG3	-0,717	2,46E-02
MGP	-1,375	1,19E-04
MIF	-0,770	1,22E-05
MMP1	-0,993	3,37E-02
MMP2	-0,849	8,90E-03
MMP7	-0,970	1,92E-03
MRC1	-0,974	1,81E-02
MS4A1	-1,038	2,29E-02
MT2A	-0,741	8,16E-04
MTRNR2L1	-0,941	9,45E-03
MXRA8	-0,772	3,05E-02
MYC	-0,663	4,79E-02
MYH11	-1,158	1,81E-02
MZT2A	-1,770	4,31E-141

S100A10	-2,035	4,22E-09
S100A4	-1,551	1,91E-14
S100A6	-1,537	7,16E-17
SAT1	-1,261	1,11E-04
SEC61G	-1,097	4,73E-03
SELENOP	-1,823	2,34E-04
SERPINA1	-0,849	1,02E-02
SERPINH1	-1,989	3,99E-04
SLC40A1	-1,712	1,52E-05
SMAD2	-1,033	2,88E-03
SOD1	-1,119	1,85E-03
SOD2	-0,846	1,76E-04
SPOCK2	-0,748	4,73E-04
SQSTM1	-1,349	2,83E-06
SRGN	-1,021	4,08E-08
ST6GAL1	-2,230	1,38E-06
STAT1	-1,274	6,18E-07
STAT3	-1,055	9,60E-04
STAT4	-1,028	4,23E-05
STAT5B	-1,044	1,19E-02
TAGLN	-1,544	5,94E-08
TAP1	-0,873	7,78E-03
TAP2	-1,216	3,81E-04
TGFBR2	-1,153	3,18E-04
THBS1	-1,238	4,19E-03
THBS2	-0,967	7,78E-03
TIGIT	-1,266	1,90E-06
TIMP1	-0,917	3,89E-05
TLR5	0,834	3,73E-02
TNFRSF10B	-1,413	6,95E-03
TNFRSF12A	-0,902	1,53E-04
TNFRSF14	-0,515	8,18E-03
TNFRSF18	-0,975	2,37E-04
TNFRSF1B	-0,857	2,74E-03
TNFSF10	-0,689	4,12E-02
TNFSF8	-1,164	5,38E-03
TPM1	-1,595	1,53E-04
TPM2	-0,839	1,75E-03
TPSAB1	-1,427	7,05E-03
TPSB2	-1,566	9,51E-04
TUBB	-0,926	1,04E-05
TYK2	-2,301	3,52E-26
UBE2C	-1,066	2,02E-02
VCAN	-0,727	3,82E-02
VHL	-0,899	3,40E-04
VIM	-2,128	7,66E-28
VSIR	-0,910	1,30E-02
WNT7B	-1,333	1,56E-04
XBP1	-1,385	3,81E-08
YBX3	-0,972	3,05E-03
ZFP36	-0,960	2,66E-05

NANOG	-0,672	1,90E-02
NDRG1	-0,989	7,03E-06
NEAT1	-0,895	7,23E-12
NPPC	-1,725	3,49E-55
NPR3	-1,335	6,43E-03
NR3C1	-1,012	8,18E-03
OLFM4	-1,187	1,52E-03
OLR1	-1,433	6,50E-04
PDGFC	-1,345	1,12E-03
PECAM1	-1,155	3,43E-04
PPARA	-0,763	4,45E-02
PPARG	-1,412	2,14E-03
PRSS2	-0,753	1,14E-02
PSAP	-0,988	5,70E-07
PTGDR2	-1,967	1,26E-14
PTGDS	-0,893	2,01E-02
PTGES3	-0,960	5,24E-04
PTGS1	-1,484	8,94E-04
PTGS2	-0,663	4,45E-02
PTHLH	-0,796	4,83E-02
PTK6	-1,025	3,22E-03
QRFPR	-1,018	4,43E-03
RAC1	-0,723	2,03E-04
RAMP1	-2,224	3,90E-22
RARA	-1,207	3,09E-10
RARRES1	-0,774	1,30E-02
RARRES2	-0,603	3,59E-02
RBPJ	-1,442	7,03E-06
RELT	-0,569	2,02E-02
RGCC	-0,678	1,66E-02
RGS2	-0,706	2,59E-03
RPL21	-0,864	7,47E-09
RPL22	-0,605	6,00E-03
RPL32	-0,746	9,88E-03
RPL34	-1,285	4,68E-09
RPL37	-0,919	2,07E-06
RUNX3	-0,734	2,51E-02
RXRA	-0,668	4,36E-02
S100A10	-0,911	2,65E-03
S100A2	-1,189	8,10E-04
S100A4	-0,610	1,54E-02
S100A6	-1,414	2,38E-13
S100A8	-0,552	4,67E-02
S100B	-1,686	3,88E-08
S100P	-0,705	1,41E-02
SAA1	-1,054	2,45E-04
SAT1	-0,810	7,46E-05
SELL	-0,911	1,18E-02
SERPINA1	-0,579	3,36E-03
SERPINA3	-0,868	2,44E-02
SERPINH1	-0,772	3,28E-02
SLC2A4	-0,963	2,19E-02
SLC40A1	-1,005	1,52E-03
SMAD2	-0,732	2,56E-02
SMAD4	-0,959	3,62E-02
SMARCB1	-0,926	2,01E-02
SMO	-1,337	9,63E-04
SNAI1	-0,519	3,10E-02
SNAI2	-0,865	8,88E-03
SOSTDC1	-1,361	9,79E-04
SPARCL1	-0,987	4,58E-03
SPINK1	-1,789	6,38E-08
SPRY2	-1,387	6,50E-04
SQSTM1	-0,589	1,05E-02
SRGN	-1,246	1,03E-14
STAT3	-0,529	2,17E-02
STAT5A	-0,669	2,24E-02
STAT5B	-1,182	4,58E-03
STAT6	-0,647	2,46E-02

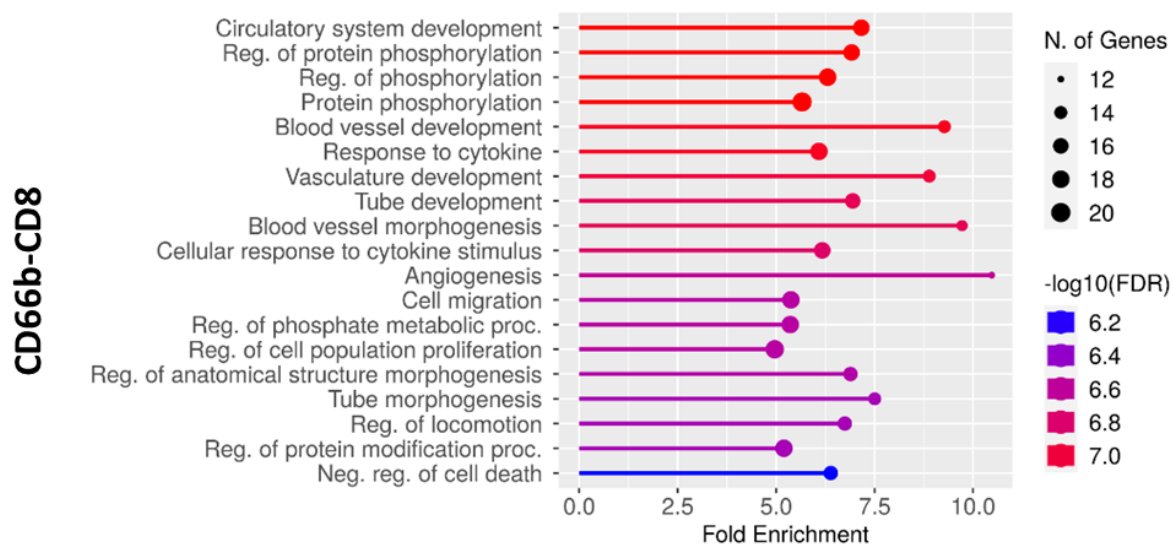
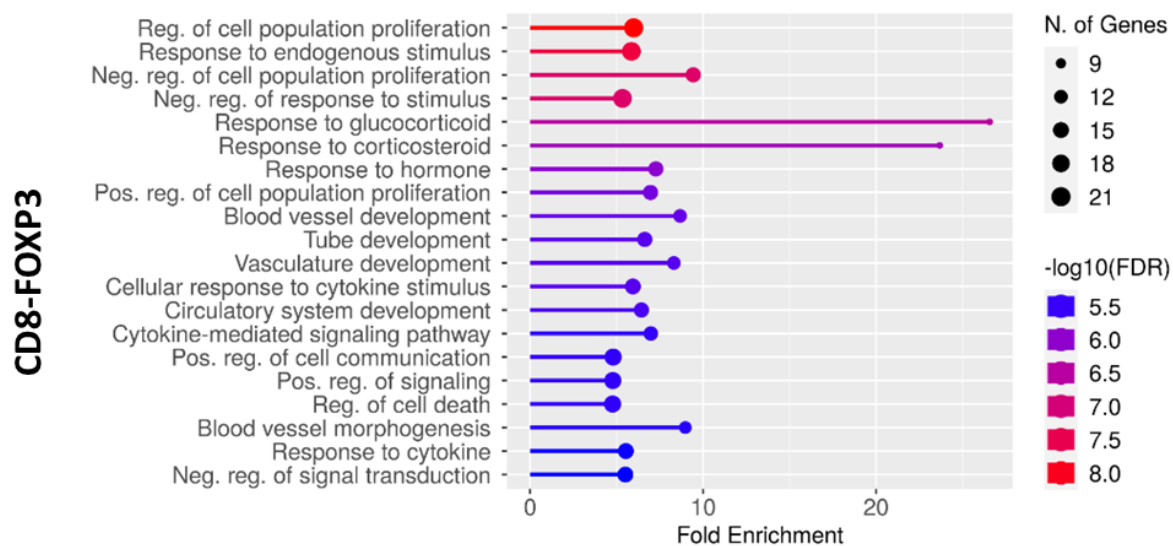
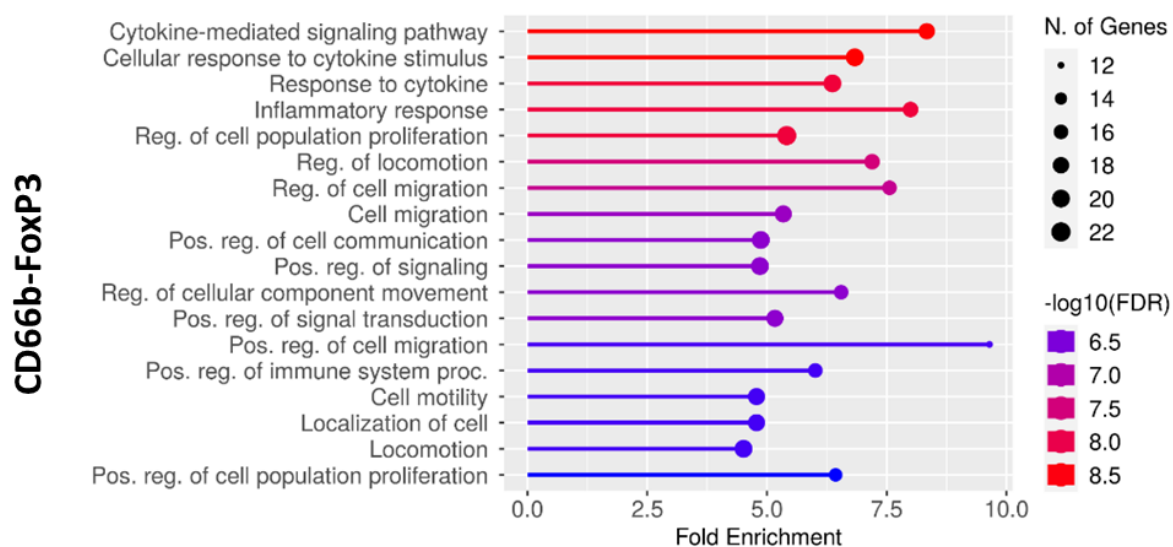
TAGLN	-1,639	4,49E-08
TAP1	-0,617	2,96E-02
TGFBR2	-0,620	3,59E-02
THBS2	-1,732	8,28E-10
TIGIT	-0,822	1,81E-02
TIMP1	-0,717	3,63E-03
TLR1	-0,851	3,10E-03
TLR2	-0,710	4,08E-03
TLR3	-0,699	4,65E-02
TLR4	-0,532	3,41E-02
TLR5	-0,905	2,63E-02
TLR8	-0,807	2,96E-02
TM4SF1	-0,905	7,48E-03
TNFRSF12A	-1,337	9,02E-15
TNFRSF18	-1,082	6,42E-05
TNFRSF1A	-0,607	5,39E-03
TNFRSF21	-0,934	2,92E-02
TNFSF12	-0,810	2,11E-02
TNFSF14	-1,146	1,41E-04
TNFSF8	-0,698	4,41E-02
TNFSF9	-0,893	6,04E-03
TOP2A	-0,645	3,94E-02
TPM1	-0,672	1,94E-02
TPM2	-1,011	6,34E-04
TPSB2	-0,915	1,06E-02
TSC22D1	-1,162	1,52E-03
TTR	-0,733	4,67E-02
TUBB	-0,829	3,68E-06
TYK2	-2,547	1,70E-61
TYMS	-0,833	4,39E-02
TYROBP	-0,893	1,15E-05
UBE2C	-1,824	8,83E-14
UPK3A	-0,729	3,90E-02
VCAN	-0,904	9,26E-04
VEGFD	-0,879	1,74E-02
VHL	-0,628	6,00E-03
VIM	-0,876	1,96E-04
VSIR	-0,734	3,18E-03
VTN	-1,344	3,31E-05
WIF1	-2,122	1,70E-33
WNT10B	-0,997	3,46E-03
WNT7B	-1,015	1,57E-03
YES1	-0,712	4,36E-02

Supplementary Table 5

Parameters	Cohort 2 (N=54)	Univariate			Multivariate		
		HR	95%CI	Pval	HR	95%CI	Pval
Age							
Median [Min, Max]	66.1 [30.6, 83.8]	0.9489	[0.9191-0.9796]	0.00124	0.9528	[0.9206-0.986]	0.00580
Sex							
F	21 (38.9%)	REF	REF	REF	REF	REF	REF
M	33 (61.1%)	1.914	[0.9709-3.773]	0.0608	2.2988	[1.1449-4.6158]	0.01926
Tobacco							
No	3 (5.6%)	REF	REF	REF			
Yes	50 (92.6%)	0.985	[0.2359-4.113]	0.984			
Missing	1 (1.9%)						
Pack year							
<15	7 (13.0%)	REF	REF	REF			
>=15	46 (85.2%)	1.610	[0.5681-4.561]	0.37			
Missing	1 (1.9%)						
Tumor stage							
I-II	0 (0.0%)	NA	NA	NA			
III-IV	54 (100%)	NA	NA	NA			
Histology							
ADK	37 (68.5%)	REF	REF	REF			
Squamous	11 (20.4%)	0.9087	[0.4122-2.003]	0.812			
Others	6 (11.1%)	0.6362	[0.2224-1.820]	0.399			
PD-L1 TPS							
<1	17 (31.5%)	REF	REF	REF			
1<x<50	14 (25.9%)	0.6973	[0.3140-1.549]	0.376			
>50	20 (37.0%)	0.6541	[0.3099-1.380]	0.265			
Missing	3 (5.6%)						
Anti-PD1							
Pembrolizumab	14 (25.9%)	REF	REF	REF			
Nivolumab	40 (74.1%)	1.081	[0.5062-2.309]	0.84			
CD8 density TOT							
Low	27 (50.0%)	REF	REF	REF	REF	REF	REF
High	27 (50.0%)	0.3242	[0.1687-0.6231]	0.000727	0.2967	[0.1500-0.5869]	0.00048
CD66b-FoxP3 I_{ND}							
Low	27 (50.0%)	REF	REF	REF			
High	27 (50.0%)	1.4702	[0.7861-2.75]	0.228			
CD8-CD66b I_{ND}							
Low	27 (50.0%)	REF	REF	REF			
High	27 (50.0%)	1.11	[0.4807-1.687]	0.744			
CD8-FoxP3 I_{ND}							
Low	27 (50.0%)	REF	REF	REF			
High	27 (50.0%)	0.9141	[0.4905-1.704]	0.777			

Supplementary Table 6

IO 360



Supplementary Figure 9

Parameters	Cohort 3 (N=72)	Univariate			Multivariate		
		HR	95%CI	Pval	HR	95%CI	Pval
Age		1.005	[0.9746-1.037]	0.734			
Median [Min, Max]	62 [39, 82]						
Sex							
F	31 (43.1%)	REF	REF	REF			
M	41 (56.9%)	1.646	[0.9014-3.005]	0.105			
Tobacco							
No	13 (18.1%)	REF	REF	REF			
Yes	59 (81.9%)	1.101	[0.53-2.288]	0.796			
Pack year							
<15	17 (23.6%)	REF	REF				
>=15	55 (76.4%)	1.586	[0.7385-3.405]	0.237			
COPD							
No	57 (79.2%)	REF	REF	REF			
Yes	15 (20.8%)	0.5627	[0.2515-1.259]	0.162			
Tumor stage							
I-II	0 (0.0%)	NA	NA	NA			
III-IV	72 (100%)	NA	NA	NA			
Histology							
ADK	50 (69.4%)	REF	REF	REF	REF	REF	REF
Squamous	14 (19.4%)	1.570	[0.7951-3.101]	0.1937	1.2595	[0.6184-2.5654]	0.5250
					1.5097	[0.7524-3.0289]	0.2463
Others	8 (11.1%)	2.586	[1.1161-5.992]	0.0267	2.1818	[0.9169-5.1917]	0.0778
					2.7249	[1.1495-6.4594]	0.0228
PD-L1 TPS							
<1	4 (5.6%)	REF	REF	REF			
1<x<50	39 (54.2%)	0.867	[0.2044-3.678]	0.847			
>=50	29 (40.3%)	1.177	[0.2746-5.052]	0.826			
Neoadjuvant Chemotherapy							
No	57 (79.2%)	REF	REF	REF	REF	REF	REF
Yes	15 (20.8%)	2.046	[1.068-3.920]	0.0309	1.8307	[0.9243-3.6240]	0.0829
					1.8938	[0.9583-3.7425]	0.0661
CD66b-FoxP3 I_{ND}							
Low	36 (50.0%)	REF	REF	REF	REF	REF	REF
High	36 (50.0%)	0.4102	[0.2258-0.7453]	0.0035	0.4468	[0.2373-0.8415]	0.0126
CD8-CD66b I_{ND}							
Low	36 (50.0%)	REF	REF	REF	REF	REF	REF
High	36 (50.0%)	0.5312	[0.2949-0.9570]	0.0352	0.5282	[0.2877-0.9697]	0.0395
CD8-FoxP3 I_{ND}							
Low	36 (50.0%)	REF	REF	REF			
High	36 (50.0%)	1.1415	[0.6407-2.034]	0.653			

Supplementary Table 7

Legends :

Table 1: Clinical description of the 3 cohorts of NSCLC patients used in this study

Figure 1: **Immune cell interaction is linked to prognosis in #Cohort 1.** (A) Representative 4-color multiplex immunohistochemistry of NSCLC samples from #Cohort 1 with low-interacting immune cell (upper left), high CD66b-FoxP3 interaction (upper right), high CD8-CD66b interaction (bottom left) and high CD8-FoxP3 interaction (bottom right). (B) Prognosis impact of CD8+ (left), CD66b+ (right) and FoxP3+ (middle) cells (red: above median value, blue : below median value). (C) Spatial plot in NSCLC sample with red circles delimiting pairs of interacting cell. Two cells were considered interacting when their nuclei centroids were distant to less than 10 μ m distance. An I_{ND} was calculated to normalize raw density of pairs of cell by the respective density of the cell types composing the cell pairs. (D) Boxplot showing the proportion of pairs of cells across NSCLC sample. (E) Prognosis impact of I_{ND} CD8-CD66b (left), I_{ND} CD8-FOXP3 (middle) and I_{ND} CD66b-FoxP3 (right) cells (red: above median value, blue : below median value).

Figure 2: **I_{ND} is linked to a less exhausted tumor microenvironment.** (A) Matrix with p-value resulting of the comparison of the proportion of several immune cell expressing activation and inhibitory markers with I_{ND} (CD8+CCR7- are effector T cells, CD8+CCR7-CD45RA- are effector memory T cells). Red-colored cells indicates an increase of the considered cell subtypes in High I_{ND} and blue-colored cell a decrease. (B) Gene expression of whole NSCLC FFPE sample from #Cohort 1 with Immune Profiling (left) and Cancer Progression Panel (right).

Figure 3: **CD8 in interaction ROIs are more activated.** (A) Matrix of proteins studied by Digital Spatial Profiling. (B) Differential protein expression between Interaction ROIs and ELANE-enriched ROIs (top), FoxP3-enriched ROIs (middle) or CD8-enriched ROIs (bottom).

Figure 4: **Immune cell interaction is linked to immune regulation.** Gene Set Enrichment analysis of most differentially expressed genes between immune cell type in interaction versus the same immune cell type free of interaction across the three studied interaction setting: CD8-FoxP3 (top), CD66b-FoxP3 (middle) and CD8-CD66b (bottom). Only 5 genes were found differentially expressed between FoxP3 interacting with CD8 and free FoxP3 cells (see Supplementary Figure 7), thus GSEA was not performed.

Figure 5: **I_{ND} is linked to a diminished PD-L1 TPS and lost their prognostic value in anti-PD1 treated patients (#Cohort 2).** (A) PD-L1 TPS variation between High and Low I_{ND} . Median value was used to discriminate High and Low groups (B) Prognosis impact of CD8 (left), CD66b (right) and FoxP3 (middle) cells. (C) Prognosis impact of I_{ND} CD8-CD66b (left), I_{ND} CD8-FOXP3 (right) and I_{ND} CD66b-FoxP3 (middle) cells.

Figure 6: I_{ND} is predictive of radiochemotherapy regimen efficacy in #Cohort 3. (A) Prognosis impact of CD8 (left), FoxP3 (middle) and CD66b (right) cells. (B) Prognosis impact of I_{ND} CD8-CD66b (left), I_{ND} CD66b-FoxP3 (middle) and I_{ND} CD8-FoxP3 (right) cells. Median value was used to discriminate High and Low groups. (C) I_{ND} impact summary in NSCLC.

Supplementary Figure 1: Representative scheme of all experiment performed in all cohorts used in this study

Supplementary Figure 2: Correlation between immune cell density of CD8⁺ T cells, FoxP3⁺ T cells and CD66b⁺ neutrophils and the density of their respective doublets in #Cohort 1.

Supplementary Figure 3: Venn diagram showing the repartition of each I_{ND} in patient of #Cohort 1

Supplementary Table 1: Variation of clinical data of #Cohort 1 with I_{ND}

Supplementary Table 2: Cox-univariate and multivariate analysis of #Cohort 1

Supplementary Table 3: Flow cytometry panels used in #Cohort 1

Supplementary Table 4: Impact of I_{ND} on immune cell type evaluated by flow cytometry

Supplementary Figure 4: GSEA of whole NSCLC FFPE sample from #Cohort 1 with Immune Profiling Panel

Supplementary Figure 5: GSEA of whole NSCLC FFPE sample from #Cohort 1 with Cancer Progression Panel

Supplementary Figure 6: Representative scheme of the spatial transcriptomic analysis using CosMx FFPE Database online. In all field, cell were segmented and identified according to gene expression. After identification of neutrophil, CD8⁺ T cell and Treg, euclidian distance was computed to separate interacting pairs of cells from « free » cells, with a 10 μ m distance threshold. Differential gene expression was performed by comparing the gene expression in one cell type in interaction setting versus the same cell type in non-interaction setting

Supplementary Figure 7: Spatial cell transcriptomic analysis for each pair of CD8+ T lymphocyte, FoxP3+ T lymphocyte and neutrophil. Volcano plot represents RNA expression variation between the immune cell type in interaction versus the same immune cell type free of interaction. Only the most differentially expressed gene are named. Complete list of differentially expressed gene can be found in Supplementary Table 5

Supplementary Table 5: Complete list of genes differentially expressed in spatial cell transcriptomic for all settings. FD : Fold Change

Supplementary Table 6: Cox-univariate and multivariate analysis of #Cohort 2

Supplementary Figure 8: Gene expression of whole NSCLC FFPE sample from #Cohort 2 with IO360 Panel

Supplementary Figure 9: GSEA of whole NSCLC FFPE sample from #Cohort 2 with IO360 Panel

Supplementary Table 7: Cox-univariate and multivariate analysis of #Cohort 3

Discussion

L'objectif de ce travail était de confirmer l'hypothèse que la composante spatiale des cellules immunitaires module leurs fonctions pro- ou anti-tumorales. Nous nous sommes focalisés sur les proximités spatiales entre les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes T régulateurs FoxP3+ et les neutrophiles CD66b+ dans le microenvironnement tumoral des CBNPC, car il s'agissait de trois types cellulaires majeurs de la réponse immunitaire anti-tumorale. Nous avons mis en place un pipeline d'analyse des interactions spatiales reposant sur (i) un marquage immunohistochimique multiplex des lymphocytes T CD8+, Treg FoxP3+ et neutrophiles CD66b+, (ii) la quantification des doublets de cellules proches de moins de 10 μ m de distance, (iii) la normalisation de la densité des interactions entre les 2 types cellulaires par rapport à leurs densités respectives et (iv) leurs impacts pronostics et prédictifs aux traitements.

L'index d'interaction

Notre travail a rencontré un obstacle technique lié à l'analyse des interactions. En effet, la proportion des proximités entre 2 cellules est corrélée à la densité respective des cellules étudiées. Plusieurs études ont seulement analysé le nombre de ces interactions et regardé l'impact sur la survie ou la récurrence tumorale [248,319,320] pour différentes cellules immunitaires. L'utilisation d'une normalisation permet d'obtenir un résultat affranchi de la corrélation intrinsèque. Nous aurions pu utiliser différentes méthodes de normalisation, comme des fonctions de répartition (G-cross fonction [308], Ripley K [321]), le pourcentage de cellule en interaction d'un type cellulaire donné [322] ou, plus récemment, un index d'interaction basé sur le nombre de cellule compté [323,324]. De fait, il n'y a pas à l'heure actuelle, de consensus sur ces méthodes de normalisation notamment dans les études de données spatiales. Cela rend difficile les comparaisons de nos résultats avec le reste de la littérature scientifique utilisant des techniques similaires. Néanmoins, en accord avec notre étude, ces données de la littérature ont montré des résultats intéressants dans plusieurs types de cancers, notamment des liens avec la survie et la réponse aux traitements, de même que l'impact des interactions cellulaires et les mécanismes cellulaires sous-jacents.

Trois interactions ont été visualisées et caractérisées : entre le lymphocyte T CD8+ et le lymphocyte Treg FoxP3+ ; entre le lymphocyte T CD8+ et le polynucléaire neutrophile CD66b+ et entre le polynucléaire neutrophile CD66b+ et le lymphocyte Treg FoxP3+. Nos

résultats suggèrent que l'interaction la plus intéressante en terme de survie dans nos cohortes est celle entre le polynucléaire neutrophile CD66b+ et le lymphocyte Treg FoxP3+. En revanche, l'interaction qui a le plus d'impact sur la fonctionnalité des T CD8+ est celle entre le lymphocyte T CD8+ et le lymphocyte Treg FoxP3+. Notre hypothèse est que les interactions sont dynamiques, avec une succession d'évènements débutants par l'interaction entre le neutrophile et le Treg, qui limite l'épuisement fonctionnel des lymphocytes T CD8+ effecteurs, d'où la diminution ou l'absence d'expression des molécules du verrou immunologique dans les CBNPC enrichis en doublets cellulaires. Une représentation sous forme de diagramme de Venn souligne la présence de tumeurs dans lesquelles tous les doublets sont au-dessus de la médiane.

L'IND CD8-FoxP3 ou le rôle de l'interaction entre les lymphocytes T CD8+ et les lymphocytes T_{reg} FoxP3+

Les interactions entre les lymphocytes T CD8+ et les Treg FoxP3+ sont les plus nombreuses dans notre étude. Cependant, l'IND CD8-FoxP3 n'a pas montré d'impact pronostique ni prédictif de la réponse au traitement, quel que soit la cohorte de patient. Ce résultat est en contradiction avec la littérature sur l'impact des interactions entre ces 2 types cellulaires. En effet, les proximités spatiales entre ces 2 cellules ont montré un impact positif sur la survie globale dans le cancer du poumon [308], le cancer gastrique [248] et le cancer rectal [325]. Les auteurs ont émis plusieurs hypothèses pour expliquer ce bon pronostic : (i) les Treg FoxP3+ à proximité des lymphocytes T CD8+ seraient des lymphocytes Treg naturels qui contrôlèrent l'inflammation associée au cancer [248] ; (ii) la forte proportion de lymphocytes T CD8+ à proximité des lymphocytes Treg FoxP3+ empêche ces derniers de réaliser efficacement leurs fonctions immunomodulatrices [308] ; (iii) l'impact fonctionnel de l'interaction dépend du compartiment tumoral et seules les interactions entre ces 2 cellules dans les massifs tumoraux entraîne une inhibition de l'inflammation associée au cancer [325]. Il nous est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature scientifique, étant donné la différence de méthode dans l'évaluation des interactions cellulaires. Notre hypothèse est que cette interaction n'est pas suffisante en elle-même pour impacter significativement le pronostic. Il est possible, comme le souligne Feichtenbeiner *et al.* que les lymphocytes Treg FoxP3+ en interaction constitue un sous-type particulier de ces cellules avec un impact différent sur la survie globale.

L'IND CD66b-FoxP3 ou le rôle de l'interaction entre les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes T_{reg} FoxP3

L'IND CD66b-FoxP3 qui étudie les interactions entre les neutrophiles et les Treg FoxP3 a montré un impact important sur la survie et la réponse à la radio-chimiothérapie. Ce résultat est d'autant plus inattendu que ces 2 types cellulaires sont connus pour être de mauvais pronostic, pour l'un, ou sans influence pronostique pour l'autre [163,275,281,326]. Si plusieurs études ont montré la présence d'interaction entre les neutrophiles et les lymphocytes T CD8+, résultant en l'immunomodulation des T CD8+ par les molécules ROS et NOS libérées par les neutrophiles [154], à l'inverse, peu d'études se sont intéressées aux interactions entre lymphocytes Treg FoxP3+ et neutrophiles CD66b+ [209]. Pillay *et al.* ont identifié un sous-type de neutrophile mature (CD11c^{bright}/CD62L^{dim}/CD11b^{bright}/CD16^{bright}) capable de supprimer la réponse T CD4 et CD8 via Mac-1 (CD11b/CD18) et la génération de ROS [327]. Lewkowicz *et al.* ont également montré que l'interaction entre des Treg activés par du LPS et des neutrophiles non activés entraîne l'apoptose des neutrophiles et la sécrétion d'IL-10. Les auteurs ont également montré que cette inhibition est médiée par ICAM-1/CD11b et que l'interaction directe cellule-cellule est indispensable, cette inhibition n'étant pas observé dans un système Transwell [328]. L'interaction entre les lymphocytes Treg FoxP3+ et les neutrophiles CD66b+ entraînerait l'inhibition des neutrophiles. Les lymphocytes T CD8+ en périphérie pourraient exercer leurs actions cytotoxiques contre la tumeur, sans cellules immunomodulatrices fonctionnelles. Nos résultats appuient cette hypothèse, comme le montre la diminution de l'expression des checkpoints immunitaires sur les lymphocytes T CD8+ et l'immunorégulation observé en transcriptomique spatiale dans les neutrophiles et les Treg en interaction. De plus, nous avons également observé cette interaction entre CD11b exprimé par les neutrophiles CD66b+ et ICAM-1 exprimé par les lymphocytes T régulateurs FoxP3+ par une technique d'immunohistochimie multiplex dans plusieurs échantillons de CBNPC.

La valeur pronostique négative d'une forte densité de neutrophiles CD66b+, leurs implications dans la résistance des cellules tumorales à la radio-chimiothérapie *in vitro* [329], et la résistance intrinsèque des lymphocytes Treg FoxP3+ au stress oxydatif [330] laissent à penser que ces derniers orchestrent ces interactions. Cela pourrait expliquer l'association entre une bonne survie et la densité des lymphocytes Treg FoxP3+ dans plusieurs études sur le CBNPC [252,270].

L'IND CD8-CD66b ou le rôle de l'interaction entre les lymphocytes T CD8+ et les polynucléaires neutrophiles

L'IND CD8-CD66b a montré un impact pronostique positif modeste dans les 2 cohortes de patients traités par radiothérapie et chimiothérapie. Les interactions entre les lymphocytes T CD8+ et neutrophiles ont été relativement bien décrits dans des modèles fonctionnels de culture de cellule. Les neutrophiles ont un rôle prépondérant en inhibant l'action cytotoxique des lymphocytes T CD8+ par la sécrétion de ROS, de NOS, de TNF α , de myéloperoxydase et d'arginase-1 [154–156]. Nous n'avons pas trouvé d'article ayant étudié l'impact de ces interactions sur le pronostic dans la littérature scientifique.

Notre résultat est inattendu, compte tenu du rôle inhibiteur du neutrophile sur le lymphocyte T CD8+. Il est probable que les interactions entre lymphocytes T CD8+ et neutrophiles ont lieu dans des régions où des lymphocytes Treg sont également à proximité. Dans ce cas, l'effet pronostic observé de l'IND CD8-CD66b serait impacté par celui de l'IND CD66b-FoxP3 et soulignerait la proximité de ces 3 types cellulaires dans le microenvironnement tumoral, avec une interaction préférentielle entre les neutrophiles et les lymphocytes Treg FoxP3. Cette hypothèse serait cohérente avec nos résultats montrant que l'interaction entre le neutrophile et le lymphocyte Treg entraîne leurs inhibitions respectives.

L'interaction cellulaire influence le phénotype et la fonction des cellules

Minns *et al.* ont montré que l'impact de l'interaction Treg-neutrophile dépendait de l'état d'activation de chaque cellule en interaction [331]. Dans cette étude, les neutrophiles non activés inhibent, par une interaction cellulaire directe, les lymphocytes T « early » activés, mais ne peuvent pas inhiber les lymphocytes T « late » activés. Ces résultats sont très proches de ceux obtenus par Lewkowicz [328]. Nous avons utilisé CD66b comme marqueur des polynucléaires neutrophiles car il s'agit d'un marqueur constitutif de ces cellules. Nous ne pouvons donc utiliser ce marqueur pour déterminer l'état d'activation des neutrophiles dans nos cohortes. Le gène de la NO synthase inductible (NOS2), responsable de la génération de NOS, et qui est étudié dans les panels d'expression de gène dans nos expériences de transcriptomique sur les tumeurs en « bulk », ne montre pas de différence d'expression significative. Cependant, NOS2 est également exprimé de façon constitutive par l'épithélium pulmonaire, ce qui peut expliquer l'absence de différence d'expression [332]. D'autres molécules témoignant de l'activation des neutrophiles, comme les gènes NOX1 (NADPH oxydase) et NOS1/3 (NO

synthase) responsables respectivement de la génération de ROS et NOS, et impliqués dans l'inhibition directe des lymphocytes T n'étaient pas dans les analyses spatiales.

Les CD66b en interaction pourraient représenter des G-MDSC

Une autre hypothèse serait que les cellules CD66b+ que nous avons quantifié correspondent à des cellules myéloïdes suppressives granulocytiques (G-MDSC) qui est un groupe cellulaire probablement hétérogène, sans marqueurs qui font consensus pour les caractériser. La présence d'interaction entre MDSC et Treg a été rapporté, mais leurs conséquences biologiques sont contradictoires selon les études et les modèles. Dans un modèle murin de cancer du poumon, les auteurs ont rapporté une suppression, par les G-MDSC, de la différenciation des CD4+ en Treg induit [333]. Ce phénomène qui survient précocement dans la polarisation de la cellule CD4+, est contact-dépendant et dépend des ROS et de IDO, mais pas de l'arginase-1, de iNOS, de NO, de la déplétion en cystine/cystéine, de la voie PD-1/PD-L1 ou de COX-2 (cyclooxygénase 2). Fujimura *et al.* ont observé, dans un modèle murin de mélanome, une suppression de la prolifération des lymphocytes T CD4 par les MDSC CD11b+Gr1+ via PD-L1 [334].

A l'inverse, dans un modèle murin d'adénocarcinome du pancréas, Siret *et al.* ont observé une induction contact-dépendante des Treg par les MDSC [335]. Des tissus humains de cancer du pancréas ont également été analysés par immunohistochimie et présentent des proximités spatiales entre cellules FoxP3+ et CD11b+. Cependant, les auteurs n'ont pas abordé les mécanismes cellulaires impliqués, ni approfondi la relation entre la proportion d'interaction entre cellules FoxP3+ et CD11b+ et les paramètres cliniques. Serafini et Schlecker ont retrouvé des résultats similaires, mais sur des cellules myéloïdes suppressives monocytiques (M-MDSC), qui n'expriment pas le marqueur CD66b [336,337].

Plusieurs études ont mis en évidence LOX-1 comme marqueur membranaire spécifique pour identifier les MDSC [161,338]. Cependant, nous n'avons pas observé de surexpression du gène OLR1, codant pour LOX-1, dans les données de transcriptome spatiale. Ceci indiquera soit que les neutrophiles en interaction ne sont pas des G-MDSCs, soit que les G-MDSCs n'interagissent pas de façon préférentielle aux autres cellules immunitaires étudiées.

Les NETs des neutrophiles ont-ils une influence dans ces interactions cellulaires ?

La formation de NET par les neutrophiles ou les G-MDSC ont été rapportés récemment dans les cancers et présentent de nombreux effets immunomodulateurs et pro-tumoraux [339,340]. L'impact des interactions entre les NETs et les lymphocytes a été très peu étudié. La littérature scientifique est plutôt en faveur d'un effet pro-inflammatoire et activateur des neutrophiles et des lymphocytes T CD8+ par les NETs [341,342]. De façon intéressante, Tillack n'a pas observé cet effet sur les lymphocytes T CD4+. Seul Wang *et al.* se sont intéressés à l'interaction Treg-NET dans un modèle murin de carcinome hépatocellulaire et montré que les NETs promeuvent la différenciation et la prolifération des Treg [343]. Nous n'avons pas observé ces modifications fonctionnelles dans nos analyses transcriptomiques, mais notre modèle est très différent car il s'agit de tumeurs humaines hétérogènes et d'étude d'expression de gènes sur tumeur et stroma mélangés. De plus, l'histone H3 citrulliné, spécifique des NETs, n'est pas disponible en expression de gène.

Les Treg FoxP3+ en interaction représentent un sous type de Treg ?

Nous pouvons poser l'hypothèse que les Treg interagissant directement sont un sous-type particulier de cellules régulatrices. En effet plusieurs sous-type de Treg ont été décrits, les principaux étant les Treg induits et les Treg naturels [344]. Nos études de transcriptomique et d'expression protéique n'ont pas permis d'identifier un sous type particulier de Treg lorsqu'ils étaient en interaction, notamment nous n'avons pas eu l'opportunité d'étudier la neuropiline-1, qui permet de discriminer les Treg induit des Treg naturels.

Nos résultats suggèrent plutôt une immunomodulation respectivement médiée par l'état d'activation des cellules en interaction, plutôt que la présence d'un sous-type cellulaire spécifique à la formation des interactions cellules-cellules.

L'interactome : un mécanisme majeur de l'immunomodulation et de la réponse thérapeutique ?

Pour analyser plus précisément les mécanismes cellulaires impliqués dans les interactions cellule-cellule nous avons utilisé une approche d'étude de données en ligne de transcriptome spatial à l'échelle cellulaire dans le CBNPC [345]. Une sous-expression des gènes liés à la présentation de l'antigène a été observé dans les cellules en interaction, dont les

neutrophiles qui sont décrits comme ayant un rôle de présentation de l'antigène dans de nombreux modèles de tumeur, dont le CBNPC [346]. Dans notre situation, l'interaction cellulaire n'aurait pas pour objectif de présenter l'antigène pour initier ou potentialiser une réponse immunitaire anti-tumorale, mais plutôt d'immunomoduler la réponse T régulatrice des lymphocytes Treg FoxP3+.

De façon intéressante, nous avons observé que les interactions cellulaires étaient associées à une sous-expression d'un ensemble de gènes impliqués dans la formation des différents composants du collagène qui est un constituant majeur de la matrice extracellulaire. Il influence les fonctions et la migration des cellules tumorales, mais également celles des lymphocytes T infiltrants les tumeurs [347] ou encore des macrophages [348] et diminue l'efficacité de l'immunothérapie [349]. Ces résultats tendent à montrer que, dans les territoires riches en collagène, les cellules immunitaires sont isolées et statiques, et ainsi le traitement du stroma par de la collagénase permet à nouveau la migration et la pénétration des lymphocytes T vers les îlots tumoraux, l'ensemble soulignant l'effet pro-tumoral du collagène [347].

Gentles *et al.* ont utilisés une approche différente d'analyse des interactions cellulaires dans le microenvironnement tumoral de CBNPC [350]. Ils ont étudié 40 échantillons de CBNPC qui ont été dissociés et les cellules triées selon 4 catégories : tumorales, immunitaires, endothéliales et fibroblastiques. Un séquençage des ARN sur les populations triées a été réalisé et les interactions entre ces types cellulaires ont été reconstruits par bioinformatique en s'aidant de base de données pour générer un interactome du microenvironnement des CBNPC (Lung-Tumor Microenvironment Interactome (LTMI)). Des analyses GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) peuvent alors être réalisées et nous permettent d'identifier les voies biologiques enrichis avec l'expression d'un gène particulier. L'analyse de transcriptome spatiale a montré une sous-expression de TYK2 (Tyrosine Kinase 2) dans plusieurs situations d'interaction. De façon intéressante, TYK2 est lié à une signature de gène de la voie IL8-CXCR1/2 impliqué dans l'activation, le développement et le recrutement des neutrophiles. De même, nous avons observé une sous-expression du gène SAT1 (Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1), et l'analyse GSEA souligne un enrichissement des gènes de la présentation antigénique avec l'expression de SAT1 dans les cellules immunitaires, cohérent avec une immunomodulation.

L'interaction des cellules immunitaires et la réponse aux ICI

Les patients ayant un CBNPC traités par chirurgie puis radiothérapie et chimiothérapie et dont les tumeurs avaient un I_{ND} CD66b-FoxP3^{Low} avaient une mauvaise survie, des lymphocytes T CD8⁺ fonctionnellement plus épuisés et une signature ARN en faveur de la transition épithélio-mésenchymateuse. Nous avons également observé un PD-L1 TPS tumoral plus élevé dans les tumeurs avec un I_{ND} CD66b-FoxP3^{Low}. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que ces patients répondraient mieux à l'immunothérapie anti-PD1.

Dans la #Cohorte 2, l'I_{ND} CD66b-FoxP3 n'a pas montré d'impact pronostique et prédictif, bien qu'une tendance négative sur la survie générale peut être observée. Il est important de noter que la majorité (40/54) patients de cette cohorte ont reçu du nivolumab en 2^{ème} ligne après une chimiothérapie en 1^{ère} ligne ; les autres (14/54) ayant reçu du pembrolizumab en 1^{ère} ligne. Cette cohorte est donc enrichie en patients qui n'ont pas progressés. Ce biais de sélection explique les signatures pro-inflammatoires en expression de gène sur cette cohorte et, peut-être, le manque de significativité statistique de l'analyse de survie de l'I_{ND} CD66-FoxP3.

L'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 a pour objectif l'expansion et la revigoration des lymphocytes T CD8⁺ fonctionnellement épuisés, mais également le recrutement de nouveaux clonotypes de lymphocytes T CD8⁺ ayant pour origine les ganglions lymphatiques drainant la tumeur. Ces résultats ont été observés chez l'Homme et la souris dans plusieurs sous-types de cancer [351] dont le cancer du poumon [352,353]. Dans notre étude, nous avons observé que la présence d'un I_{ND} CD66-FoxP3^{Low} pouvait être associé à une densité plus élevée de lymphocytes T CD8⁺. Ainsi l'I_{ND} CD66-FoxP3 pourrait représenter un marqueur d'efficacité à l'immunothérapie anti-PD-1, la densité de lymphocytes T CD8⁺ étant également prédictif de la survie chez les patients traités par immunothérapie anti-PD-1. Cependant, ces résultats tendent à montrer que l'immunothérapie anti-PD-1 seule n'est pas suffisante pour obtenir une réponse anti-tumorale efficace dans les tumeurs I_{ND} CD66b-FoxP3^{Low}. Il serait ainsi intéressant de cibler plusieurs formes d'immunosuppression simultanément pour potentialiser la réponse immunitaire anti-tumorale.

Le lien entre neutrophiles et immunothérapie est connu, en effet il a été montré que les tumeurs enrichies en neutrophiles étaient moins sensibles aux ICI, sans que l'on sache s'il s'agit d'un lien fonctionnel direct ou une association entre ce stroma riche en neutrophiles et les altérations moléculaires, comme les mutations de STK11 ou la perte de BRG1 (carcinomes

SMARCA4 déficients) [277,354]. Faget *et al.* ont rapporté que les neutrophiles inhibent l'efficacité de l'immunothérapie [355] en limitant l'angiogenèse et en induisant la TEM, tandis que Markowitz *et al.* ont observé que les G-MDSC sont augmentés après traitement par des anti-PD-1 chez les patients CBNPC non-répondeurs aux anti-PD-1 [356]. Kargl *et al.* ont montré que l'utilisation d'un antagoniste de CXCR1/2 améliore les résultats des anti-PD-1 sur la souris, avec une diminution significative des neutrophiles et une augmentation des lymphocytes T CD8 anti-tumoraux. L'administration d'un anti-PD-1 et d'une immunothérapie ciblant les neutrophiles serait une stratégie thérapeutique intéressante, ainsi plusieurs antagonistes de CXCR1/2 existent avec des résultats encourageants sur la souris [357]. Chez l'Homme, des thérapies combinant anti-PD-1 et CXCR1/2 sont en cours d'étude dans le cancer colorectal, le mélanome et les adénocarcinomes du pancréas [358].

Nos résultats suggèrent de cibler les protéines responsables de l'interaction neutrophile-Treg. Des anti-ICAM1 et anti-CD11b ont été décrits dans la littérature scientifique [359,360]. Cependant, la large expression de ces 2 marqueurs sur d'autres sous types cellulaires va probablement limiter leurs applications en immunothérapie. L'utilisation de bispécifique anti-CD11b & anti-CXCR1/2 permettrait de restreindre le champ d'application de l'immunothérapie sur les neutrophiles.

Nous avons également observé dans nos résultats d'expression de gènes que l'IND CD66b-FoxP3^{Low} était associé à une surexpression du gène codant pour COX-2, qui a un impact pro-tumoral et qui peut être ciblé par des immunothérapies anti-COX-2, en combinaison avec des anti-PD-1 [361–363]. Une étude a montré un allongement significatif de la survie générale chez les patients souffrant de CBNPC métastatiques et traités par une combinaison d'anti-PD(L)1 et anti-COX-2, comparé à des patients traités par anti-PD1 seuls [364].

Perspectives et Conclusion

La caractérisation du microenvironnement immunitaire peut se faire désormais par des approches d'analyses spatiales qui permettent de quantifier les cellules, de les localiser, d'en déterminer les interactions avec les cellules avoisinantes et parfois d'en déterminer le transcriptome comme le PIC-seq (physically-interacting cell sequencing) [365]. Cette technique identifie les cellules en interaction, les collecte avec un trieur de cellules classique, puis le séquençage des ARN est réalisé séparément sur chaque type cellulaire. Elle permet d'étudier une seule interaction entre 2 cellules, à très faible débit et à des coûts élevés. Cohen *et al.* ont utilisé le PIC-seq dans des échantillons de CBNPC pour caractériser les interactions entre des lymphocytes T CD4+ et des cellules myéloïdes [366]. Les auteurs y ont décrit un sous-type de lymphocyte T CD4+ (PD-1+/CXCL13+) qui interagit préférentiellement avec les cellules dendritiques DC-LAMP matures et assure une réponse anti-tumorale efficace dans les CBNPC traités par immunothérapie anti-PD-1 chez la souris. De manière intéressante, la proportion d'interaction observée dans leur étude est de grandeur équivalente à celle que nous avons observé.

A l'échelle de notre travail, nous avons montré que les interactions cellulaires avaient plus d'importance que la simple quantification des sous-populations de cellules immunitaires. En effet, ces interactions modulent les fonctions des cellules immunitaires et identifient des mécanismes anti-tumoraux particuliers, qui ne peuvent être identifiés à l'échelle de la tumeur. L'utilité de l' I_{ND} CD66b-FoxP3 comme indicateur prédictif de la réponse aux traitements, à la fois de radio-chimiothérapie et d'immunothérapie, est particulièrement intéressant. Il serait pertinent d'en poursuivre l'étude, notamment en précisant le phénotype des cellules en interaction, ceci afin d'identifier des cibles thérapeutiques permettant de moduler l'occurrence de ces interactions.

Etendre les analyses spatiales à d'autres types cellulaires va permettre de mieux comprendre, à l'échelle cellulaire, la complexité de l'environnement immunitaire tumoral et leurs impacts sur la progression tumorale et la réponse thérapeutique.

Bibliographie

- [1] WHO Globocan n.d. <https://gco.iarc.fr/> (accessed August 25, 2022).
- [2] Defossez G. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 – Tumeurs solides n.d.
- [3] Andler R, Guignard R, Spilka S, Le Nézet O, Pasquereau A, Richard J-B, et al. Consommation de tabac et usage de cigarette électronique en France. *Rev Mal Respir* 2018;35:673–85. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.01.008>.
- [4] Panorama des Cancers 2021 2021.
- [5] Pujol J-L, Thomas P-A, Giraud P, Denis MG, Tretarre B, Roch B, et al. Lung Cancer in France. *J Thorac Oncol* 2021;16:21–9. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.09.012>.
- [6] de Koning HJ, van der Aalst CM, de Jong PA, Scholten ET, Nackaerts K, Heuvelmans MA, et al. Reduced Lung-Cancer Mortality with Volume CT Screening in a Randomized Trial. *N Engl J Med* 2020;382:503–13. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911793>.
- [7] Blanchon T, Lukasiewicz-Hajage E, Lemarié E, Milleron B, Bréchet J-M, Flahault le groupe Dépiscan A. Dépiscan, un projet pilote pour évaluer le dépistage du cancer broncho-pulmonaire par le scanner hélicoïdal à faible dose 2002;19:701–5. <https://doi.org/RMR-12-2002-19-6-0761-8425-101019-ART9>.
- [8] Warren GW, Cummings KM. Tobacco and Lung Cancer: Risks, Trends, and Outcomes in Patients with Cancer n.d.:6.
- [9] Whitman DC. The fractions of cancer attributable to modifiable factors: A global review. *Cancer Epidemiol* 2016:19.
- [10] Pleasants RA, Rivera MP, Tilley SL, Bhatt SP. Both Duration and Pack-Years of Tobacco Smoking Should Be Used for Clinical Practice and Research. *Ann Am Thorac Soc* 2020;17:804–6. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.202002-133VP>.
- [11] Tanner NT, Thomas NA, Ward R, Rojewski A, Gebregziabher M, Toll B, et al. Association of Cigarette Type With Lung Cancer Incidence and Mortality: Secondary Analysis of the National Lung Screening Trial. *JAMA Intern Med* 2019;179:1710. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2019.3487>.
- [12] Tindle HA, Stevenson Duncan M, Greevy RA, Vasani RS, Kundu S, Massion PP, et al. Lifetime Smoking History and Risk of Lung Cancer: Results From the Framingham Heart Study. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2018. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy041>.
- [13] Rusmaully J, Tvardik N, Martin D, Billmann R, Cénée S, Antoine M, et al. Risk of lung cancer among women in relation to lifetime history of tobacco smoking: a population-based case-control study in France (the WELCA study). *BMC Cancer* 2021;21:711. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08433-z>.
- [14] Sagerup CMT, Smastuen M, Johannesen TB, Helland A, Brustugun OT. Sex-specific trends in lung cancer incidence and survival: a population study of 40 118 cases. *Thorax* 2011;66:301–7. <https://doi.org/10.1136/thx.2010.151621>.
- [15] Sun Y-Q, Chen Y, Langhammer A, Skorpen F, Wu C, Mai X-M. Passive smoking in relation to lung cancer incidence and histologic types in Norwegian adults: the HUNT study. *Eur Respir J* 2017;50:1700824. <https://doi.org/10.1183/13993003.00824-2017>.
- [16] Olsson AC, Vermeulen R, Schüz J, Kromhout H, Pesch B, Peters S, et al. Exposure–Response Analyses of Asbestos and Lung Cancer Subtypes in a Pooled Analysis of Case–Control Studies: *Epidemiology* 2017;28:288–99. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000604>.
- [17] Tableaux des maladies professionnelles - Cancer du poumon n.d. https://www.inrs.fr/publications/bdd/mp/recherche.html?typeRegime=R&field_activites_nuisances=&field_maladies=cancer+du+poumon&field_numeroCAS=&mot_cles_tableau=&motsCles=&valid_RECHERCHE_MOTSCLES=Rechercher&introspection (accessed May 23, 2022).
- [18] Gharibvand L, Shavlik D, Ghamsary M, Beeson WL, Soret S, Knutsen R, et al. The Association between Ambient Fine Particulate Air Pollution and Lung Cancer Incidence: Results from the AHSMOG-2 Study. *Environ Health Perspect* 2017;125:378–84. <https://doi.org/10.1289/EHP124>.
- [19] Lequy E. Contribution of Long-Term Exposure to Outdoor Black Carbon to the Carcinogenicity of Air Pollution: Evidence regarding Risk of Cancer in the Gazel Cohort. *Environ Health Perspect* 2021:11.
- [20] Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol* 2013;14:813–22. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70279-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70279-1).
- [21] Ou JY, Fowler B, Ding Q, Kirchhoff AC, Pappas L, Boucher K, et al. A statewide investigation of geographic lung cancer incidence patterns and radon exposure in a low-smoking population. *BMC Cancer* 2018;18:115. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4002-9>.

- [22] Coté ML, Liu M, Bonassi S, Neri M, Schwartz AG, Christiani DC, et al. Increased risk of lung cancer in individuals with a family history of the disease: A pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Eur J Cancer* 2012;48:1957–68. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.01.038>.
- [23] Jonsson S. Familial Risk of Lung Carcinoma in the Icelandic Population. *JAMA* 2004;292:2977. <https://doi.org/10.1001/jama.292.24.2977>.
- [24] Hjelmberg J, Korhonen T, Holst K, Skytthe A, Pukkala E, Kutschke J, et al. Lung cancer, genetic predisposition and smoking: the Nordic Twin Study of Cancer. *Thorax* 2017;72:1021–7. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207921>.
- [25] Donin N, Filson C, Drakaki A, Tan H-J, Castillo A, Kwan L, et al. Risk of second primary malignancies among cancer survivors in the United States, 1992 through 2008: Second Primary Malignancies in the US. *Cancer* 2016;122:3075–86. <https://doi.org/10.1002/cncr.30164>.
- [26] Shukuya T, Takahashi K. Germline mutations in lung cancer. *Respir Investig* 2019;57:201–6. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2018.12.005>.
- [27] Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. TNM classification of malignant tumours. Eighth edition. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2017.
- [28] Dettnerbeck FC. The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2018;155:356–9. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2017.08.138>.
- [29] Lababede O. The Eighth Edition of TNM Staging of Lung Cancer: Reference Chart and Diagrams 2018:5.
- [30] Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016;11:39–51. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009>.
- [31] Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol* 2022;17:362–87. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.11.003>.
- [32] Pass HI, Ball D, Scagliotti GV, editors. IASLC thoracic oncology. Second edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018.
- [33] NIH. SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2012 n.d. https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2012/browse_csr.php?sectionSEL=15&pageSEL=sect_15_table.04.
- [34] Zamay T, Zamay G, Kolovskaya O, Zukov R, Petrova M, Gargaun A, et al. Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer. *Cancers* 2017;9:155. <https://doi.org/10.3390/cancers9110155>.
- [35] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011;6:244–85. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318206a221>.
- [36] Osmani L, Askin F, Gabrielson E, Li QK. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Semin Cancer Biol* 2018;52:103–9. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.11.019>.
- [37] Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol* 2011;24:1348–59. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.92>.
- [38] Bishop JA, Sharma R, Illei PB. Napsin A and thyroid transcription factor-1 expression in carcinomas of the lung, breast, pancreas, colon, kidney, thyroid, and malignant mesothelioma. *Hum Pathol* 2010;41:20–5. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.06.014>.
- [39] Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N. p40 (Δ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 2012;25:405–15. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.173>.
- [40] Nobre AR, Albergaria A, Schmitt F. p40: A p63 Isoform Useful for Lung Cancer Diagnosis - A Review of the Physiological and Pathological Role of p63. *Acta Cytol* n.d.:8.
- [41] Gurda GT, Zhang L, Wang Y, Chen L, Geddes S, Cho WC, et al. Utility of five commonly used immunohistochemical markers TTF-1, Napsin A, CK7, CK5/6 and P63 in primary and metastatic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: a retrospective study of 246 fine needle aspiration cases. *Clin Transl Med* 2015;4. <https://doi.org/10.1186/s40169-015-0057-2>.
- [42] Eguchi T, Kadota K, Park BJ, Travis WD, Jones DR, Adusumilli PS. The New IASLC-ATS-ERS Lung Adenocarcinoma Classification: What the Surgeon Should Know. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2014;26:210–22. <https://doi.org/10.1053/j.semtcvs.2014.09.002>.

- [43] Mansuet-Lupo A, Bobbio A, Blons H, Becht E, Ouakrim H, Didelot A, et al. The New Histologic Classification of Lung Primary Adenocarcinoma Subtypes Is a Reliable Prognostic Marker and Identifies Tumors With Different Mutation Status n.d.:633–43.
- [44] Warth A, Muley T, Meister M, Stenzinger A, Thomas M, Schirmacher P, et al. The Novel Histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification System of Lung Adenocarcinoma Is a Stage-Independent Predictor of Survival. *J Clin Oncol* n.d.:9.
- [45] Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol* 2011:12.
- [46] Woo T, Okudela K, Mitsui H, Tajiri M, Yamamoto T, Rino Y, et al. Prognostic value of the IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma in stage I disease of Japanese cases. *Pathol Int* 2012:7.
- [47] Tsao M-S, Marguet S, Teuff GL, Lantuejoul S, Shepherd FA, Seymour L, et al. Subtype Classification of Lung Adenocarcinoma Predicts Benefit From Adjuvant Chemotherapy in Patients Undergoing Complete Resection. *J Clin Oncol* 2015:10.
- [48] Lackey A, Donington JS. Surgical Management of Lung Cancer n.d.:30:8.
- [49] Pignon J-P, Arriagada R. A Meta-Analysis of Thoracic Radiotherapy for Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 1992:1618–24.
- [50] Olausson KA, Postel-Vinay S. Predictors of chemotherapy efficacy in non-small-cell lung cancer: a challenging landscape. *Ann Oncol* 2016;27:2004–16. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw321>.
- [51] Pignon J-P, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard J-Y, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation: A Pooled Analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol* 2008;26:3552–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.9030>.
- [52] Timothy W, Robert L, David J, James R, Michael J, Charles B, et al. Vinorelbine plus Cisplatin vs. Observation in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2005:9.
- [53] Depierre A, Milleron B, Moro-Sibilot D, Chevret S, Quoix E, Lebeau B, et al. Preoperative Chemotherapy Followed by Surgery Compared With Primary Surgery in Resectable Stage I (Except T1N0), II, and IIIa Non-Small-Cell Lung Cancer n.d.:7.
- [54] Ziel E. Survival Benefit of Surgery after Chemoradiotherapy for Stage III (N0–2) Non-Small-Cell Lung Cancer Is Dependent on Pathologic Nodal Response. *J Thorac Oncol* 2015;10:6.
- [55] Gilligan D, Nicolson M, Smith I, Groen H, Dalesio O, Goldstraw P, et al. Preoperative chemotherapy in patients with resectable non-small cell lung cancer: results of the MRC LU22/NVALT 2/EORTC 08012 multicentre randomised trial and update of systematic review 2007;369:9.
- [56] Hung M-S, Wu Y-F, Chen Y-C. Efficacy of chemoradiotherapy versus radiation alone in patients with inoperable locally advanced non-small-cell lung cancer: A meta-analysis and systematic review. *Medicine (Baltimore)* 2019;98:e16167. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016167>.
- [57] Miller ED. The Addition of Chemotherapy to Radiation Therapy Improves Survival in Elderly Patients with Stage III Non-Small Cell Lung Cancer 2018;13:10.
- [58] Ferreira CG, Zalis M, Reis M, Schluckebier L, Montella T. PUB070 Rare Actionable Mutations in a Lung Adenocarcinoma Cohort in Brazil. *J Thorac Oncol* 2017;12:S2388–9. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.09.1933>.
- [59] Chen R, Manochakian R, James L, Azzouqa A-G, Shi H, Zhang Y, et al. Emerging therapeutic agents for advanced non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* 2020;13:58. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00881-7>.
- [60] Majeed U. Targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer: current advances and future trends 2021:20.
- [61] Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, et al. Osimertinib in Untreated *EGFR* -Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2018;378:113–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1713137>.
- [62] Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in *ALK* -Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2014;371:2167–77. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408440>.
- [63] Bergethon K, Shaw AT, Ignatius Ou S-H, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. *ROS1* Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *J Clin Oncol* 2012;30:863–70. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.6345>.
- [64] Calles A, Riess JW, Brahmer JR. Checkpoint Blockade in Lung Cancer With Driver Mutation: Choose the Road Wisely. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2020:372–84. https://doi.org/10.1200/EDBK_280795.
- [65] Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 2019;19:495–509. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0179-8>.

- [66] Rodak O, Peris-Díaz MD, Olbromski M, Podhorska-Okołów M, Dzięgiel P. Current Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Histological Classification, Targeted Therapies, and Immunotherapy. *Cancers* 2021;13:4705. <https://doi.org/10.3390/cancers13184705>.
- [67] Walsh RJ, Soo RA. Resistance to immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: biomarkers and therapeutic strategies. *Ther Adv Med Oncol* n.d.:22.
- [68] Kinoshita T, Terai H, Yaguchi T. Clinical Efficacy and Future Prospects of Immunotherapy in Lung Cancer. *Life* 2021;11:1029. <https://doi.org/10.3390/life11101029>.
- [69] Upadhaya S. Challenges and opportunities in the PD1/PDL1 inhibitor clinical trial landscape n.d.:2.
- [70] Ramamurthy D, Nundalall T, Cingo S, Mungra N, Karaan M, Naran K, et al. Recent advances in immunotherapies against infectious diseases. *Immunother Adv* 2021;1:Itaa007. <https://doi.org/10.1093/imadv/Itaa007>.
- [71] Li W, Song P, Guo L, Liu X, Guo C, Ying J, et al. Clinical significance of $\geq 50\%$ PD-L1 expression with the SP263 monoclonal antibody in non-small cell lung cancer patients. *Thorac Cancer* 2018;8.
- [72] de Ruiter EJ, Mulder FJ, Koomen BM, Speel E-J, van den Hout MFCM, de Roest RH, et al. Comparison of three PD-L1 immunohistochemical assays in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Mod Pathol* 2021;34:1125–32. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0644-7>.
- [73] Shields MD, Marin-Acevedo JA, Pellini B. Immunotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Decade of Progress. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2021:e105–27. https://doi.org/10.1200/EDBK_321483.
- [74] Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016;375:1823–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>.
- [75] Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015;372:2018–28. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501824>.
- [76] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2443–54. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>.
- [77] Forde PM, Spicer J, Lu S, Provencio M, Mitsudomi T, Awad MM, et al. Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med* 2022;386:1973–85. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2202170>.
- [78] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Five-Year Survival and Correlates Among Patients With Advanced Melanoma, Renal Cell Carcinoma, or Non-Small Cell Lung Cancer Treated With Nivolumab. *JAMA Oncol* 2019;5:1411. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.2187>.
- [79] Doroshow DB, Sanmamed MF, Hastings K, Politi K, Rimm DL, Chen L, et al. Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res* 2019;25:4592–602. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1538>.
- [80] Adam J, Le Stang N, Rouquette I, Cazes A, Badoual C, Pinot-Roussel H, et al. Multicenter harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2018;29:953–8. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy014>.
- [81] Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 2017;168:707–23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>.
- [82] Schoenfeld AJ, Hellmann MD. Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Cell* 2020;37:443–55. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.017>.
- [83] Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, Zurawski B, Kim S-W, Carcereny Costa E, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2019;381:2020–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910231>.
- [84] Grant MJ, Herbst RS, Goldberg SB. Selecting the optimal immunotherapy regimen in driver-negative metastatic NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18:625–44. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00520-1>.
- [85] Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017;28:iv1–21. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx222>.
- [86] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science* 2013;339:1546–58. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>.
- [87] Domazet-Lošo T, Tautz D. RPEhseyrclhoasrtitclreatigraphic tracking of cancer genes suggests a link to the emergence of multicellularity in metazoa 2010:10.
- [88] Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, Chatila WK, Luna A, La KC, et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* 2018;173:321–337.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.035>.
- [89] Kzma R, Babron M-C, Gaborieau V, Génin E, Brennan P, Hung RJ, et al. Lung cancer and DNA repair genes: multilevel association analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Carcinogenesis* 2012;33:1059–64. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs116>.

- [90] Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat Genet* 2013;45:1127–33. <https://doi.org/10.1038/ng.2762>.
- [91] Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005;24:2899–908. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208615>.
- [92] Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008;455:1069–75. <https://doi.org/10.1038/nature07423>.
- [93] Imperial R, Toor OM, Hussain A, Subramanian J, Masood A. Comprehensive pancancer genomic analysis reveals (RTK)-RAS-RAF-MEK as a key dysregulated pathway in cancer: Its clinical implications. *Semin Cancer Biol* 2019;54:14–28. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.11.016>.
- [94] Samatar AA, Poulidakos PI. Targeting RAS–ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:928–42. <https://doi.org/10.1038/nrd4281>.
- [95] Campbell JD, Lathan C, Sholl L, Ducar M, Vega M, Sunkavalli A, et al. Comparison of Prevalence and Types of Mutations in Lung Cancers Among Black and White Populations. *JAMA Oncol* 2017;3:801. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.6108>.
- [96] Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:671–88. <https://doi.org/10.1038/nrd2062>.
- [97] Coutte L, Dreyer C, Sablin M-P, Faivre S, Raymond É. Rôle de la voie PI3K-AKT-mTOR dans le cancer et les thérapies antitumorales. *Bull Cancer (Paris)* 2012;99:173–80. <https://doi.org/10.1684/bdc.2011.1384>.
- [98] Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022;23:74–88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>.
- [99] Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;100:57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- [100] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;144:646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [101] Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022;12:31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- [102] Burnet FM. The Concept of Immunological Surveillance. In: Schwartz RS, editor. *Prog. Tumor Res.*, vol. 13, S. Karger AG; 1970, p. 1–27. <https://doi.org/10.1159/000386035>.
- [103] Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity 2001;410:5.
- [104] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity’s Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 2011;331:1565–70. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>.
- [105] The TRACERx consortium, Rosenthal R, Cadieux EL, Salgado R, Bakir MA, Moore DA, et al. Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution. *Nature* 2019;567:479–85. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1032-7>.
- [106] Wagner M. Cancer Immunoediting by Innate Lymphoid Cells n.d.:16.
- [107] Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007;450:903–7. <https://doi.org/10.1038/nature06309>.
- [108] Borroni EM, Grizzi F. Cancer Immunoediting and beyond in 2021. *Int J Mol Sci* 2021;22:13275. <https://doi.org/10.3390/ijms222413275>.
- [109] Beatty GL, Gladney WL. Immune Escape Mechanisms as a Guide for Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2015;21:687–92. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1860>.
- [110] Lee SH, Shin MS, Park WS, Kim SY, Kim HS, Han JY, et al. Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in non-small cell lung cancer n.d.:7.
- [111] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860–7. <https://doi.org/10.1038/nature01322>.
- [112] Josephs SF, Ichim TE, Prince SM, Kesari S, Marincola FM, Escobedo AR, et al. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. *J Transl Med* 2018;16:242. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1611-7>.
- [113] Shen J, Xiao Z, Zhao Q, Li M, Wu X, Zhang L, et al. Anti-cancer therapy with TNF α and IFN γ : A comprehensive review. *Cell Prolif* 2018;51:e12441. <https://doi.org/10.1111/cpr.12441>.
- [114] Benci JL, Xu B, Qiu Y, Wu TJ, Dada H, Twyman-Saint Victor C, et al. Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell* 2016;167:1540-1554.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.022>.
- [115] Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res* 2020;8:49. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>.
- [116] Colak S, ten Dijke P. Targeting TGF- β Signaling in Cancer. *Trends Cancer* 2017;3:56–71. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.11.008>.

- [117] Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin C-H. Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 2002;7.
- [118] Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 2018;9:7204–18. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>.
- [119] Man SM. Context-dependent functions of pattern recognition receptors in cancer n.d.:17.
- [120] Aguilar-Cazares D, Chavez-Dominguez R, Carlos-Reyes A, Lopez-Camarillo C, Hernandez de la Cruz ON, Lopez-Gonzalez JS. Contribution of Angiogenesis to Inflammation and Cancer. *Front Oncol* 2019;9:1399. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01399>.
- [121] Liu T. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2017;9.
- [122] Greten FR, Grivnenkov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* 2019;51:27–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>.
- [123] Pandey S, Singh S, Anang V, Bhatt AN, Natarajan K, Dwarakanath BS. Pattern Recognition Receptors in Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Growth Metastasis* 2015;8:CGM.S24314. <https://doi.org/10.4137/CGM.S24314>.
- [124] Saman H, Raza SS, Uddin S, Rasul K. Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches. *Cancers* 2020;12:1172. <https://doi.org/10.3390/cancers12051172>.
- [125] Ansari MJ, Bokov D, Markov A, Jalil AT, Shalaby MN, Suksatan W, et al. Cancer combination therapies by angiogenesis inhibitors; a comprehensive review. *Cell Commun Signal* 2022;20:49. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00838-y>.
- [126] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721–32. <https://doi.org/10.1038/nrc1187>.
- [127] Mizukami Y, Kohgo Y, Chung DC. Hypoxia Inducible Factor-1 α Independent Pathways in Tumor Angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2007;5.
- [128] Landskron G, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. *J Immunol Res* n.d.:20.
- [129] Choi B-J, Park S-A, Lee S-Y, Cha YN, Surh Y-J. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells through ubiquitin-specific protease 47-mediated stabilization of Snail: A potential role of Sox9. *Sci Rep* 2017;7:15918. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15139-5>.
- [130] Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112:1776–84. <https://doi.org/10.1172/JCI200320530>.
- [131] Schliekelman MJ, Taguchi A, Zhu J, Dai X, Rodriguez J, Celiktas M, et al. Molecular Portraits of Epithelial, Mesenchymal, and Hybrid States in Lung Adenocarcinoma and Their Relevance to Survival. *Cancer Res* 2015;75:1789–800. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2535>.
- [132] Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;20:69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>.
- [133] Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol* 2019;29:212–26. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>.
- [134] Liu Q. Factors involved in cancer metastasis: a better understanding to “seed and soil” hypothesis 2017:19.
- [135] Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 2009;1796:293–308. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.07.006>.
- [136] Albert ML, Pearce SFA, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, et al. Immature Dendritic Cells Phagocytose Apoptotic Cells via α v β 5 and CD36, and Cross-present Antigens to Cytotoxic T Lymphocytes n.d.:10.
- [137] Kim MK, Kim J. Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *RSC Adv* 2019;9:11230–8. <https://doi.org/10.1039/C9RA00818G>.
- [138] Dudek AM, Martin S, Garg AD, Agostinis P. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Front Immunol* 2013;4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00438>.
- [139] Gardner A, Ruffell B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol* 2016;37:855–65. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.09.006>.
- [140] Piqueras B, Connolly J, Freitas H, Palucka AK, Banchereau J. Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood* 2006;107:2613–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2965>.
- [141] Takamura K, Fukuyama S, Nagatake T, Kim D-Y, Kawamura A, Kawauchi H, et al. Regulatory Role of Lymphoid Chemokine CCL19 and CCL21 in the Control of Allergic Rhinitis. *J Immunol* 2007;179:5897–906. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.5897>.
- [142] Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev* 2018;32:1267–84. <https://doi.org/10.1101/gad.314617.118>.

- [143] Xue J. Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation n.d.:15.
- [144] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes 2002:7.
- [145] Gao L, Wang F, Li H, Yang J, Ren J-G, He K, et al. CCL2/EGF positive feedback loop between cancer cells and macrophages promotes cell migration and invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016;7:87037–51. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13523>.
- [146] Schmid MC, Khan SQ, Kaneda MM, Pathria P, Shepard R, Louis TL, et al. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. *Nat Commun* 2018;9:5379. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07387-4>.
- [147] Jayasingam SD, Citartan M, Thang TH, Mat Zin AA, Ang KC, Ch'ng ES. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front Oncol* 2020;9:1512. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01512>.
- [148] Powell D, Tazuin S, Hind LE, Deng Q, Beebe DJ, Huttenlocher A. Chemokine Signaling and the Regulation of Bidirectional Leukocyte Migration in Interstitial Tissues. *Cell Rep* 2017;19:1572–85. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.078>.
- [149] McKenna E, Mhaonaigh AU, Wubben R, Dwivedi A, Hurley T, Kelly LA, et al. Neutrophils: Need for Standardized Nomenclature. *Front Immunol* 2021;12:14.
- [150] Shen M, Hu P, Donskov F, Wang G, Liu Q, Du J. Tumor-Associated Neutrophils as a New Prognostic Factor in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2014;9:e98259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098259>.
- [151] Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 2012;33:949–55. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs123>.
- [152] Eruslanov EB. Phenotype and function of tumor-associated neutrophils and their subsets in early-stage human lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2017;66:997–1006. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-1976-0>.
- [153] Wang X, Qiu L, Li Z, Wang X-Y, Yi H. Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 2018;9:2456. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02456>.
- [154] Michaeli J. Tumor-associated neutrophils induce apoptosis of non-activated CD8 T-cells in a TNF α and NO-dependen n.d.:13.
- [155] Masucci MT. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front Oncol* 2019;9:16.
- [156] Yachimovich-Cohen N, Even-Ram S, Shufaro Y, Rachmilewitz J, Reubinoff B. Human Embryonic Stem Cells Suppress T Cell Responses via Arginase I-Dependent Mechanism. *J Immunol* n.d.:10.
- [157] Saraiva DP, Correia BF, Salvador R, de Sousa N, Braga S, Cabral MG. Circulating low density neutrophils of breast cancer patients are associated with their worse prognosis due to the impairment of T cell responses n.d.:16.
- [158] Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2018;18:134–47. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>.
- [159] Arpinati L, Shaul ME, Kaisar-Iluz N, Mali S, Mahroum S, Fridlender ZG. NETosis in cancer: a critical analysis of the impact of cancer on neutrophil extracellular trap (NET) release in lung cancer patients vs. mice. *Cancer Immunol Immunother* 2020;69:199–213. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02474-x>.
- [160] Sagiv JY. Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer n.d.:13.
- [161] Condamine T, Dominguez GA, Youn J-I, Kossenkov AV, Mony S, Alicea-Torres K, et al. Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol* 2016;1. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaf8943>.
- [162] Chai E, Zhang L, Li C. LOX-1+ PMN-MDSC enhances immune suppression which promotes glioblastoma multiforme progression. *Cancer Manag Res* 2019;Volume 11:7307–15. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S210545>.
- [163] Kargl J, Zhu X, Zhang H, Yang GHY, Friesen TJ, Shipley M, et al. Neutrophil content predicts lymphocyte depletion and anti-PD1 treatment failure in NSCLC. *JCI Insight* 2019;4:e130850. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.130850>.
- [164] Valadez-Cosmes P. Identification of Novel Low-Density Neutrophil Markers Through Unbiased High-Dimensional Flow Cytometry Screening in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Front Immunol* 2021;12:11.
- [165] Harbaum L, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Bokemeyer C, Langner C. Peritumoral eosinophils predict recurrence in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2015;28:403–13. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.104>.
- [166] Molin D, Glimelius B, Sundström C, Venge P, Enblad G. The Serum Levels of Eosinophil Cationic Protein (ECP) Are Related to the Infiltration of Eosinophils in the Tumours of Patients with Hodgkin's Disease n.d.:9.

- [167] Varricchi G. Eosinophils: The unsung heroes in cancer? n.d.:14.
- [168] Bax HJ, Chauhan J, Stavrika C, Khiabany A, Nakamura M, Pellizzari G, et al. Basophils from Cancer Patients Respond to Immune Stimuli and Predict Clinical Outcome. *Cells* 2020;9:1631. <https://doi.org/10.3390/cells9071631>.
- [169] Lavin Y. Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses n.d.:34.
- [170] Sektioglu IM, Carretero R, Bulbuc N, Bald T, Tüting T, Rudensky AY, et al. Basophils Promote Tumor Rejection via Chemotaxis and Infiltration of CD8+ T Cells. *Cancer Res* 2017;77:291–302. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0993>.
- [171] Hayes MD, Ward S, Crawford G, Seoane RC, Jackson WD, Kipling D, et al. Inflammation-induced IgE promotes epithelial hyperplasia and tumour growth. *ELife* 2020;9:e51862. <https://doi.org/10.7554/eLife.51862>.
- [172] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22:633–40. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02060-9).
- [173] Quamine AE, Olsen MR, Cho MM, Capitini CM. Approaches to Enhance Natural Killer Cell-Based Immunotherapy for Pediatric Solid Tumors. *Cancers* 2021;13:2796. <https://doi.org/10.3390/cancers13112796>.
- [174] Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells 2011;331:7.
- [175] Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2017;8:1124. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01124>.
- [176] Kärre K. Natural killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol* 2008;9:477–80. <https://doi.org/10.1038/ni0508-477>.
- [177] Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris A, Gatter K. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer* 1996;73:148–53. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.28>.
- [178] Dhatchinamoorthy K, Colbert JD, Rock KL. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Front Immunol* 2021;12:636568. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.636568>.
- [179] Cremer I, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Tumor microenvironment in NSCLC suppresses NK cells function. *OncoImmunology* 2012;1:244–6. <https://doi.org/10.4161/onci.1.2.18309>.
- [180] Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 2013;39:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>.
- [181] Marin-Acevedo JA. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges 2018:20.
- [182] Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-Mediated Inhibition in Regulation of T Cell Responses: Mechanisms and Manipulation in Tumor Immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2001;19:565–94. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.565>.
- [183] Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu Rev Immunol* 2016;34:539–73. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112049>.
- [184] Goldberg MV, Drake CG. LAG-3 in Cancer Immunotherapy. In: Dranoff G, editor. *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 344, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010, p. 269–78. https://doi.org/10.1007/82_2010_114.
- [185] Das M, Zhu C, Kuchroo VK. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol Rev* 2017;276:97–111. <https://doi.org/10.1111/imr.12520>.
- [186] Chauvin J-M, Zarour HM. TIGIT in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2020;8:e000957. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000957>.
- [187] Fathman CG, Lineberry NB. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol* 2007;7:599–609. <https://doi.org/10.1038/nri2131>.
- [188] Chen YM, Yang WK, Whang-Peng J, Tsai WY, Hung YM, Yang DM, et al. Restoration of the immunocompetence by IL-2 activation and TCR-CD3 engagement of the in vivo anergized tumor-specific CTL from lung cancer patients. *J Immunother Hagerstown Md* 1997 1997;20:354–64. <https://doi.org/10.1097/00002371-199709000-00004>.
- [189] Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011;12:8.
- [190] Wherry EJ. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion n.d.:14.
- [191] Jiang Y. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis* n.d.:9.
- [192] Belk JA, Yao W, Ly N, Freitas KA, Chen Y-T, Shi Q, et al. Genome-wide CRISPR screens of T cell exhaustion identify chromatin remodeling factors that limit T cell persistence. *Cancer Cell* 2022;40:768–786.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.06.001>.
- [193] Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* 2018;48:202–13. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>.

- [194] Klein L, Hinterberger M, Wirsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 2009;9:833–44. <https://doi.org/10.1038/nri2669>.
- [195] Jung D, Alt FW. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 2004;116:299–311. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00039-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00039-x).
- [196] Golstein P, Griffiths GM. An early history of T cell-mediated cytotoxicity. *Nat Rev Immunol* 2018;18:527–35. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0009-3>.
- [197] Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I. Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 2021;124:359–67. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01048-4>.
- [198] Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787–93. <https://doi.org/10.1038/383787a0>.
- [199] Ivanova EA, Orekhov AN. T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. *BioMed Res Int* 2015;2015:1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/327470>.
- [200] Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function n.d.:13.
- [201] Alizadeh D, Katsanis E, Larmonier N. The Multifaceted Role of Th17 Lymphocytes and Their Associated Cytokines in Cancer. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/957878>.
- [202] Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>.
- [203] Zhuang Y, Peng L, Zhao Y, Shi Y, Mao X, Guo G, et al. Increased intratumoral IL-22-producing CD4+ T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival. *Cancer Immunol Immunother* 2012;11.
- [204] Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity* 2013;39:782–95. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.003>.
- [205] Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* 2019;50:1132–48. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.011>.
- [206] Basu A, Ramamoorthi G, Albert G, Gallen C, Beyer A, Snyder C, et al. Differentiation and Regulation of TH Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2021;12:669474. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669474>.
- [207] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing 11-2 Receptor α -Chains (CD25) n.d.:15.
- [208] Hatzioannou A, Boumpas A, Papadopoulou M, Papafragkos I, Varveri A, Alissafi T, et al. Regulatory T Cells in Autoimmunity and Cancer: A Duplicious Lifestyle. *Front Immunol* 2021;12:731947. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.731947>.
- [209] Okeke EB, Uzonna JE. The Pivotal Role of Regulatory T Cells in the Regulation of Innate Immune Cells. *Front Immunol* 2019;10:680. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00680>.
- [210] Rocamora-Reverte L, Melzer FL, Würzner R, Weinberger B. The Complex Role of Regulatory T Cells in Immunity and Aging. *Front Immunol* 2021;11:616949. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.616949>.
- [211] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330–6. <https://doi.org/10.1038/ni904>.
- [212] Weber SE, Harbertson J, Godebu E, Mros A, Padrick RC, Carson BD, et al. Adaptive Islet-Specific Regulatory CD4 T Cells Control Autoimmune Diabetes and Mediate the Disappearance of Pathogenic Th1 Cells In Vivo. *J Immunol* n.d.:11.
- [213] Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-regulatory cells. *Immunol Cell Biol* 2018;96:21–33. <https://doi.org/10.1111/imcb.1003>.
- [214] Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work 2009:20.
- [215] Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007;8:1353–62. <https://doi.org/10.1038/ni1536>.
- [216] Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Heßling S, Palmethofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007;204:1303–10. <https://doi.org/10.1084/jem.20062129>.
- [217] Sobhani N, Tardiel-Cyril DR, Davtyan A, Generali D, Roudi R, Li Y. CTLA-4 in Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. *Cancers* 2021;13:1440. <https://doi.org/10.3390/cancers13061440>.
- [218] Jarnicki AG, Lysaght J, Todryk S, Mills KHG. Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF- β -Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4+ and CD8+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 2006;177:896–904. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.896>.
- [219] Hatanaka H, Abe Y, Kamiya T, Morino F, Nagata J, Tokunaga T, et al. Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2000;11:815–9. <https://doi.org/10.1023/A:1008375208574>.

- [220] Hayday AC. $\gamma\delta$ Cells: A Right Time and a Right Place for a Conserved Third Way of Protection. *Annu Rev Immunol* 2000;18:975–1026. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.975>.
- [221] Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* 2015;21:938–45. <https://doi.org/10.1038/nm.3909>.
- [222] Wu Y. A local human V δ 1 T cell population is associated with survival in nonsmall-cell lung cancer 2022;3:28.
- [223] Kakimi K, Matsushita H, Murakawa T, Nakajima J. $\gamma\delta$ T cell therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2014;3:11.
- [224] Deng J, Yin H. Gamma delta ($\gamma\delta$) T cells in cancer immunotherapy; where it comes from, where it will go? *Eur J Pharmacol* 2022;919:174803. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174803>.
- [225] Calame KL. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol* 2001;2:1103–8. <https://doi.org/10.1038/ni1201-1103>.
- [226] LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function 2008;112:11.
- [227] Luning Prak ET, Monestier M, Eisenberg RA. B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity: B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1217:96–121. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05877.x>.
- [228] Laumont CM. Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities n.d.:17.
- [229] Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15:160–71. <https://doi.org/10.1038/nri3795>.
- [230] Gottlin EB, Bentley RC, Campa MJ, Pisetsky DS, Herndon JE, Patz EF. The Association of Intratumoral Germinal Centers with Early-Stage Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2011;6:1687–90. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182217bec>.
- [231] Dieu-Nosjean M-C, Goc J, Giraldo NA, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol* 2014;35:571–80. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.09.006>.
- [232] Kurebayashi Y, Emoto K, Hayashi Y, Kamiyama I, Ohtsuka T, Asamura H, et al. Comprehensive Immune Profiling of Lung Adenocarcinomas Reveals Four Immunotypes with Plasma Cell Subtype a Negative Indicator. *Cancer Immunol Res* 2016;4:234–47. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0214>.
- [233] Patel AJ, Richter A, Drayson MT, Middleton GW. The role of B lymphocytes in the immuno-biology of non-small-cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2020;69:325–42. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02461-2>.
- [234] Sharonov GV, Serebrovskaya EO, Yuzhakova DV, Britanova OV, Chudakov DM. B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2020;20:294–307. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0257-x>.
- [235] Inoue S, Leitner WW, Golding B, Scott D. Inhibitory Effects of B Cells on Antitumor Immunity. *Cancer Res* 2006;66:7741–7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3766>.
- [236] Qin Z, Richter G, Schüler T, Ibe S, Cao X, Blankenstein T. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med* 1998;4:627–30. <https://doi.org/10.1038/nm0598-627>.
- [237] Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012;12:298–306. <https://doi.org/10.1038/nrc3245>.
- [238] Fridman WH, Galon J, Pagès F, Tartour E, Sautès-Fridman C, Kroemer G. Prognostic and Predictive Impact of Intra- and Peritumoral Immune Infiltrates. *Cancer Res* 2011;71:5601–5. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1316>.
- [239] Galon J, Fridman W-H, Pagès F. The Adaptive Immunologic Microenvironment in Colorectal Cancer: A Novel Perspective. *Cancer Res* 2007;67:1883–6. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4806>.
- [240] Briukhovetska D, Dörr J, Endres S, Libby P, Dinarello CA, Kobold S. Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat Rev Cancer* 2021;21:481–99. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00363-z>.
- [241] Parra ER, Ferrufino-Schmidt MC, Tamegnon A, Zhang J, Solis L, Jiang M, et al. Immuno-profiling and cellular spatial analysis using five immune oncology multiplex immunofluorescence panels for paraffin tumor tissue. *Sci Rep* 2021;11:8511. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88156-0>.
- [242] Stankovic B, Bjørhovde HAK, Skarshaug R, Aamodt H, Frafjord A, Müller E, et al. Immune Cell Composition in Human Non-small Cell Lung Cancer. *Front Immunol* 2019;9:3101. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03101>.
- [243] Germain C, Gnjjatic S, Tamzalit F, Knockaert S, Remark R, Goc J, et al. Presence of B Cells in Tertiary Lymphoid Structures Is Associated with a Protective Immunity in Patients with Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:832–44. <https://doi.org/10.1164/rccm.201309-1611OC>.
- [244] Bruni D, Angell HK, Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer* 2020;20:662–80. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0285-7>.

- [245] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* 2006;313:1960–4. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>.
- [246] Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer* 2016;4:59. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0165-6>.
- [247] Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients With Early-Stage Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:5944–51. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.6147>.
- [248] Feichtenbeiner A, Haas M, Büttner M, Grabenbauer GG, Fietkau R, Distel LV. Critical role of spatial interaction between CD8+ and Foxp3+ cells in human gastric cancer: the distance matters. *Cancer Immunol Immunother* 2014;63:111–9. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1491-x>.
- [249] Kim K-J, Lee KS, Cho HJ, Kim YH, Yang HK, Kim WH, et al. Prognostic implications of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells and CD8+ cytotoxic T cells in microsatellite-unstable gastric cancers. *Hum Pathol* 2014;45:285–93. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.09.004>.
- [250] Yao W, He J, Yang Y, Wang J, Yang T. Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep* n.d.:11.
- [251] Gartrell RD, Marks DK, Hart TD, Li G, Davari DR, Wu A, et al. Quantitative Analysis of Immune Infiltrates in Primary Melanoma. *Cancer Immunol Res* 2018;6:481–93. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0360>.
- [252] Schulze AB, Evers G, Görlich D, Mohr M, Marra A, Hillejan L, et al. Tumor infiltrating T cells influence prognosis in stage I–III non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 2020;12:1824–42. <https://doi.org/10.21037/jtd-19-3414a>.
- [253] Donnem T, Hald SM, Paulsen E-E, Richardsen E, Al-Saad S, Kilvaer TK, et al. Stromal CD8+ T-cell Density—A Promising Supplement to TNM Staging in Non–Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:2635–43. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1905>.
- [254] Goc J, Germain C, Vo-Bourgais TKD, Lupo A, Klein C, Knockaert S, et al. Dendritic Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Signal a Th1 Cytotoxic Immune Contexture and License the Positive Prognostic Value of Infiltrating CD8+ T Cells. *Cancer Res* 2014;74:705–15. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1342>.
- [255] Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orihara S, Aizawa M, et al. Proliferative Activity of Intratumoral CD8⁺ T-Lymphocytes As a Prognostic Factor in Human Renal Cell Carcinoma: Clinicopathologic Demonstration of Antitumor Immunity n.d.:5.
- [256] Dieu-Nosjean M-C, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, et al. Long-Term Survival for Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer With Intratumoral Lymphoid Structures. *J Clin Oncol* 2008;26:4410–7. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0284>.
- [257] Wang S. Tumor-infiltrating B cells: their role and application in anti-tumor immunity in lung cancer. *Mol Immunol* 2019:13.
- [258] Broz ML, Binnewies M, Boldajipour B, Nelson AE, Pollack JL, Erle DJ, et al. Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell* 2014;26:638–52. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.007>.
- [259] Aloe C, Wang H, Vlahos R, Irving L, Steinfurt D, Bozinovski S. Emerging and multifaceted role of neutrophils in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2021;10:2806–18. <https://doi.org/10.21037/tlcr-20-760>.
- [260] Tamminga M, Hiltermann TJN, Schuurings E, Timens W, Fehrmann RS, Groen HJ. Immune microenvironment composition in non-small cell lung cancer and its association with survival. *Clin Transl Immunol* 2020;9. <https://doi.org/10.1002/cti2.1142>.
- [261] Ocana A, Nieto-Jiménez C, Pandiella A, Templeton AJ. Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies. *Mol Cancer* 2017;16:137. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0707-7>.
- [262] Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, et al. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2014;106. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju124>.
- [263] Donskov F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. *Semin Cancer Biol* 2013;23:200–7. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.02.001>.
- [264] Jamiyan T, Kuroda H, Yamaguchi R, Abe A, Hayashi M. CD68- and CD163-positive tumor-associated macrophages in triple negative cancer of the breast. *Virchows Arch* 2020;477:767–75. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02855-z>.
- [265] Tremble LF, McCabe M, Walker SP, McCarthy S, Tynan RF, Beecher S, et al. Differential association of CD68+ and CD163+ macrophages with macrophage enzymes, whole tumour gene expression and overall survival in advanced melanoma. *Br J Cancer* 2020;123:1553–61. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01037-7>.
- [266] Mei J, Xiao Z, Guo C, Pu Q, Ma L, Lin F, et al. Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in n.d.:12.

- [267] Dong P, Ma L, Liu L, Zhao G, Zhang S, Dong L, et al. CD86+/CD206+, Diametrically Polarized Tumor-Associated Macrophages, Predict Hepatocellular Carcinoma Patient Prognosis. *Int J Mol Sci* 2016;17:320. <https://doi.org/10.3390/ijms17030320>.
- [268] Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskienė B, Miliuskas S, Vaitkienė S, et al. Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. *BMC Immunol* 2018;19:3. <https://doi.org/10.1186/s12865-018-0241-4>.
- [269] Herrera M, Herrera A, Domínguez G, Silva J, García V, García JM, et al. Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Sci* 2013;104:437–44. <https://doi.org/10.1111/cas.12096>.
- [270] Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer* 2012;75:95–101. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.06.002>.
- [271] O’Callaghan DS, Rexhepaj E, Gately K, Coate L, Delaney D, O’Donnell DM, et al. Tumour islet Foxp3 + T-cell infiltration predicts poor outcome in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 2015;46:1762–72. <https://doi.org/10.1183/13993003.00176-2014>.
- [272] Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, Conlon D, Joshi M-B, Harpole DH, et al. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 2006;107:2866–72. <https://doi.org/10.1002/cncr.22282>.
- [273] Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2015;5:15179. <https://doi.org/10.1038/srep15179>.
- [274] Yang S. FOXP3 promotes tumor growth and metastasis by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer 2017:12.
- [275] Teng F, Meng X, Wang X, Yuan J, Liu S, Mu D, et al. Expressions of CD8+TILs, PD-L1 and Foxp3+TILs in stage I NSCLC guiding adjuvant chemotherapy decisions. *Oncotarget* 2016;7:64318–29. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11793>.
- [276] Biton J, Ouakrim H, Dechartres A, Alifano M, Mansuet-Lupo A, Si H, et al. Impaired Tumor-Infiltrating T Cells in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Impact Lung Cancer Response to PD-1 Blockade. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;198:928–40. <https://doi.org/10.1164/rccm.201706-1110OC>.
- [277] Biton J, Mansuet-Lupo A, Pécuchet N, Alifano M, Ouakrim H, Arrondeau J, et al. TP53, STK11, and EGFR Mutations Predict Tumor Immune Profile and the Response to Anti-PD-1 in Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2018;24:5710–23. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0163>.
- [278] Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* 2012;10:205. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-205>.
- [279] Boscolo A, Fortarezza F, Lunardi F, Comacchio G, Urso L, Frega S, et al. Combined Immunoscore for Prognostic Stratification of Early Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Oncol* 2020;10:564915. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.564915>.
- [280] Zhao Z, Zhao D, Xia J, Wang Y, Wang B. Immunoscore Predicts Survival in Early-Stage Lung Adenocarcinoma Patients. *Front Oncol* 2020;10:691. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00691>.
- [281] Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:717–34. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.101>.
- [282] Soo RA, Chen Z, Yan Teng RS, Tan H-L, Iacopetta B, Tai BC, et al. Prognostic significance of immune cells in non-small cell lung cancer: meta-analysis. *Oncotarget* 2018;9:24801–20. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24835>.
- [283] Tokito T, Azuma K, Kawahara A, Ishii H, Yamada K, Matsuo N, et al. Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8+ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy. *Eur J Cancer* 2016;55:7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.11.020>.
- [284] Remark R, Lupo A, Alifano M, Biton J, Ouakrim H, Stefani A, et al. Immune contexture and histological response after neoadjuvant chemotherapy predict clinical outcome of lung cancer patients. *OncoImmunology* 2016;5:e1255394. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1255394>.
- [285] Yao Y, Yuan D, Liu H, Gu X, Song Y. Pretreatment neutrophil to lymphocyte ratio is associated with response to therapy and prognosis of advanced non-small cell lung cancer patients treated with first-line platinum-based chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2013;9.
- [286] Liu H, Zhang T, Ye J, Li H, Huang J, Li X, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2012;8.
- [287] Fumet J-D, Richard C, Ledys F, Klopfenstein Q, Joubert P, Routy B, et al. Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy. *Br J Cancer* 2018;119:950–60. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0220-9>.
- [288] Monette A. Immune-enrichment of non-small cell lung cancer baseline biopsies for multiplex profiling define prognostic immune checkpoint combinations for patient stratification 2019:16.

- [289] Ku BM, Kim Y, Lee KY, Kim S, Sun J, Lee S, et al. Tumor infiltrated immune cell types support distinct immune checkpoint inhibitor outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Eur J Immunol* 2021;51:956–64. <https://doi.org/10.1002/eji.202048966>.
- [290] Zuazo M, Arasanz H, Fernández-Hinojal G, García-Granda MJ, Gato M, Bocanegra A, et al. Functional systemic CD4 immunity is required for clinical responses to PD-L1/PD-1 blockade therapy. *EMBO Mol Med* 2019;14.
- [291] Rochigneux P, Garcia AJ, Chanez B, Madroszyk A, Olive D, Garon EB. Medical Treatment of Lung Cancer: Can Immune Cells Predict the Response? A Systematic Review. *Front Immunol* 2020;11:1036. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01036>.
- [292] Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, Tafreshi A, Gümüş M, Mazières J, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2018;379:2040–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1810865>.
- [293] Kim S-H, Go S-I, Song DH, Park SW, Kim HR, Jang I, et al. Prognostic impact of CD8 and programmed death-ligand 1 expression in patients with resectable non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2019;120:547–54. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0398-5>.
- [294] Koh J, Kim Y, Lee KY, Hur JY, Kim MS, Kim B, et al. MDSC subtypes and CD39 expression on CD8⁺ T cells predict the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy in patients with advanced NSCLC. *Eur J Immunol* 2020;50:1810–9. <https://doi.org/10.1002/eji.202048534>.
- [295] Youn J-I. Peripheral natural killer cells and myeloid-derived suppressor cells correlate with anti-PD-1 responses in non-small cell lung cancer n.d.:7.
- [296] Kang DH, Chung C, Sun P, Lee DH, Lee S-I, Park D, et al. Circulating regulatory T cells predict efficacy and atypical responses in lung cancer patients treated with PD-1/PD-L1 inhibitors. *Cancer Immunol Immunother* 2022;71:579–88. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-03018-y>.
- [297] Kim CG, Kim KH, Pyo K-H, Xin C-F, Hong MH, Ahn B-C, et al. Hyperprogressive disease during PD-1/PD-L1 blockade in patients with non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2019;30:1104–13. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz123>.
- [298] Datar I, Sanmamed MF, Wang J, Henick BS, Choi J, Badri T, et al. Expression Analysis and Significance of PD-1, LAG-3, and TIM-3 in Human Non–Small Cell Lung Cancer Using Spatially Resolved and Multiparametric Single-Cell Analysis. *Clin Cancer Res* 2019;25:4663–73. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4142>.
- [299] Norton SE, Ward-Hartstonge KA, Taylor ES, Kemp RA. Immune cell interplay in colorectal cancer prognosis. *World J Gastrointest Oncol* 2015;7:221. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v7.i10.221>.
- [300] Tsujikawa T, Mitsuda J, Ogi H, Miyagawa-Hayashino A, Konishi E, Itoh K, et al. Prognostic significance of spatial immune profiles in human solid cancers n.d.:9.
- [301] Fu T, Dai L-J, Wu S-Y, Xiao Y, Ma D, Jiang Y-Z, et al. Spatial architecture of the immune microenvironment orchestrates tumor immunity and therapeutic response. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol* 2021;14:98. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01103-4>.
- [302] Corredor G, Wang X, Zhou Y, Lu C, Fu P, Syrigos K, et al. Spatial Architecture and Arrangement of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Predicting Likelihood of Recurrence in Early-Stage Non–Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2019;25:1526–34. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2013>.
- [303] Mezheyeuski A, Bergsland CH, Backman M, Djureinovic D, Bruun J, Micke P. Multispectral imaging for quantitative and compartment-specific immune infiltrates reveals distinct immune profiles that classify lung cancer patients. n.d.:27.
- [304] Johnson AM, Boland JM, Wrobel J, Klezcko EK, Weiser-Evans M, Hopp K, et al. Cancer Cell-Specific Major Histocompatibility Complex II Expression as a Determinant of the Immune Infiltrate Organization and Function in the NSCLC Tumor Microenvironment. *J Thorac Oncol* 2021;16:1694–704. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.05.004>.
- [305] Enfield KSS, Martin SD, Marshall EA, Kung SHY, Gallagher P, Milne K, et al. Hyperspectral cell sociology reveals spatial tumor-immune cell interactions associated with lung cancer recurrence. *J Immunother Cancer* 2019;7:13. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0488-6>.
- [306] Qin A, Lima F, Bell S, Kalemkerian GP, Schneider BJ, Ramnath N, et al. Cellular engagement and interaction in the tumor microenvironment predict non-response to PD-1/PD-L1 inhibitors in metastatic non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 2022;12:9054. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13236-8>.
- [307] Zheng X, Weigert A, Reu S, Guenther S, Mansouri S, Bassaly B, et al. Spatial Density and Distribution of Tumor-Associated Macrophages Predict Survival in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer Res* 2020;80:4414–25. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0069>.
- [308] Barua S, Fang P, Sharma A, Fujimoto J, Wistuba I, Rao AUK, et al. Spatial interaction of tumor cells and regulatory T cells correlates with survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2018;117:73–9. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.01.022>.

- [309] Zugazagoitia J, Gupta S, Liu Y, Fuhrman K, Gettinger S, Herbst RS, et al. Biomarkers Associated with Beneficial PD-1 Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Identified Using High-Plex Digital Spatial Profiling. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2020;26:4360–8. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0175>.
- [310] Johnson DB, Bordeaux J, Kim JY, Vaupel C, Rimm DL, Ho TH, et al. Quantitative Spatial Profiling of PD-1/PD-L1 Interaction and HLA-DR/IDO-1 Predicts Improved Outcomes of Anti-PD-1 Therapies in Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* 2018;24:5250–60. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0309>.
- [311] Tumeah PC. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance n.d.:16.
- [312] Gide TN, Silva IP, Quek C, Ahmed T, Menzies AM, Carlino MS, et al. Close proximity of immune and tumor cells underlies response to anti-PD-1 based therapies in metastatic melanoma patients. *OncoImmunology* 2020;9:1659093. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1659093>.
- [313] Fan G, Wang Z, Hao M, Li J. Bispecific antibodies and their applications. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol* 2015;8:130. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0227-0>.
- [314] Runcie K, Budman DR, John V, Seetharamu N. Bi-specific and tri-specific antibodies- the next big thing in solid tumor therapeutics. *Mol Med* 2018;24:50. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0051-4>.
- [315] Esfandiari A, Cassidy S, Webster RM. Bispecific antibodies in oncology. *Nat Rev Drug Discov* 2022;21:411–2. <https://doi.org/10.1038/d41573-022-00040-2>.
- [316] Bogen JP, Carrara SC, Fiebig D, Grzeschik J, Hock B, Kolmar H. Design of a Trispecific Checkpoint Inhibitor and Natural Killer Cell Engager Based on a 2 + 1 Common Light Chain Antibody Architecture. *Front Immunol* 2021;12:669496. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669496>.
- [317] Wu L. Trispecific antibodies enhance the therapeutic efficacy of tumor-directed T cells through T cell receptor co-stimulation 2020;1:24.
- [318] Tapia-Galisteo A, Sánchez Rodríguez Í, Aguilar-Sopeña O, Harwood SL, Narbona J, Ferreras Gutierrez M, et al. Trispecific T-cell engagers for dual tumor-targeting of colorectal cancer. *OncoImmunology* 2022;11:2034355. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2034355>.
- [319] Lundgren S, Elebro J, Heby M, Nodin B, Leandersson K, Micke P, et al. Quantitative, qualitative and spatial analysis of lymphocyte infiltration in periampullary and pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2020;13.
- [320] Tsakiroglou AM. Spatial proximity between T and PD-L1 expressing cells as a prognostic biomarker for oropharyngeal squamous cell carcinoma n.d.:6.
- [321] Carstens JL, Correa de Sampaio P, Yang D, Barua S, Wang H, Rao A, et al. Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer. *Nat Commun* 2017;8:15095. <https://doi.org/10.1038/ncomms15095>.
- [322] Steinhart B, Jordan KR, Bapat J, Post MD, Brubaker LW, Bitler BG, et al. The Spatial Context of Tumor-Infiltrating Immune Cells Associates with Improved Ovarian Cancer Survival. *Mol Cancer Res* 2021;19:1973–9. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-21-0411>.
- [323] Brück O, Lee MH, Turkki R, Uski I, Penttilä P, Paavolainen L, et al. Spatial immunoprofiling of the intratumoral and peritumoral tissue of renal cell carcinoma patients. *Mod Pathol* 2021;34:2229–41. <https://doi.org/10.1038/s41379-021-00864-0>.
- [324] Autio M, Leivonen S-K, Brück O, Karjalainen-Lindsberg M-L, Pellinen T, Leppä S. Clinical Impact of Immune Cells and Their Spatial Interactions in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Microenvironment. *Clin Cancer Res* 2022;28:781–92. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-3140>.
- [325] Posselt R, Erlenbach-Wünsch K, Haas M, Jeßberger J, Büttner-Herold M, Haderlein M, et al. Spatial distribution of FoxP3+ and CD8+ tumour infiltrating T cells reflects their functional activity. *Oncotarget* 2016;7:60383–94. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11039>.
- [326] Shaul ME, Eyal O, Guglietta S, Aloni P, Zlotnik A, Forkosh E, et al. Circulating neutrophil subsets in advanced lung cancer patients exhibit unique immune signature and relate to prognosis. *FASEB J* 2020;34:4204–18. <https://doi.org/10.1096/fj.201902467R>.
- [327] Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers J-W, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest* 2012;122:327–36. <https://doi.org/10.1172/JCI57990>.
- [328] Lewkowicz N. Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10 2016;9:15.
- [329] Hirz T, Matera E-L, Chettab K, Jordheim LP, Mathé D, Evesque A, et al. Neutrophils protect lymphoma cells against cytotoxic and targeted therapies through CD11b/ICAM-1 binding. *Oncotarget* 2017;8:72818–34. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20350>.
- [330] Mougiakakos D, Johansson CC, Kiessling R. Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death. *Blood* 2009;113:3542–5. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-181040>.

- [331] Minns D. The Outcome of Neutrophil-T Cell Contact Differs Depending on Activation Status of Both Cell Types. *Front Immunol* 2021;12:10.
- [332] Mattila JT. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front Immunol* n.d.:5.
- [333] Centuori SM, Trad M, LaCasse CJ, Alizadeh D, Larmonier CB, Hanke NT, et al. Myeloid-derived suppressor cells from tumor-bearing mice impair TGF- β -induced differentiation of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs from CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁻ T cells. *J Leukoc Biol* 2012;92:987–97. <https://doi.org/10.1189/jlb.0911465>.
- [334] Fujimura T, Ring S, Umansky V, Mahnke K, Enk AH. Regulatory T Cells Stimulate B7-H1 Expression in Myeloid-Derived Suppressor Cells in *ret* Melanomas. *J Invest Dermatol* 2012;132:1239–46. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.416>.
- [335] Siret C, Collignon A, Silvy F, Robert S, Cheyrol T, André P, et al. Deciphering the Crosstalk Between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Front Immunol* 2020;10:3070. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03070>.
- [336] Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Cross-Tolerance in B-Cell Lymphoma by Expanding Regulatory T Cells. *Cancer Res* 2008;68:5439–49. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6621>.
- [337] Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, et al. Tumor-Infiltrating Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate CCR5-Dependent Recruitment of Regulatory T Cells Favoring Tumor Growth. *J Immunol* 2012;189:5602–11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201018>.
- [338] Kim HR, Park S-M, Seo S-U, Jung I, Yoon HI, Gabrilovich DI, et al. The Ratio of Peripheral Regulatory T Cells to Lox-1⁺ Polymorphonuclear Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts the Early Response to Anti-PD-1 Therapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;199:243–6. <https://doi.org/10.1164/rccm.201808-1502LE>.
- [339] Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:13076–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200419109>.
- [340] Wang H. The regulatory mechanism of neutrophil extracellular traps in cancer biological behavior 2021:13.
- [341] Dömer D, Walther T, Möller S, Behnen M, Laskay T. Neutrophil Extracellular Traps Activate Proinflammatory Functions of Human Neutrophils. *Front Immunol* 2021;12:636954. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.636954>.
- [342] Tillack K, Breiden P, Martin R, Sospedra M. T Lymphocyte Priming by Neutrophil Extracellular Traps Links Innate and Adaptive Immune Responses. *J Immunol* 2012;188:3150–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103414>.
- [343] Wang H. Regulatory T-cell and neutrophil extracellular trap interaction contributes to carcinogenesis in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2021;75:14.
- [344] Jørgensen N, Persson G, Hviid TVF. The Tolerogenic Function of Regulatory T Cells in Pregnancy and Cancer. *Front Immunol* 2019;10:911. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00911>.
- [345] He S, Bhatt R, Brown C, Brown EA, Buhr DL, Chantranuvatana K, et al. High-plex Multiomic Analysis in FFPE at Subcellular Level by Spatial Molecular Imaging. *Genomics*; 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.11.03.467020>.
- [346] Singhal S, Bhojnagarwala PS, O'Brien S, Moon EK, Garfall AL, Rao AS, et al. Origin and Role of a Subset of Tumor-Associated Neutrophils with Antigen-Presenting Cell Features in Early-Stage Human Lung Cancer. *Cancer Cell* 2016;30:120–35. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.001>.
- [347] Salmon H, Franciszkiewicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean M-C, Validire P, Trautmann A, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest* 2012;122:899–910. <https://doi.org/10.1172/JCI45817>.
- [348] Larsen AMH, Kuczek DE, Kalvisa A, Siersb MS, Carretta M, Grøntved L, et al. Collagen Density Modulates the Immunosuppressive Functions of Macrophages n.d.:13.
- [349] Jensen C, Nissen NI, Von Arenstorff CS, Karsdal MA, Willumsen N. Serological assessment of collagen fragments and tumor fibrosis may guide immune checkpoint inhibitor therapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2021;40:326. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02133-z>.
- [350] Gentles AJ, Hui AB-Y, Feng W, Azizi A, Nair RV, Bouchard G, et al. A human lung tumor microenvironment interactome identifies clinically relevant cell-type cross-talk. *Genome Biol* 2020;21:107. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02019-x>.
- [351] Yost KE, Satpathy AT, Wells DK, Qi Y, Wang C, Kageyama R, et al. Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade 2020:44.
- [352] Nagasaki J, Inozume T, Sax N, Ariyasu R, Ishikawa M, Yamashita K, et al. PD-1 blockade therapy promotes infiltration of tumor-attacking exhausted T cell clonotypes. *Cell Rep* 2022;38:110331. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110331>.

- [353] Liu B. Temporal single-cell tracing reveals clonal revival and expansion of precursor exhausted T cells during anti-PD-1 therapy in lung cancer 2022;3:32.
- [354] Velut Y, Decroix E, Blons H, Alifano M, Leroy K, Petitprez F, et al. SMARCA4-deficient lung carcinoma is an aggressive tumor highly infiltrated by FOXP3+ cells and neutrophils. *Lung Cancer Amst Neth* 2022;169:13–21. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2022.05.001>.
- [355] Faget J, Groeneveld S, Boivin G, Sankar M, Zangger N, Garcia M, et al. Neutrophils and Snail Orchestrate the Establishment of a Pro-tumor Microenvironment in Lung Cancer. *Cell Rep* 2017;21:3190–204. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.052>.
- [356] Markowitz GJ, Havel LS, Crowley MJP, Ban Y, Lee SB, Thalappillil JS, et al. Immune reprogramming via PD-1 inhibition enhances early-stage lung cancer survival n.d.:22.
- [357] Horn LA, Riskin J, Hempel HA, Fousek K, Lind H, Hamilton DH, et al. Simultaneous inhibition of CXCR1/2, TGF- β , and PD-L1 remodels the tumor and its microenvironment to drive antitumor immunity. *J Immunother Cancer* 2020;8:e000326. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000326>.
- [358] Bullock K, Richmond A. Suppressing MDSC Recruitment to the Tumor Microenvironment by Antagonizing CXCR2 to Enhance the Efficacy of Immunotherapy. *Cancers* 2021;13:6293. <https://doi.org/10.3390/cancers13246293>.
- [359] Siebert N, Zumpe M, von Lojewski L, Troschke-Meurer S, Marx M, Lode HN. Reduction of CD11b + myeloid suppressive cells augments anti-neuroblastoma immune response induced by the anti-GD 2 antibody ch14.18/CHO. *OncoImmunology* 2020;9:1836768. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1836768>.
- [360] Sherbenou DW, Su Y, Behrens CR, Aftab BT, Perez de Acha O, Murnane M, et al. Potent Activity of an Anti-ICAM1 Antibody–Drug Conjugate against Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 2020;26:6028–38. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0400>.
- [361] Prasetya RA, Metselaar-Albers M, Engels F. Concomitant use of analgesics and immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: A pharmacodynamics perspective. *Eur J Pharmacol* 2021;906:174284. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174284>.
- [362] Pu D, Yin L, Huang L, Qin C, Zhou Y, Wu Q, et al. Cyclooxygenase-2 Inhibitor: A Potential Combination Strategy With Immunotherapy in Cancer. *Front Oncol* 2021;11:637504. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.637504>.
- [363] Yokouchi H, Kanazawa K, Ishida T, Oizumi S, Shinagawa N, Sukoh N, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors for non-small-cell lung cancer: A phase II trial and literature review. *Mol Clin Oncol* n.d.:7.
- [364] Wang J, Khullar K, Kim S, Yegya N, Malhotra J, Groisberg R, et al. Effect of cyclo-oxygenase inhibitor use during checkpoint blockade immunotherapy in patients with metastatic melanoma and non-small cell lung cancer. *Open Access* n.d.:11.
- [365] Giladi A, Cohen M, Medaglia C, Baran Y, Li B, Zada M, et al. Dissecting cellular crosstalk by sequencing physically interacting cells. *Nat Biotechnol* 2020;38:629–37. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0442-2>.
- [366] Cohen M, Giladi A, Barboy O, Hamon P, Li B, Zada M, et al. The interaction of CD4+ helper T cells with dendritic cells shapes the tumor microenvironment and immune checkpoint blockade response. *Nat Cancer* 2022;3:303–17. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00338-5>.

Annexes

Article 3: SMARCA4-deficient lung carcinoma is an aggressive tumor highly infiltrated by FOXP3+ cells and neutrophils

Yoan Velut, Elise Decroix, Hélène Blons, Marco Alifano, Karen Leroy, Florent Petitprez, Aurélie Boni, Simon Garinet, Jérôme Biton, Isabelle Cremer, Marie Wislez, Pascaline Boudou-Rouquette, Jennifer Arrondeau, François Goldwasser, Ludovic Fournel, Diane Damotte, Audrey Mansuet-Lupo

Publié dans « Lung Cancer »

Résumé des résultats de l'Article 3 :

Les carcinomes SMARCA4-déficient constituent une entité récente, peu décrite, caractérisée par la perte d'expression du gène *SMARCA4*, codant pour la protéine BRG1 impliquée dans le remodelage de la chromatine dans le complexe protéique SWI/SNF. Ce sont des tumeurs de faible pronostic. Ces tumeurs sont de faible pronostic, ne semblent pas présenter de mutation actionnable, et leurs réponses à l'immunothérapie restent controversées. L'objectif de l'étude a été d'analyser leur environnement immunitaire et leur profil mutationnel, et de les comparer à une cohorte de patient BRG1 non perdu.

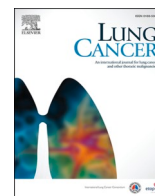
Les tumeurs BRG1 perdus ne présentaient pas de mutation d'EGFR, moins de mutation de TP53 et moins de PD-L1 TPS comparé aux tumeurs BRG1 non perdu.

Les densités de lymphocytes T FoxP3+ et de neutrophiles CD66b+ étaient plus importants dans les tumeurs BRG1 perdus. La densité de lymphocytes T CD8+ n'était pas significativement entre les 2 groupes. Des résultats similaires ont été retrouvés sur les données du TCGA, à l'exception des lymphocytes T FoxP3+ non disponibles.

Les tumeurs BRG1 perdus ont montrés une survie globale inférieure aux BRG1 non perdus comme attendu. Au niveau de l'environnement immunitaire, nous n'avons pas observé de relation entre la densité de lymphocyte T CD8+, de lymphocyte T régulateurs FoxP3+ et de neutrophile sur la survie globale.

Ces résultats suggèrent que l'environnement immunitaire des tumeurs BRG1 perdus ne permet pas une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Ceci pourrait s'expliquer par la plus grande proportion de lymphocytes T régulateurs FoxP3+ et de neutrophiles.

Les tumeurs BRG1 perdus traités par immunothérapie anti-PD-1 présentent des survies globales plus faible que les tumeurs BRG1 non perdu traités par anti-PD-1. Ceci suggère que les tumeurs BRG1 perdus ne sont pas de bons candidats aux immunothérapies anti-PD-1.



SMARCA4-deficient lung carcinoma is an aggressive tumor highly infiltrated by FOXP3+ cells and neutrophils

Yoan Velut^{a,1}, Elise Decroix^{a,1}, Hélène Blons^{b,c}, Marco Alifano^{a,d}, Karen Leroy^{a,b}, Florent Petitprez^e, Aurélie Boni^a, Simon Garinet^{b,c}, Jérome Biton^f, Isabelle Cremer^a, Marie Wislez^{a,g}, Pascaline Boudou-Rouquette^h, Jennifer Arrondeau^h, François Goldwasser^{h,i}, Ludovic Fournel^d, Diane Damotte^{a,j,*}, Audrey Mansuet-Lupo^{a,j,1}

^a Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, INSERM, Université Paris Cité, Team Inflammation, Complement and Cancer, F-75006 Paris, France

^b Department of Biochemistry, Unit of Pharmacogenetic and Molecular Oncology, Georges Pompidou European Hospital, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Paris, France

^c Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM UMR-S1138, Sorbonne Université, Université Paris Cité, 75006 Paris, France

^d Department of Thoracic Surgery, Hôpitaux Universitaire Paris Centre, Cochin Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France

^e MRC Centre for Reproductive Health, The Queen’s Medical Research Institute, University of Edinburgh, United Kingdom

^f INSERM UMR-1125, Université Sorbonne Paris Nord, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France

^g Department of Pneumology, Hôpitaux Universitaire Paris Centre, Cochin Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France

^h Department of Oncology, Hôpitaux Universitaire Paris Centre, Cochin Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France

ⁱ URP 4466, Université Paris Cit 

^j Department of Pathology, Hôpitaux Universitaire Paris Centre, Cochin Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Non-small cell lung cancer
SMARCA4-deficient
BRG1
Immunotherapy

ABSTRACT

Introduction: SMARCA4/BRG1 loss of expression occurs in 5–10% of non-small cell lung carcinomas (NSCLC). We investigated the pathological, molecular and immune environment characteristics of this deficiency among NSCLC, its impact on overall survival (OS) of resected patients and the sensitivity to anti-PD1 inhibitors in metastatic patients.

Materials and methods: BRG1 expression was assessed by immunohistochemistry to identify SMARCA4-deficient NSCLC (SD-NSCLC) from the cancer tissue collection of Cochin Hospital (Paris, France). Molecular profiles were analyzed by targeted NGS covering 28 genes in 63 resected SD-NSCLC. The balance of immune cells between CD8+, FOXP3+ cells and neutrophils (CD66b+) was characterized by multiplex immunohistochemistry and compared to non-SD NSCLC. Clinical outcome after anti-PD-1 therapy was evaluated in 7 SD-NSCLC out of 77 NSCLC patients.

Results: SD-NSCLCs were more commonly found in TTF1-negative high-grade adenocarcinomas and pleomorphic carcinomas. They were associated with few targetable alterations (*KRAS* G12C and *MET* amplification). Their immune environment was characterized by an increased of FOXP3+ cell and neutrophil densities, but not of CD8+ T cells, compared to non-SD NSCLC. SD-NSCLC patients had a significantly shorter OS in early stages of resected patients and in metastatic patients treated by anti-PD1 treatment.

Conclusion: BRG1-loss in NSCLC confers a poor prognosis and is associated with an immunosuppressive environment that could be responsible of limited efficacy to anti-PD1 inhibitors. The identification of SD-NSCLC by BRG1 immunohistochemistry is desirable for an optimal management of NSCLC patients.

* Corresponding author at: Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Team Inflammation, Complement and Cancer, 15 Rue de l’Ecole de Médecine, 75006 Paris, France.

E-mail address: diane.damotte@aphp.fr (D. Damotte).

¹ Authors contributed equally to the work.

<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2022.05.001>

Received 1 April 2022; Received in revised form 25 April 2022; Accepted 1 May 2022

Available online 5 May 2022

0169-5002/  2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The switch/sucrose-non-fermenting (SWI/SNF) complex functions as a tumor suppressor and mutations in at least one of its subunits have been demonstrated in 20% of human cancers [1]. The *SMARCA4* gene encodes BRG1, one of the two ATPase subunits of the SWI/SNF complex. *SMARCA4* inactivating mutations are described in two thoracic tumors: *SMARCA4*-deficient undifferentiated tumor (SD-UT, formerly known as *SMARCA4*-deficient sarcoma) and *SMARCA4*-deficient non-small cell lung carcinoma (SD-NSCLC) [2–5]. Only SD-UT is recognized as a separate entity in the 8th edition of the WHO classification that should be differentiated from SD-NSCLC [5]. Nevertheless, a recent study suggests a biological continuum between these two tumors, SD-UT being a form of ‘dedifferentiated’ lung carcinoma [6], leading to the replacement of the term “sarcoma” by that of undifferentiated tumor in the latest WHO classification. Moreover, these entities are linked at molecular level, as they share genomic alterations typical of smoking-related NSCLC (*KRAS*, *KEAP1*, *STK11*) and have a high tumor mutational load [2,4].

Loss of expression of BRG1/SD-NSCLC occurs in approximately 5–10% of NSCLC, predominantly male and heavy smokers. SD-NSCLCs are mostly TTF1/p40-negative poorly differentiated carcinomas, mainly adenocarcinomas and pleomorphic carcinomas [7–11]. The way to identify this entity, either by the mutation of *SMARCA4* gene or by the loss of expression of BRG1 protein is not clearly defined. Indeed, the loss of BRG1 expression is often associated with *SMARCA4* mutations but not all *SMARCA4* mutations induce a loss of expression of BRG1. Truncating mutations (i.e. frameshift, splice-site or nonsense) are most usually associated with loss of protein expression, in contrast to non-truncating mutations (i.e. missense). On the contrary, the loss of BRG1 can be present without *SMARCA4* mutations [6,10,12,13]. Many studies reported a poor prognosis of SD-NSCLC, whether by identifying them by the loss of BRG1 expression [9,14] or by the *SMARCA4* mutation [15–17]. Although all *SMARCA4* alterations are associated with poor clinical outcomes, truncating mutations which are associated with BRG1 protein loss, were associated with the poorest prognosis [12], emphasizing the importance of BRG1 immunohistochemistry to identify SD-NSCLC.

Currently, there is no codified treatment for SD-NSCLC. These tumors do not seem to harbor actionable oncogenic driver alterations, such as *EGFR*, *ALK*, and *ROS1*, as in conventional NSCLC [7,9,12,13], excluding the prescription of targeted therapy. Data on the effectiveness of immunotherapy are contradictory, some case reports suggest an efficacy of immune checkpoint inhibitors (ICI) [18,19], which may be explained by a high mutational load [2,4]; but most studies report a low response to ICI [15,16], which may be due to low PD-L1 expression and presence of co-mutations in *STK11* and *KEAP1* genes [20]. Recent studies seem to confirm the non-benefit to ICI in SD-NSCLC, particularly in patients with *KRAS*- and *SMARCA4*-mutant NSCLC [15,16]. Since we previously showed that intratumoral immune cell densities were significantly associated with molecular alterations in NSCLC [21], we hypothesized that SD-NSCLC might have a specific immune environment, which could explain its poor prognosis in untreated patients and in patients treated with ICI.

In the present study, we aimed at analyzing clinical, pathological, molecular and immune environment of 63 SD-NSCLC resected patients and we compared these tumors to non-SD NSCLC. We also reported the overall survival of 7 SD-NSCLC among 77 patients treated by PD-1 blockade within the CERTIM (Immunomodulatory Therapies Multidisciplinary Study group) network.

2. Patients and methods

2.1. Study design and sample selection

We retrospectively selected 63 SD-NSCLC patients naive of

treatment, operated with curative intent at Cochin Hospital, Paris, France, between 2001 and 2020. These 63 SD-NSCLC FFPE specimens were defined by a complete loss of BRG1 expression by immunohistochemistry. Twenty-three were identified from a consecutive cohort of 417 patients who underwent NSCLC resection between 2001 and 2005; and 40 cases were identified from routine care practice from internal patients (2014–2020), with some analyzed for different parameters in previous studies [21–23] (Supplementary Fig. 1). Squamous-cell lung carcinomas and large-cell neuroendocrine carcinomas were excluded. The immune cell infiltrate of the 63 SD-NSCLC tumors was compared with that of 28 non-SD NSCLCs. The 28 non-SD NSCLC patients were included according to the following criteria: resected NSCLC, available tumor samples for the multiplex immunohistochemistry study and period of surgery identical to the 63 SD-NSCLC. We excluded squamous-cell and neuro-endocrine carcinomas and tumors with *EGFR*, *ALK* and *ROS1* alterations, since these findings are never found in SD-NSCLC. At last, we also checked that clinical and pathological characteristics of the 28 non-SD NSCLCs were similar from those of the 63 SD-NSCLC (Supplementary Table 1).

Finally, we evaluated the benefit of immunotherapy in 7 patients with SD-NSCLC from a cohort of 77 patients with metastatic non-squamous cell carcinomas, included in the CERTIM group, who received anti-PD-1 therapy (either nivolumab or pembrolizumab), in second line or more, between 2015 and 2020 (Supplementary Fig. 1).

This study was performed with the approval of our institutional review board (CPP Ile de France II, 2008-133 and 2012 06-12, No. 2018 MS1).

2.2. Pathological evaluation and immunohistochemistry

Histological tumor typing was performed according to the 5th WHO criteria [5] and pathologic tumor staging was evaluated using the 8th edition of TNM classification. All adenocarcinomas were classified into 3 grades according to their predominant architectural pattern, as previously described [22,24]. Immunohistochemistry was performed using the fully automated Leica Bond III platform and antibodies against the following antigens: BRG1 (clone EPNCR111A, Abcam), TTF1 (clone SPT24, Tebu Novocastra), p40 (clone BC28, Zytomed), PD-L1 (clone QR1, Diagnostics/BIOCYC).

2.3. Molecular analysis

DNA was extracted from FFPE tumor samples, selected to contain at least 30% of tumor cells, using the Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit (Promega). All samples were characterized using 2 NGS panels: (1) The Ion AmpliSeq™ Colon-Lung Cancer Research Panel v2 (Life Technologies™, France), as previously described [23,25], and (2) a custom Ion AmpliSeq™ DNA panel, full gene coding sequence for *SMARCA4*, *TP53*, *STK11*, *KEAP1*, *RB1*, *CDKN2A*, *ARID1A* and *PTEN* and sequenced on the Ion Proton™ System (Life Technologies™). Samples were considered as non-interpretable when mean coverage depth was <300X.

2.4. Multiplexed immunofluorescence

Fluorescent multiplexed immunohistochemistry was only performed on the surgically resected samples, using 5-µm thick serial sections from the selected tumor tissue section containing the highest density of immune cells on hematoxylin-eosin-safran (HES) stained slides. Staining was performed on Leica Bond RX (Leica Biosystem®), using Opal™ 4-Color IHC Kit (AKOYA Biosciences®) for CD66b (clone G10F5, BD), FOXP3 (clone 236A/E7, Abcam), pan-cytokeratin (clone AE1/AE3, Agilent) and CD8 (clone SP16, Abcam), as previously described [26]. Immune cells densities were quantified in the tumoral cores with Halo software (indica labs). Results are expressed as the absolute number of positive cells per square millimeter. Unfortunately, for the patients

Table 1

Clinical, pathological and molecular characteristics of 63 resected SMARCA4-deficient NSCLC. Adenocarcinoma grade corresponded to II (intermediate grade) for lepidic, papillary, or acinar predominant pattern and III (high grade) for solid, micropapillary, or solid predominant pattern and mucinous type, as previously described [22,24]. Wilcoxon-Mann-Whitney or Chi² test were used to find associations between clinical and molecular data. PD-L1 TPS: tumor proportion score corresponding to the percentage of PD-L1 positive tumor cells. SD-NSCLC: non-SMARCA4-deficient NSCLC, COPD: chronic obstructive pulmonary disease.

SD-NSCLC (N = 63)			
Age at diagnosis		Molecular status:	
Median [Min, Max]	61 [38, 80]	KRAS status	
Sex number (%)		WT	48 (76%)
Female	12 (19%)	mutated	15 (24%)
Male	51 (81%)	TP53 status	
Smoking status (Pack-y)		WT	18 (29%)
≤15	4 (6%)	mutated	40 (63%)
>15	59 (94%)	Non-interpretable	5 (8%)
COPD		STK11 status	
No	19 (30%)	WT	38 (60%)
Yes	43 (68%)	mutated	17 (27%)
unknown	1 (2%)	Non-interpretable	8 (13%)
Histological type		KEAP1 status	
Adenocarcinoma	54 (86%)	WT	39 (62%)
Large-cell carcinoma	4 (6%)	mutated	15 (24%)
Pleomorphic carcinoma	5 (8%)	Non-interpretable	9 (14%)
Adenocarcinoma grade		CDKN2A status	
II	17 (31%)	WT	43 (68%)
III	37 (69%)	mutated	11 (18%)
TTF1 expression		Non-interpretable	9 (14%)
Positive	31 (49%)	KEAP1-STK11 comutation	
Negative	32 (51%)	No	48 (76%)
PD-L1 (TPS, %)		Yes	6 (10%)
0	36 (57%)	Non-interpretable	9 (14%)
≥1% <50%	17 (27%)	SMARCA4 status	
≥ 50%	10 (16%)	WT	12 (19%)
Tumor stage		Mutated (truncating)	40 (64%)
I-II	39 (62%)	Mutated (non-truncating)	2 (3%)
III-IV	24 (38%)	Non-interpretable	9 (14%)

treated with ICI, samples were too small to perform multiplex analysis.

2.5. Gene expression analysis

Gene expression for neutrophil (CD66b) and CD8+ T lymphocyte populations was performed using an independent transcriptome dataset from the Cancer Genome Atlas in Lung adenocarcinoma (TCGA LUAD) database, including NSCLC without or with SMARCA4 (missense and nonsense) mutations. The presence of these two immune populations was inferred using the microenvironment cell populations (MCP)-counter, with no available data for FOXP3+ cells [27].

2.6. Statistical analysis

Statistical analyzes were conducted using R 3.3.2 (<https://www.R-project.org/>). Wilcoxon-Mann-Whitney or Chi² test were used to find associations between clinical and molecular data and to compare immune cell densities. For survival analysis, we used Kaplan-Meier method and log-rank test, overall survival (OS) was calculated from the date of surgical resection to the date of death or date of last follow-up. Cox proportional-hazards regression model was used for univariate analysis. OS was defined as the time from the date of diagnosis to the date of death or last follow-up. For patients treated by ICI, we also measured the OS from the date of the first cure of immunotherapy to the date of death or last follow-up.

Table 2

Comparison of clinicopathological and molecular characteristics of SMARCA4-deficient NSCLC with non-SMARCA4 NSCLC in resected patients. PD-L1 TPS: tumor proportion score corresponding to the percentage of PD-L1 positive tumor cells. SD-NSCLC: SMARCA4-deficient non-small cell lung cancer, non-SD NSCLC: SMARCA4-deficient non-small cell lung cancer, COPD: chronic obstructive pulmonary disease.

Parameters	Non SMARCA4 resected non-squamous NSCLC n = 303	SMARCA4 resected non-squamous NSCLC n = 63	P-value
Age at diagnosis			0.5
Median [Min, Max]	61 [19, 84]	61 [38, 80]	
Sex number (%)			0.1
Female	89 (29%)	12 (19%)	
Male	214 (71%)	51 (81%)	
Smoking status (Pack-y)			0.02
≤15	58 (19%)	4 (6%)	
>15	238 (79%)	59 (94%)	
NR	7 (2%)	0 (0%)	
COPD			<0.001
No	173 (57%)	19 (30%)	
Yes	130 (43%)	43 (68%)	
Unknown	0 (0%)	1 (2%)	
Tumor size (mm)			0.8
Mean (SD)	36 (21)	36 (25)	
Histological type			0.002
Adenocarcinoma	286 (94.5%)	54 (86%)	
Large-cell carcinoma	14 (4.5%)	4 (6%)	
Pleomorphic carcinoma	3 (1%)	5 (8%)	
Adenocarcinoma grade (resected samples N = 286)			<0.001
I	1 (0.3%)	0 (0%)	
II	197 (68.7%)	17 (31%)	
III	88 (31%)	37 (69%)	
TTF1 expression			<0.001
Negative	35 (12%)	32 (51%)	
Positive	268 (88%)	31 (49%)	
PD-L1 (TPS, %)			0.001
0%	103 (34%)	36 (57%)	
≥1% <50%	96 (32%)	17 (27%)	
≥ 50%	103 (34%)	10 (16%)	
Tumor stage			0.1
I-II	221 (73%)	39 (62%)	
III-IV	82 (27%)	24 (38%)	
EGFR status			0.003
WT	191/224 (85%)	63/63 (100%)	
mutated	33/224 (15%)	0/63 (0%)	
KRAS status			0.01
WT	130/224 (58%)	48/63 (76%)	
mutated	94/224 (42%)	15/63 (24%)	
TP53 status			0.2
WT	93/224 (42%)	18/58 (31%)	
mutated	131/224 (58%)	40/58 (69%)	
STK11 status			0.3
WT	173/224 (77%)	38/55 (69%)	
mutated	51/224 (23%)	17/55 (31%)	

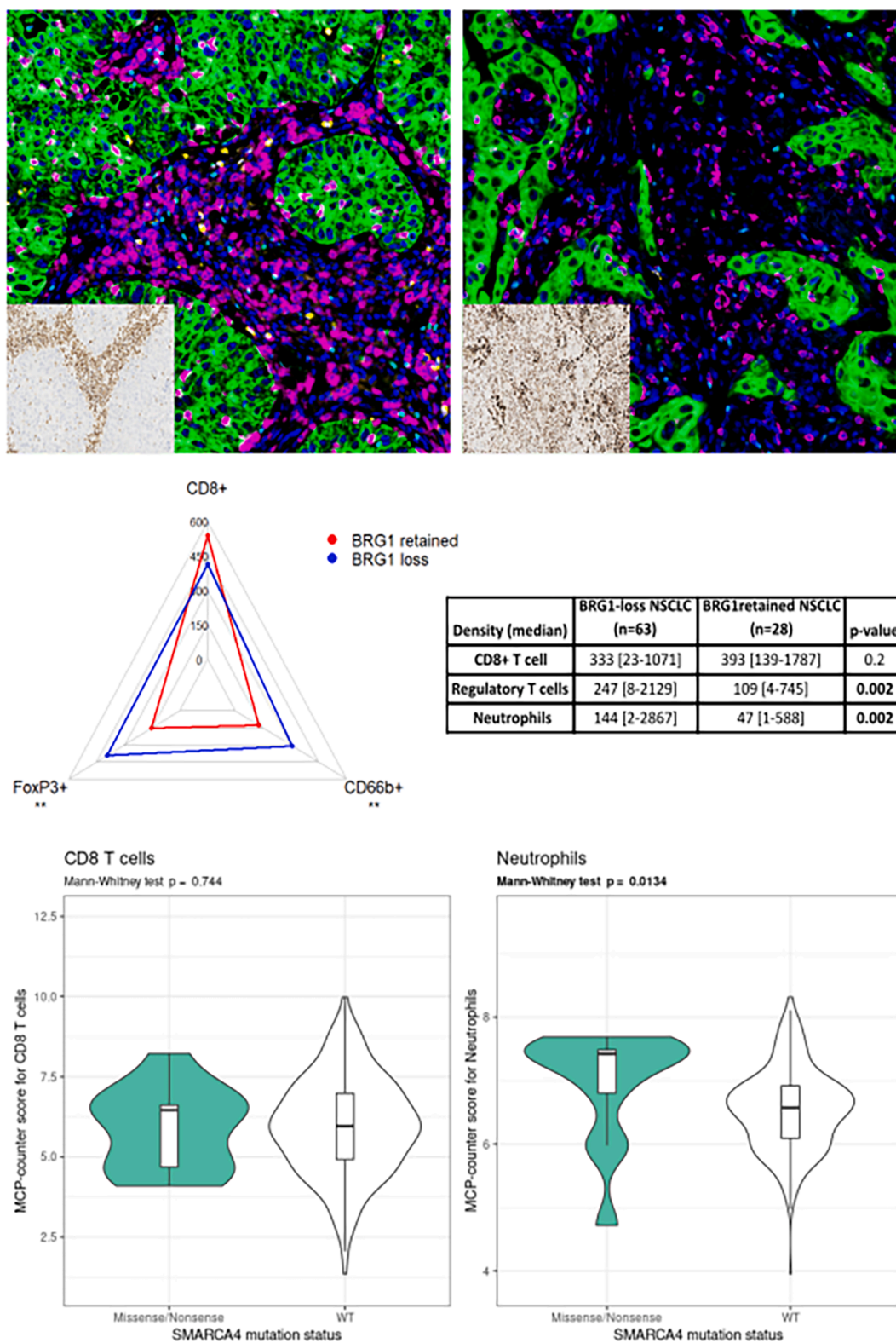


Fig. 1. Comparison of immune environment between SMARCA4-deficient NSCLC and non-SMARCA4 deficient NSCLC. Fluorescent multiplex immunohistochemistry (A, B) and radar plot (C), showing a higher infiltration of regulatory T cells (FOXP3+, green nuclei) and neutrophils (CD66b+, yellow) in BRG1loss/SMARCA4-deficient (A) compared to BRG1retained/non-SMARCA4 deficient NSCLC (B). Fluorescent multiplex immunohistochemistry used CD8+ T cell (pink), CD66b+ neutrophils (yellow), FOXP3 (green in nuclei) and cytokeratin (green in membrane). HR and p-value were calculated with Cox-regression. (D) Analysis of the CD8+ T cell and neutrophil in lung adenocarcinoma according to the mutation status of SMARCA4 gene by the MCP-counter method based on TCGA database. SMARCA4 mutations included missense and nonsense mutation. Data are shown as MCP-counter scores and comparisons were performed with the Mann-Whitney U test. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

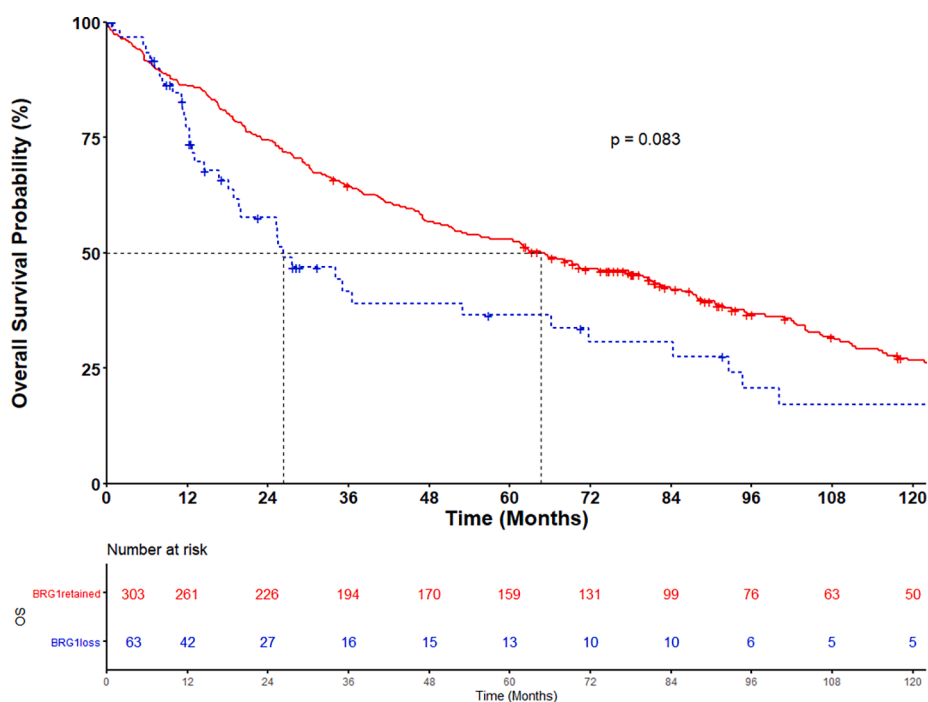


Fig. 2. Survival analysis for resected NSCLC according to BRG1 expression. Overall survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method, and differences between patient groups were evaluated by log-rank test. Number at risk and percentage of alive are indicated. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3. Results

3.1. Clinical and molecular characteristics of SD-NSCLC

The 63 patients with SD-NSCLC were mostly male ($n = 51$, 81%), heavy smokers (≥ 15 pack-years) ($n = 59$, 94%) and with COPD (chronic obstructive pulmonary disease) ($n = 43$, 68%). The major histological type was adenocarcinoma ($n = 54$, 86%), mostly solid predominant pattern ($n = 36$, 66%), with only one lepidic and one mucinous adenocarcinoma. TTF1 expression was found in 31 (49%) tumors. Of the 128 squamous-cell carcinomas tested, none had a BRG1-loss. Only 10 tumors (16%) had PD-L1 tumor cell expression (TPS) $\geq 50\%$. We often found aggressive histological criteria, i.e. vascular emboli ($n = 45$, 71%), pleural infiltration ($n = 41$, 65%) and lymph node invasion ($n = 30$, 47%) (13 pN1 and 17 pN2). Pathological stages for all resected tumors were 20 (32%), 19 (30%), 22 (35%) and 2 (3%) for stage I, II, III, and IV, respectively. Regarding the molecular characteristics, 54 of the 63 SD-NSCLC had interpretable results and 42 tumors (78%) had at least one *SMARCA4* mutation, composed of nonsense ($n = 28$), frameshift ($n = 12$), missense ($n = 6$), and splice-site ($n = 5$) mutations. No significant difference was found between patients with BRG1-loss tumors by *SMARCA4* mutation status, in term of clinical, molecular and immune infiltrate parameters, including overall survival (supplementary Table 2). Truncating mutations (i.e., frameshift, nonsense or splice mutations) were found in 40/42 (95%) tumors. Six tumors had concomitant several *SMARCA4* mutations (2 or 3). Co-mutations were identified in *TP53* (63%), *STK11* (27%), *KEAP1* (24%), *KRAS* (24%), *CDKN2A* (18%), *ARID1A* (8%), *PTEN* (3%), and *RB1* (2%) genes (Table 1). Concerning potential targetable driver genes, we never found *EGFR* mutation, 2 tumors had a non-V600 *BRAF* activating mutation, 5 tumors had *KRAS* G12C activating mutation, one had *HER2* amplification and one had *MET* amplification, both confirmed by FISH, with gene-to-centromere ratio > 2 .

We compared the SD-NSCLC ($n = 63$) and the non-SD NSCLC ($n = 303$) patients and found that SD-NSCLC patients were associated with heavier smoking history ($p = 0.02$), COPD ($p < 0.001$), non-

adenocarcinoma histological type ($p = 0.002$), a higher grade of adenocarcinoma ($p < 0.001$), more negative TTF1 expression ($p < 0.001$), lower PD-L1 tumor cell expression (TPS) ($p = 0.001$), less *KRAS* mutations ($p = 0.01$) and absence of *EGFR* mutation ($p = 0.003$). We found no significant difference according to tumor stage, *TP53* and *STK11* mutations (Table 2).

3.2. Characteristic of immune environment in SD-NSCLC

We compared the 63 resected SD-NSCLCs to the 28 non-SD NSCLCs (clinical and molecular characteristics detailed in Supplementary Table 1), and found that SD-NSCLC had significantly higher densities of FOXP3+ cells ($p = 0.002$) and CD66b + neutrophils ($p = 0.002$) compared to non-SD NSCLC (Fig. 1), contrasting with similar densities of CD8+ cells. We confirmed these *in situ* multiplex data by studying the TCGA LUAD cohort, using the Microenvironment Cell Populations-counter (MCP-counter) method [27]. Indeed, we found a higher occurrence of neutrophils and no significant difference for CD8+ T cells in *SMARCA4*-mutated tumors compared to non-SD-NSCLC, no data was available for FOXP3+ cells (Fig. 1). Among SD-NSCLC, there was no association between immune cell density and molecular status of studied genes, particularly for *TP53*, *KEAP1* and *STK11* genes.

3.3. Clinical outcome of resected SD-NSCLC

At the time of the study, 40 SD-NSCLC patients had died (63%). The median follow-up time was 18 months [95% CI: 0.5–0.8] for SD-NSCLC and 62 months [95% CI: 0.5–0.6] for non-SD NSCLC. Overall survival (OS) at 1 year was not significantly different between SD-NSCLC and non-SD NSCLC patients (77% [67–89] vs 86% [82–90]), but it dropped down and was significantly poorer in SD-NSCLC at 2 and 5 years (58% [46–73] vs 74% [70–80]; 37% [25–54] vs 53% [48–59], respectively) (Fig. 2). Univariate analyses of the 63 SD-NSCLCs showed that TTF1 expression ($p = 0.01$) and tumor stage ($p = 0.0002$) were related to OS. None of the immune cell densities were associated with prognosis. Cox-regression revealed that stage was the only independent prognostic

Table 3

Univariate and multivariate analyses of resected SMARCA4-deficient NSCLC patients. REF: reference group in Cox regression. SD-NSCLC: SMARCA4-deficient non-small cell lung cancer, COPD: chronic obstructive pulmonary disease, PD-L1 TPS: tumor proportion score corresponding to the percentage of PD-L1 positive tumor cells. Median-based stratifications were used to dichotomize immune cell densities into high and low densities.

Parameters	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Hazard ratio (95% CI)	P-value	Hazard ratio (95% CI)	P-value
SD-NSCLC (n = 63)				
Age at diagnosis	1 (1–1.1)	0.4		
Sex				
Female	REF			
Male	1 (0.4–2.2)	1.0		
Smoking status (Pack-y)				
≤15	REF			
>15	1.1 (0.3–3.5)	0.9		
COPD				
No	REF			
Yes	1.0 (0.5–1.9)	0.9		
Histological type				
Adenocarcinoma	REF			
Large-cell carcinoma	3.0 (1–8.7)	0.05		
Pleomorphic carcinoma	0.9 (0.3–3)	0.8		
TTF1 expression				
Negative	REF		REF	
Positive	0.4 (0.2–0.85)	0.01	0.5 (0.26–1.1)	0.09
Adenocarcinoma grade				
II	REF			
III	1.0 (0.5–2.0)	0.9		
PD-L1 (TPS, %)				
0	REF			
≥1% <50%	0.9 (0.5–2.0)	0.9		
≥ 50%	0.6 (0.2–1.6)	0.3		
Tumor stage				
I-II	REF		REF	
III-IV	4 (1.8–7.4)	0.0002	3.3 (1.6–6.7)	0.001
KRAS status				
WT	REF			
mutated	0.8 (0.4–1.7)	0.6		
TP53 status				
WT	REF			
mutated	0.8 (0.4–1.8)	0.6		
STK11 status				
WT	REF			
mutated	1.6 (0.7–3.3)	0.3		
KEAP1 status				
WT	REF			
mutated	2.2 (1–4.7)	0.05		
CD8+ cell density				
Low	REF			
High	1.4 (0.73–2.7)	0.3		
FOXP3+ cell density				
Low	REF			
High	1 (0.6–2)	0.9		
CD66b+ cell density				
Low	REF			
High	1.2 (0.7–2.4)	0.5		

factor ($p = 0.001$, HR: 3 [1.6–6.7]) (Table 3).

3.4. Overall survival of metastatic SD-NSCLC treated by anti-PD1

We investigated the efficacy of an anti-PD-1 blockade in SD-NSCLC by analyzing a single-center cohort of 77 patients with metastatic NSCLC of whom 7 were SD-NSCLC. SD-NSCLC and non-SD NSCLC patients did not differ for any clinical and pathological parameters, except the age at diagnosis that was significantly higher in non-SD NSCLC (supplementary Table 3). With a median follow-up of 5.2 months [95%CI: 0.2–1], we observed that SD-NSCLC patients had a shorter OS than patients with non-SD NSCLC, considering either from the date of diagnosis ($p = 0.01$, HR = 2.9 [95% CI: 1.2–7.1]) or from the date of first cure of immunotherapy ($p = 0.006$, HR = 3.2 [95% CI: 1.3–7.8]) (Fig. 3). Interestingly,

we found a trend for a shorter time interval between the date of diagnosis and the date of first anti-PD1 treatment for SD-NSCLC patients, compared to non-SD NSCLC patients, although this did not reach significance ($p = 0.3$, 9.5 vs 16 months, respectively).

4. Discussion

This study aimed to characterize a monocentric series of SD-NSCLC, in order to understand the aggressive behavior of this recent entity and to determine if it requires a dedicated therapy. Two approaches can be used to identify SD-NSCLC, either by assessing BRG1 protein expression by IHC or by identifying *SMARCA4* mutations by NGS-based strategy. The molecular approach should use a large panel with entire gene sequencing as no recurrent alterations have been described [9,12] and it is not a perfect surrogate marker of protein loss as NGS may fail to detect non-mutational mechanisms of BRG1 inactivation or a large deletion or variants involving poorly covered intronic regions [6,10,13]. On the contrary, it was reported that 16–20% of truncating *SMARCA4* mutated tumors exhibited intact BRG1 expression [9,12]. Whether loss of protein expression or *SMARCA4* mutations is the most accurate prognostic predictor remains to be determined. Schoenfeld AJ *et al* showed that tumors with truncating mutations, that are enriched in BRG1-loss tumors, were associated with the poorest prognosis compared to the other *SMARCA4* mutations [12]. In our study, we defined SD-NSCLC as tumors with complete loss of BRG1 expression, regardless of the *SMARCA4* mutations, which means that some of the non-SD-NSCLCs included in our immune environment analysis may contain some SD-NSCLCs defined by *SMARCA4* mutations only. We identified 64 SD-NSCLC, in which 78% had *SMARCA4* mutation, mostly truncating. This finding was in accordance with Agaimy *et al* where they found 75% of BRG1-loss lung carcinomas with *SMARCA4* mutations [10]. Histological and clinical data, including survival, could not distinguish between patients with BRG1-loss harboring *SMARCA4*-mutations ($n = 42$) or not ($n = 12$) (supplementary Table 2).

We showed that SD-NSCLCs were more common in smokers and COPD patients, and occurred in all clinical stages, including stage I, which is consistent with previous studies [6,9,12,15]. Tumors were mainly high-grade adenocarcinomas (37/54, 68%) and half were TTF1-negative (31/63, 49%) but no squamous-cell carcinoma was found (0/128). SD-NSCLCs have lower PD-L1 TPS and we never found *EGFR* mutations. In accordance with literature, we found increased mutations in *TP53* (63%), *STK11* (27%), *KEAP1* (24%) and *CDKN2A* (18%) genes, compared to non-SD NSCLC [15,28]. Some targetable alterations could be seen, such as *KRAS* G12C mutation, *MET* or *HER2* amplification, which may benefit from targeted therapy [29].

We confirmed that SD-NSCLC had poorer overall survival compared to non-SD NSCLC, unrelated to the pathological stage. The cause of this adverse prognosis is not well understood. BRG1-loss is frequently found in poorly-differentiated carcinomas (solid adenocarcinoma, pleomorphic carcinoma, with TTF1-negative phenotype), which are known to be poor prognostic factors in non-SD NSCLC [30]. Indeed, several studies have reported that the loss of SWI/SNF complex subunits promotes the dedifferentiation of carcinomas and even alters the cellular morphology with rhabdoid and sarcomatoid features [31,32]. The frequent coaltered *KEAP1* and *STK11* genes could also be responsible in part of the poor prognosis, as previously described in non-SD-NSCLC [33,34]. Moreover, these alterations have been generally associated with an immunosuppressive tumor environment [34], as we found in our study, with a high density of FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) and neutrophils, meanwhile CD8+ T cell density was similar to non-SD NSCLC. We confirmed this finding with MCP-counter approach from TCGA LUAD.

CD8+ T cells are typically associated with favorable prognosis [35] but surprisingly, we did not find any association between CD8+ T cells densities and patient's outcome in SD-NSCLC. Thus, we hypothesized that CD8+ T-cell function might be impaired by the immunosuppressive environment, and particularly Tregs. Indeed, intratumor Tregs have

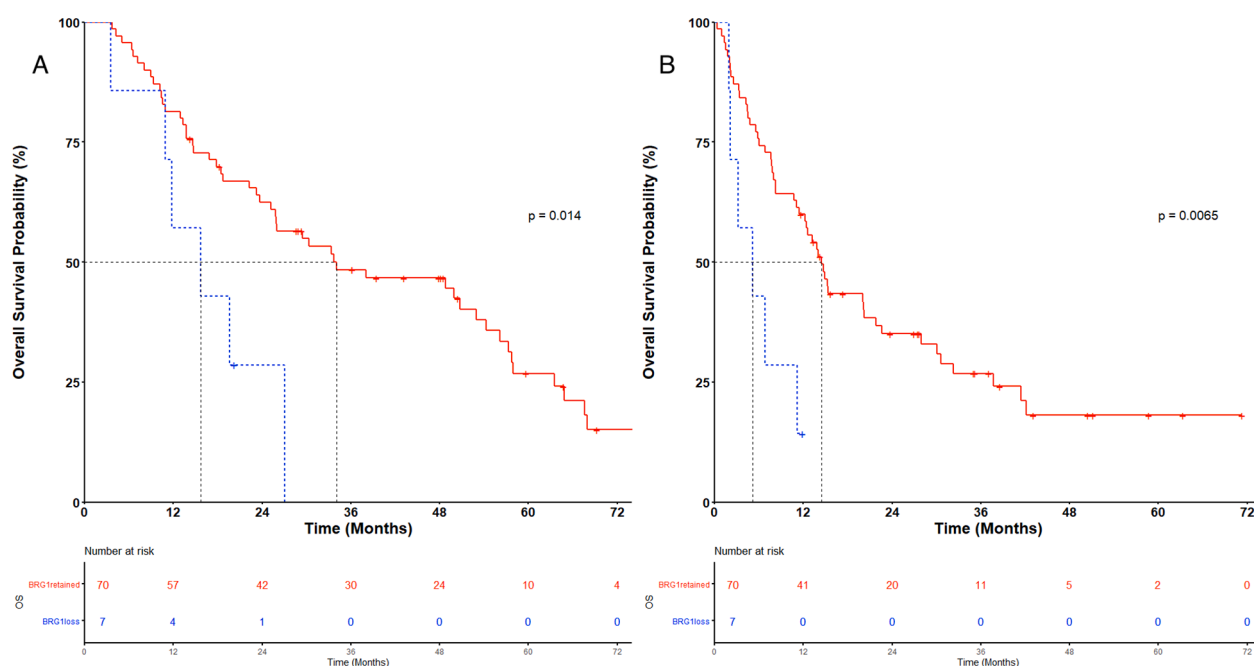


Fig. 3. Prognostic value (OS) of anti-PD1-treated patients with SD-NSCLC defined from the date of diagnosis (A) and from the start of PD-1 inhibitors (B). 77 metastatic-stage NSCLC patients received nivolumab or pembrolizumab, in second line or more, excluding squamous-cell and large-cell neuro-endocrine carcinomas, 7 of whom had SD-NSCLC. OS curves were estimated by using the Kaplan-Meier method, and differences between patient groups were evaluated by log-rank test. HR and p-value calculated with Cox-regression are indicated in the table beside. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

been reported to be positively correlated with poor survival in NSCLC [36–39] and in the peripheral blood, Treg cells have been reported to be significantly higher in metastatic stages than in non-metastatic stages of NSCLC patients [40,41]. Additionally, Tregs seem deleterious in lung cancer receiving ICIs treatment [42], and it was proposed that PD-1+ Tregs could be activated by PD-1 blockade increasing their immunosuppressive function [43]. Given the role of Tregs in blocking the effector function of CD8+ T-cells and as a likely barrier to the efficacy of ICIs, they have become a strong target for therapy. Indeed, ICI combined with Treg-targeting therapies could overpass immunosuppressive functions and become a new standard of care, as shown in experimental NSCLC models [44].

The benefit of ICI in SD-NSCLC patients was reported in several studies with conflicting data. We found a shorter survival in our cohort, whereas others reported successful treatment [18], or reported no significant difference in PFS and OS [12]. Two studies reported a negative effect of *SMARCA4* mutations but only when tumors harbored a mutation in the *KRAS* gene [15,16]. Altogether, *SMARCA4*-deficiency may represent a prognostic and/or a predictive marker but the limited number of SD-NSCLC patients in our study does not allow us to conclude. Additional prospective studies are required to validate whether the immunosuppressive environment, particularly related to Tregs, is predictive of ICI efficacy in SD-NSCLC.

In total, there is increasing clinical interest in identifying SD-NSCLC, as it may influence treatment design and prognosis. As BRG1-loss is particularly found in poorly-differentiated adenocarcinomas with TTF1-negative expression and usually not in squamous-cell carcinomas, we propose to perform BRG1 staining in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) with both TTF1 and p40/p63 negative expression.

5. Conclusion

In this retrospective and monocentric study, we showed that SD-NSCLC, defined by BRG1-loss, is associated with poor outcome independent from stages and anti-PD1 inhibitors treatment. These tumors are characterized by increased densities of Tregs and neutrophils and

innovative immunotherapies targeting this immunosuppressive milieu may be promising. To identify these patients and improve their management, we recommend the integration of BRG1 immunohistochemistry into the pathology workflow for NSCLC with negative p40 and TTF1 expression.

Funding information

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Paris, Sorbonne University, Site de Recherche Intégrée sur le Cancer SIRIC CAnCer Research for PErsonalized Medicine (CARPEM), LabEx Immuno-oncology, the Institut National du Cancer (2011-PLBIO-06-INSERM 6-1). This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CRedit authorship contribution statement

Yoa Velut: Conceptualization, Methodology, Data curation, Formal analysis, Investigation, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Elise Decroix:** Conceptualization, Methodology, Data curation, Formal analysis, Investigation, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Hélène Blons:** Conceptualization, Methodology, Data curation, Formal analysis, Investigation, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Marco Alifano:** Resources, Investigation, Writing – review & editing. **Karen Leroy:** Resources, Investigation, Writing – review & editing. **Florent Petitprez:** Resources, Investigation, Writing – review & editing. **Aurélié Boni:** Resources, Investigation, Writing – review & editing. **Simon Garinet:** Resources, Investigation, Writing – review & editing. **Jérôme Biton:** Resources, Investigation, Writing – review & editing. **Isabelle Cremer:** Resources, Investigation, Writing – review & editing. **Marie Wislez:** Resources, Investigation, Writing – review & editing. **Pascaline Boudou-Rouquette:** Resources, Investigation, Writing – review & editing. **Jennifer Arrondeau:** Resources, Investigation, Writing – review & editing. **François Goldwasser:** Resources, Investigation, Writing – review &

editing. **Ludovic Fournel**: Resources, Investigation, Writing – review & editing. **Diane Damotte**: Conceptualization, Funding acquisition, Data curation, Project administration, Supervision, Visualization, Writing – original draft. **Audrey Mansuet-Lupo**: Conceptualization, Funding acquisition, Data curation, Project administration, Supervision, Visualization, Writing – original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank the following clinicians and surgeons who provided follow-up information: Drs Jacky Crequit, Christos Chouaid, Marie De Torcy, Sébastien Morel, Stéphane Jouveshomme, Jean Tredaniel, Edgar Petit, Pierre Magdeleinat, Jean-François Régnard, Kais Aldabbagh, Sandrine Loutski. We also thank the following laboratory technicians: Anne Audebourg, Isabelle Hermay, Yvan Lafuente, Léa Le Lay, Nathalie Mathiot, Alice Nardetto, Phuong Lan Truong. We thank the “Centre de Recherche des Cordeliers” core facilities for the technical and methodological help, assistance and support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2022.05.001>.

References

- [1] P. Mittal, C.W.M. Roberts, The SWI/SNF complex in cancer – biology, biomarkers and therapy, *Nat Rev Clin Oncol* 17 (2020) 435–448, <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0357-3>.
- [2] F. Le Loarer, S. Watson, G. Pierron, V.T. de Montpreville, S. Ballet, N. Firmin, A. Auguste, D. Pissaloux, S. Boyault, S. Paindavoine, P.J. Dechelotte, B. Besse, J. M. Vignaud, M. Brevet, E. Fadel, W. Richer, I. Treilleux, J. Masliah-Planchon, M. Devouassoux-Shisheboran, G. Zalczman, Y. Allory, F. Bourdeaut, F. Thivolet-Bejui, D. Ranchere-Vince, N. Girard, S. Lantuejoul, F. Galateau-Sallé, J.M. Coindre, A. Leary, O. Delattre, J.Y. Blay, F. Tirede, SMARCA4 inactivation defines a group of undifferentiated thoracic malignancies transcriptionally related to BAF-deficient sarcomas, *Nat Genet* 47 (10) (2015) 1200–1205.
- [3] J.L. Sauter, R.P. Graham, B.T. Larsen, S.M. Jenkins, A.C. Roden, J.M. Boland, SMARCA4-deficient thoracic sarcoma: a distinctive clinicopathological entity with undifferentiated rhabdoid morphology and aggressive behavior, *Mod Pathol* 30 (10) (2017) 1422–1432.
- [4] A. Yoshida, E. Kobayashi, T. Kubo, M. Kodaira, T. Motoi, N. Motoi, K. Yonemori, Y. Ohe, S.-I. Watanabe, A. Kawai, T. Kohno, H. Kishimoto, H. Ichikawa, N. Hiraoka, Clinicopathological and molecular characterization of SMARCA4-deficient thoracic sarcomas with comparison to potentially related entities, *Mod Pathol* 30 (6) (2017) 797–809.
- [5] World Health Organization (WHO) C of TE. Thoracic Tumours. vol. 5. 5th Edition. 2021.
- [6] N. Rekhman, J. Montecalvo, J.C. Chang, D. Alex, R.N. Ptashkin, N.I. Ai, J. L. Sauter, B. Kezlarian, A. Jungbluth, P. Desmeules, A. Beras, J.A. Bishop, A. J. Plodkowski, M.M. Gounder, A.J. Schoenfeld, A. Namakydoust, B.T. Li, C. M. Rudin, G.J. Riely, D.R. Jones, M. Ladanyi, W.D. Travis, SMARCA4-Deficient Thoracic Sarcomatoid Tumors Represent Primarily Smoking-Related Undifferentiated Carcinomas Rather Than Primary Thoracic Sarcomas, *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 15 (2) (2020) 231–247.
- [7] D. Matsubara, Y. Kishaba, S. Ishikawa, T. Sakatani, S. Oguni, T. Tamura, H. Hoshino, Y. Sugiyama, S. Endo, Y. Murakami, H. Aburatani, M. Fukayama, T. Niki, Lung cancer with loss of BRG1/BRM, shows epithelial mesenchymal transition phenotype and distinct histologic and genetic features, *Cancer Sci* 104 (2) (2013) 266–273.
- [8] E. Herpel, R.J. Rieker, H. Dienemann, T. Muley, M. Meister, A. Hartmann, A. Warth, A. Agaimy, SMARCA4 and SMARCA2 deficiency in non-small cell lung cancer: immunohistochemical survey of 316 consecutive specimens, *Ann Diagn Pathol* 26 (2017) 47–51.
- [9] I. Dagogo-Jack, A.B. Schrock, M. Kem, N. Jessop, J. Lee, S.M. Ali, J.S. Ross, J. K. Lennerz, A.T. Shaw, M. Mino-Kenudson, Clinicopathologic characteristics of BRG1-deficient NSCLC, *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 15 (5) (2020) 766–776.
- [10] A. Agaimy, F. Fuchs, E.A. Moskalev, H. Sirbu, A. Hartmann, F. Haller, SMARCA4-deficient pulmonary adenocarcinoma: clinicopathological, immunohistochemical, and molecular characteristics of a novel aggressive neoplasm with a consistent TTF1neg/CK7pos/HepPar1pos immunophenotype, *Virchows Arch Int J Pathol* 471 (2017) 599–609, <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2148-5>.
- [11] T. Yoshimoto, D. Matsubara, T. Nakano, T. Tamura, S. Endo, Y. Sugiyama, T. Niki, Frequent loss of the expression of multiple subunits of the SWI/SNF complex in large cell carcinoma and pleomorphic carcinoma of the lung, *Pathol Int* 65 (11) (2015) 595–602.
- [12] A.J. Schoenfeld, C. Bandlamudi, J.A. Lavery, J. Montecalvo, A. Namakydoust, H. Rizvi, J. Egger, C.P. Concepcion, S. Paul, M.E. Arcila, Y. Daneshbod, J. Chang, J. L. Sauter, A. Beras, M. Ladanyi, T. Jacks, C.M. Rudin, B.S. Taylor, M.T. A. Donoghue, G. Heller, M.D. Hellmann, N. Rekhman, G.J. Riely, The genomic landscape of SMARCA4 alterations and associations with outcomes in patients with lung cancer, *Lung Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 26 (21) (2020) 5701–5708.
- [13] L.H. Araujo, C. Timmers, E.H. Bell, K. Shilo, P.E. Lammers, W. Zhao, T. G. Natarajan, C.J. Miller, J. Zhang, A.S. Yilmaz, T. Liu, K. Coombes, J. Amann, D. P. Carbone, Genomic characterization of non-small-cell lung cancer in african americans by targeted massively parallel sequencing, *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 33 (17) (2015) 1966–1973.
- [14] D.N. Reisman, J. Sciarrotta, W. Wang, W.K. Funkhouser, B.E. Weissman, Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis, *Cancer Res* 63 (2003) 560–566.
- [15] J.V. Alessi, B. Ricciuti, L.F. Spurr, H. Gupta, Y.Y. Li, C. Glass, M. Nishino, A. D. Cherniack, J. Lindsay, B. Sharma, K.D. Felt, S.J. Rodig, M.L. Cheng, L.M. Sholl, M.M. Awad, SMARCA4 and other SWI/SNF/sucrose nonfermentable family genomic alterations in NSCLC: clinicopathologic characteristics and outcomes to immune checkpoint inhibition, *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 16 (7) (2021) 1176–1187.
- [16] L. Liu, T. Ahmed, W.J. Petty, S. Grant, J. Ruiz, T.W. Lycan, U. Topaloglu, P.-C. Chou, L.D. Miller, G.A. Hawkins, M.A. Alexander-Miller, S.S. O'Neill, B. L. Powell, R.B. D'Agostino, R.F. Munden, B. Pasche, W. Zhang, SMARCA4 mutations in KRAS-mutant lung adenocarcinoma: a multi-cohort analysis, *Mol Oncol* 15 (2) (2021) 462–472.
- [17] T.M. Fernando, R. Piskol, R. Bainer, E.S. Sokol, S.E. Trabucco, Q. Zhang, H. Trinh, S. Maund, M. Kschonsak, S. Chaudhuri, Z. Modrusan, T. Januario, R.L. Yauch, Functional characterization of SMARCA4 variants identified by targeted exome-sequencing of 131,668 cancer patients, *Nat Commun* 11 (1) (2020), <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19402-8>.
- [18] T. Naito, S. Umemura, H. Nakamura, Y. Zenke, H. Udagawa, K. Kiritu, S. Matsumoto, K. Yoh, S. Niho, N. Motoi, K. Aokage, M. Tsuboi, G. Ishii, K. Goto, Successful treatment with nivolumab for SMARCA4-deficient non-small cell lung carcinoma with a high tumor mutation burden: a case report, *Thorac Cancer* 10 (5) (2019) 1285–1288.
- [19] N. Anzić, F. Krasniqi, A.-L. Eberhardt, A. Tzankov, J.D. Haslbauer, Ipilimumab and pembrolizumab mixed response in a 41-year-old patient with SMARCA4-deficient thoracic sarcoma: an interdisciplinary case study, *Case Rep Oncol* 14 (2021) 706–715, <https://doi.org/10.1159/000515416>.
- [20] F. Skoulidis, L.A. Byers, L. Diao, V.A. Papadimitrakopoulou, P. Tong, J. Izzo, C. Behrens, H. Kadara, E.R. Parra, J.R. Canales, J. Zhang, U. Giri, J. Gudikote, M. A. Cortez, C. Yang, Y. Fan, M. Peyton, L. Girard, K.R. Coombes, C. Toniatti, T. P. Heffernan, M. Choi, G.M. Frampton, V. Miller, J.N. Weinstein, R.S. Herbst, K.-K. Wong, J. Zhang, P. Sharma, G.B. Mills, W.K. Hong, J.D. Minna, J.P. Allison, A. Futreal, J. Wang, L.I. Wistuba, J.V. Heymach, Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities, *Cancer Discov* 5 (8) (2015) 860–877.
- [21] A. Mansuet-Lupo, M. Alifano, N. Pécuchet, J. Biton, E. Becht, J. Goc, C. Germain, H. Ouakrim, J.-F. Régnard, I. Cremer, P. Laurent-Puig, M.-C. Dieu-Nosjean, H. Blons, D. Damotte, Intratumoral immune cell densities are associated with lung adenocarcinoma gene alterations, *Am J Respir Crit Care Med* 194 (11) (2016) 1403–1412.
- [22] A. Mansuet-Lupo, A. Bobbio, H. Blons, E. Becht, H. Ouakrim, A. Delidol, M.-C. Charpentier, S. Bain, B. Marmey, P. Bonjour, J. Biton, I. Cremer, M.-C. Dieu-Nosjean, C. Sautès-Fridman, J.-F. Régnard, P. Laurent-Puig, M. Alifano, D. Damotte, The new histologic classification of lung primary adenocarcinoma subtypes is a reliable prognostic marker and identifies tumors with different mutation status: the experience of a French cohort, *Chest* 146 (3) (2014) 633–643.
- [23] A. Mansuet-Lupo, M. Barritault, M. Alifano, A. Janet-Vendroux, M. Zarmaev, J. Biton, Y. Velut, C. Le Hay, I. Cremer, J.-F. Régnard, L. Fournel, B. Rance, M. Wislez, P. Laurent-Puig, R. Herbst, D. Damotte, H. Blons, Proposal for a combined histomolecular algorithm to distinguish multiple primary adenocarcinomas from intrapulmonary metastasis in patients with multiple lung tumors, *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 14 (5) (2019) 844–856.
- [24] A. Yoshizawa, N. Motoi, G.J. Riely, C.S. Sima, W.L. Gerald, M.G. Kris, B.J. Park, V. W. Rusch, W.D. Travis, Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases, *Mod Pathol* 24 (5) (2011) 653–664.
- [25] A. Legras, M. Barritault, A. Tallet, E. Fabre, A. Guyard, B. Rance, W. Digan, N. Pecuchet, E. Giroux-Leprieur, C. Julie, S. Jouveshomme, V. Duchatelle, V. Giraudet, L. Gibault, A. Cazier, J. Pastre, F. Le Pimpec-Barthes, P. Laurent-Puig, H. Blons, Validity of targeted next-generation sequencing in routine care for identifying clinically relevant molecular profiles in non-small-cell lung cancer: results of a 2-year experience on 1343 samples, *J Mol Diagn JMD* 20 (4) (2018) 550–564.

- [26] G. Boulle, Y. Velut, A. Mansuet-Lupo, L. Gibault, H. Blons, L. Fournel, A. Boni, I. Cremer, M. Wislez, V. Duchatelle, J. Trédaniel, S.A. Hammond, R. Herbst, M. Alifano, P. Giraud, D. Damotte, Chemoradiotherapy efficacy is predicted by intra-tumour CD8⁺/FoxP3⁺ double positive T cell density in locally advanced N2 non-small-cell lung carcinoma, *Eur J Cancer Oxf Engl* 135 (2020) 221–229.
- [27] E. Becht, N.A. Giraldo, L. Lacroix, B. Buttard, N. Elarouci, F. Petitprez, J. Selves, P. Laurent-Puig, C. Sautès-Fridman, W.H. Fridman, A. de Reyniès, Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression, *Genome Biol* 17 (1) (2016), <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1070-5>.
- [28] The Cancer Genome Atlas Research Network, Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma, *Nature* 511 (2014) 543–550, <https://doi.org/10.1038/nature13385>.
- [29] N.H. Hanna, A.G. Robinson, S. Temin, S. Baker, J.R. Brahmer, P.M. Ellis, L. E. Gaspar, R.Y. Haddad, P.J. Hesketh, D. Jain, I. Jaiyesimi, D.H. Johnson, N. B. Leigh, P.R. Moffitt, T. Phillips, G.J. Riely, R. Rosell, J.H. Schiller, B.J. Schneider, N. Singh, D.R. Spigel, J. Tashbar, G. Masters, Therapy for stage IV non-small-cell lung cancer with driver alterations: ASCO and OH (CCO) joint guideline update, *J Clin Oncol* 39 (9) (2021) 1040–1091.
- [30] J.H. Kim, H.S. Kim, B.J. Kim, B. Han, D.R. Choi, J.H. Kwon, Prognostic impact of TTF-1 expression in non-squamous non-small-cell lung cancer: a meta-analysis, *J Cancer* 9 (2018) 4279–4286, <https://doi.org/10.7150/jca.26830>.
- [31] A.N. Karnezis, L.N. Hoang, M. Coatham, S. Ravn, N. Almadani, B. Tessier-Cloutier, J. Irving, B.o. Meng, X. Li, C. Chow, J. McAlpine, K.-T. Kuo, T.-L. Mao, B. Djordjevic, R.A. Soslow, D.G. Huntsman, C. Blake Gilks, M. Köbel, C.-H. Lee, Loss of switch/sucrose non-fermenting complex protein expression is associated with dedifferentiation in endometrial carcinomas, *Mod Pathol* 29 (3) (2016) 302–314.
- [32] A. Agaimy, L. Cheng, L. Egevad, B. Feyerabend, O. Hes, B. Keck, S. Pizzolitto, S. Sioletic, B. Wullich, A. Hartmann, Rhabdoid and undifferentiated phenotype in renal cell carcinoma: analysis of 32 cases indicating a distinctive common pathway of dedifferentiation frequently associated With SWI/SNF complex deficiency, *Am J Surg Pathol* 41 (2) (2017) 253–262.
- [33] S. Papillon-Cavanagh, P. Doshi, R. Dobrin, J. Szustakowski, A.M. Walsh, STK11 and KEAP1 mutations as prognostic biomarkers in an observational real-world lung adenocarcinoma cohort, *ESMO Open* 5 (2) (2020) e000706.
- [34] A. Di Federico, A. De Giglio, C. Parisi, F. Gelsomino, STK11/LKB1 and KEAP1 mutations in non-small cell lung cancer: Prognostic rather than predictive? *Eur J Cancer* 157 (2021) 108–113, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.08.011>.
- [35] J. Goc, C. Germain, T.K.D. Vo-Bourgais, A. Lupo, C. Klein, S. Knockaert, L. de Chaisemartin, H. Ouakrim, E. Becht, M. Alifano, P. Validire, R. Remark, S. A. Hammond, I. Cremer, D. Damotte, W.-H. Fridman, C. Sautès-Fridman, M.-C. Diou-Nosjean, Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8⁺ T cells, *Cancer Res* 74 (3) (2014) 705–715.
- [36] R.P. Petersen, M.J. Campa, J. Sperlizza, D. Conlon, M.-B. Joshi, D.H. Harpole, E. F. Patz, Tumor infiltrating Foxp3⁺ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients, *Cancer* 107 (12) (2006) 2866–2872.
- [37] D.S. O'Callaghan, E. Rexhepaj, K. Gately, L. Coate, D. Delaney, D.M. O'Donnell, E. Kay, F. O'Connell, W.M. Gallagher, K.J. O'Byrne, Tumour islet Foxp3⁺ T-cell infiltration predicts poor outcome in nonsmall cell lung cancer, *Eur Respir J* 46 (6) (2015) 1762–1772.
- [38] Zhao S, Jiang T, Zhang L, Yang H, Liu X, Jia Y, et al. Clinicopathological and prognostic significance of regulatory T cells in patients with non-small cell lung cancer: A systematic review with meta-analysis. *Oncotarget* 2016;7:36065–73. doi: 10.18632/oncotarget.9130.
- [39] K. Shimizu, M. Nakata, Y. Hirami, T. Yukawa, A. Maeda, K. Tanemoto, Tumor-infiltrating Foxp3⁺ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer, *J Thorac Oncol* 5 (2010) 585–590, <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181d60fd7>.
- [40] N. Erfani, S.M. Mehrabadi, M.A. Ghayumi, M.R. Haghshenas, Z. Mojtahedi, A. Ghaderi, D. Amani, Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), *Lung Cancer* 77 (2) (2012) 306–311.
- [41] X. Hu, Y. Gu, S. Zhao, S. Hua, Y. Jiang, Elevated circulating CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ regulatory T cells in patients with nonsmall cell lung cancer, *Cancer Biother Radiopharm* 34 (2019) 325–333, <https://doi.org/10.1089/cbr.2018.2672>.
- [42] D.R. Principe, L. Chiec, N.A. Mohindra, H.G. Munshi, Regulatory T-cells as an emerging barrier to immune checkpoint inhibition in lung cancer, *Front Oncol* 11 (2021), 684098, <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.684098>.
- [43] S. Kumagai, Y. Togashi, T. Kamada, E. Sugiyama, H. Nishinakamura, Y. Takeuchi, K. Vitaly, K. Itahashi, Y. Maeda, S. Matsui, T. Shibahara, Y. Yamashita, T. Irie, A. Tsuge, S. Fukuoka, A. Kawazoe, H. Udagawa, K. Kiritani, K. Aokage, G. Ishii, T. Kuwata, K. Nakama, M. Kawazu, T. Ueno, N. Yamazaki, K. Goto, M. Tsuboi, H. Mano, T. Doi, K. Shitara, H. Nishikawa, The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies, *Nat Immunol* 21 (11) (2020) 1346–1358.
- [44] E. Redin, I. Garmendia, T. Lozano, D. Serrano, Y. Senent, M. Redrado, M. Villalba, C.E. De Andrea, F. Exposito, D. Ajona, S. Ortiz-Espinosa, A. Ramirez, C. Bertolo, C. Sainz, J. Garcia-Pedrero, R. Pio, J. Lasarte, J. Agorreta, L.M. Montuenga, A. Calvo, SRC family kinase (SFK) inhibitor dasatinib improves the antitumor activity of anti-PD-1 in NSCLC models by inhibiting Treg cell conversion and proliferation, *J Immunother Cancer* 9 (3) (2021) e001496.

Résumé :

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer. Bien qu'ayant bénéficié des nombreuses avancées médicales dans la prévention, le diagnostic et le traitement des cancers, la survie des patients souffrants de cancer du poumon reste médiocre avec une survie à 5 ans d'environ 20%, tous stades confondus. L'influence du système immunitaire sur le contrôle et la progression tumorale est maintenant clairement établie. De nombreuses études ont démontré que la composition en cellules immunitaires du microenvironnement tumoral a un fort impact pronostique et prédictif de la réponse aux traitements. Dans ce contexte, l'immunothérapie ciblant notamment l'axe PD-1/PD-L1 et CTLA4 a connu une croissance rapide, mais seulement 20% de patients vont bénéficier de ce traitement dans le cancer pulmonaire. Au-delà de la densité des cellules immunitaires, l'influence mutuelle des cellules immunitaires impacte probablement leurs fonctions anti-tumorales et cet élément doit être pris en compte dans l'analyse des tumeurs. Ceci expliquerait les discordances observées entre la densité d'un sous-type cellulaire, la survie attendue et la survie réelle. Les travaux de l'équipe ont montré la présence de proximités cellulaires entre différentes cellules immunitaires du stroma tumoral. Dans ce travail, nous avons déterminé l'impact de ces contacts et les mécanismes cellulaires impliqués. Nous avons quantifié, par une approche d'immunohistochimie multiplexe, les interactions spatiales entre les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes T FoxP3+ et les neutrophiles CD66b+ dans le microenvironnement tumoral de 3 cohortes de patients souffrant de cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC), traités ou non par immunothérapie, radiothérapie et leurs impacts pronostiques et prédictifs de la réponse aux traitements. Nous avons complété notre étude par des analyses en cytométrie de flux, d'expression de gènes et de protéomique et transcriptomique spatiale. Un Index d'interaction normalisé (I_{ND}) a été calculé pour normaliser la densité des interactions entre 2 types cellulaires par rapport à leurs densités respectives. Nous avons montré l'impact pronostique de I_{ND} , en particulier I_{ND} CD66b-FoxP3, sur la survie globale. Par cytométrie en flux nous avons observé une diminution de l'expression des checkpoints immunitaires CTLA-4, TIM-3 et LAG-3 et une augmentation de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8+, mais pas sur les lymphocytes T CD4+ lorsque I_{ND} est élevé. Une analyse d'expression de gènes dans le microenvironnement tumoral a montré que I_{ND} était lié à un environnement tumoral immunosuppresseur, avec une diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'activation et la différenciation des cellules immunitaires, et une surexpression de gènes du versant épithélial de la transition épithélio-mésenchymateuse. Nous avons confirmé ces résultats par Digital Spatial Profiling en analysant l'expression de protéines de l'immunité à l'échelle paucicellulaire. Nous avons observé une augmentation de l'expression des protéines de costimulation et d'activation sur les lymphocytes T CD8+ dans les régions d'interaction, comparé aux régions de CD8 « libres ». L'utilisation d'une base de données en ligne de transcriptomique spatiale à l'échelle cellulaire (CosMx) a permis de confirmer la régulation des fonctions immunitaires dans les interactions cellulaires comparé aux cellules « libres » d'interaction. Ces interactions cellulaires influencent la réponse aux thérapies conventionnelles, notamment I_{ND} CD66b-FoxP3, mais ne paraît pas modifier l'efficacité des immunothérapies. L'ensemble de ces résultats suggère que les interactions entre les neutrophiles et les lymphocytes T FoxP3+ favorisent l'activation des lymphocytes T CD8+ et une réponse anti-tumorale efficace, soulignant la complexité de l'immunité anti-tumorale, dont son organisation et les interactions cellulaires présents.

Mots clés : CD8+, FoxP3+, neutrophile, cancer, interaction, immunothérapie

Characterization of clusters of CD8⁺ T lymphocytes, FoxP3⁺ regulatory T lymphocytes and CD66b⁺ neutrophils in lung cancer and their impact on immunotherapy

Abstract :

Lung cancer is the leading cause of cancer death. Although having benefited from numerous medical advances in the prevention, diagnosis and treatment of cancers, survival of patients suffering from lung cancer remains poor with a 5-year survival of approximately 20%, all stages combined. Nowadays, the immune system influence on tumor control and progression is clearly established. Numerous studies have shown that the immune cell composition of the tumor microenvironment has a strong prognostic and predictive impact on the anti-tumor treatment response. In this context, immunotherapy targeting the PD-1/PD-L1 and CTLA4 axis has experienced rapid growth, but only 20% of patients will benefit from this treatment in lung cancer. Beyond the density of immune cells, the mutual influence of immune cells probably affects their anti-tumor functions, thus this factor must be taken into account in the analysis of tumors. This would explain the discrepancies observed between the density of a cell subtype, the expected survival and the observed survival. The team's work has shown the presence of cellular proximities between different immune cells in the tumor stroma. In this work, we determined the impact of these contacts and the cellular mechanisms involved. We quantified, by multiplex immunohistochemistry, the spatial interactions between CD8⁺ T lymphocytes, FoxP3⁺ T lymphocytes and CD66b⁺ neutrophils in the tumor microenvironment of 3 cohorts of patients suffering from non-small cell lung cancer (NSCLC), treated or not by immunotherapy, radiotherapy and their prognostic and predictive impacts of response to treatment. We completed our study using flow cytometry, gene expression and spatial proteomic and transcriptomic. A Normalized Interaction Index (I_{ND}) was calculated to normalize the density of interactions between 2 cell types according to their respective densities. We have shown the prognostic impact of I_{ND} , particularly I_{ND} CD66b-FoxP3, on overall survival. By flow cytometry, we observed a decrease in the expression of immune checkpoints CTLA-4, TIM-3 and LAG-3 and an increase in the expression of PD-1 on CD8⁺ T lymphocytes, but not on CD4⁺ T lymphocytes when I_{ND} is high. An analysis of gene expression in the tumor microenvironment showed that I_{ND} was related to an immunosuppressive tumor environment, with decreased expression of genes involved in immune cell activation and differentiation, and overexpression of genes from the epithelial side of the epithelial-mesenchymal transition. We confirmed these results by Digital Spatial Profiling by analyzing the expression of immunity proteins at the paucicellular level. We observed an increase in the expression of co-stimulatory and activation proteins on CD8⁺ T cells in interaction regions, compared to the “free” CD8-enriched regions. The use of an online database of spatial transcriptomic at cellular scale (CosMx) made it possible to confirm the regulation of immune functions in cellular interactions compared to cells “free” of interaction. These cellular interactions influence the response to conventional therapies, notably I_{ND} CD66b-FoxP3, but do not seem to modify the efficacy of immunotherapy. Taken together, these results suggest that interactions between neutrophils and FoxP3⁺ T cells promote CD8⁺ T cell activation and an effective anti-tumor response, highlighting the complexity of anti-tumor immunity, its organization and the presence of cellular interactions.

Keywords : CD8⁺, FoxP3⁺, neutrophil, cancer, interaction, immunotherapy